



ESCUELA POLITÉCNICA DE INGENIERÍA DE GIJÓN

GRADO EN INGENIERÍA QUÍMICA INDUSTRIAL

ÁREA DE QUÍMICA FÍSICA Y ANALÍTICA

**DESARROLLO DE UN DISPOSITIVO ELECTROQUÍMICO PARA LA
DETERMINACIÓN DE CONTAMINANTES EN AGUAS**

**D.ª DEL RÍO ALEGRE, Ainhoa María
TUTORAS: COSTA RAMA, Estefanía
CERRATO ÁLVAREZ, María**

FECHA: Julio de 2024

Agradecimientos

Me gustaría agradecer a mis tutoras Estefanía y María por su apoyo, orientación y por motivarme a lo largo de la realización de este Trabajo Fin de Grado.

También quiero agradecer a mi familia por su constante apoyo y comprensión durante la elaboración de este trabajo. A mis padres por apoyarme y creer siempre en mí, y en especial a mis abuelas por enseñarme el valor de la dedicación y el esfuerzo. A mis amigas, por haberme acompañado en este camino tan bonito.

Índice

1.	Introducción	11
1.1-	CONTAMINANTES EN AGUAS	11
1.2-	BIOSENSORES	18
1.3-	MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETECCIÓN DEL GLIFOSATO	36
2.	Objetivos	41
3.	Materiales y métodos	43
3.1-	MATERIALES Y REACTIVOS	43
3.2-	INSTRUMENTOS Y APARATOS	46
3.3-	PROCEDIMIENTOS	50
4.	Resultados	54
4.1-	COMPORTAMIENTO ELECTROQUÍMICO DEL GLIFOSATO SOBRE ELECTRODOS DE ORO	54
4.2-	CALIBRADO DEL GLIFOSATO EN ELECTRODOS DE ORO	55
4.3-	COMPORTAMIENTO ELECTROQUÍMICO DEL TMB EN ELECTRODOS DE CARBONO	58
4.4-	ESTUDIO DE LA CONCENTRACIÓN DE LA ENZIMA.....	60
4.5-	EVALUACIÓN DE LA INHIBICIÓN DEL GLIFOSATO	62
4.6 -	ESTUDIO DEL TIEMPO DE REACCIÓN ENZIMÁTICA.....	65
4.7-	EVALUACIÓN DE UNA CELDA ELECTROQUÍMICA BASADA EN PAPEL	66
5.	Conclusiones y trabajos futuros	71
6.	Anexos	73

6.1 CRONOAMPEROGRAMAS DEL ESTUDIO DE LA INHIBICIÓN DEL GLIFOSATO	73
6.2 CRONOAMPEROGRAMAS DEL ESTUDIO DEL TIEMPO DE REACCIÓN ENZIMÁTICA	75
7. Bibliografía.....	77

Índice de Figuras

Figura 1.1. Estructura química del N-fosfometilglicina (glifosato). Fuente: PubChem	15
Figura 1.2. Esquema de funcionamiento de un biosensor.....	19
Figura 1.3. Representación esquemática de un biosensor enzimático por a) ruta catalítica y por b) inhibición.	27
Figura 1.4. Principales elementos de una celda electroquímica para medidas voltamperométricas.....	29
Figura 1.5. Esquema de una celda electroquímica serigrafiada.....	30
Figura 1.6. Proceso de excitación (a) y respuesta (b) en voltamperometría cíclica. E_0 es el potencial inicial, E_i el potencial de inflexión, E_{fi} el potencial final, E_{pa} el potencial del pico anódico, E_{pc} el potencial del pico catódico, i_{pa} la intensidad de corriente de pico catódico.	34
Figura 1.7. Formato de excitación a potencial constante (a) y respuesta (b) en una cronoamperometría.....	35
Figura 3.1. Electrodo serigrafiado de carbono de la casa comercial MicruX Technologies (ref. ED-S1PE-C10).....	44
Figura 3.2. Electrodo serigrafiado de oro de la casa comercial Metrohm Dropsens (ref. 220 AT).....	45
Figura 3.3. Potenciostato/galvanostato Autolab PGSTAT101. Fuente: Metrohm	47
Figura 3.4. a) Caja conector para electrodos serigrafiados MicruX Technologies. b) Caja conector para electrodos serigrafiados Metrohm Dropsens.....	48

Figura 3.5. Conector de pines eléctricos para electrodos de papel en la caja conectora Metrohm DropSens.51

Figura 3.6. Esquema del procedimiento de ensayo enzimático.....53

Figura 4.1. Voltamperograma cíclico registrado en disolución de glifosato $500 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ tampón fosfato $0,1 \text{ M}$ con $\text{pH} = 7,0$, sobre un electrodo serigrafiado de oro de la casa comercial Metrohm Dropsens (ref. 220 AT). Parámetros instrumentales: barrido de potencial desde 0 hasta $1,2 \text{ V}$; velocidad de barrido $0,05 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$; potencial de paso $0,01 \text{ V}$. En el inset se amplía la región entre $0,5 \text{ V}$ y $1,1 \text{ V}$ donde se puede observar el pico de reducción del glifosato a un potencial de $0,78 \text{ V}$55

Figura 4.2. Voltamperogramas cíclicos registrados en las disoluciones de glifosato en una disolución reguladora de fosfato $0,1 \text{ M}$ $\text{pH} = 7,0$, sobre un electrodo de oro serigrafiado de la casa comercial Metrohm Dropsens (ref. 220 AT). Parámetros instrumentales: barrido de al desde 0 hasta $1,2 \text{ V}$; velocidad de barrido $0,05 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$; potencial de paso $0,01 \text{ V}$56

Figura 4.3. Curva de calibrado de las concentraciones de glifosato entre 50 y $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en disolución reguladora de fosfato $0,1 \text{ M}$ $\text{pH} = 7,0$, sobre un electrodo de oro serigrafiado de la casa comercial Metrohm Dropsens (ref. 220 AT).57

Figura 4.4. Voltamperograma cíclico registrado del $3,3',5,5'$ -tetrametilbencidina diluido $1:10$ en medio de una disolución tampón de fosfato $0,1 \text{ M}$ $\text{pH} = 7,0$, sobre electrodo de carbono serigrafiado de la casa comercial MicruX Technologies (ref. ED-S1PE-C10). Parámetros instrumentales: barrido desde $-0,4$ hasta $0,8 \text{ V}$; velocidad de barrido $0,05 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$; potencial de paso $0,01 \text{ V}$59

Figura 4.5. Cronoamperometría para $3,3',5,5'$ -tetrametilbencidina diluido $1:10$ en tampón fosfato $0,1 \text{ M}$ $\text{pH} = 7,0$, sobre electrodo de carbono serigrafiado de la casa comercial MicruX Technologies (ref. ED-S1PE-C10). Parámetros instrumentales: potencial aplicado $-0,1 \text{ V}$; intervalo de tiempo $0,01 \text{ s}$; duración de 30 s60

Figura 4.6. Cronoamperogramas registrados con diferentes concentraciones de enzima HRP tampón fosfato 0,1 M pH = 7,0, empleando como sustrato 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina sin diluir, sobre electrodo de carbono serigrafiado de la casa comercial MicruX Technologies (ref. ED-S1PE-C10). Parámetros instrumentales: potencial aplicado -0,1 V; intervalo de tiempo 0,01 s; duración de 100 s.61

Figura 4.7. Relación lineal de la señal analítica con la concentración de la enzima HRP. Parámetros instrumentales: potencial aplicado -0,1 V; intervalo de tiempo 0,01 s; duración de 100 s.62

Figura 4.8. Cronoamperogramas registrados en disoluciones de glifosato de diferente concentración (0 y 500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) en tampón fosfato 0,1 M pH = 7,0, añadiendo 10 μL de HRP (25 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$) con un tiempo de reacción de 12 min, empleando como sustrato TMB sin diluir sobre electrodo de carbono serigrafiado de la casa MicruX Technologies (ref. ED-S1PE-C10). Parámetros instrumentales: potencial aplicado -0,1 V; intervalo de tiempo 0,01 s; duración de 60 s.63

Figura 4.9. Voltamperogramas cíclicos registrados en una disolución de 5mM de $\text{Fe}^{3-/4-}$ empleando electrodos de carbono serigrafiados de la casa MicruX Technologies (ref. ED-S1PE-C10) y celdas electroquímicas de papel con electrodos de trabajo preparados con lápices de durezas 5B, 6B y 7B. Parámetros instrumentales: barrido de potencial desde -0,4 hasta 0,6 V para 5B y desde -0,6 hasta 0,6 V para electrodos serigrafiados, 6B y 7B; velocidad de barrido 0,05 $\text{V}\cdot\text{s}^{-1}$; potencial de paso 0,01 V.68

Figura 4.10. Voltamperogramas cíclicos registrados empleando celda electroquímica de papel con electrodo serigrafiado con lápices de dureza a) 5B b) 6B. Parámetros instrumentales: barrido de potencial desde -0,4 hasta 0,6 V; velocidad de barrido 0,05 $\text{V}\cdot\text{s}^{-1}$; potencial de paso 0,01 V.70

Figura I. Cronoamperogramas registrados en una disolución de glifosato ($500 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) en tampón fosfato $0,1 \text{ M}$ $\text{pH} = 7,0$, añadiendo $10 \mu\text{L}$ de HRP ($5 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$) con un tiempo de reacción de 12 min , empleando como sustrato 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina sin diluir y sobre electrodo de carbono serigrafiado de la casa comercial MicruX Technologies (ref. ED-S1PE-C10). Parámetros instrumentales: potencial aplicado $-0,1 \text{ V}$; intervalo de tiempo $0,01 \text{ s}$; duración de 60 s75

Figura II. Cronoamperogramas registrados en una disolución de glifosato ($500 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) en tampón fosfato $0,1 \text{ M}$ $\text{pH} = 7,0$, añadiendo $10 \mu\text{L}$ de HRP ($0,25 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$) con un tiempo de reacción de 12 min , empleando como sustrato TMB sin diluir sobre electrodo de carbono serigrafiado de la casa comercial MicruX Technologies (ref. ED-S1PE-C10). Parámetros instrumentales: potencial aplicado $-0,1 \text{ V}$; intervalo de tiempo $0,01 \text{ s}$; duración de 60 s76

Figura III. Cronoamperogramas registrados en una disolución de glifosato ($500 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) en medio de una disolución tampón de fosfato $0,1 \text{ M}$ $\text{pH}=7,0$, añadiendo $10 \mu\text{L}$ de HRP ($5 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$) con un tiempo de reacción de 5 min , empleando como sustrato 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina sin diluir y sobre electrodo de carbono serigrafiado de la casa comercial MicruX Technologies (ref. ED-S1PE-C10). Parámetros instrumentales: potencial aplicado $-0,1 \text{ V}$; intervalo de tiempo $0,01 \text{ s}$; duración de 60 s77

Figura IV. Cronoamperogramas registrados en una disolución de glifosato ($500 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) tampón fosfato $0,1 \text{ M}$ $\text{pH}=7,0$, añadiendo $10 \mu\text{L}$ de HRP ($5 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$) con un tiempo de reacción de 12 min , empleando como sustrato TMB sin diluir y sobre electrodo de carbono serigrafiado de la casa comercial MicruX Technologies (ref. ED-S1PE-C10). Parámetros instrumentales: potencial aplicado $-0,1 \text{ V}$; intervalo de tiempo $0,01 \text{ s}$; duración de 60 s78

Índice de tablas

Tabla 1.1. Propiedades físicas y química del glifosato.	17
Tabla 4.1. Resumen de la relación entre la variación de la cantidad de enzima HRP con el porcentaje de inhibición obtenido.	65
Tabla 4.2. Resultados estudio del tiempo de reacción enzimática a 5 minutos.	66
Tabla 4.3. Resultados estudio del tiempo de reacción enzimática a 12 minutos. ...	66
Tabla 4.4. Potenciales e intensidades de los picos anódicos y catódicos empleando lápices de durezas 5B, 6B y 7B y electrodos serigrafados de la casa comercial MicruX Technologies (ref. ED-S1PE-C10).	69

Anexo; Glosario de términos

A

AMPA Ácido Aminometilfosfónico

C

CE Electrodo auxiliar

CEs Contaminantes Emergentes

CNOs Nanopartículas de carbono

CV Voltamperometría Cíclica

E

EDAR Plantas de tratamiento de aguas residuales

EDCs Compuestos disruptores endocrinos

ELISA Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

H

HPLC Cromatografía líquida de alta resolución

HRP Enzima peroxidasa de rábano picante

I

IARC Agencia Internacional para la investigación sobre el Cáncer

IUPAC Unión Internacional de Química Pura y Aplicada

L

LMRs Límite Máximo de Residuos permitidos

N

NCA Normas de Calidad Ambiental

O

OMS Organización Mundial de la Salud

OPD Fenilendiamina

P

PCP Productos farmacéuticos y de cuidado personal

R

RE Electrodo de Referencia

REM Radiación Electromagnética

S

SPE Electroodos serigrafados comerciales

T

TMB 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina

W

WE Electrodo de trabajo

1. Introducción

1.1-CONTAMINANTES EN AGUAS

El agua es un recurso fundamental para la vida. Abarca aproximadamente el 70% de la superficie de la Tierra y compone los fluidos de la mayoría de los organismos vivos. Estos organismos utilizan el agua principalmente para beber, aunque para algunos, es también su medio de vida. Los seres humanos, además de consumirla, emplean el agua en diversas actividades cotidianas. El creciente desarrollo de la actividad antropogénica, la superpoblación y el cambio climático está causando su deterioro natural, repercutiendo de forma negativa en la biodiversidad y ecosistemas acuáticos además de en la salud humana. (Hara & Singh, 2021)

La contaminación del agua se produce cuando los contaminantes llegan a las masas de agua. Los contaminantes son sustancias introducidas de forma directa o indirecta en el medio ambiente que causan efectos adversos en los seres vivos y ecosistemas. (Rebelo et al., 2021) La contaminación del agua puede ser química, biológica y física. El presente trabajo se va a centrar en la contaminación química. Dentro de este tipo de contaminación, los contaminantes emergentes (CEs) están recibiendo una enorme atención debido a su creciente presencia y amplia distribución en el medio ambiente. (Kroon et al., 2020) Los CEs son un grupo heterogéneo de compuestos que recientemente han sido detectados en las masas de agua y que en muchos casos no están completamente regulados, por lo que no se controlan de forma rutinaria ni se someten a una normativa de control de emisiones. (Bilal et al., 2019)

Las principales fuentes de CEs son los vertidos procedentes de la industria, la agricultura, las plantas de tratamiento de aguas residuales (EDAR) y la industria farmacéutica. (En et al., 2015) Su presencia implica un riesgo tanto para la salud humana como para la biodiversidad acuática. Además, su eliminación con los tratamientos convencionales de aguas residuales es poco eficaz debido principalmente, a las siguientes razones (Petrović et al., 2003):

- Diseño no apropiado: las EDAR están diseñadas para tratar contaminantes de materia orgánica, de sólidos suspendidos y de nutrientes, pero no tienen un tratamiento dirigido a contaminantes emergentes.

- Propiedades fisicoquímicas: debido a sus propiedades algunos CEs no quedan retenidos en las etapas de filtración durante los tratamientos convencionales.

- Transformación en otros compuestos: durante los tratamientos convencionales en las EDAR, algunos CEs se transforman en otros compuestos que siguen produciendo efectos nocivos tanto en la salud humana como en el medio acuático.

Los principales contaminantes emergentes son: (Ahmed et al., 2017)

- Compuestos disruptores endocrinos (EDCs): son compuestos que modifican el funcionamiento de los sistemas endocrinos pudiendo inducir una reacción adversa en los organismos inalterados o en sus sucesores, como por ejemplo los productos farmacéuticos y de cuidado personal (PCP). Además, pueden contener residuos de antibióticos que

estimulan el crecimiento de genes resistentes a antibióticos los cuales provocan el desarrollo de superbacterias. Algunos de los efectos causados por los EDCs son la rotura de huevos de aves, peces y tortugas, problemas en los sistemas reproductivos, cambio en el sistema inmunológico de los mamíferos marinos, reducción de espermatozoides en el ser humano, aumento de la incidencia de cáncer de mama, testículo y cánceres de próstata y endometriosis.

- Surfactantes: son sustancias químicas presentes en detergentes, champús y productos de limpieza, que alteran el equilibrio de las hormonas del crecimiento humano y juegan un papel importante en la actividad endocrina, puesto que, pueden perturbar procesos biológicos del crecimiento y desarrollo.

- Pesticidas: como atrazina, diazinon y terbutrina que causan una disminución de las defensas inmunológicas en los mamíferos y en los peces, pero también afectan al sistema renal y provocan cáncer en humanos.

- Retardantes de llama: son sustancias que permiten reducir la inflamabilidad y retardar la propagación del fuego principalmente en productos plásticos y textiles. Persisten en el medio ambiente y además en los seres humanos pueden provocar cáncer, disrupción endocrina y problemas en el aparato reproductor.

Para hacer frente al problema de los contaminantes emergentes, la Unión Europea ha puesto en marcha una serie de directivas, como la Directiva Marco del Agua (2000/60/EC) y la Directiva de Normas de Calidad Ambiental (2008/105/EC), que establecen

límites de concentración para diferentes sustancias químicas y contaminantes en el agua potable, en aguas superficiales y en aguas subterráneas. (Hara & Singh, 2021)

De todos los tipos de contaminantes emergentes, este trabajo se va a centrar en los pesticidas, los cuales son ampliamente empleados en la industria agroalimentaria con el objetivo de controlar, prevenir y eliminar plagas. Algunos de estos productos químicos son insecticidas, acaricidas, fungicidas, bactericidas y herbicidas. Los pesticidas más comunes incluyen compuestos como carbamatos, organoclorados, organofosforados, piretroides, neonicotinoides y triazinas. Estos compuestos poseen una alta toxicidad y, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), pueden catalogarse como carcinogénicos, neurotóxicos o teratogénicos. Debido a su potencial riesgo para la salud humana y el medio ambiente, es necesario un riguroso control de su presencia en aguas residuales, suelos, alimentos, animales y seres humanos. (Pérez-Fernández et al., 2020) Asimismo, la Unión Europea establece límites máximos de residuos permitidos (LMRs) para pesticidas en agua, fijando este límite en $0,1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para pesticidas individuales y $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para el total de pesticidas. Estos límites están establecidos con el propósito de reducir los riesgos vinculados a la exposición prolongada a estos contaminantes.

Para poder llevar a cabo este control tan estricto y asegurar una calidad del agua, es necesario disponer de métodos de análisis fiables y sensibles. En la actualidad, se usan métodos como la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (Bai & Ogbourne, 2016), disponibles en laboratorios equipados con la instrumentación necesaria. Este tipo de métodos requieren que se transporte las muestras a los mismos, sin embargo, una alternativa a estos métodos son los biosensores que permiten llevar a cabo los análisis de manera rápida, sencilla y descentralizada. (Hara & Singh, 2021; Pérez-Fernández et al., 2020)

1.1.1- El glifosato

Según la IUPAC su nombre químico es N-fosfonometilglicina cuya fórmula empírica es $C_3H_8NO_5P$, su estructura química se muestra en la Figura 1.1. A nivel químico, el glifosato posee un grupo amina, un grupo carboxilato y un grupo fosfonato, lo que le confiere un comportamiento anfotérico con cuatro constantes de ionización: $pK_a = 2.0, 2.6, 5.8$ y 10.8 . (Kergaravat et al., 2021a)

El glifosato fue sintetizado en 1950 por la compañía estadounidense Stauffer Chemical. Más tarde, en 1964 se comenzó a utilizar como sustancia química que tenía la capacidad de unirse a iones metálicos y formar complejos estables, lo cual era muy útil para eliminar metales tales como magnesio, calcio, manganeso, cobre y zinc en las tuberías y calderas comerciales. Diez años más tarde, en 1974 la empresa multinacional Monsanto lo patentó como herbicida por primera vez en Malasia hasta que, en el año 2000 cuando la patente expiró, comenzaron a comercializarse formulaciones genéricas por diversas marcas. (Bai & Ogbourne, 2016)

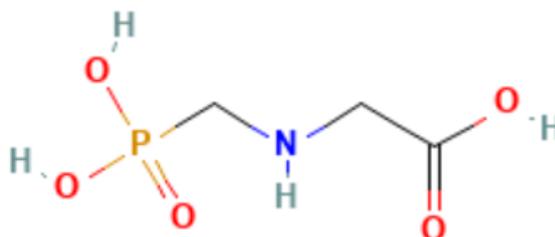


Figura 1.1. Estructura química del N-fosfonometilglicina (glifosato). Fuente: PubChem

El glifosato es actualmente el pesticida de aplicación foliar más utilizado en el mundo. Se aplica antes de que aparezcan las malas hierbas, formando una barrera en el suelo para evitar su germinación. Aunque este compuesto tiene una toxicidad menor en

comparación con otros pesticidas, se caracteriza por su solubilidad en agua y su persistencia ambiental. (Chang et al., 2024)

En cuanto a su persistencia en el medio, el glifosato puede llegar a durar hasta 215 días si se encuentra adherido a partículas del suelo o sedimentos, a diferencia de otros pesticidas similares cuya duración es de 2 a 91 días. Esta persistencia es debida a que su principal metabolito, el ácido aminometilfosfónico (AMPA), el cual posee una gran capacidad de adsorción por los grupos fosfato, prolongando de esta forma su presencia en el entorno. (Kergaravat et al., 2021a; Van Bruggen et al., 2018)

En la Tabla 1.1 se presentan las principales propiedades físicas y químicas del glifosato.

Fórmula química	$C_3H_8NO_5P$
Masa molecular ($g \cdot mol^{-1}$)	169,1
Color	Blanco
Estado físico	Polvo cristalino
Punto de fusión ($^{\circ}C$)	184,5
Densidad específica a $20^{\circ}C$ ($g \cdot mL^{-1}$)	1,704
Presión de Vapor a $45^{\circ}C$ (mmHg)	$1,84 \cdot 10^{-7}$
Tensión superficial ($N \cdot m^{-1}$)	0,072
Inflamabilidad	No inflamable
Explosividad	No explosivo

Tabla 1.1. Propiedades físicas y química del glifosato.

Debido al uso de creciente de este herbicida, se han detectado concentraciones de este compuesto en diferentes muestras ambientales, en fluidos tanto de origen animal como de seres humanos, así como en vegetales, frutas y alimentos. Diversas investigaciones (Kergaravat et al., 2021a) han demostrado efectos negativos producidos por el glifosato en seres humanos como disrupción endocrina, efectos teratogénicos, genotoxicidad, carcinogenicidad, inmunotoxicidad, neurotoxicidad y mutagenicidad.

En 2016, la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC) clasificó al glifosato como "probablemente carcinogénico para los humanos", ya que, existen evidencias de que el glifosato podría influir en el ADN. (Chang et al., 2024; Kergaravat et al., 2021b)

Debido a todos los efectos contraproducentes que presenta este herbicida tanto para la salud humana como para el medio ambiente es necesario establecer unos límites máximos de residuos permitidos (LMRs) de glifosato. En el caso de los Estados Unidos, el límite máximo de residuos en agua potable es de $700 \mu\text{g L}^{-1}$, en Canadá es de $280 \mu\text{g L}^{-1}$, en China es $700 \mu\text{g L}^{-1}$ y en Australia es de $1000 \mu\text{g L}^{-1}$. La normativa europea que regula la presencia de glifosato en las aguas está principalmente establecida por la Directiva 2008/105/CE del Parlamento Europeo y del Consejo. Esta directiva establece normas de calidad ambiental (NCA) para diversas sustancias prioritarias, incluyendo el glifosato, en aguas superficiales. Las normas regulan los límites de concentración media anual y concentraciones máximas establecidas para proteger contra exposiciones tanto a largo como a corto plazo. Según esta normativa se establece una concentración máxima permitida para pesticidas individuales en agua potable de $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$, y de $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ para el total de pesticidas. (Chang et al., 2024; Hara & Singh, 2021; Kergaravat et al., 2021a; Van Bruggen et al., 2018)

1.2- BIOSENSORES

Según la IUPAC, los biosensores se definen como dispositivos analíticos compuestos por un componente de reconocimiento biológico, denominado receptor biológico, que está en contacto directo con un sistema transductor apropiado que permite procesar la señal producida por la interacción entre el biomaterial y el analito de interés (Figura 1.2). La señal obtenida se correlaciona con la concentración del analito y, gracias a la especificidad del receptor biológico, es posible realizar una detección en muestras complejas, idealmente sin

la necesidad de un tratamiento previo, lo cual es particularmente relevante en matrices biológicas. (Sánchez-Paniagua López et al., 2008)

El primer biosensor enzimático fue desarrollado en 1962 por Clark y Lyons para determinar los niveles de glucosa y empezó a comercializarse a partir de 1975. Este biosensor se basaba en la enzima glucosa oxidasa acoplada a un electrodo de oxígeno. Actualmente, la tecnología de los biosensores está experimentando un periodo de intensa actividad y evolución debido a su potencial para su aplicación, en diversas áreas donde se requiere de sistemas que ofrezcan información selectiva, rápida, automatizada y en tiempo real sobre la composición de las muestras. Estas áreas incluyen el control de procesos biotecnológicos, fermentaciones, control medioambiental y control de calidad de los alimentos. Además, es útil también para la detección de bajas concentraciones de distintos analitos, por ejemplo, en aguas, y en alimentos, o en diferentes tipos de matrices, tanto acuosas como no acuosas. (Michael Keusgen, n.d.; Thévenot et al., 2001)

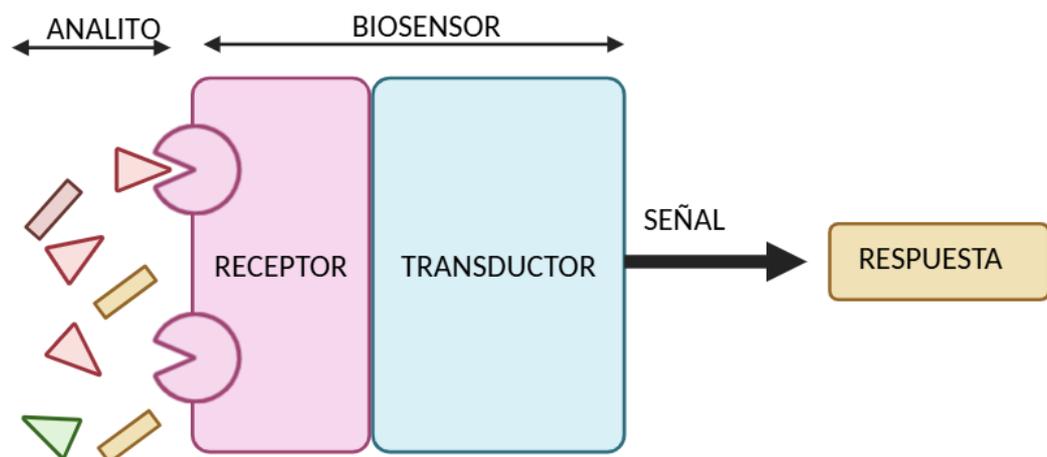


Figura 1.2. Esquema de funcionamiento de un biosensor.

Las principales propiedades que presentan los biosensores son:

- Sensibilidad alta: en algunos casos son capaces de detectar hasta concentraciones de analito de partes por billón ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). (Du et al., 2024).

- Elevada selectividad: posee elementos de reconocimiento específicos para detectar y cuantificar únicamente el analito de interés, sin apenas verse afectado por otras sustancias con propiedades similares al analito objeto de estudio.

- Bajos costes de operación y personal: suelen requerir instrumentación sencilla y no muy cara, que además consume poca energía. Por otro lado, no suele ser necesario hacer un pretratamiento de la muestra. Además, al ser portables, permiten hacer análisis *in-situ*, sin necesidad de trasladar las muestras al laboratorio, ahorrando tiempo y dinero. En otros casos, se puede automatizar el proceso, por lo que se reduciría el coste de personal.

- Tiempo de análisis cortos: por lo que se puede llegar a realizar análisis en tiempo real.

- Facilidad de uso: permite su manejo por personal no especializado.

Los biosensores se clasifican generalmente según el tipo de transductor utilizado o según la naturaleza del material biológico empleado. Dentro del tipo de transductor existen principalmente los transductores ópticos, térmicos, piezoeléctricos y electroquímicos.

Según la naturaleza del material biológico los biosensores se pueden dividir en catalíticos y de afinidad.

A continuación, se describen brevemente los biosensores clasificados según el tipo de transductor. (Cano Luna, 2009)

- Transductores ópticos: convierten los cambios producidos por la interacción de un analito con el receptor en una señal óptica. Esta señal es debida a cambios en la absorción de la radiación electromagnética (REM), en el índice de refracción, en la dispersión de REM o luminiscencia, que se dan cuando el analito interactúa con el elemento de reconocimiento.

- Transductores térmicos: tienen la capacidad de cuantificar los cambios de temperatura producidos sobre la superficie del transductor generados por las interacciones bioquímicas, como por ejemplo las reacciones enzimáticas exotérmicas (Shahbaz et al., 2022), relacionadas con la concentración del analito objeto de estudio.

- Transductores piezoeléctricos: este tipo de dispositivos son capaces de detectar la variación de masa del electrodo el cual ha sido modificado con materiales que poseen propiedades piezoeléctricas.

- Transductores electroquímicos: transforman una señal electroquímica producida por la interacción entre el elemento de reconocimiento y el analito. Dentro de los biosensores electroquímicos existen cuatro tipos: potenciométricos (registran cambios en

el potencial), voltamperométricos (detectan variaciones en la corriente), impedimétricos (se basan en cambios en la impedancia del sistema electroquímico) y conductimétricos (sensibles a cambios en la conductancia). (Cano Luna, 2009; Thévenot et al., 2001) En este trabajo se ha desarrollado un biosensor voltamperométrico.

Por otro lado, como ya se ha comentado, según la naturaleza del material biológico, los biosensores se pueden clasificar en catalíticos y de afinidad. (Sánchez-Paniagua López et al., 2008)

-Biosensores catalíticos: se basan en la utilización de biocatalizadores como las enzimas. Estos biocatalizadores son elementos que tienen la capacidad de facilitar una reacción química sin que ellos mismos se consuman, lo que permite su regeneración y reutilización. Estos biosensores pueden emplearse para detectar la presencia de cualquier sustrato que intervenga en la reacción, ya sea a través de la identificación de la desaparición de un cosustrato o la aparición de un producto. Para mejorar la estabilidad del material biológico, se recurre a varios sistemas de inmovilización que se explicarán con más detalle en la sección 1.2.1.

-Biosensores de afinidad: los receptores que utilizan principalmente son anticuerpos y ácidos nucleicos. Su funcionamiento se basa en la interacción del analito objeto de estudio con el elemento de reconocimiento, sin que se produzca una transformación catalítica. En cambio, se genera una reacción que da lugar a la formación de un complejo analito-receptor.

1.2.1- Elementos de reconocimiento y métodos de inmovilización

La especificidad, pero también la sensibilidad de un biosensor depende en gran medida de la naturaleza del elemento de reconocimiento, que es la biomolécula que tiene la capacidad de interactuar de forma específica con uno o varios analitos de interés en la matriz de la muestra.

Según el tipo de biosensor se utilizan diferentes elementos de reconocimiento. En el caso de los biosensores catalíticos, el principal elemento de reconocimiento empleado son las enzimas, pero también se pueden emplear tejidos y células.

Por otro lado, en los biosensores de afinidad los principales elementos de reconocimiento empleados son anticuerpos, ácidos nucleicos y polímeros de impresión molecular.

Entre los dos tipos de biosensores mencionados anteriormente, catalíticos y de afinidad, los primeros son los más utilizados. La combinación de una capa enzimática inmovilizada en contacto con un transductor permite la creación de dispositivos que fusionan la sensibilidad del transductor con la selectividad inherente que las enzimas proporcionan. Se han desarrollado numerosos sensores enzimáticos, algunos de los cuales se han empleado en aplicaciones comerciales, como el biosensor enzimático electroquímico para la determinación de la glucosa, demostrando ser fáciles de usar y selectivos para la determinación de diversas sustancias. Sin embargo, un factor que limita la vida útil de estos biosensores es la estabilidad de las enzimas.

Para mejorar la estabilidad estructural y funcional del biomaterial a lo largo del tiempo, se han utilizado varios métodos de inmovilización que ofrecen un entorno en el que el material biológico está protegido del medio circundante. Este biomaterial puede

actuar solamente como soporte del componente biológico o también puede participar en la transmisión de la señal al sistema de transducción, por ejemplo, a través de mediadores para las reacciones redox. En general, los métodos más empleados para la inmovilización del biomaterial se pueden clasificar en métodos físicos como la adsorción, encapsulación y el atrapamiento y en métodos químicos como el entrecruzamiento y las uniones covalentes. (Rafael, 2012; Sánchez-Paniagua López et al., 2008)

- Adsorción: la inmovilización de las biomoléculas mediante adsorción sobre diversos materiales es un método sencillo, económico y que no desnaturaliza la enzima, lo que lo convierte en una técnica versátil para la modificación del transductor. Este tipo de inmovilización se fundamenta en la unión de la biomolécula a la superficie del electrodo a través de interacciones no covalentes, incluyendo fuerzas electrostáticas, hidrofóbicas, enlaces de hidrógeno o de Van der Waals. El proceso de adsorción implica poner en contacto las moléculas de enzima con el material adsorbente durante un tiempo suficiente para que se establezcan las interacciones. Los materiales adsorbentes comúnmente utilizados incluyen resinas de intercambio iónico, geles de sílice, arcillas, alúmina, colágeno y vidrio poroso. Sin embargo, este sistema presenta la desventaja de ser un proceso reversible, dado que la unión entre la superficie del electrodo y la enzima es débil, lo que podría resultar en la pérdida de la enzima.

- Encapsulación: en este caso, el biomaterial se aísla de la solución mediante una membrana semipermeable, a través de la cual, los sustratos y los productos difunden libremente ya que son lo suficientemente pequeños. Los principales tipos de membranas empleadas incluyen acetato de celulosa (membrana de diálisis), policarbonato y Nafion®. La ventaja que posee este método es la existencia de una estrecha unión entre el biomaterial y el transductor, además de su sencilla preparación.

-Atrapamiento: se trata de otro método físico de inmovilización que puede realizarse de dos maneras; incluyendo el biomaterial dentro de una matriz polimérica o incorporándolo en la matriz del transductor. Las técnicas de atrapamiento proporcionan una serie de ventajas, como su sencilla preparación, su fácil manipulación y la protección de la enzima contra la biodegradación y la contaminación debido a la matriz, lo que prolonga la vida útil del biosensor. Una desventaja es la barrera de difusión impuesta, ya que, puede impedir que el sustrato acceda a la enzima.

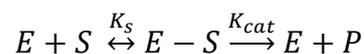
- Entrecruzamiento: es un método químico de inmovilización que, consiste en generar uniones intermoleculares entre las moléculas de enzimas mediante reactivos bifuncionales, destacando entre ellos el glutaraldehído. Este método conlleva una pérdida mínima de enzima, aunque las uniones entre las enzimas son irreversibles y suelen requerir sustancias químicas tóxicas como el formaldehído, que tras una exposición prolongada puede provocar cáncer en el ser humano.

- Enlaces covalentes: se forman uniones covalentes entre los grupos funcionales de la enzima que no son esenciales para su actividad catalítica y los grupos químicos de la matriz o directamente del transductor. Entre las ventajas de este método se incluyen su sencilla manipulación y su alta estabilidad bajo condiciones ambientales extremas. Sin embargo, se pueden presentar desventajas como la posible alteración del centro activo de la enzima, además del uso de sustancias químicas tóxicas.

1.2.2- Biosensores enzimáticos

Dado que en la parte experimental de este trabajo se ha desarrollado un biosensor enzimático electroquímico para la detección de glifosato, a continuación, se resumen algunas de las principales características de este tipo de biosensores.

Los biosensores enzimáticos presentan dos tipos principales de mecanismos: por ruta catalítica y por inhibición. Los biosensores por ruta catalítica (Figura 1.3.a) miden la actividad enzimática de manera directa, en el cual la enzima cataliza una determinada reacción con su sustrato correspondiente. El producto resultante de esta reacción es determinando, lo que permite la cuantificación del analito. La reacción enzimática es sumamente específica, lo que otorga un alto grado de selectividad en la detección. Estos biosensores son habitualmente empleados para determinar concentraciones de sustrato específicos en muestras de composición compleja. (Amine et al., 2016) La reacción que se produce en este tipo de biosensores es la siguiente:



donde E es la enzima, S es el sustrato, E-S es el complejo enzima-sustrato, P es el producto, K_s es la constante de disociación y K_{cat} es la constante catalítica. (Amine et al., 2016; Cano Luna, 2009)

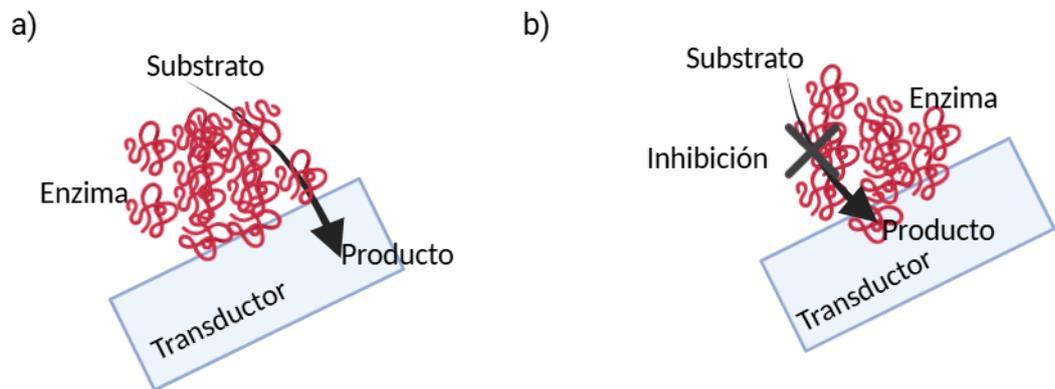


Figura 1.3. Representación esquemática de un biosensor enzimático por a) ruta catalítica y por b) inhibición.

Por otro lado, los biosensores por inhibición (Figura 1.3.b) registran la disminución de la actividad enzimática en presencia de un inhibidor. La inhibición enzimática puede clasificarse en reversible e irreversible. En el caso de la inhibición reversible, la enzima recupera su actividad una vez se elimine el inhibidor, a diferencia de la inhibición irreversible en la que la enzima pierde de forma permanente su actividad. Este tipo de biosensores por inhibición irreversible son los que se han empleado en este trabajo. En el caso de la inhibición irreversible se produce la siguiente, reacción en la que no hay producto debido a la inhibición:



En esta reacción E es la enzima, I es el inhibidor, y EI es el complejo enzima-inhibidor (Amine et al., 2016)

1.2.3- Celda y técnicas electroquímicas

La electroquímica es la rama de la química que se encarga de estudiar las transformaciones químicas que sufren las sustancias como consecuencia del intercambio de electrones que se producen entre ellas.

La detección electroquímica es la más comúnmente utilizada para el desarrollo de biosensores. Los componentes esenciales para llevar a cabo una medición electroquímica son la celda electroquímica, donde sucede la reacción de interés, y el circuito electrónico, que controla y mide la corriente o el potencial, según la técnica aplicada. Las celdas electroquímicas normalmente están formadas por un electrodo de trabajo, un electrodo auxiliar y un electrodo de referencia (Figura 1.4). A continuación, se procede a explicar cada uno de ellos. (Alonso-Lomillo et al., 2010)

-Electrodo de trabajo: es donde ocurre la reacción electroquímica de interés (oxidación o reducción). Suelen ser de carbono, de metal (oro, platino) o de materiales semiconductores.

-Electrodo auxiliar o contraelectrodo: es el que se encarga de cerrar el circuito dentro de la celda, de manera que la corriente electrolítica fluye entre este electrodo y el electrodo de trabajo, lo que evita que pase por el electrodo de referencia mejorando su estabilidad experimental. El material del que suelen estar fabricados es platino.

-Electrodo de referencia: proporciona un potencial constante y conocido contra el cual se controla el potencial del electrodo de trabajo. Los electrodos de referencia más comunes son de plata/cloruro de plata (Ag/AgCl).

En los inicios los electrodos eran de barras metálicas; sin embargo, debido al desarrollo de las técnicas voltamperométrías, apareció el primer electrodo de gota de mercurio descubierto por Jaroslav Heyrovsky en 1925 con la puesta a punto del primer polarógrafo. Posteriormente surgieron otros electrodos metálicos y de carbono. (Bard & Faulkner, 1980)

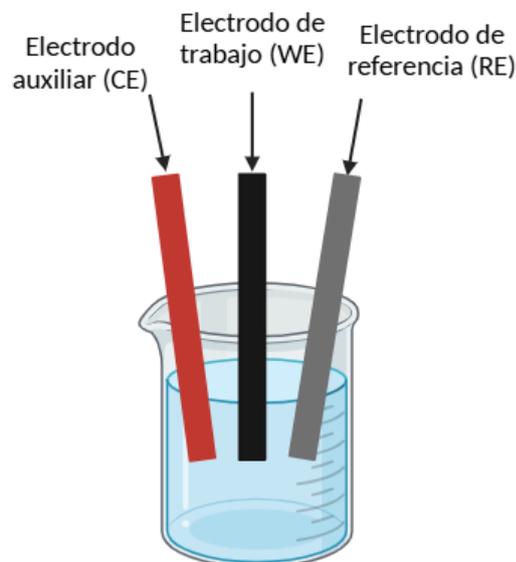


Figura 1.4. Principales elementos de una celda electroquímica para medidas voltamperométricas.

En la actualidad, gracias a la tendencia de la miniaturización de los dispositivos electroquímicos y al desarrollo de métodos que respondan a la necesidad creciente de llevar a cabo análisis rápidos, las celdas electroquímicas más convencionales (con volúmenes de trabajo del orden de mL) están siendo sustituidas por celdas o electrodos serigrafiados (SPEs, *screen-printed electrodes*). Los SPEs son dispositivos fabricados sobre una base plástica o cerámica donde se serigrafía el electrodo de trabajo (el material más

utilizado es el carbono), el electrodo auxiliar (normalmente también de carbono) y el electrodo de referencia (generalmente de plata). (Figura 1.5)

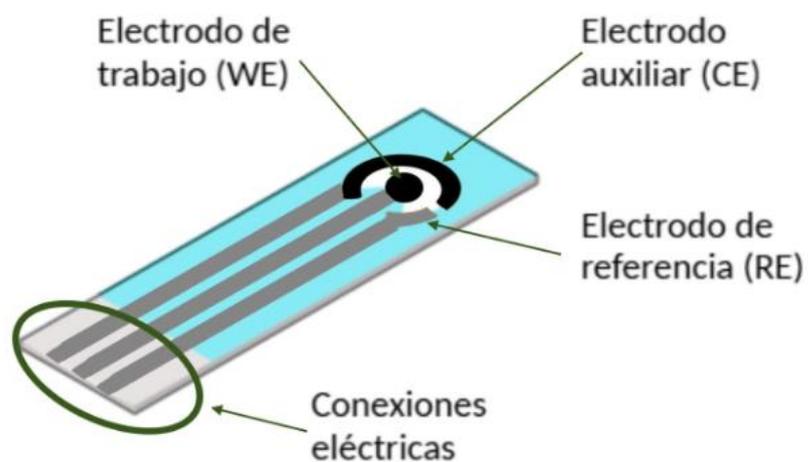


Figura 1.5. Esquema de una celda electroquímica serigrafiada.

A continuación, se detallan algunas de las principales ventajas de los SPEs:

- Bajo coste: los costes de producción se reducen, debido a que los materiales utilizados son baratos y los procesos de fabricación están automatizados, lo cual permite una producción barata a gran escala. Su bajo coste permite que sean utilizados como electrodos desechables, eliminando la necesidad de mantenimiento y limpieza entre usos.

- Implementación en circuitos electrónicos: al obtener directamente una señal eléctrica, permite una fácil implementación en los circuitos electrónicos, ya que, no son

necesarios dispositivos intermediarios para el tratamiento de la señal. Por lo que, gracias a su pequeño tamaño, este tipo de electrodos son muy fáciles de integrar en dispositivos pequeños.

- Versatilidad: al utilizar técnicas de serigrafiado, se pueden utilizar diferentes tipos de tinta, tales como plata, oro, carbono o platino, que pueden ser fácilmente modificadas con mediadores redox, o con nanomateriales o biomateriales una vez fabricados. De igual forma, las plataformas sobre las que se imprime también pueden ser cerámicas, plásticas, o incluso papel. Además, es posible incorporar múltiples electrodos en una sola plataforma, permitiendo la realización de mediciones simultáneas o análisis multiparamétricos. Por lo tanto, se pueden fabricar múltiples tipos de electrodos según las necesidades requeridas por el tipo muestra que se desee analizar.

- Menor consumo de muestra y reactivos: los SPEs permiten trabajar con volúmenes de disolución y muestra del orden de microlitros.

- Portabilidad: al tener un tamaño más pequeño que los convencionales, son más fáciles de manejar y de transportar por lo que se permite realizar medidas en el terreno.

En los últimos años, se ha generalizado el interés por explorar materiales producidos en serie de bajo coste y respetuosos con el medio ambiente para desarrollar dispositivos analíticos. Numerosos materiales funcionales derivados de bienes cotidianos son utilizados como sustratos, conductores y dieléctricos en sensores químicos, físicos y biológicos, debido a las propiedades mecánicas y electrónicas que presentan. En este contexto, el papel

ha atraído una enorme atención como base de dispositivos electroanalíticos. (Costa-Rama & Fernández-Abedul, 2021)

Algunas de las ventajas más destacables que presentan los electrodos de papel son las siguientes (Alahmad et al., 2023; Costa-Rama & Fernández-Abedul, 2021; Silva-Neto et al., 2024):

- Sostenibles: son una alternativa más respetuosa con el medio ambiente en comparación con los electrodos cuyo sustrato es plástico. Debido a que se fabrican con materiales biodegradables como la celulosa, se reduce la contaminación por residuos plásticos.
- Coste reducido y simplicidad: debido a que se fabrican con técnicas como la serigrafía, el trazado con lápiz y la impresión de cera, que son económicas y simples. Además, estos métodos no requieren equipos de alta tecnología ni de instalaciones avanzadas.
- Pequeño volumen de muestra: su diseño ofrece la posibilidad de realizar mediciones con volúmenes de muestra reducidos, lo que es una gran ventaja para aplicaciones donde el volumen de muestra es limitado.
- Minimización de los desechos: cómo se puede emplear una cantidad mínima de muestra y reactivos se reduce la producción de residuos
- Portabilidad y sencillez de manejo: son ligeros y fáciles de transportar. Además, al ser fáciles de usar no requieren personal altamente cualificado.

-
- Flexibilidad de producción: se pueden fabricar mediante diferentes métodos como la impresión serigrafiada, la impresión por inyección de tinta, el grabado láser y las técnicas de impresión aditiva, lo que ofrece la posibilidad de personalizar el diseño y optimizar su rendimiento según las necesidades requeridas.

Una vez explicadas las principales características y componentes de una celda electroquímica y algunas ventajas de los electrodos de papel, se procede a describir brevemente el fundamento teórico de las técnicas electroquímicas utilizadas en el desarrollo de este trabajo.

La voltamperometría cíclica (CV) es una técnica electroquímica ampliamente utilizada para estudiar el comportamiento redox de un compuesto, así como para caracterizar electrodos. Esta técnica se basa en la medición de la corriente resultante de la aplicación de un potencial variable en una celda electroquímica. El potencial se barre linealmente con el tiempo, de un potencial más negativo (E_0) a uno más positivo (E_i) o viceversa, y luego se invierte (E_i) para regresar a un potencial (E_{ii}), que suele ser igual al potencial inicial (E_0), formando un ciclo completo conocido como barrido triangular de potencial (Figura 1.6. a).

Los principales parámetros de la CV son el potencial de pico anódico (E_{pa}) y catódico (E_{pc}) correspondiente a los potenciales de oxidación y reducción, respectivamente; las intensidades de corriente de pico anódico (i_{pa}) y catódico (i_{pc}) asociada a las intensidades de oxidación y reducción de la especie electroactiva, respectivamente; y la velocidad de

barrido (v) que es la velocidad a la que se cambia el potencial del electrodo de trabajo (Figura 1.6. b). (Bard & Faulkner, 1980)

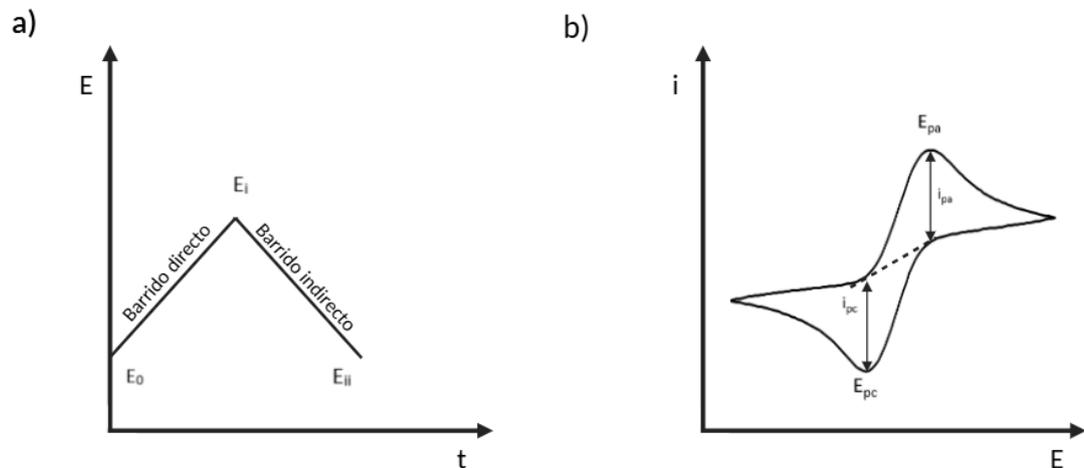


Figura 1.6. Proceso de excitación (a) y respuesta (b) en voltamperometría cíclica. E_0 es el potencial inicial, E_i el potencial de inflexión, E_{ii} el potencial final, E_{pa} el potencial del pico anódico, E_{pc} el potencial del pico catódico, i_{pa} la intensidad de corriente de pico catódico.

En general, la CV destaca porque permite estudiar el proceso redox. Sin embargo, presenta algunas limitaciones de cara a su aplicación como técnica electroquímica, como una menor sensibilidad en comparación con otras técnicas de determinación, como la voltamperometría de onda cuadrada o la voltamperometría diferencial de pulso.

Por otro lado, la cronoamperometría consiste en medir la corriente a lo largo del tiempo aplicando un potencial constante sobre el electrodo de trabajo (Figura 1.7.a). En este caso, a diferencia de la CV, el potencial se mantiene constante para observar la

evolución temporal de la corriente. En la cronoamperometría la corriente faradaica cerca de la superficie del electrodo decae con el tiempo a medida que se alcanza el límite de transporte de masa (Figura 1.7.b).

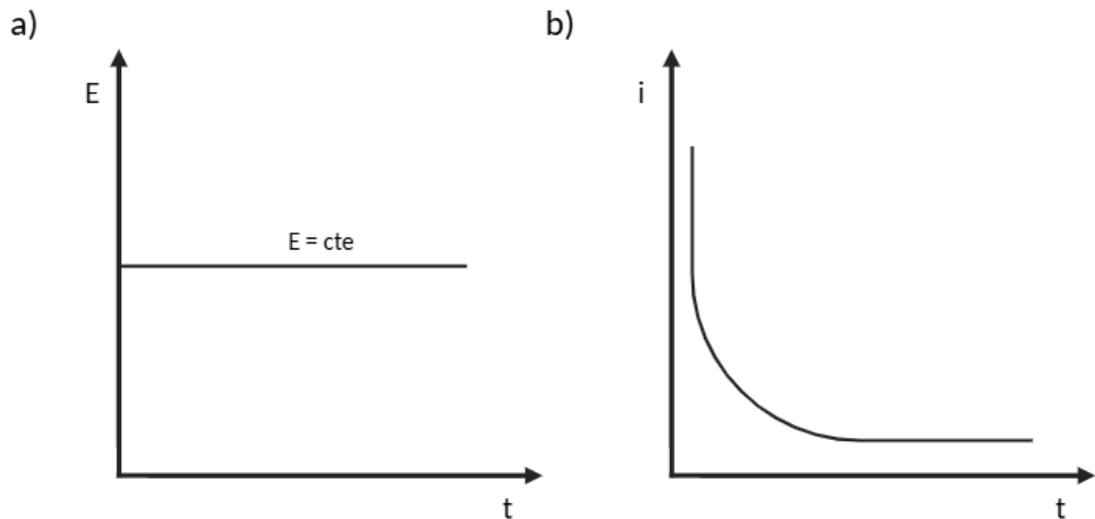


Figura 1.7. Formato de excitación a potencial constante (a) y respuesta (b) en una cronoamperometría.

Estas corrientes proporcionan una curva de decaimiento exponencial típica, que se describe mediante la ecuación de Cottrell (1.1) para un electrodo plano cuando el transporte de masa es controlado por difusión.

$$i(t) = \frac{nFAD_0^{1/2}C_0}{\pi^{1/2}t^{1/2}} \quad (1.1)$$

donde i es la corriente (A), n es el número de transferencia de electrones, F es la constante de Faraday ($C \cdot mol^{-1}$), A es el área del electrodo (cm^2), D_0 es el coeficiente de difusión del analito ($cm^2 \cdot s^{-1}$), C_0 es la concentración inicial del analito ($mol \cdot cm^{-3}$) y t es el tiempo (s).

La cronoamperometría es muy adecuada para aplicaciones que requieren de una detección continua y rápida de los analitos, como ocurre en los (bio)sensores. Las principales ventajas de la cronoamperometría son su elevada sensibilidad, rápida respuesta y capacidad de monitorización en continuo. Entre las limitaciones destacan, la necesidad de un control preciso del potencial y la posible interferencia de otras especies presentes en la solución. (Bard & Faulkner, 1980)

1.3- MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETECCIÓN DEL GLIFOSATO

Como ya se ha mencionado anteriormente, el glifosato es uno de los pesticidas más usados a nivel mundial para evitar, reducir o eliminar en los campos de cultivo el crecimiento de plantas no deseadas que pueden afectar de forma negativa a la calidad de los cultivos. A su vez, este pesticida puede producir efectos contraproducentes para la salud del ser humano y el medio ambiente. Por lo tanto, para asegurar la salud pública y la seguridad alimentaria, es necesario desarrollar metodologías analíticas que permitan un análisis rápido, fiable y sensible para analizar el glifosato en muestras ambientales y proporcionar una alerta temprana en incidentes de contaminación.

Varios métodos analíticos han sido reportados en la bibliografía para la detección de glifosato. Estos métodos incluyen principalmente: cromatografía líquida acoplada a

espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), espectrometría de masas con ionización por electrospray (ESI-MS) y ensayos inmunoquímicos. (Bai & Ogbourne, 2016; Hara & Singh, 2021)

La cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) comprende dos etapas. Una primera etapa de cromatografía líquida en la que los compuestos son separados en función a sus interacciones con la fase estacionaria de la columna cromatográfica y la fase móvil. Una vez separados los compuestos, existe una segunda fase en la que los compuestos son ionizados y detectados por la espectrometría de masas. Con dicha ionización se consigue que las moléculas se conviertan en iones los cuales pueden ser detectados y analizados. En la espectrometría de masas tándem, los iones se someten a una fragmentación adicional para descomponerlos en fragmentos más pequeños. En función a la relación masa/carga que tengan estos fragmentos, se separan y llegan al detector que proporciona una señal característica única que facilita la determinación y cuantificación exacta del glifosato y de su principal metabolito AMPA.

Sin embargo, otra alternativa para el análisis el glifosato puede ser la espectrometría de masas con ionización por electrospray (ESI-MS). Esta técnica es muy útil para compuestos no volátiles como es el caso de este pesticida, ya que se pueden ionizar en moléculas que se encuentran en una fase líquida. Consiste en hacer pasar la muestra que contiene el analito de interés a través de un capilar estrecho con ayuda de un gas (normalmente suele ser nitrógeno) consiguiendo de esta forma un aerosol de pequeñas gotas cargadas. A continuación, en la punta de dicho capilar se aplica un voltaje alto, consiguiendo de esta forma generar un campo eléctrico que ioniza las gotas del aerosol. Los iones son dirigidos al espectrómetro de masas donde en función a la relación masa/carga que tengan los iones se van a separar y llegan al elemento final del

espectrómetro de masas que es el detector, obteniendo de esta forma información sobre la estructura y concentración del glifosato y sus metabolitos presentes en la muestra que se ha analizado.

Cabe destacar que para determinar la presencia del glifosato en muestras ambientales y agrícolas se suele emplear la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) combinándola con detección espectrometría de masas o fluorescencia, debido a que es una de las técnicas más robustas para su detección y cuantificación en diferentes tipos de matrices. En este caso, a partir de un pretratamiento previo de la muestra, empleando una columna cromatográfica se procede a separar los componentes de la muestra debido a su interacción con la fase estacionaria. A medida que los componentes van saliendo de la columna se hacen pasar por un detector de espectrometría de masas para poder cuantificar la concentración de glifosato.

Finalmente, otra manera de detectar el glifosato es empleando ensayos inmunoquímicos como ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), los cuales son más rápidos que los métodos cromatográficos y de espectrometría de masas. Este tipo de ensayos se basan en emplear anticuerpos específicos los cuales se unen a los analitos. Al introducir la muestra en un pocillo revestido con los anticuerpos específicos, el glifosato presente se adhiere a los mismos. Seguidamente, un segundo anticuerpo, que está conjugado con una enzima, se liga al complejo creado por el glifosato y el anticuerpo. Al añadir un sustrato, la enzima unida al segundo anticuerpo cataliza una reacción que produce una señal colorimétrica. La intensidad de esta señal se relaciona con la cantidad de glifosato presente en la muestra. (Bai & Ogbourne, 2016; Zambrano-Intriago et al., 2021)

1.3.1-Biosensores electroquímicos para el glifosato

Como ya se ha mencionado, los métodos analíticos más comunes para la detección de glifosato se basan en técnicas cromatográficas que requieren de pretratamientos extensos, instrumentación costosa y personal altamente cualificado, además de una gran cantidad de reactivos orgánicos que suelen no ser adecuados para el medio ambiente. En cambio, los biosensores electroquímicos ofrecen una detección rápida, sensible, portátil, fiable y económica del glifosato a bajas concentraciones. (Kergaravat et al., 2021a)

Dentro de los biosensores electroquímicos existen diferentes variantes. Uno de los más relevantes son los basados en la inhibición de la actividad enzimática de la peroxidasa de rábano picante (HRP) en disolución. La detección se realiza mediante técnicas voltamperométricas mediante una celda de tres electrodos. La HRP actúa como catalizador en la oxidación de un sustrato (por ejemplo, o-fenilendiamina -OPD- o 3,3',5,5'-tetrametilbencidina -TMB-) en presencia de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), dando lugar a un producto con propiedades electroactivas. La presencia de glifosato provoca una inhibición en la actividad de la HRP, lo que conlleva a una reducción en la señal de corriente producida. Esta disminución es directamente proporcional a la concentración de glifosato presente en la muestra. (Kergaravat et al., 2021a) Este tipo de biosensores se ha desarrollado utilizando diferentes celdas electroquímicas, desde celdas más convencionales como electrodos de grafito, hasta celdas serigrafadas comerciales, en las que los electrodos están serigrafados sobre sustratos rígidos de cerámica. (Paimard et al., 2023). Como ya se mencionó anteriormente, este tipo de celdas electroquímicas presentan ventajas como el bajo coste, reducción de los residuos producidos y sencillez de manejo, entre otras.

Basado también en el principio de inhibición enzimática, se ha descrito otro biosensor para la detección del glifosato, en este caso, con la enzima tirosinasa conjugada con nanopartículas de carbono (CNOs) e inmovilizada en una matriz de quitosano sobre un electrodo serigrafiado. En este biosensor se emplea L-dopa como sustrato de la enzima tirosinasa y mediante amperometría se detecta la inhibición debida al glifosato. Cabe destacar que, al estar conjugada la enzima con CNOs, aumenta la sensibilidad del sensor debido al incremento del área de superficie activa, además de mejorar las propiedades electroquímicas. (Sok & Fragoso, 2019)

Para la detección del glifosato también se pueden emplear biosensores de ureasa, ya que esta enzima cataliza la hidrólisis de la urea en amoníaco y dióxido de carbono, pero experimenta una inhibición en su actividad cuando se encuentra en presencia de glifosato. Dicha inhibición se manifiesta en una producción reducida de amoníaco y un cambio menos pronunciado en el pH, lo cual se utiliza como señal electroquímica para detectar el glifosato. Estos biosensores son sensibles debido a la fuerte inhibición de la ureasa por el glifosato, y su selectividad se mejora utilizando materiales de soporte, como por ejemplo polímeros conductores o nanopartículas de oro, sobre los que se inmoviliza la enzima que minimicen las interferencias de otros compuestos. (Vaghela et al., 2018; Zambrano-Intriago et al., 2021)

2. Objetivos

Como ya se ha comentado anteriormente, la presencia de contaminantes emergentes (CEs) en el agua está creciendo de forma exponencial en la actualidad. El origen de dicha contaminación se encuentra principalmente en las descargas de efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales, las cuales no logran eliminar por completo los contaminantes emergentes como es el caso de fármacos, pesticidas, productos de cuidado personal y plastificantes. La presencia de estos contaminantes produce efectos negativos tanto en la salud del ser humano como en el medio ambiente. En consecuencia, el desarrollo de métodos analíticos para determinar su presencia en medios acuáticos es de enorme interés. Para la cuantificación de estos contaminantes normalmente se utilizan métodos de análisis descentralizados basados generalmente en técnicas cromatográficas, los cuales requieren del traslado de las muestras al laboratorio y además suponen tiempos de análisis largos. Un método alternativo, son los biosensores debido a que permiten hacer análisis de forma rápida, fácil, descentralizada y barata, lo que además permite obtener datos espacio-temporales de la presencia de estas sustancias contaminantes.

Por estas razones, se plantea como objetivo general de este trabajo, el diseño y desarrollo de una plataforma bioelectroanalítica para determinar glifosato, basada en la inhibición enzimática de la enzima HRP. Para ello, se plantea el desarrollo de un dispositivo miniaturizado y portátil utilizando materiales de uso común y bajo coste como el papel.

Este objetivo general se puede desglosar en los siguientes objetivos específicos:

1. Estudio del comportamiento electroquímico del glifosato sobre electrodos serigrafiados de oro.
2. Estudio del comportamiento electroquímico del sustrato TMB.
3. Evaluación de las variables experimentales que pueden influir en la inhibición enzimática del glifosato.
4. Evaluación de una celda electroquímica basada en papel como transductor para la determinación del pesticida.

3. Materiales y métodos

3.1-MATERIALES Y REACTIVOS

Se utilizaron como celdas electroquímicas, electrodos serigrafiados comerciales de la casa comercial MicruX Technologies (ref. ED-S1PE-C10) fabricados sobre un soporte de tereftalato de polietileno (PET) de dimensiones 27,5 x 10,1 x 0,35 mm (largo x ancho x espesor) donde se encuentran serigrafiados los electrodos de trabajo, referencia y auxiliar (Figura 3.1). El material de los electrodos de trabajo y el auxiliar es tinta de carbono, mientras que el electrodo de referencia es tinta de plata. El electrodo de trabajo tiene un diámetro de 3 mm (superficie de trabajo 7.1 mm²). Lo cual permite trabajar con volúmenes de muestra que varía entre 20 y 50 µL. Los contactos eléctricos están hechos de tinta de plata y parte de ellos están cubiertos por una capa de material aislante para facilitar el manejo. Estos electrodos impresos se distribuyen en cajas de plástico que contienen 50 unidades. Cada caja está perfectamente sellada para prevenir el deterioro de los electrodos y evitar posibles contaminaciones de estos.

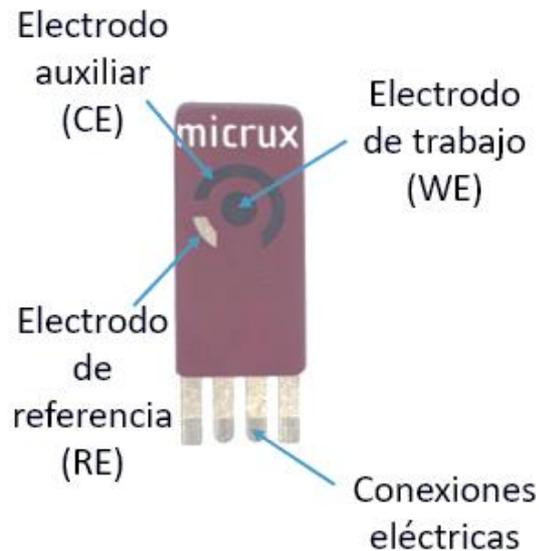


Figura 3.1. Electrodo serigrafiado de carbono de la casa comercial MicruX Technologies (ref ED-S1PE-C10).

Además, se utilizaron electrodos serigrafiados de tinta de oro serigrafiado curados a alta temperatura de la casa comercial Metrohm DropSens (ref. 220 AT). Estos electrodos están fabricados sobre un soporte cerámico con dimensiones 3,38 x 1,02 x 0,05 cm (largo x ancho x espesor) donde se encuentran serigrafiados los electrodos de trabajo, referencia y auxiliar (Figura 3.2). El electrodo de trabajo y el auxiliar están fabricados con tinta de oro, mientras que el electrodo de referencia es de tinta de plata. En este tipo de celdas, el electrodo de trabajo tiene un diámetro de 4 mm (superficie de trabajo 12,6 cm²), lo cual permite trabajar con volumen de muestra entre 40 y 50 μ L. Las conexiones eléctricas están, aisladas por una capa de material aislante, y también están fabricadas con tinta de plata. Al igual que ocurre con los electrodos de la casa comercial MicruX Technologies, estos se distribuyen en cajas de plástico y contienen 100 unidades.

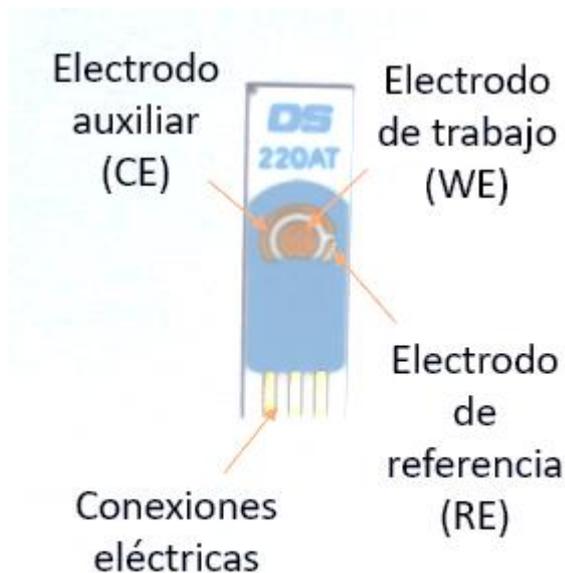


Figura 3.2. Electrodo serigrafado de oro de la casa comercial Metrohm Dropsens (ref. 220 AT).

Para la construcción de las celdas electroquímicas basadas en papel, se utiliza papel cromatográfico Whatman™ grado 1 y lápices de dureza 5B, 6B y 7B.

Otros materiales que también se utilizaron fueron: micropipetas (marca *Eppendorf*), tubos de microcentrifuga tipo *Eppendorf* de 1,5 y 2 mL y material de vidrio de calidad analítica (vasos de precipitados y matraces).

Además, también se utilizaron los siguientes reactivos y disoluciones:

- di-Sodio hidrogenofosfato anhidro (VWR Chemicals).
- Sodio dihidrogenofosfato dihidratado (VWR Chemicals).

-
- 3,3',5,5'-tetrametilbencidina o TMB (Abcam).
 - Glifosato (Sigma-Aldrich).
 - Enzima peroxidasa de rábano picante (Sigma-Aldrich).

Para la preparación de todas las disoluciones se utilizó agua ultrapura obtenida mediante un sistema de purificación Millipore Direct-Q™5.

3.2-INSTRUMENTOS Y APARATOS

Para realizar las medidas electroquímicas se utilizó un potenciostato/galvanostato Autolab PGSTAT101/Metrohm conectado a un ordenador de sobremesa que está equipado con el software NOVA (Figura 3.3). Este equipo dispone de entradas y salidas analógicas y digitales para conectar y controlar aparatos externos. En cuanto a sus especificaciones técnicas cabe destacar:

- Voltaje de cumplimiento: ± 10 V.
- Rango de corriente: ± 100 mA.
- Resolución de corriente: 0,0003 % del rango de corriente.
- Rango de potencial aplicado: -10 V a 10 V.
- Impedancia de entrada: 100 G Ω .
- Integrador analógico incorporado: Sí.

-
- Célula dummy interna: Sí.
 - Dimensiones en mm (ancho x alto x profundidad): 90 x 150 x 210.
 - Peso: 2,1 kg.
 - Software: se controla mediante el software NOVA, el cual permite realizar y analizar una amplia variedad de experimentos electroquímicos.
 - Entradas y salidas: tiene tanto entradas y salidas analógicas como digitales para la interfaz y el control de accesorios externos.



Figura 3.3. Potenciostato/galvanostato Autolab PGSTAT101. Fuente: Metrohm

Para conectar los electrodos de la casa MicruX Technologies al potenciostato, se utilizó un conector de caja (ref. ED-SPE-BOX) de dimensiones 58 x 40 x 15 mm con terminales de bananas hembras de 2 mm, que actúa como interfaz entre los electrodos serigrafiados y el potenciostato (Figura 3.4.a). En el caso de los electrodos serigrafiados de Metrohm Dropsens, se empleó un conector de caja (ref. DSC4MM) de

dimensiones 8 x 4 x 3,5 cm con terminales de bananas hembras de 4 mm (Figura 3.4 b). Además, se utilizó un cable flexible con conexiones macho de 2 mm y pinzas cocodrilo que actúa como interfase entre los conectores y el potencióstato. Este cable es compatible tanto para el conector de MicruX Technologies como el de Metrohm Dropsens.

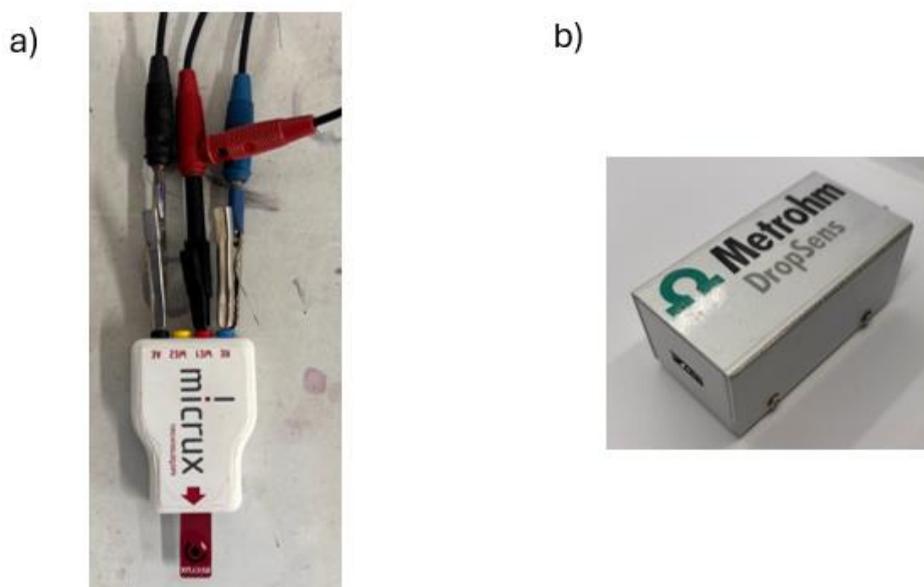


Figura 3.4. a) Caja conector para electrodos serigrafiados MicruX Technologies. b) Caja conector para electrodos serigrafiados Metrohm Dropsens.

Para preparar los electrodos de papel y difundir la cera en ellos, se utilizó una placa calefactora Velp Scientifica Arex. Esta placa es de aluminio con una protección especial, tiene una interfaz analógica con un ajuste analógico de temperatura escalar de 0 a 370 °C y un diámetro de placa calefactora de 135 mm. Del mismo modo, también tiene un control de velocidad analógico de 0 a 1500 rpm. Las dimensiones del equipo son 160 x 105 x 280 mm, con una potencia de 630 W y un peso de 2,6 kg.

Otros aparatos generales utilizados a lo largo de este trabajo fueron:

- Balanza VWR Classic LPW con una pantalla LCD con calibración interna automática y protector de tres puertas. Sus principales características son: capacidad de pesada de 210 g, lectura de 0,0001 g, diámetro del plato 110 mm y linealidad ± 3 mg.
- Un pH-metro HACH Sesión + pH3 Basic. Sus especificaciones técnicas más destacables son: monitor con pantalla LCD gráfica retroiluminada, intervalos de calibración de una hora a siete días, dimensiones (alto x ancho x profundidad) 110 x 350 201 mm, soporte para electrodos, temperatura de funcionamiento 0 – 40 °C, rango de medición de pH -2,00 – 16,00 y resolución pH 0,01.
- Un agitador Vortex Heidolph Reax 2000 para homogenizar las disoluciones preparadas en los tubos *Eppendorf*. Sus dimensiones en centímetros (profundidad x ancho x alto) son 14 x 12 x 13. Este agitador cuenta con una velocidad ajustable entre 200 y 2400 rpm, permitiendo un funcionamiento continuo o intermitente por presión sobre el cabezal. Su funcionamiento es silencioso y tiene una plataforma de goma lo cual hace que no se deslice cuando se presiona con el *Eppendorf*, consiguiendo de esta forma para operar de forma segura en el laboratorio.
- Para imprimir el diseño en cera hidrófoba de los electrodos de papel, se empleó una impresora de cera XEROX ColorQube 8570.

3.3-PROCEDIMIENTOS

3.3.1 Fabricación de los electrodos de papel

En primer lugar, utilizando una impresora específica como se ha indicado antes, se imprimió un patrón con cera hidrofóbica en el papel Whatman para definir el área de trabajo de $12,6 \text{ mm}^2$ (forma circular con un diámetro de 4 mm), el cual ya había sido diseñado previamente por el grupo de investigación para otros trabajos. A continuación, utilizando una placa calefactora a $100 \text{ }^\circ\text{C}$, se colocó durante un minuto el papel impreso y se dejó difundir la cera. Se dejó enfriar unos segundos, y se pintó el área de trabajo, a mano, con lápices de diferentes durezas (5B, 6B, 7B) consiguiendo de esta forma construir el electrodo de trabajo con diferente composición de grafito. Por otro lado, tres pines metálicos recubiertos de oro (suministrados por la empresa Digikey) desempeñaron la función de electrodos de referencia y auxiliar, además de ser interfaz entre la celda electroquímica y el conector de caja DSC4MM conectado al potencióstato. (Amor-Gutiérrez et al., 2017) (Figura 3.5)

Dos de los pines metálicos funcionan como electrodos de referencia y auxiliar, y también como conexión a la caja conectora, mientras que, el electrodo de trabajo (electrodo de papel) está en contacto directo con el tercer pin metálico, el cual actúa como conector a la caja conectora. Para realizar las medidas, la alícuota de la disolución correspondiente se deposita en la parte posterior del electrodo de trabajo para que no entre en contacto directo con el pin que actúa como conector eléctrico del electrodo de trabajo. (Amor-Gutiérrez et al., 2017)

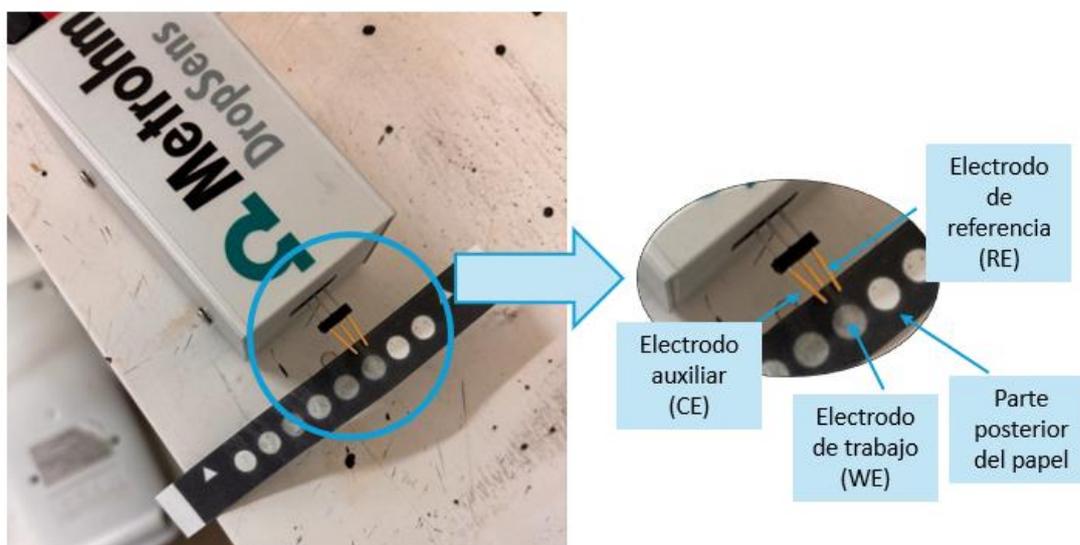


Figura 3.5. Conector de pines eléctricos para electrodos de papel en la caja conectora Metrohm DropSens.

3.3.2. Medidas electroquímicas

Durante este trabajo, el procedimiento que se sigue para llevar a cabo las medidas sobre los electrodos de la casa MicruX Technologies y Metrohm DropSens fue muy sencillo. Consiste en depositar un volumen de disolución de medida adecuado (entre 40 y 60 μL), asegurándose de que el sistema de tres electrodos (trabajo, referencia y auxiliar) queden totalmente cubiertos, consiguiendo de esta forma una correcta conexión entre todos ellos.

En el caso de los electrodos de papel, el procedimiento a seguir para realizar las medidas consistió en colocar una gota de 15 μL de la disolución de medida sobre el electrodo de papel. Cabe destacar, la importancia de asegurarse que los pines metálicos

quedaran cubiertos con la gota para conseguir una correcta conexión entre los tres electrodos de la celda.

Las técnicas electroquímicas utilizadas a lo largo de este trabajo fueron la voltamperometría cíclica (medida de la intensidad de corriente respecto a un barrido de potencial) y la cronoamperometría (medida de intensidad de corriente respecto al tiempo a un potencial determinado). En el caso de la cronoamperometría se integró la señal de la corriente de reducción haciendo la media de las corrientes registradas los últimos segundos (entre 58 y 60 s, cuando la medida se realiza durante 60 segundos, y entre 28 y 30 s, cuando la medida es de 30 segundos)

3.3.3. Ensayo enzimático

La determinación del glifosato se llevó a cabo mediante inhibición amperométrica de la enzima peroxidasa de rábano picante utilizando como sustrato el 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB).

Para ello en primer lugar, se depositó una gota de 20 μ L de una disolución de glifosato (en disolución tampón fosfato 0,1 M pH = 7) o tampón en el caso de los blancos. Seguidamente, se adicionó un volumen (2 ó 10 μ L) de una disolución de peroxidasa de rábano picante de una concentración determinada (0,25; 5 ó 25 U·mL⁻¹) (en disolución tampón fosfato 0,1 M pH = 7), y se esperó un tiempo de entre 5 y 12 minutos, dependiendo del ensayo, para que se produjera la inhibición. Luego, se depositó 20 μ L de la disolución de TMB comercial sin diluir y se registró la medida por cronoamperometría (Figura 3.6). La señal que se integra, según se indica en la sección 3.3.2, es la corriente de reducción que por convenio tiene signo negativo.

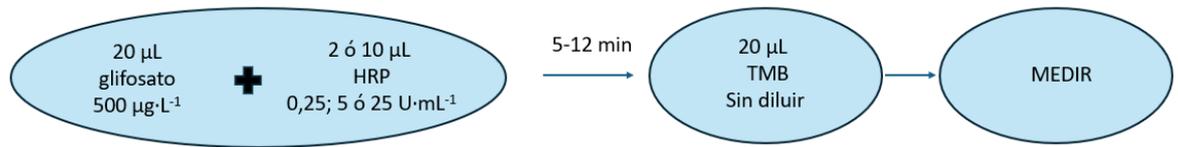


Figura 3.6. Esquema del procedimiento de ensayo enzimático.

4. Resultados

4.1-COMPORTAMIENTO ELECTROQUÍMICO DEL GLIFOSATO SOBRE ELECTRODOS DE ORO

Aunque los electrodos de carbono son los más comunes, para la detección electroquímica del glifosato de manera directa se utilizan normalmente electrodos de oro (Noori et al., 2018), ya que estos se pueden utilizar sin necesidad de ninguna modificación, mientras que en el caso de los electrodos de carbono es necesario realizar modificaciones sobre el electrodo de trabajo para poder detectar el glifosato. (Pintado et al., 2012)

En la Figura 4.1 se muestra la voltamperometría cíclica de una disolución de glifosato ($500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) en una disolución reguladora de fosfato $0,1 \text{ M}$ con $\text{pH } 7,0$ registrada utilizando electrodos serigrafiados de oro de la casa comercial Metrohm Dropsens (ref. 220 AT). Como se puede observar, en este electrodo, el glifosato presenta un proceso de reducción, no muy definido a un potencial de $0,78 \text{ V}$ con una intensidad de $-4,48 \mu\text{A}$. Este comportamiento está de acuerdo con el reportado en la bibliografía por (Noori et al., 2018), el cual utiliza los mismos electrodos. Además, también se puede observar un pico de oxidación muy bien definido y con una gran intensidad, a un potencial $1,04 \text{ V}$ con intensidad $102,3 \mu\text{A}$.

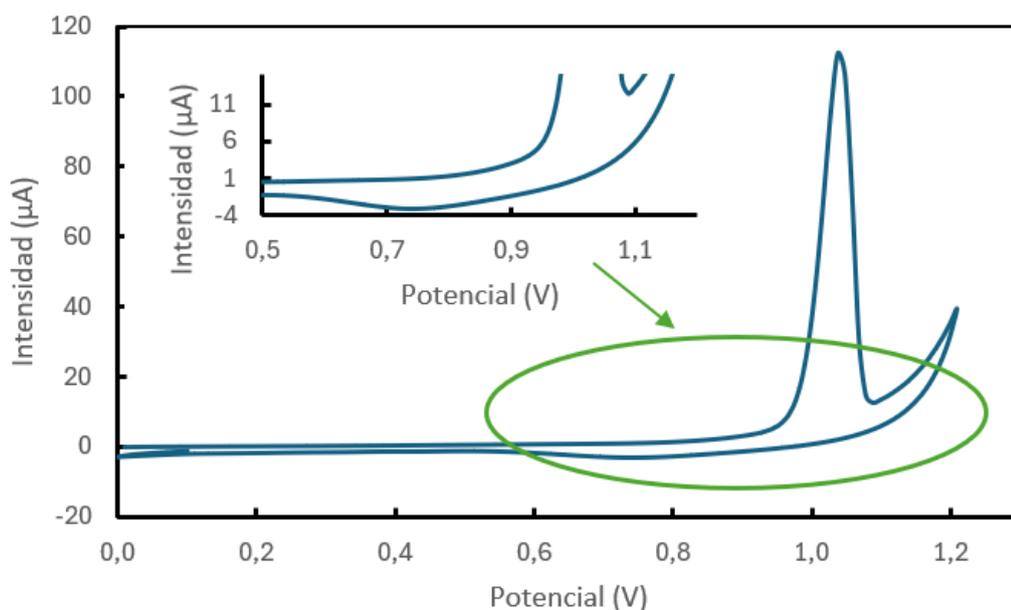


Figura 4.1. Voltamperograma cíclico registrado en disolución de glifosato $500 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ tampón fosfato $0,1 \text{ M}$ con $\text{pH} = 7,0$, sobre un electrodo serigrafado de oro de la casa comercial Metrohm Dropsens (ref. 220 AT). Parámetros instrumentales: barrido de potencial desde 0 hasta $1,2 \text{ V}$; velocidad de barrido $0,05 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$; potencial de paso $0,01 \text{ V}$. En el *inset* se amplía la región entre $0,5 \text{ V}$ y $1,1 \text{ V}$ donde se puede observar el pico de reducción del glifosato a un potencial de $0,78 \text{ V}$.

4.2-CALIBRADO DEL GLIFOSATO EN ELECTRODOS DE ORO

Tomando como señal analítica la intensidad de corriente del pico de oxidación, se estudió su relación con la concentración de glifosato. Para ello, se midieron concentraciones crecientes de glifosato entre $50\text{-}1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en tampón fosfato $0,1 \text{ M}$ $\text{pH} 7,0$ mediante, voltamperometría cíclica utilizando electrodos serigrafados de oro de Metrohm Dropsens.

En la Figura 4.2 se puede observar cómo la intensidad del pico de oxidación (a un potencial de 1,03 V aproximadamente) aumenta con la concentración de glifosato.

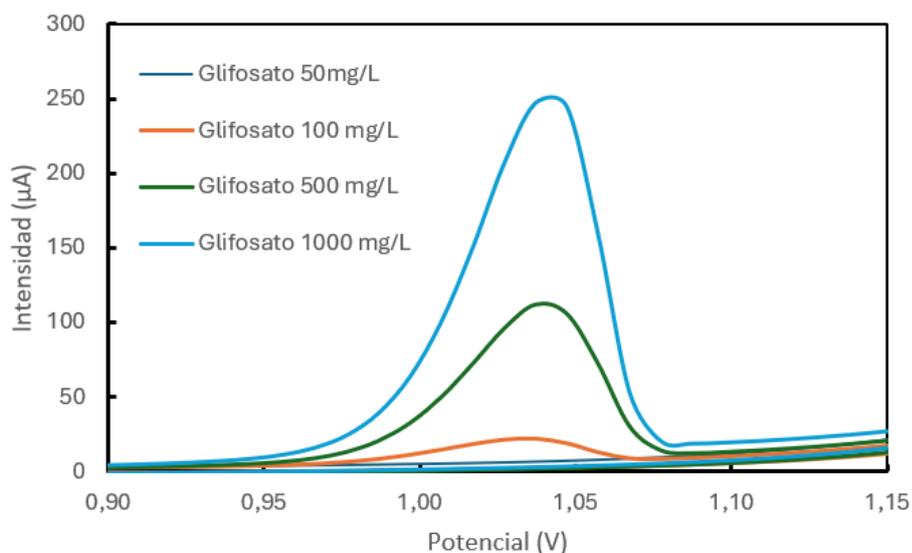


Figura 4.2. Voltamperogramas cíclicos registrados en las disoluciones de glifosato en una disolución reguladora de fosfato 0,1 M pH = 7,0, sobre un electrodo de oro serigrafiado de la casa comercial Metrohm Dropsens (ref. 220 AT). Parámetros instrumentales: barrido de al desde 0 hasta 1,2 V; velocidad de barrido $0,05 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$; potencial de paso 0,01 V.

Tomando como señal analítica la intensidad de corriente de ese pico de oxidación, se puede obtener el siguiente calibrado de glifosato (Figura 4.3) con una sensibilidad de $0,242 \mu\text{A} / \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

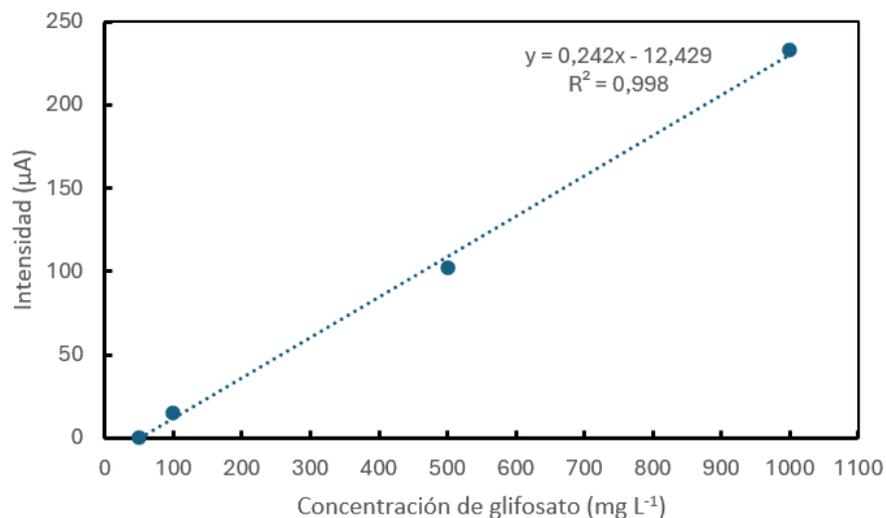


Figura 4.3. Curva de calibrado de las concentraciones de glifosato entre 50 y 1000 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en disolución reguladora de fosfato 0,1 M pH = 7,0, sobre un electrodo de oro serigrafiado de la casa comercial Metrohm Dropsens (ref. 220 AT).

Como se puede deducir con este calibrado, el glifosato se puede cuantificar directamente sobre electrodos de oro sin necesidad de modificarlos con un elemento de reconocimiento. Sin embargo, la medida obtenida no sería selectiva y cualquier sustancia presente en la muestra objeto de estudio es susceptible de ser oxidada, lo que puede producir una señal a ese potencial que provocaría una interferencia en los resultados obtenidos. Por esta razón, en este trabajo se ha planteado hacer un biosensor utilizando la enzima HRP para aumentar la sensibilidad y especificidad del análisis. Se trata de un sensor por inhibición enzimática que se encarga de medir la disminución de la actividad de una determinada enzima debido a la presencia de un inhibidor, el glifosato, produciendo una señal cuantificable inversamente proporcional a la concentración del inhibidor presente en la muestra.

4.3-COMPORTAMIENTO ELECTROQUÍMICO DEL TMB EN ELECTRODOS DE CARBONO

El 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) es el sustrato de la enzima peroxidasa de rábano picante (HRP) que se emplea habitualmente en ensayos bioanalíticos. Aunque normalmente el TMB se emplea como sustrato de la enzima en métodos ópticos, ya que al oxidarse con la enzima cambia de color, también se puede emplear en métodos electroquímicos por ser una especie electroactiva. (Zhang et al., 2020)

Por lo tanto, en primer lugar, se estudió el comportamiento electroquímico del TMB sobre electrodos de carbono, ya que son los que normalmente se emplean para esta especie, contando también con la ventaja de que son más baratos que los de oro. Para ello, se midió una disolución de TMB (dilución 1:10) en una disolución tampón fosfato 0,1 M pH = 7,0 mediante voltamperometría cíclica, utilizando como transductor electrodos serigrafiados de carbono de la casa comercial MicruX Technologies (ref. ED-S1PE-C10). Se obtuvo el siguiente voltamperograma (Figura 4.4), en el cual se pueden observar dos procesos electroquímicos: un pico de oxidación a un potencial de 0,22 V con una intensidad de 3,04 μ A y un pico de reducción a un potencial de 0,07 V con una intensidad de -2,27 μ A.

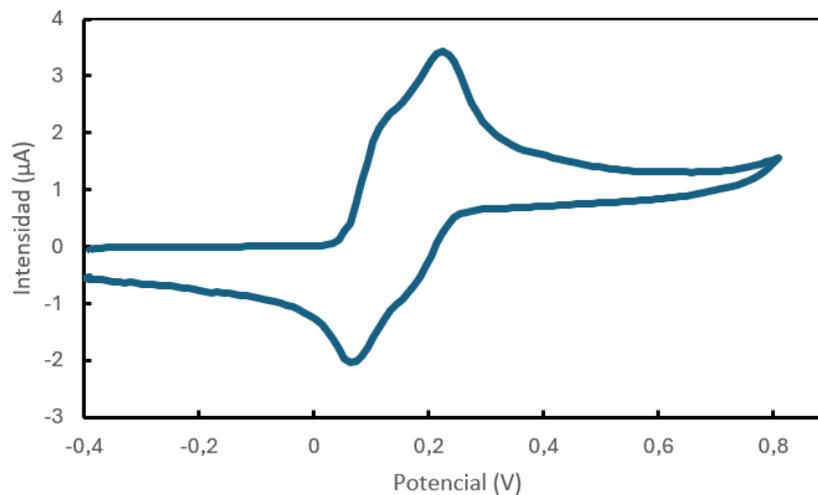


Figura 4.4. Voltamperograma cíclico registrado del 3,3',5,5'-tetrametilbencidina diluido 1:10 en medio de una disolución tampón de fosfato 0,1 M pH = 7,0, sobre electrodo de carbono serigrafiado de la casa comercial MicruX Technologies (ref. ED-S1PE-C10). Parámetros instrumentales: barrido desde -0,4 hasta 0,8 V; velocidad de barrido 0,05 V·s⁻¹; potencial de paso 0,01 V.

A partir de este voltamperograma se puede deducir el potencial adecuado para realizar las medidas en cronoamperometría. El potencial seleccionado es -0,1 V ya que es necesario un potencial que asegure la reducción del TMB (previamente oxidado enzimáticamente por la HRP). Este potencial se aplicó durante 30 segundos con el objetivo de que la intensidad de corriente se estabilizara. Por lo tanto, la señal analítica es la media de la intensidad de corriente registrada entre los segundos 28 y 30 al aplicar una cronoamperometría a un potencial de -0,1 V durante 30 segundos. En la Figura 4.5 se puede observar la forma de dicha cronoamperometría para una disolución de TMB. Cabe destacar que, todas las medidas realizadas en este trabajo para la cuantificación del glifosato fueron tomadas de este modo.

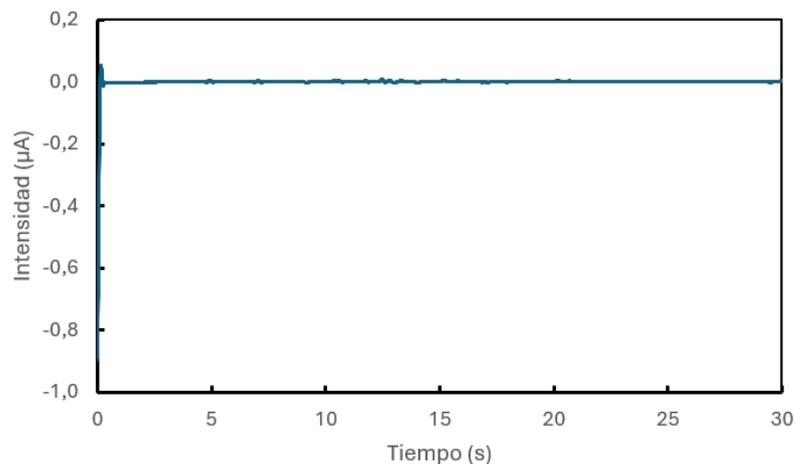


Figura 4.5. Cronoamperometría para 3,3',5,5'-tetrametilbencidina diluido 1:10 en tampón fosfato 0,1 M pH = 7,0, sobre electrodo de carbono serigrafiado de la casa comercial MicruX Technologies (ref. ED-S1PE-C10). Parámetros instrumentales: potencial aplicado -0,1 V; intervalo de tiempo 0,01 s; duración de 30 s.

4.4-ESTUDIO DE LA CONCENTRACIÓN DE LA ENZIMA

En los biosensores por inhibición enzimática es fundamental optimizar la concentración de la enzima. Para ello, se registraron cronoamperometrías (con un potencial fijado de -0,1 V) de una mezcla de TMB (sin diluir) a diferentes concentraciones de enzima en un rango desde $0,25 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ hasta $5,00 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ siguiendo el procedimiento explicado en la sección 3.3.3.

Como se puede ver en la Figura 4.6 se representan los cronoamperogramas obtenidos para las diferentes concentraciones de la enzima HRP, en la cual se puede

observar que cuanto mayor es la concentración de la enzima peroxidasa de rábano picante la intensidad de corriente aumenta en valor absoluto.

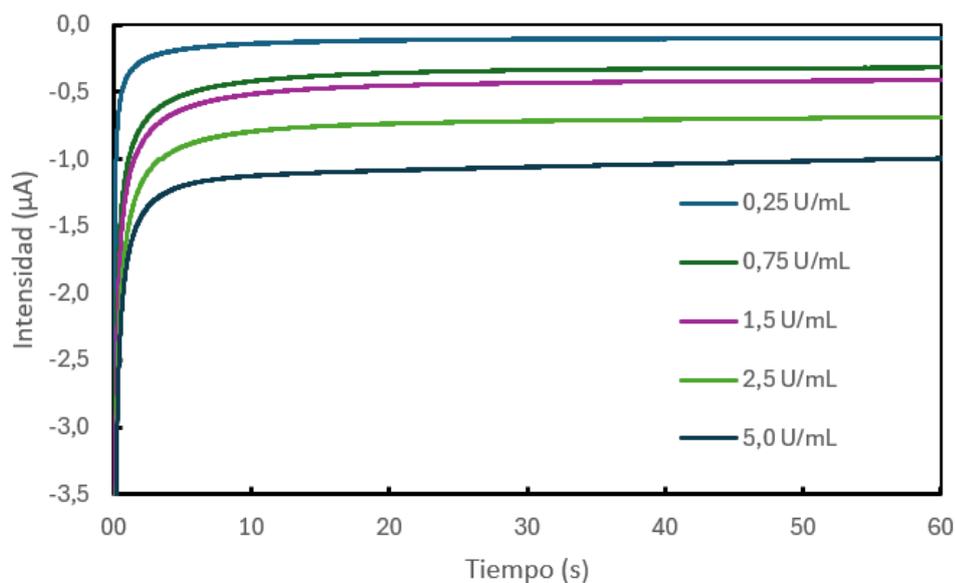


Figura 4.6. Cronoamperogramas registrados con diferentes concentraciones de enzima HRP tampón fosfato 0,1 M pH = 7,0, empleando como sustrato 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina sin diluir, sobre electrodo de carbono serigrafiado de la casa comercial MicruX Technologies (ref. ED-S1PE-C10). Parámetros instrumentales: potencial aplicado -0,1 V; intervalo de tiempo 0,01 s; duración de 100 s.

En la Figura 4.7, se puede observar la relación lineal entre la señal analítica (media de la intensidad de corriente en el intervalo 58-60 s) la concentración de la enzima HRP, de acuerdo con la ecuación (4.1):

$$y (\mu A) = -0,21 \cdot x (U \cdot L^{-1}) - 0,15(\mu A) \quad (4.1)$$

$$R^2 = 0,98$$

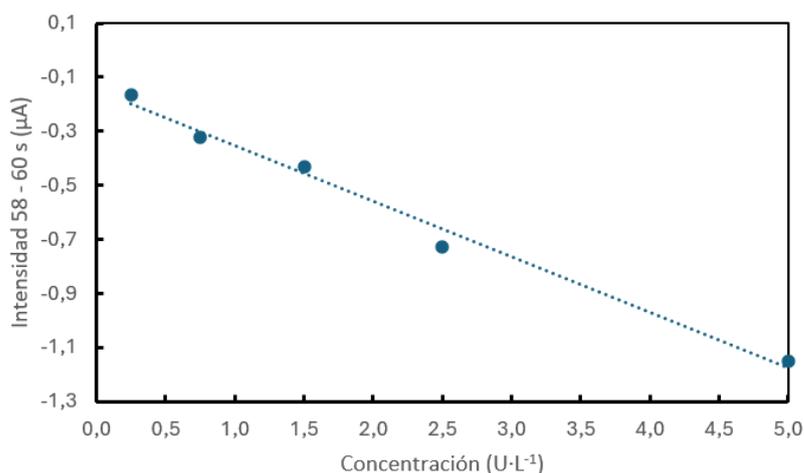


Figura 4.7. Relación lineal de la señal analítica con la concentración de la enzima HRP. Parámetros instrumentales: potencial aplicado -0,1 V; intervalo de tiempo 0,01 s; duración de 100 s.

4.5-EVALUACIÓN DE LA INHIBICIÓN DEL GLIFOSATO

Después de haber evaluado la relación lineal entre la señal analítica con la concentración de enzima, se procede a determinar la concentración de enzima necesaria para estudiar la inhibición del glifosato. Para llevar a cabo este análisis se utilizó cronoamperometría aplicando un potencial de -0,1 V.

Siguiendo el procedimiento seguido por (Moro et al., 2023), se depositó sobre el electrodo impreso de carbono MicruX Technologies (ref. ED-S1PE-C10) 20 µL de glifosato de 500 µg·L⁻¹. Seguidamente, se adicionó 2 µL de enzima peroxidasa de rábano picante con una concentración 25 U·mL⁻¹, y finalmente, 20 µL de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina. Los

cronoamperogramas obtenidos se recogen en la Figura 4.8. El valor obtenido para la señal analítica blanco fue $-0,32 \mu\text{A}$, mientras que para la disolución de glifosato fue de $-0,25 \mu\text{A}$.

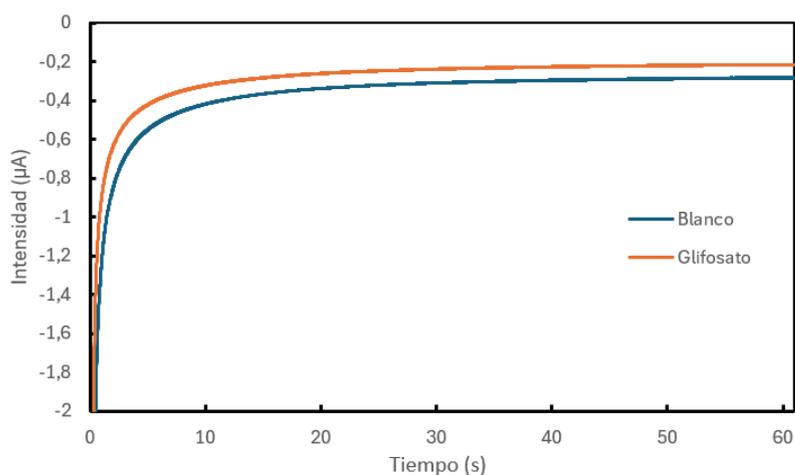


Figura 4.8. Cronoamperogramas registrados en disoluciones de glifosato de diferente concentración (0 y $500 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) en tampón fosfato $0,1 \text{ M}$ $\text{pH} = 7,0$, añadiendo $10 \mu\text{L}$ de HRP ($25 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$) con un tiempo de reacción de 12 min , empleando como sustrato TMB sin diluir sobre electrodo de carbono serigrafiado de la casa MicruX Technologies (ref. ED-S1PE-C10). Parámetros instrumentales: potencial aplicado $-0,1 \text{ V}$; intervalo de tiempo $0,01 \text{ s}$; duración de 60 s .

Teniendo en cuenta que el porcentaje de inhibición para este método se calcula según la Ecuación 4.2, en este caso se obtuvo un porcentaje de inhibición $23,3\%$.

$$I\% = \frac{I_0 - I_i}{I_0} * 100 \quad (4.2)$$

Sin embargo, como se obtuvo un porcentaje de inhibición muy bajo comparado con la referencia bibliográfica (Moro et al., 2023), se probó a cambiar el volumen de disolución por si pudiera deberse a la reproducibilidad del pipeteo, ya que, es difícil pipetear 2 μL . Aunque se cambió el volumen de la disolución de enzima peroxidasa de rábano picante por 10 μL de 5 $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$ se mantuvo la concentración de enzima que se añade. Se volvió a medir por cronoamperometría y se obtuvo la Figura I del Anexo. El valor para la intensidad de corriente del blanco fue $-0,39 \mu\text{A}$ y para la disolución de glifosato de $-0,13 \mu\text{A}$. En este caso, el porcentaje de inhibición obtenido fue del 66,9 %, que comparándolo con el caso anterior, en el que se emplearon 2 μL de 25 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ de HRP, es casi tres veces mayor. Esto puede ser debido a que se aumenta el volumen final de reacción aumenta lo cual es favorable porque se cubre de forma más homogénea y mejor la superficie del electrodo.

Debido a que seguía siendo baja la inhibición para una concentración tan alta de glifosato, se probó a mantener el volumen de encima HRP (10 μL), modificando su concentración a 0,25 $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$. En este caso los cronoamperogramas obtenidos (Figura II en Anexo), mostraron un valor de intensidad de corriente para el blanco de $-0,52 \mu\text{A}$ y para la disolución de glifosato de $-0,32 \mu\text{A}$ lo que implica una inhibición del 38,4 %.

A continuación, en la siguiente Tabla 4.1 se recoge un resumen que relaciona la variación de la cantidad de enzima HRP con el porcentaje de inhibición obtenido. Se puede observar que la cantidad de enzima que presenta mayor inhibición se obtiene añadiendo 10 μL de 5 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ de HRP. Además, para mejor esta inhibición se decidió evaluar diferentes tiempos de incubación, como se recoge en la sección 4.6.

Variación cantidad de enzima	% Inhibición
------------------------------	--------------

10 μL de 25 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ de HRP	23,3 %
10 μL de 5 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ de HRP	66,9 %
10 μL de 0,25 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ de HRP	38,4 %

Tabla 4.1. Resumen de la relación entre la variación de la cantidad de enzima HRP con el porcentaje de inhibición obtenido.

4.6 - ESTUDIO DEL TIEMPO DE REACCIÓN ENZIMÁTICA

Otro factor para tener en cuenta en los ensayos enzimáticos es el tiempo de reacción entre la enzima y el inhibidor, ya que es necesario que sea suficiente para que se produzca la inhibición.

En los análisis electroquímicos por inhibición enzimática es necesario dejar en contacto un tiempo determinado la disolución de glifosato ($500 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) con la enzima HRP para que se produzca la inhibición. Inicialmente se probó a dejarlo 5 minutos y se obtuvo un porcentaje de inhibición de 13,2 % (Tabla 4.2). Pero posteriormente, se probó a dejar ambas disoluciones en contacto durante 12 minutos, obteniendo un porcentaje de inhibición de 26,5% (Tabla 4.2). Por lo tanto, se decidió dejarlo 12 minutos, debido a que se obtiene una inhibición mayor. En el Anexo 6.2 (Figuras III y IV) se pueden observar los cronoamperogramas que se obtuvieron.

	Intensidad (μA)	% Inhibición
--	------------------------------	--------------

Blanco	-0,3188	13,2
Glifosato (500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	-0,2767	

Tabla 4.2. Resultados estudio del tiempo de reacción enzimática a 5 minutos.

	Intensidad (μA)	% Inhibición
Blanco	-0,8561	26,5
Glifosato (500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	-0,6280	

Tabla 4.3. Resultados estudio del tiempo de reacción enzimática a 12 minutos.

Como se puede observar en las tablas, en todas las situaciones existía inhibición, pero no lo suficientemente alta para las concentraciones en las que se estaba trabajando. Por lo que sería necesario realizar más estudios para la optimización de los tiempos de inhibición y la concentración de HRP.

4.7-EVALUACIÓN DE UNA CELDA ELECTROQUÍMICA BASADA EN PAPEL

El objetivo final de este trabajo era el diseño de un dispositivo electroquímico de bajo coste y portátil que permitiese realizar análisis descentralizados, es decir, fuera del laboratorio evitando así el transporte de las muestras al laboratorio, y reduciendo, por tanto, el tiempo y coste de los análisis. Para ello, se plantea el uso de materiales de bajo coste como el papel. En la sección 3.3.1 se explica detalladamente el proceso de fabricación de las celdas electroquímicas basadas en papel, en el que una de las etapas consiste en

pintar a mano con lápices de grafito para crear el electrodo de trabajo. La composición de los lápices de grafito es fundamentalmente grafito y arcilla. En este trabajo, se probaron tres tipos de lápices con diferentes grados de dureza, siendo todos ellos tipo B, ya que, tienen mayor proporción de grafito que de arcilla, que los que tienen en su etiqueta la H.

Para evaluar la funcionalidad de esta celda, se midió una disolución de 5mM de $\text{Fe}^{3-/4-}$ mediante voltamperometría cíclica utilizando celdas con electrodos de papel preparados utilizando diferentes lápices (Figura 4.9).

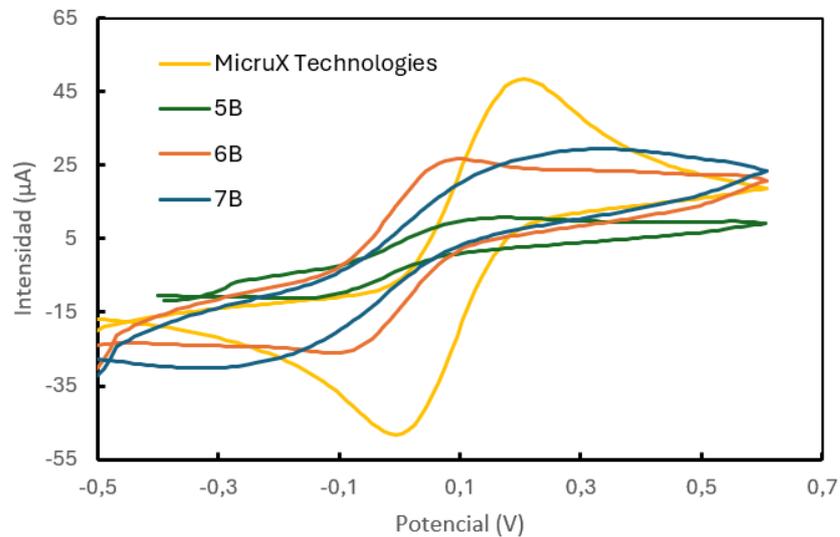


Figura 4.9. Voltamperogramas cíclicos registrados en una disolución de 5mM de $Fe^{3-/4-}$ empleando electrodos de carbono serigrafiados de la casa MicruX Technologies (ref. ED-S1PE-C10) y celdas electroquímicas de papel con electrodos de trabajo preparados con lápices de durezas 5B, 6B y 7B. Parámetros instrumentales: barrido de potencial desde -0,4 hasta 0,6 V para 5B y desde -0,6 hasta 0,6 V para electrodos serigrafiados, 6B y 7B; velocidad de barrido $0,05 V \cdot s^{-1}$; potencial de paso 0,01 V.

Como se puede observar, para los tres lápices se obtuvieron CVs con un pico de oxidación y uno de reducción (Tabla 4.4), siguiendo el comportamiento típico de esta especie redox en electrodos de carbono (Koç et al., 2021). Comparando los resultados obtenidos con los electrodos basados en papel con los obtenidos con electrodos de carbono serigrafiados comerciales (de la casa MicruX Technologies ref. ED-S1PE-C10), se observa que en todos sale una intensidad de pico menor. En el caso del lápiz de dureza 7B se obtuvieron picos muy anchos y poco definidos, por lo que se descarta.

Por otro lado, aunque los potenciales obtenidos con las celdas basadas en papel son diferentes en comparación con los obtenidos empleando electrodos serigrafiados, esto es normal puesto que el electrodo de referencia es diferente. Sin embargo, se puede observar

cómo los potenciales obtenidos con las celdas creadas utilizando los lápices 5B y 6B son bastante parecidos entre sí, mientras que para el lápiz de dureza 7B son mucho más diferentes debido a la anchura de los picos registrados.

	Potencial anódico (V)	Intensidad de pico anódica (μA)	Potencial catódico (V)	Intensidad de pico catódica (μA)
MicruX Technologies	0,189	47,79	-0,004	-51,87
5B	0,104	8,23	-0,128	-6,35
6B	0,065	23,98	-0,076	-20,47
7B	0,207	19,25	-0,207	-17,77

Tabla 4.4. Potenciales e intensidades de los picos anódicos y catódicos empleando lápices de durezas 5B, 6B y 7B y electrodos serigrafiados de la casa comercial MicruX Technologies (ref. ED-S1PE-C10).

Dado que los que mejores resultados han mostrado son los lápices 5B y 6B, se evaluó la reproducibilidad de tres celdas diferentes creadas con cada uno de estos lápices. En la Figura 4.10, se pueden observar las tres réplicas para los lápices de durezas 5B y 6B, respectivamente. Aunque la intensidad de pico obtenida con los lápices de dureza 6B es más alta que la intensidad obtenida con lápices de dureza 5B, estas últimas son mucho más reproducibles que las primeras. Los lápices de dureza 5B presentan unos valores de RSD de 25,3% y 16,2% para las intensidades del pico de oxidación y de reducción respectivamente, mientras que para los lápices de 6B se obtienen unos valores de RSD 63,7 % y 30,7% para

las intensidades de pico de oxidación y de reducción, respectivamente. Por lo que, como trabajo futuro, sería necesario mejorar las celdas electroquímicas creadas utilizando ambos lápices con el fin de o bien mejorar la intensidad de corriente en el caso de los lápices 5B, o mejorar la reproducibilidad para las celdas creadas con los lápices 6B.

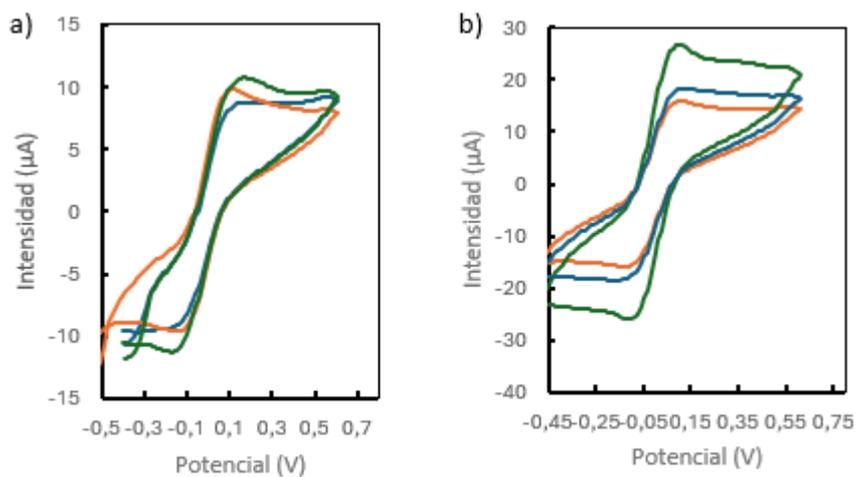


Figura 4.10. Voltamperogramas cíclicos registrados empleando celda electroquímica de papel con electrodo serigrafiado con lápices de dureza a) 5B b) 6B. Parámetros instrumentales: barrido de potencial desde -0,4 hasta 0,6 V; velocidad de barrido 0,05 V·s⁻¹; potencial de paso 0,01 V.

5. Conclusiones y trabajos futuros

Las conclusiones más destacadas que se han obtenido después de realizar este trabajo se resumen a continuación:

- 1- Se estudió el comportamiento del glifosato en electrodos serigrafiados de oro y se observó que es electroactivo, lo que permitió realizar un calibrado tomando como señal analítica la intensidad del pico anódico.
- 2- Se evaluó la concentración de la enzima HRP utilizando como sustrato TMB y midiendo, por cronoamperometría, la reducción de este una vez oxidado enzimáticamente.
- 3- Se trabajó en el desarrollo de un sensor de glifosato basado en la inhibición que este produce sobre la enzima HRP. Debido a que el tiempo de inhibición y la concentración de la enzima utilizada son factores claves, se evaluó su efecto sobre la inhibición. Aunque en todos los casos estudiados se encontró un efecto inhibidor del glifosato, es necesario realizar más para aumentar dicha inhibición y mejorar así la sensibilidad del sensor.
- 4- Se evaluó la fabricación de celdas electroquímicas basadas en papel utilizando electrodos de trabajo pintados a mano con lápices de grafito. Se probaron lápices con diferentes durezas (5B,6B,7B), observando que los mejores resultados en cuanto a reproducibilidad e intensidad de corriente fueron obtenidos con los lápices 5B y 6B, respectivamente. Aunque es necesario realizar más estudios, los resultados son prometedores para el uso de este tipo de celda

como transductor en un biosensor de glifosato. Este diseño de celda electroquímica permitirá desarrollar un dispositivo portátil y sencillo de manejar para la determinación de glifosato.

Como trabajos futuros en este estudio se propone:

- 1- Mejorar la sensibilidad del sensor de glifosato, realizando más estudios de optimización de factores clave como la concentración de enzima y sustrato, así como tiempos de inhibición. Una posible alternativa sería evaluar la tirosinasa como enzima a ser inhibida por el glifosato, ya que está reportado en bibliografía que su actividad puede ser inhibida por este pesticida.
- 2- Trabajar en la optimización de la celda basada en papel. Para ello sería necesario mejorar la intensidad de corriente en el caso de la celda creada con los lápices de 5B, para lo que podría evaluarse preparar un WE con mayores áreas.
- 3- También se podría trabajar en la mejora de la reproducibilidad para los lápices de dureza 6B, lo que podría hacerse optimizando el proceso pintado con el lápiz.
- 4- Finalmente, se plantearía utilizar la celda basada en papel como transductor para el biosensor por inhibición para el glifosato.

6. Anexos

6.1 CRONOAMPEROGRAMAS DEL ESTUDIO DE LA INHIBICIÓN DEL GLIFOSATO

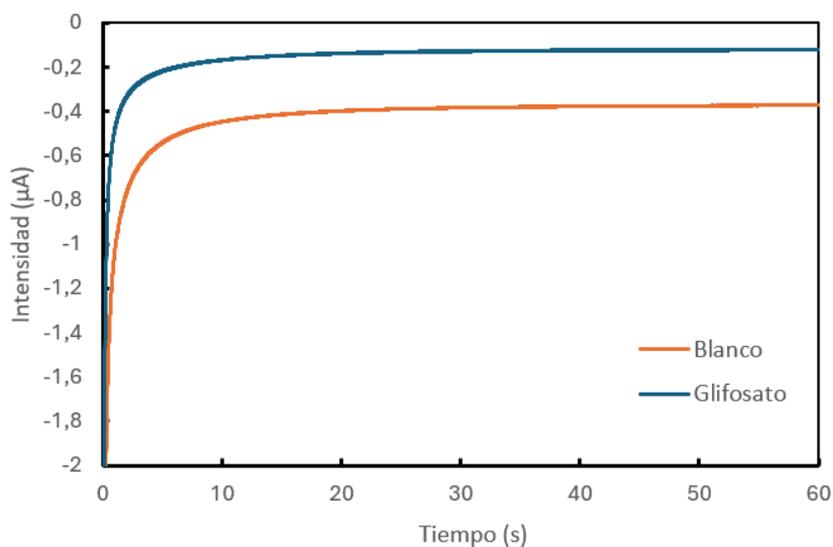


Figura I. Cronoamperogramas registrados en una disolución de glifosato ($500 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) en tampón fosfato $0,1 \text{ M}$ $\text{pH} = 7,0$, añadiendo $10 \mu\text{L}$ de HRP ($5 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$) con un tiempo de reacción de 12 min , empleando como sustrato 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina sin diluir y sobre electrodo de carbono serigrafiado de la casa comercial MicruX Technologies (ref. ED-S1PE-C10). Parámetros instrumentales: potencial aplicado $-0,1 \text{ V}$; intervalo de tiempo $0,01 \text{ s}$; duración de 60 s .

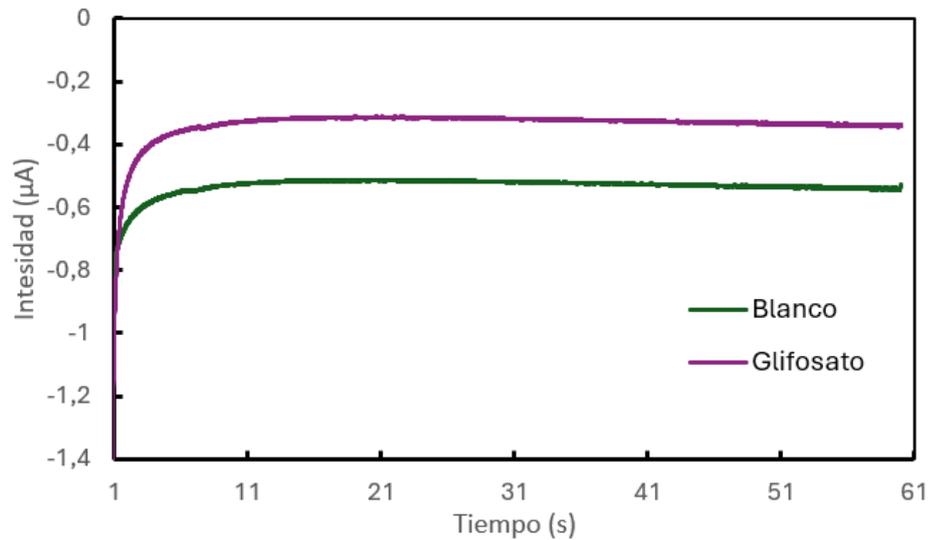


Figura II. Cronoamperogramas registrados en una disolución de glifosato ($500 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) en tampón fosfato $0,1 \text{ M}$ $\text{pH} = 7,0$, añadiendo $10 \mu\text{L}$ de HRP ($0,25 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$) con un tiempo de reacción de 12 min , empleando como sustrato TMB sin diluir sobre electrodo de carbono serigrafiado de la casa comercial MicruX Technologies (ref ED-S1PE-C10). Parámetros instrumentales: potencial aplicado $-0,1 \text{ V}$; intervalo de tiempo $0,01 \text{ s}$; duración de 60 s .

6.2 CRONOAMPEROGRAMAS DEL ESTUDIO DEL TIEMPO DE REACCIÓN ENZIMÁTICA

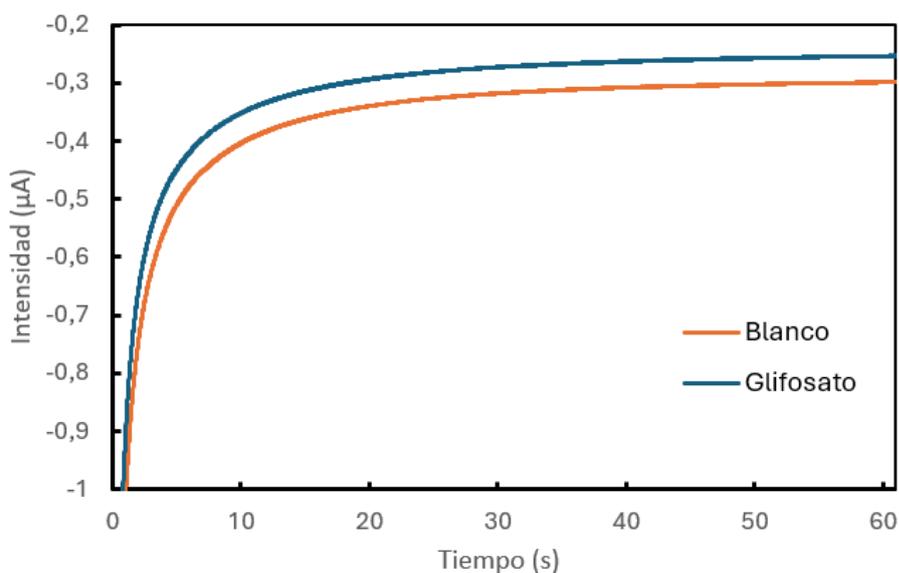


Figura III. Cronoamperogramas registrados en una disolución de glifosato $500 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ en medio de una disolución tampón de fosfato $0,1 \text{ M}$ $\text{pH}=7,0$, añadiendo $10 \mu\text{L}$ de HRP ($5 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$) con un tiempo de reacción de 5 min , empleando como sustrato 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina sin diluir y sobre electrodo de carbono serigrafiado de la casa comercial Micrux Technologies (ref. ED-S1PE-C10). Parámetros instrumentales: potencial aplicado $-0,1 \text{ V}$; intervalo de tiempo $0,01 \text{ s}$; duración de 60 s .

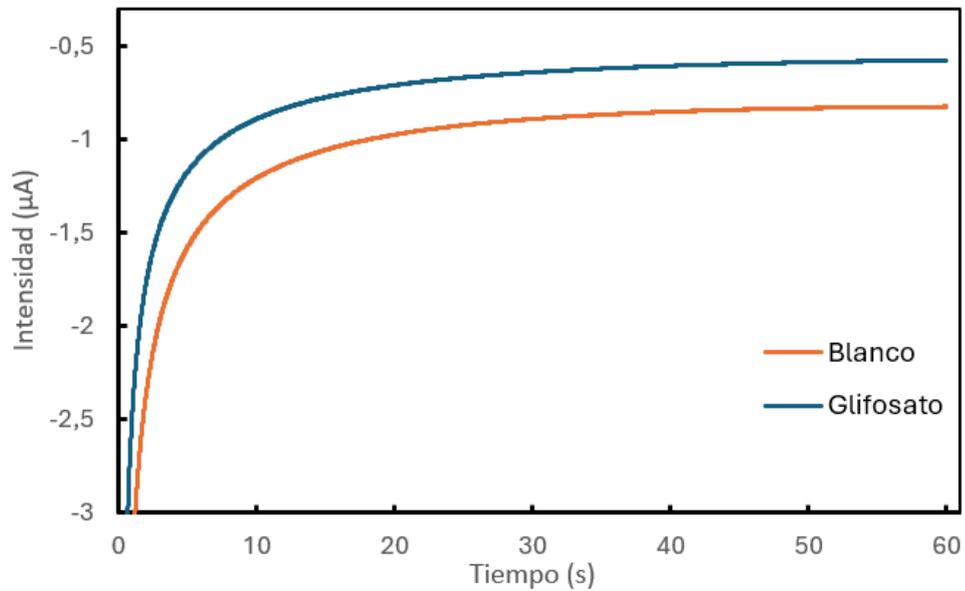


Figura IV. Cronoamperogramas registrados en una disolución de glifosato ($500 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) tampón fosfato $0,1 \text{ M}$ $\text{pH}=7,0$, añadiendo $10 \mu\text{L}$ de HRP ($5 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$) con un tiempo de reacción de 12 min , empleando como sustrato TMB sin diluir y sobre electrodo de carbono serigrafiado de la casa comercial Micrux Technologies (ref. ED-S1PE-C10). Parámetros instrumentales: potencial aplicado $-0,1 \text{ V}$; intervalo de tiempo $0,01 \text{ s}$; duración de 60 s .

7. Bibliografía

- Ahmed, M. B., Zhou, J. L., Ngo, H. H., Guo, W., Thomaidis, N. S., & Xu, J. (2017). Progress in the biological and chemical treatment technologies for emerging contaminant removal from wastewater: A critical review. *Journal of Hazardous Materials*.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.04.045>
- Alahmad, W., Cetinkaya, A., Kaya, S. I., Varanusupakul, P., & Ozkan, S. A. (2023). Electrochemical paper-based analytical devices for environmental analysis: Current trends and perspectives. In *Trends in Environmental Analytical Chemistry* (Vol. 40). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.teac.2023.e00220>
- Alonso-Lomillo, M. A., Domínguez-Renedo, O., & Arcos-Martínez, M. J. (2010). Screen-printed biosensors in microbiology; A review. In *Talanta* (Vol. 82). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2010.08.033>
- Amine, A., Arduini, F., Moscone, D., & Palleschi, G. (2016). Recent advances in biosensors based on enzyme inhibition. *Biosensors and Bioelectronics*.
<https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.07.010>
- Amor-Gutiérrez, O., Costa Rama, E., Costa-García, A., & Fernández-Abedul, M. T. (2017). Paper-based maskless enzymatic sensor for glucose determination combining ink and wire electrodes. *Biosensors and Bioelectronics*.
<https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.11.008>
- Bai, S. H., & Ogbourne, S. M. (2016). Glyphosate: environmental contamination, toxicity and potential risks to human health via food contamination. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(19), 18988–19001. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7425-3>

-
- Bard, A. J., & Faulkner, L. R. (1980). *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*. Wiley. <https://books.google.es/books?id=p5tqAAAAMAAJ>
- Bilal, M., Adeel, M., Rasheed, T., Zhao, Y., & Iqbal, H. M. N. (2019). Emerging contaminants of high concern and their enzyme-assisted biodegradation – A review. In *Environment International* (Vol. 124). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.01.011>
- Cano Luna, Manuel. (2009). *Diseño y aplicación de sensores electroquímicos basados en moléculas orgánicas conductoras*. Servicio de Publicaciones, Universidad de Córdoba.
- Chang, V. C., Ospina, M., Xie, S., Andreotti, G., Parks, C. G., Liu, D., Madrigal, J. M., Ward, M. H., Rothman, N., Silverman, D. T., Sandler, D. P., Friesen, M. C., Beane Freeman, L. E., Calafat, A. M., & Hofmann, J. N. (2024). Urinary biomonitoring of glyphosate exposure among male farmers and nonfarmers in the Biomarkers of Exposure and Effect in Agriculture (BEEA) study. *Environment International*. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2024.108644>
- Costa-Rama, E., & Fernández-Abedul, M. T. (2021). Paper-Based Screen-Printed Electrodes: A New Generation of Low-Cost Electroanalytical Platforms. In *Biosensors* (Vol. 11). <https://doi.org/10.3390/bios11020051>
- Du, J., Cui, C., Chen, H., Liu, H., Zhang, X., & Zhang, W. (2024). Graphene field-effect transistor biosensors for detection of heavy metal ions. In *Journal of Food Measurement and Characterization*. Springer. <https://doi.org/10.1007/s11694-024-02598-4>
- En, E., Residuales, A., Microextracción, P., Peña-Álvarez, A., & Castillo-Alanís, A. (2015). IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE CONTAMINANTES DE MASAS (MEFS-CG-EM). In *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas* (Vol. 18).
- Hara, T. O., & Singh, B. (2021). Electrochemical Biosensors for Detection of Pesticides and Heavy Metal Toxicants in Water: Recent Trends and Progress. In *ACS Environmental*

Science and Technology Water (Vol. 1). American Chemical Society.
<https://doi.org/10.1021/acsestwater.0c00125>

Kergaravat, S. V., Fabiano, S. N., Soutullo, A. R., & Hernández, S. R. (2021a). Comparison of the performance analytical of two glyphosate electrochemical screening methods based on peroxidase enzyme inhibition. *Microchemical Journal*, 160.
<https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105654>

Koç, Y., Morali, U., Erol, S., & Avcı, H. (2021). Investigation of electrochemical behavior of potassium ferricyanide/ferrocyanide redox probes on screen printed carbon electrode through cyclic voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy. *Turkish Journal of Chemistry*. <https://doi.org/10.3906/kim-2105-55>

Kroon, F. J., Berry, K. L. E., Brinkman, D. L., Kookana, R., Leusch, F. D. L., Melvin, S. D., Neale, P. A., Negri, A. P., Puotinen, M., Tsang, J. J., van de Merwe, J. P., & Williams, M. (2020). Sources, presence and potential effects of contaminants of emerging concern in the marine environments of the Great Barrier Reef and Torres Strait, Australia. In *Science of the Total Environment* (Vol. 719). Elsevier B.V.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135140>

Michael Keusgen. (n.d.). *Biosensors: new approaches in drug discovery*. Retrieved June 12, 2024, from <https://link.springer.com/article/10.1007/s00114-002-0358-3>

Moro, G., Fama, F., Colozza, N., Gambaro, A., Bassanello, M., Arduini, F., & Zanardi, C. (2023). A paper-based device for glyphosate electrochemical detection in human urine: A case study to demonstrate how the properties of the paper can solve analytical issues. *Green Analytical Chemistry*, 7. <https://doi.org/10.1016/j.greeac.2023.100076>

Noori, J. S., Dimaki, M., Mortensen, J., & Svendsen, W. E. (2018). Detection of glyphosate in drinking water: A fast and direct detection method without sample pretreatment. *Sensors (Switzerland)*, 18(9). <https://doi.org/10.3390/s18092961>

-
- Paimard, G., Ghasali, E., & Baeza, M. (2023). Screen-Printed Electrodes: Fabrication, Modification, and Biosensing Applications. In *Chemosensors* (Vol. 11). <https://doi.org/10.3390/chemosensors11020113>
- Pérez-Fernández, B., Costa-García, A., & De La Escosura- Muñiz, A. (2020). Electrochemical (bio)sensors for pesticides detection using screen-printed electrodes. In *Biosensors* (Vol. 10). <https://doi.org/10.3390/bios10040032>
- Petrović, M., Gonzalez, S., & Barceló, D. (2003). Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 22(10), 685–696. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(03\)01105-1](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(03)01105-1)
- Pintado, S., Montoya, M. R., Rodríguez-Amaro, R., Mayén, M., Miguel, J., & Mellado, R. (2012). Electrochemical Determination of Glyphosate in Waters Using Electrogenerated Copper Ions. In *Int. J. Electrochem. Sci* (Vol. 7). www.electrochemsci.org
- Rebelo, P., Costa-Rama, E., Seguro, I., Pacheco, J. G., Nouws, H. P. A., Cordeiro, M. N. D. S., & Delerue-Matos, C. (2021). Molecularly imprinted polymer-based electrochemical sensors for environmental analysis. In *Biosensors and Bioelectronics* (Vol. 172). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112719>
- Sánchez-Paniagua López, Marta., López Ruiz, B., & López Cabarcos, E. (2008). *Biosensores amperométricos de tirosinasa para la determinación de compuestos fenólicos en medios acuosos y no acuosos*. Universidad Complutense de Madrid, Servicio de Publicaciones.
- Shahbaz, A., Hussain, N., Intisar, A., Bilal, M., & Iqbal, H. M. N. (2022). Immobilized Enzymes-Based Biosensing Cues for Strengthening Biocatalysis and Biorecognition. *Catalysis Letters*, 152(9), 2637–2649. <https://doi.org/10.1007/s10562-021-03866-4>

-
- Silva-Neto, H. A., de Lima, L. F., Rocha, D. S., Ataíde, V. N., Meloni, G. N., Moro, G., Raucci, A., Cinti, S., Paixão, T. R. L. C., de Araujo, W. R., & Coltro, W. K. T. (2024). Recent achievements of greenness metrics on paper-based electrochemical (bio) sensors for environmental and clinical analysis. In *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* (Vol. 174). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2024.117675>
- Sok, V., & Fragoso, A. (2019). Amperometric biosensor for glyphosate based on the inhibition of tyrosinase conjugated to carbon nano-onions in a chitosan matrix on a screen-printed electrode. *Microchimica Acta*, 186(8). <https://doi.org/10.1007/s00604-019-3672-6>
- Thévenot, D. R., Toth, K., Durst, R. A., Wilson, G. S., & Thévenot, D. R. (2001). Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. In *Biosensors & Bioelectronics* (Vol. 16). www.elsevier.com/locate/bios
- Vaghela, C., Kulkarni, M., Haram, S., Aiyer, R., & Karve, M. (2018). A novel inhibition based biosensor using urease nanoconjugate entrapped biocomposite membrane for potentiometric glyphosate detection. *International Journal of Biological Macromolecules*. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.11.136>
- Van Bruggen, A. H. C., He, M. M., Shin, K., Mai, V., Jeong, K. C., Finckh, M. R., & Morris, J. G. (2018). Environmental and health effects of the herbicide glyphosate. In *Science of the Total Environment* (Vols. 616–61). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.309>
- Zambrano-Intriago, L. A., Amorim, C. G., Rodríguez-Díaz, J. M., Araújo, A. N., & Montenegro, M. C. B. S. M. (2021). Challenges in the design of electrochemical sensor for glyphosate-based on new materials and biological recognition. In *Science of the Total Environment* (Vol. 793). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148496>

Zhang, X., Yang, Q., Lang, Y., Jiang, X., & Wu, P. (2020). Rationale of 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine as the Chromogenic Substrate in Colorimetric Analysis. *Analytical Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c02149>