



**DESARROLLO DE UN PROTOTIPO DE SENSOR MEDIADO POR NANOMATERIALES
PARA LA DETECCIÓN Y DETERMINACIÓN TEMPRANA DE RESIDUOS DE
PLAGUICIDAS EN ALIMENTOS**

Autores:

DAVID BAHAMÓN PINZÓN

CÓD. 1328041

STEVEN CALDERÓN HERNÁNDEZ

CÓD. 1329100

**Propuesta de trabajo de grado para optar al título de
Ingeniero de alimentos**

Directora:

DIANA CAROLINA VANEGAS, IA, PhD.

Co-Director:

OSCAR ANDRÉS LOAIZA FERNÁNDEZ, IQ, PhD.

Grupo de Investigación: BioNOVO

Universidad del Valle
Facultad de Ingeniería
Escuela de Ingeniería de Alimentos
Cali - Colombia
2018

AGRADECIMIENTOS

A nuestros padres y familiares, a nuestra directora Diana Carolina Vanegas Gamboa y al profesor Eric McLamore de la Universidad de la Florida y el proyecto de cooperación internacional “Rapid, low-cost nano-biosensors for developing risk analytical tools in rural Colombia” por la financiación de los equipos y materiales utilizados para el desarrollo de este proyecto, y a todas las personas que hicieron este trabajo posible.

CONTENIDO

Lista de Tablas.....	5
Lista de Figuras	5
Lista de Ecuaciones	6
Resumen.....	7
Abstract.....	7
1 Introducción.....	9
2 Problema de investigación	11
2.1 Planteamiento y formulación del problema	11
2.2 Justificación	13
2.3 Objetivos.....	14
3 Marco de referencia	15
3.1 Propiedades del analito	15
3.2 Técnicas de medición convencionales	15
3.3 Técnicas de medición emergentes	16
3.4 Sensores de transducción electroquímica	17
3.5 Biosensores mediados por nanomateriales	19
3.6 Biosensores para la detección de glifosato	20
4 Metodología.....	22
4.1 Ubicación.....	22
4.2 Materiales y reactivos	22
4.3 Fabricación del sensor	22
4.4 Caracterización electroquímica.....	24
4.5 Factor de reproducibilidad	25
4.6 Determinación del potencial de oxidorreducción	25
4.7 Curva de calibración.....	26
4.8 Prueba de concepto	27
4.9 Análisis estadístico	28
5 Resultados y discusión.....	29
5.1 Caracterización morfológica y electroquímica	29
5.2 Factor de reproducibilidad	34
5.3 Determinación del potencial de óxido reducción.....	34
5.4 Curva de calibración.....	35
5.5 Prueba de concepto	38
6 Costos del sensor.....	39
7 Conclusiones.....	41
8 Recomendaciones.....	42

9	Referencias bibliográficas.....	43
----------	--	-----------

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Concentración obtenida con aplicaciones de leche materna y leche materna contaminada.	38
Tabla 2. Costos relacionados con la fabricación del sensor.	39
Tabla 3. Costos del sensor.	39
Tabla 4. Comparación de costos del sensor.	40

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Molécula de a) glifosato y b) AMPA.	15
Figura 2. Diagrama de potencial	17
Figura 3. Diagrama de la forma de onda potencial usada en NPV.	17
Figura 4. (a) Diagrama de la forma de onda potencial usada en DPV. (b) Voltamograma diferencial de pulso	18
Figura 5. (a) Diagrama de la forma de onda usada en voltametría de barrido lineal (cíclico). (b) Voltamograma cíclico	18
Figura 6. Ejemplo de amperimetría utilizada para la detección de glucosa.	19
Figura 7. Estructuras con enlaces de carbono sp^2 . a) Fullerenos, b) Nano tubos de carbono de una sola pared, c) grafeno y d) grafito.	20
Figura 8. Partes de un sistema de tres electrodos.	23
Figura 9. Fabricación de un sensor con un sistema grabado de tres electrodos de grafeno. a) Diseño grabado en un pedazo de cinta Kapton, b) Aplicación de tinta de cloruro de plata en el electrodo de referencia, c) Aislante.	23
Figura 10. Voltamograma representativo de la técnica de voltametría cíclica en una solución 4,6 mM Fe(CN) $_6$ /1M KNO $_3$, con picos de óxido-reducción y el efecto de las diferentes velocidades de barrido de potencial sobre la corriente.	24
Figura 11. Correlación lineal representativa entre la corriente del pico de oxidación y la raíz cuadrada de la velocidad de barrido.	25
Figura 12. (a). Representación de una corrida en DPV con inyecciones de glifosato (a, 0.83 μ M, b, 1.66, c, 3.32, d, 4.97, e, 6.62, f, 8.26, g, 9.90 μ mol L $^{-1}$; (b). Curva de calibración del sensor.	26
Figura 13. Representación de una corrida cronoamperométrica con ampliación de un pulso.	27
Figura 14. Caracterización morfológica de los electrodos grabados con láser. (a) SEM de baja magnificación de los electrodos de grafeno. (b) SEM de alta resolución de los electrodos de grafeno funcionalizados con cobre.	29
Figura 15. Curvas representativas: voltamogramas obtenidos por voltametría cíclica en ferrocianuro de potasio, de los sensores con los siguientes tiempos de electrodeposición: a) 0 s, b) 3 s, c) 10 s, d) 30 s y e) 60 s. Velocidad de escaneo 100 mV/s.	30
Figura 16. Curvas representativas: voltamogramas obtenidos por voltametría cíclica de los sensores (a) horneados y (b) secados a temperatura ambiente. Velocidad de escaneo 100 mV/s.	31
Figura 17. (a) Voltamogramas representativos de la técnica de voltametría cíclica de los sensores fabricados, a diferentes velocidades de barrido. (b) Relación entre la corriente de los picos de reducción y la raíz cuadrada de la velocidad de barrido.	32
Figura 18. Comparación entre el área electroactiva de los sensores horneados (Hor), y secados a temperatura ambiente (Tamb), con diferentes tiempos de electrodeposición (0, 3 y 10 s).	33
Figura 19. Voltograma de diferencia de pulso en solución PBS (pH 7,4) para sensores: Sin electrodepositar en ausencia de glifosato (línea gris), Sin electrodepositar en presencia de glifosato	

(línea verde), electrodepositado a 3 s en ausencia de glifosato (línea azul), electrodepositado a 3 s en presencia de glifosato (línea marrón).	34
Figura 20. Voltagramas representativos de la técnica voltametría diferencial de pulsos de los sensores (a) sin electrodeposición y (b) con 3 segundos de electrodeposición.	35
Figura 21. Curva de calibración representativa del sensor obtenida con DPV.	36
Figura 22. (a) Respuesta de un sensor con la técnica cronoamperometría y (b) curva de calibración representativa de un sensor con 3 s de deposición de cobre.....	36
Figura 23. Comparación de la sensibilidad en sensores con tiempos de electrodeposición: 0, 3 y 10 s.	37
Figura 24. Regresión no lineal de la corriente de un pulso para determinar t_{95}	37

LISTA DE ECUACIONES

Ecuación 1. Modelo de Randles-Sevcik.....	24
Ecuación 2. Regresión no lineal para determinar el tiempo de respuesta.	27
Ecuación 3. Límite inferior de detección del sensor.	27
Ecuación 4. Concentración calculada a partir de la corriente.	28
Ecuación 5. Balance de materia de la aplicación de glifosato en una solución PBS.....	28
Ecuación 6. Determinación de la concentración de la solución	28

RESUMEN

El glifosato es el herbicida más usado en Colombia. En el Valle del Cauca se implementa para la erradicación de cultivos ilícitos y como madurante para aumentar el rendimiento de los cultivos de caña de azúcar. Sin embargo, el glifosato tiene un impacto directo en aguas, plantas y animales, además de ser un compuesto catalogado por la OMS como posiblemente cancerígeno en humanos. En este trabajo se muestra el desarrollo de un dispositivo de bajo costo para la detección de glifosato. La plataforma de sensado está basada en un arreglo amperométrico de tres electrodos (trabajo, referencia y auxiliar) obtenidos mediante la metodología de grafeno grabado con láser. El electrodo de trabajo fue funcionalizado con nanopartículas de cobre que imparten selectividad hacia el glifosato a partir de la afinidad entre el nanocobre y los compuestos organofosforados. El sensor desarrollado presenta un valor de sensibilidad de $6,8 \pm 0,5$ nA/uM, límite inferior de detección de $4,29 \pm 0,64$ μM, y tiempo de respuesta de 139 ± 59 s. Finalmente se realizaron pruebas de concepto en muestras de leche materna y agua destilada presuntamente contaminadas con glifosato, obteniéndose concentraciones de $4,05 \pm 0,15$ μM y $5,81 \pm 0,21$ μM, en leche materna, y resultados incoherentes para el agua destilada. Aunque el sensor desarrollado necesita ser mejorado en algunos aspectos, es la primera tecnología de bajo costo para detección rápida e *in situ* de glifosato desarrollada localmente, y presenta gran potencial como herramienta de valoración de la carga contaminante por herbicidas en muestras ambientales y de alimentos.

Palabras clave: Sensor, glifosato, grafeno, nanocobre, monitoreo químico.

ABSTRACT

Glyphosate is the most used herbicide in Colombia. It is employed for the control of illicit weeds and as ripening agent to increase the yields of sugar cane. However, glyphosate has a direct impact in water, plants and animals, also is classified as possibly carcinogenic in humans. In this work, the development of a low cost device for glyphosate detection is shown. The sensing platform is based on an amperometric arrangement of three electrodes (work, reference and counter) fabricated with the laser engraved graphene technology. The working electrode was functionalized with copper nanoparticles that impart selectivity to glyphosate because of the affinity between the nanocopper and the organophosphate compounds. The developed sensor presents a sensitivity value of $6,8 \pm 0,5$ μA/uM, lower limit of detection of $4,29 \pm 0,64$ μM, and response time of 139 ± 59 s. Finally, concept tests were realized in real samples presumably contaminated with glyphosate of breast milk and water, where concentrations of $4,05 \pm 0,15$ μM and $5,81 \pm 0,21$ μM were obtained for breast milk and incoherent results for water. Although, the developed sensor must be improved in some aspects, it is the first low cost technology for fast and *in situ* glyphosate detection, which is locally developed, and presents a great potential as valuation tool of the contaminant charge by herbicides in food and environmental samples.

Keywords: Sensor, glyphosate, graphene, nanocupper, chemical monitoring.

1 INTRODUCCIÓN

El glifosato es uno de los herbicidas más utilizados en el mundo. En Colombia, el glifosato se ha utilizado como estrategia química para la erradicación de cultivos ilícitos mediante aspersiones aéreas. Además, se ha empleado extensamente en los monocultivos de caña de azúcar del Valle del Cauca con una doble función: Como herbicida previo a la germinación de la caña para eliminar cualquier otra planta que pueda prosperar en el terreno, y como madurante posterior a la germinación de la caña para aumentar el rendimiento de sacarosa hasta en un 26% (Arcila y Villegas, 1995). En ciertos cultivos como la caña de azúcar, el glifosato puede ser aplicado como regulador de crecimiento una vez la planta alcanza cierto grado de desarrollo, pues en concentraciones sub-letales elimina sólo las hojas, haciendo que se utilice la energía metabólica de la planta predominantemente para el crecimiento del tallo que es donde se concentra la mayor cantidad de azúcares.

Las dosis de glifosato aplicadas en Colombia exceden las recomendadas en agricultura en muchos otros países; además, este herbicida puede contaminar suelos, agua, cultivos y organismos no objetivo (Hena Muñoz, Montes Rojas, y Bernal Bautista, 2015). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC), el glifosato se clasifica como posiblemente cancerígeno en humanos (WHO, 2015). Además, se han presentado estudios donde se evidencia la presencia de los residuos de este plaguicida en humanos (Campoy et al., 2001; Krüger et al., 2014). En Colombia, el glifosato ha afectado directamente algunas poblaciones rurales del Cauca y el Valle del Cauca, ya que han sido rodeados por cultivos de caña pertenecientes a los grandes ingenios azucareros. La forma de sobrevivencia de estas poblaciones está en peligro, pues el glifosato ha contaminado sus aguas, plantas y alimentos.

Existen diversas tecnologías de detección de glifosato, donde se incluyen mecanismos ópticos y cromatográficos, sin embargo, estas técnicas son, generalmente, complejas, costosas y consumen mucho tiempo debido a la complejidad de las propiedades químicas del glifosato. Los métodos más desarrollados para el análisis de glifosato y su derivado principal, AMPA (ácido aminometilfosfónico) emplean procesos de derivatización pre o post columnas que confieren volatilidad, fluorescencia o propiedades de absorción UV a los analitos, lo cual incrementa el tiempo y el costo del análisis, así como la incertidumbre analítica (Song et al., 2009).

Debido a las desventajas de las técnicas convencionales, se hace necesario el desarrollo de dispositivos de detección que sean económicos, de fácil manejo y que permitan obtener una respuesta temprana y particularmente en aplicaciones donde la medición en campo sea prioritaria. Un sensor es un dispositivo analítico que convierte la concentración de un analito objetivo en una señal medible (por ejemplo, eléctricos, ópticos, piezoeléctricos) usando un elemento de reconocimiento selectivo (es decir que sólo genera señal a partir de su interacción específica con el analito objetivo) acoplado a un transductor.

Las propiedades únicas de los materiales de nano-escala ofrecen una excelente base para la señal de transducción óptica o eléctrica y el diseño de una nueva generación de dispositivos bioelectrónicos y de biosensado (Ju, Xueji, y Wang, 2011).

En la actualidad se han propuesto diferentes biosensores electroquímicos para la detección de glifosato, como el nanobiosensor electroquímico para glifosato y AMPA, desarrollado por Songa et al. (2009), o el biosensor desarrollado por Oliveira et al. (2012) basado en peroxidasa de atemoya inmovilizada en nanoarcilla para la determinación de glifosato por el método de inhibición enzimática, entre otros. Sin embargo, en Colombia no se han reportado dispositivos para la detección de glifosato que sean económicos y que permitan medir en campo. Por lo tanto, se propone la construcción de un sensor de bajo costo conformado por nanomateriales que permitan la detección de glifosato en muestras simuladas de agua y matrices alimentarias.

2 PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

2.1 PLANTEAMIENTO Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

El cultivo de caña de azúcar comprende uno de los sistemas productivos de carácter agroindustrial más importantes en el Valle del Cauca. A pesar de que el monocultivo de caña de azúcar ha impulsado significativamente el desarrollo económico regional en las últimas décadas, también ha generado impactos socio-ambientales negativos que evidentemente amenazan la calidad de vida de las comunidades localizadas en las cercanías de los cultivos de caña de azúcar. Particularmente, prácticas asociadas al uso intensificado de agroquímicos sintéticos (fertilizantes y plaguicidas) y su dispersión incontrolada en el ambiente, han comprometido considerablemente la seguridad e inocuidad de los alimentos destinados al abastecimiento de las comunidades. Los herbicidas (una categoría de agroquímicos ampliamente utilizados en los monocultivos del Valle del Cauca) son compuestos orgánicos que modifican e inhiben procesos fisiológicos de la planta. En el caso de la caña de azúcar, aparte de eliminar la competencia por el crecimiento de otras plantas sobre el terreno, actúan como reguladores de crecimiento que favorecen mayores rendimientos de la sacarosa al eliminar las hojas de la planta y concentrar la energía metabólica de la caña únicamente hacia el crecimiento del tallo. Por esta razón, la industria azucarera también utiliza el término “madurantes” para referirse a ciertos herbicidas como el glifosato.

De acuerdo a Arcila y Villegas (1995), en los valles del Río Cauca se han utilizado herbicidas como madurantes, gracias al aumento en el rendimiento de la producción de la caña de azúcar, con incrementos de azúcar reutilizable hasta del 26% según la variedad de la caña.

El uso de herbicidas como madurantes es una práctica agrícola previamente implementada en monocultivos de caña en varios países alrededor del mundo. Los madurantes más importantes han sido Ethrel, Asulox, Embark, Polaris, Polado y Roundup (la mezcla de glifosato patentada por Monsanto), que se han utilizado con éxito en Estados Unidos, Puerto Rico, Brasil y Suráfrica. Y los compuestos que han mostrado los mejores resultados a nivel mundial son Polaris o glifosina, Polado, Roundup y Ethepon o Ethrel (Nivia, 2001).

En Colombia el uso del glifosato excede las cantidades aplicadas en muchos otros países; esto se debe a que además de ser utilizado como herbicida y madurante, el glifosato se implementa en gran parte del territorio nacional para la erradicación de cultivos ilícitos, combinado con Cosmo-flux@ 411F, el cual aumenta la eficiencia y penetrabilidad del glifosato (Henao Muñoz et al., 2015). La erradicación por aspersión en Colombia comienza a finales de los años setenta para combatir la aparición y el incremento de los cultivos de marihuana en las estribaciones de la Sierra Nevada de Santa Marta (Vargas Meza, 1999). Sin embargo, como afirman Nivia (2001) y la oficina de la Naciones Unidas contra la Droga y el Delito (UNODC), la erradicación de los cultivos ilícitos con fumigaciones aéreas de glifosato ha sido un fracaso durante un cuarto de siglo; del 2014 al 2015, las hectáreas de cultivos de

coca han aumentado de 69000 a 96000, un incremento del 39% (UNODC, 2016). Además, en el análisis descrito por Nivia (2001), se observa que en los cultivos ilícitos se aplica glifosato al 26% en la mezcla de fumigación, y no al 1%, como se recomienda en los Estados Unidos para aplicaciones terrestres. La proporción de aplicación de glifosato formulado con Cosmoflux para la erradicación de cultivos ilícitos en Colombia es 3,69 kg/ha, la cual es significativamente mayor que la recomendada en usos en agricultura (1,78 kg/ha) (Henao Muñoz et al., 2015; Ministerio de Ambiente, 2007). Aunque la aspersión aérea de glifosato para la erradicación de cultivos ilícitos fue recientemente prohibida en Colombia, su uso en agricultura todavía se permite, y sigue siendo una práctica muy común en los extensos monocultivos de caña de azúcar del Valle del Cauca.

Adicionalmente, los niveles de glifosato permitidos en agricultura en Colombia (1,78 kg/ha o 5 L/ha) (Ministerio de Ambiente, 2007) superan los recomendados en otros países: en Estados Unidos, según la Agencia de Protección Ambiental (EPA), el uso de glifosato en sitios agrícolas es menor a 0,75 libras por acre (Cordero Heredia y Sánchez, 2007), lo que equivale a 0,95 kg/ha, aproximadamente; en Ecuador, de acuerdo con el INIAP (Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias de Ecuador), se recomienda el uso de 2 a 4 L/ha de glifosato en agricultura; en Canadá, Roundup se debe aplicar en la pre-cosecha en 2,5 L/ha (Cordero Heredia y Sánchez, 2007); entre otros.

El uso de los herbicidas a base de glifosato se ha incrementado significativamente en la última década y ahora es el herbicida aplicado con mayor frecuencia en el mundo (Myers et al., 2016). Se emplean en un amplio rango de cultivos, incluyendo maíz, soya, canola, trigo, cebada, algunos granos, entre otros. Sin embargo, esta aplicación puede resultar en residuos de glifosato y su metabolito AMPA en cultivos durante la cosecha y en alimentos procesados. Por ejemplo, se han encontrado residuos en muestras de pan y granos de soya (Bøhn et al., 2014; TESTBIOTECH, 2013).

Diversos estudios de laboratorio realizados en animales salvajes, poblaciones humanas y animales domésticos sugieren que los niveles actuales de exposición a los plaguicidas a base de glifosato pueden traer resultados negativos para la salud (Myers et al., 2016). Debido a esto, la OMS en el 2015, clasificó el glifosato como posible cancerígeno en humanos; y de acuerdo a la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC), el glifosato pertenece al grupo 2A, lo cual implica que hay suficiente evidencia que demuestra una correlación entre la exposición a glifosato y el desarrollo de cáncer en animales superiores (WHO, 2015).

Teniendo en cuenta los efectos nocivos del uso de glifosato, y su aplicación masiva en Colombia, se hace necesario controlar la exposición de las personas (y demás organismos no objetivo) a este agente químico a través de la evaluación periódica de su presencia en el agua y los alimentos. Para ello se requiere el desarrollo de dispositivos de detección temprana e *in situ* que permitan la evaluación rápida de concentraciones perjudiciales de glifosato, y de esta

manera establecer medidas de control que disminuyan los daños que este herbicida pueda provocar sobre los seres humanos y el ambiente.

2.2 JUSTIFICACIÓN

Varios estudios han demostrado que los plaguicidas sintéticos y sus derivados causan graves problemas de salud en personas y animales, contaminan el suelo, el aire, el agua y los alimentos, y destruyen cultivos no objetivo. En el Valle del Cauca, además de su amplia aplicación como herbicida y madurante en la caña de azúcar, el glifosato se emplea como herbicida en cultivos de café, banano, arroz, cacao, palma africana y cítricos (Varona et al., 2009), y a pesar de que existe una norma para regular la aplicación de los plaguicidas (Resolución 341 de 2001), no se sigue un control para verificar el cumplimiento de la misma.

Debido a la forma de aplicación del glifosato, se han encontrado residuos del mismo en alimentos como fresas, moras azules, frambuesas, lechugas, zanahoria y cebada; además, se ha encontrado que los animales de granja expuestos por vía oral a concentraciones sub-letales de glifosato, pueden acumular residuos del plaguicida en riñones, carne, leche y huevos (Dinham, como se citó en Nivia, 2001). Los plaguicidas comerciales a base de glifosato incorporan surfactantes que permiten que el compuesto activo penetre en los tejidos de las plantas, y no se eliminan simplemente con el lavado o pelado de las partes comestibles.

El glifosato se presenta a lo largo de toda la cadena alimentaria, desde el campo, hasta la mesa de los consumidores. Incluso, se ha evidenciado la presencia del herbicida en orina y leche materna, como se afirma en los trabajos de Krüger et al. (2014) y Campoy et al. (2001). Ante esta situación y la clasificación presentada por la OMS al glifosato en el 2015 (WHO, 2015), se observa el peligro que corren los consumidores al verse comprometida la inocuidad de los alimentos y surgen preguntas como: ¿Qué tan vulnerable se encuentra la población colombiana ante el consumo de alimentos expuestos a este plaguicida?

Algunas poblaciones rurales en los departamentos de Cauca y el Valle del Cauca (El tiple, López adentro, entre otros) han sido rodeadas por cultivos de caña pertenecientes a los grandes ingenios azucareros y se han visto afectadas directamente por la presencia de glifosato en sus plantas, alimentos, aguas de cultivo y de consumo y en su población, debido a las permanentes aspersiones aéreas de este compuesto. Como afirma Nivia (2001): “De acuerdo con quejas que se presentan ante la Defensoría del Pueblo en Colombia, los cultivos alimenticios son destruidos totalmente por las fumigaciones aéreas de Roundup y se ven afectadas las siembras posteriores”. De esta forma, se pone en peligro la manera de sobrevivencia de estas poblaciones, pues se atenta contra sus recursos naturales, la salud, seguridad y soberanía alimentaria.

Las situaciones anteriormente expuestas justifican la determinación periódica de glifosato a lo largo de la cadena alimenticia como mecanismo de control y prevención de las

repercusiones perjudiciales del uso indiscriminado de dicho compuesto. Aunque existen técnicas estandarizadas para la determinación de plaguicidas organofosforados como el glifosato (técnicas cromatográficas acopladas a técnicas espectrométricas), éstas son costosas, tardan mucho tiempo en producir resultados, no permiten medir *in situ* o requieren pre-tratamientos exhaustivos de extracción y purificación para el análisis (Koskinen, Marek, y Hall, 2016; Nivia, 2001), lo cual limita su uso a mediciones dentro de instalaciones de laboratorio.

Por otro lado, en Colombia no hay laboratorios certificados para el análisis de residuos de glifosato (ICA, s.f.) y el costo de un análisis de este tipo en un laboratorio certificado, por ejemplo en Europa es de alrededor de 200 Euros.

En este sentido, se propone el desarrollo de un prototipo de sensor que sea económico, portátil y de fácil manejo para detectar las concentraciones de glifosato en agua y alimentos, disminuyendo el riesgo de exposición en las poblaciones vulnerables.

2.3 OBJETIVOS

2.3.1 General

Desarrollar un prototipo de un dispositivo de detección in situ y en tiempo real para la medición de glifosato en agua y alimentos.

2.3.2 Específicos

- Seleccionar los nano-materiales y las configuraciones más adecuadas de los mismos para la fabricación de un prototipo de sensor de plaguicidas organofosforados (disponibilidad local de materiales, costo y características fisicoquímicas).
- Caracterizar el desempeño del dispositivo de detección en términos de sensibilidad, tiempo de respuesta y límite de detección.
- Realizar una prueba de concepto a través de la medición de residuos de glifosato en agua y matrices alimentarias.

3 MARCO DE REFERENCIA

3.1 PROPIEDADES DEL ANALITO

El glifosato es un herbicida ampliamente usado en el mundo en agricultura y silvicultura. Se trata de un ácido orgánico débil y está compuesto por una molécula de glicina y una molécula de fosfonometil, como se muestra en la Figura 1. La degradación primaria del glifosato en plantas, suelo y agua, forma el ácido aminometilfosfónico (AMPA), cuya estructura química es similar a la del glifosato, Figura 1 (WHO, 2005).

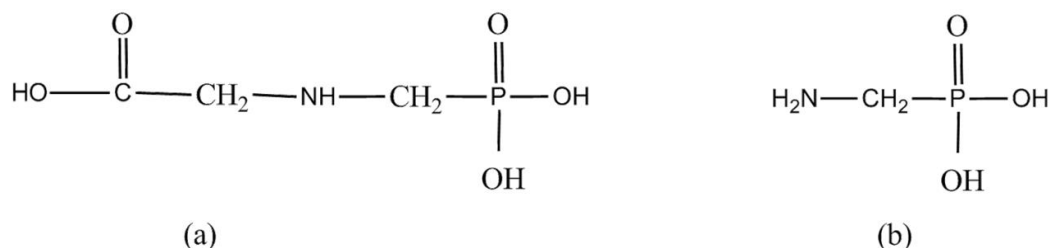


Figura 1. Molécula de a) glifosato y b) AMPA.

Fuente: WHO (2005).

El glifosato es estable químicamente en agua y no sufre degradación fotoquímica. La baja movilidad del glifosato en suelo indica una probabilidad mínima de contaminación de aguas subterráneas. Sin embargo, el glifosato puede incidir en aguas superficiales por aplicación cercana a ambientes acuáticos o por la escorrentía y la lixiviación de las zonas de aplicación terrestre (WHO, 2005).

Según la PPDB (Pesticides Properties DataBase) elaborada por Agriculture and Environment Unit de la University of Hertfordshire (Inglaterra), la persistencia del glifosato es (UNL, 2010):

- DT50 a campo: 12 días.
- DT50 en laboratorio a 20°C: 49 días.
- DT90 en laboratorio a 20°C: 159 días.

Se define como DT 50 (Greenhalgh et al., 1980) la cantidad de días necesarios para que un plaguicida se reduzca a la mitad de la concentración inicial. Se denomina DT 90 la cantidad de días necesarios para que un plaguicida se reduzca al 90% de la concentración.

3.2 TÉCNICAS DE MEDICIÓN CONVENCIONALES

Las tecnologías convencionales de medición incluyen técnicas ópticas, colorimétricas y cromatográficas. La mayoría de los métodos reportados para la determinación de glifosato y AMPA se basan en el uso de cromatografía de gas (Oliveira et al., 2012) [Separación de

muestras volátiles o derivados volátiles, por medio de una corriente de un gas inerte a elevada temperatura, la cual atraviesa una columna cromatográfica que separa los componentes de la mezcla (MNCN, s.f.)), Cromatografía líquida (LC) [Separación de un sólido o líquido, por medio de un líquido que circula en contacto con un sólido o líquido inmiscible. Al introducir los analitos, la velocidad dependerá de su afinidad por cada una de las fases (MNCN, s.f.)] o electroforesis capilar (EC) [Separación basada en la diferente velocidad de migración de las distintas especies cargadas bajo la acción de un campo eléctrico (Osatinsky, 2007)]. Los métodos más desarrollados para el análisis de glifosato y AMPA emplean procesos de derivatización pre o post columnas que confieren volatilidad, fluorescencia o propiedades de absorción UV a los analitos, lo cual incrementa el tiempo y el costo del análisis, así como la incertidumbre analítica (Songa et al., 2009). Algunos reactivos típicos de derivatización para glifosato son o-phtalaldehyde-mercaptoethanol (OPA-Merc) en post-columna de derivatización (Nollet, 2004; Winfiel, Bashe, y Baker, 1990) y 9-fluorenylmethoxycarbonyl chloride (FMOC-Cl) en pre-columna de derivatización (Nollet, 2004).

Los análisis anteriormente mencionados son conducidos de forma casi exclusiva al interior de instalaciones de laboratorio, puesto que estas técnicas son, complejas, requieren personal altamente entrenado, son costosas y consumen mucho tiempo debido a la complejidad de las propiedades químicas del glifosato, como por ejemplo: alta solubilidad en agua, insolubilidad en solventes orgánicos, ausencia de grupos cromóforos y baja volatilidad (Koskinen et al., 2016; Viswanathan, Radecka, y Radecki, 2009).

3.3 TÉCNICAS DE MEDICIÓN EMERGENTES

Teniendo en cuenta las limitaciones de las tecnologías de medición convencionales, se hace necesario el desarrollo de dispositivos de detección que sean económicos, de fácil manejo y que permitan obtener una respuesta temprana y particularmente en aplicaciones donde la medición en campo sea prioritaria. En este sentido, un biosensor es un dispositivo de medida analítico compuesto por un elemento de reconocimiento biológico o biomimético en contacto directo con un material transductor, produciendo una respuesta, que es convertida y amplificada por un sistema de adquisición de señal y post-procesamiento.

Los biosensores pueden ser clasificados según su tipo de biocomponente y el tipo de transducción. Los elementos biológicos pueden ser sistemas que contienen enzimas, tejidos animales o vegetales, microorganismos, organelos, células receptoras, anticuerpos, ácidos nucleicos, entre otros. Los elementos de transducción son generalmente electroquímicos, ópticos o piezoeléctricos. Las señales eléctricas pueden ocurrir por un cambio en la medida de corriente a un voltaje fijo (amperométrico), un cambio en la medida del voltaje entre los electrodos (potenciométrico) o un cambio en la capacidad de transportar carga (conductividad) (Lavecchia, Tibuzzi, y Giardi Maria, 2010).

3.4 SENSORES DE TRANSDUCCIÓN ELECTROQUÍMICA

Algunos métodos más comunes de análisis electroquímico utilizados en el desarrollo de sensores y biosensores son (Michael y Borland, 2006):

- **Cronoamperometría:** En este método, el electrodo es inicialmente mantenido en algún potencial eléctrico de reposo que no causa oxidación o reducción de las moléculas en la solución de baño. Para realizar la medida, se modula de forma escalonada el potencial hacia un valor que desencadene la reacción electroquímica.

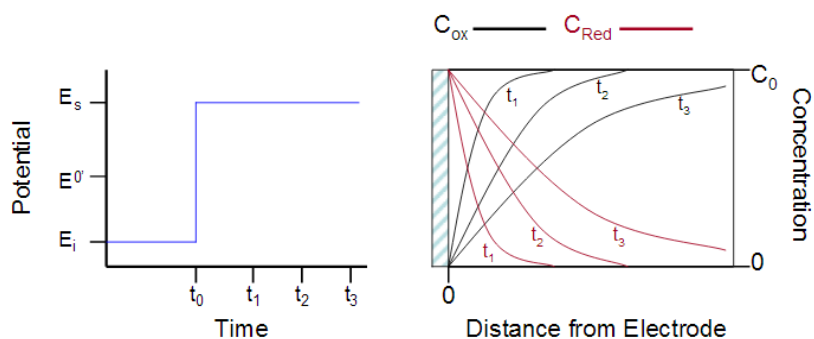


Figura 2. Diagrama de potencial

Fuente: ASDL (S.f.)

- **Voltamperometría normal de pulso (NPV):** es una extensión del método cronoamperométrico; involucra la aplicación de una serie de pulsos de potencial, cada uno con diferentes valores. Al igual que en cronoamperometría, la corriente producida durante cada pulso de potencial es proporcional a la concentración del analito dentro de la celda electroquímica, pero también refleja cómo la aplicación del potencial durante cada pulso controla la reacción electroquímica de modo que el voltamograma (gráfica de la corriente en función del potencial aplicado en cada pulso) comprueba la detección de la sustancia.

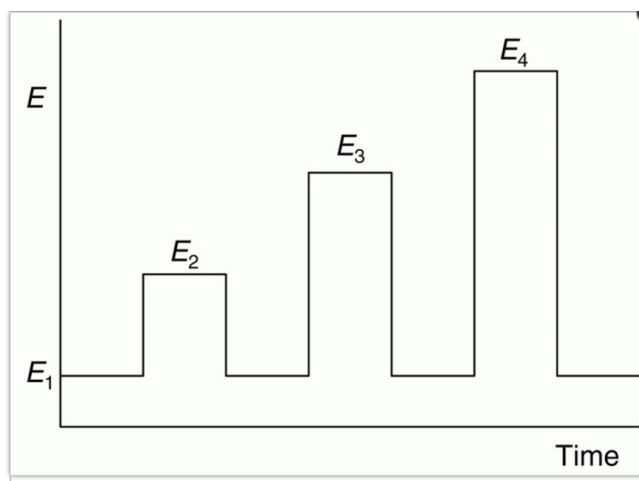


Figura 3. Diagrama de la forma de onda potencial usada en NPV

Fuente: Michael y Borland (2006)

- Voltamperometría diferencial de pulso (DPV): proporciona un incremento en sensibilidad y mayor eficiencia de diferenciación y resolución de diferentes especies. La forma de onda de los pulsos se diferencia a la usada en NPV, en que el potencial entre cada pulso no retorna al mismo potencial de reposo. La DPV produce un puntiagudo voltamograma, correspondiente a la derivada del voltamograma de NPV: Este comportamiento puntiagudo puede mejorar tanto los aspectos cualitativos, como los aspectos cuantitativos de la técnica.

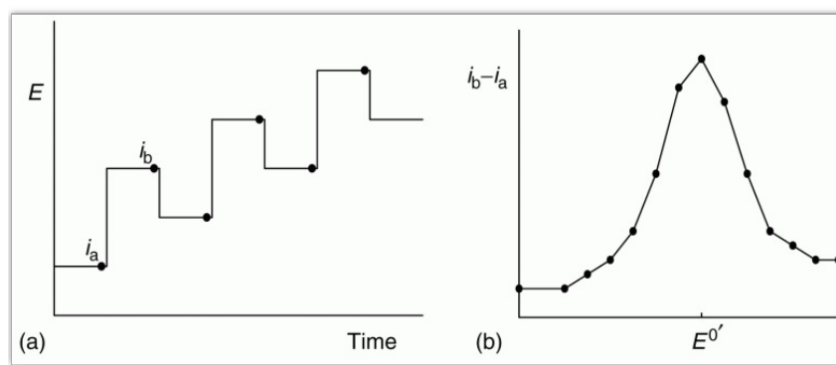


Figura 4. (a) Diagrama de la forma de onda potencial usada en DPV. (b) Voltamograma diferencial de pulso

Fuente: Michael y Borland (2006).

- Voltamperometría cíclica: El potencial es llevado hasta un valor final y posteriormente se retorna al potencial inicial, usualmente con la misma tasa de cambio. La corriente medida continuamente se reporta contra el potencial aplicado. Por lo tanto, la técnica proporciona información voltamétrica (corriente vs. potencial) de la sustancia analizada. Esta técnica se emplea en identificación cualitativa, ya que el voltamograma de una sustancia generalmente es único y es la técnica voltamétrica disponible más rápida.

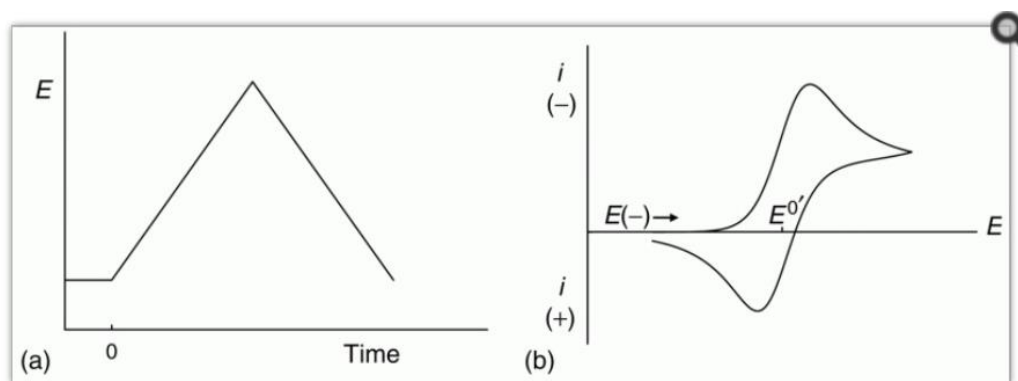


Figura 5. (a) Diagrama de la forma de onda usada en voltametría de barrido lineal (cíclico). (b) Voltamograma cíclico

Fuente: Michael y Borland (2006)

- Amperometría: Mantiene un potencial constante durante el proceso experimental y permite una recolección de datos rápida, puesto que la escala de tiempo del experimento es limitada sólo por la velocidad de los electrones usados para reconocer la corriente.

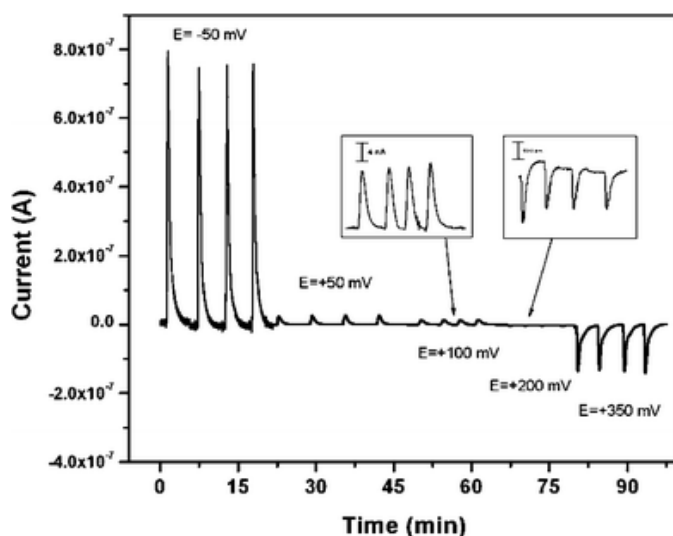


Figura 6. Ejemplo de amperimetría utilizada para la detección de glucosa.

Fuente: Zhang, Wilkop, Lee, y Cheng (2007)

3.5 BIOSENSORES MEDIADOS POR NANOMATERIALES

Con el acelerado desarrollo en nanotecnología y nanociencia durante la últimas décadas, una gran variedad de nanomateriales con diferentes tamaños, formas y composiciones han sido introducidos en las tecnologías de biosensado, alcanzando, entre otras propiedades, límites de detección más bajos (Ju et al., 2011).

El aspecto más importante de los nanomateriales consiste en sus propiedades especiales asociadas con diferentes geometrías de nano-escala. Los nanomateriales poseen una alta área superficial en relación al volumen, lo que causa sus propiedades físicas y químicas inusuales, como alta absorción molecular, alta tensión superficial, mejores actividades químicas y biológicas, altos efectos catalíticos, extrema fuerza mecánica y el efecto del confinamiento cuántico. Estas propiedades de los nanomateriales pueden ser utilizadas en el desarrollo de dispositivos con características de desempeño extraordinarias (sensibilidad, tiempo de respuesta, rango de operación y selectividad) lo cual ha revolucionado el campo del análisis instrumental (Tuantranont, 2013).

Las propiedades únicas de los materiales de nanoescala ofrecen una excelente base para la señal de transducción óptica o eléctrica y el diseño de una nueva generación de dispositivos bioelectrónicos y de biosensado. Sin embargo, los inconvenientes de las nanopartículas en biocompatibilidad y reconocimiento biológico limitan su aplicación en química analítica. La biofuncionalidad de los nanomateriales los puede dotar de buena compatibilidad para

biomoléculas inmovilizadas, tejidos o células y también les puede proporcionar alta especificidad de reconocimiento biológico, lo que permite establecer sistemas de biosensado con buena selectividad y reproducibilidad. Particularmente, los nanomateriales biofuncionales pueden producir un efecto sinérgico entre la actividad catalítica, la conductividad y la biocompatibilidad para acelerar la señal de transducción y aumentar la sensibilidad (Ju et al., 2011).

Uno de los nanomateriales más utilizados en la detección electroquímica es el grafeno, el cual está compuesto por átomos de carbono organizados de forma hexagonal con enlaces sp^2 , en dos dimensiones (2-D). El grafeno es el miembro más reciente de la familia de los nanomateriales de carbono multidimensionales, comenzando con los fullerenos como material 0-D, nanotubos de carbono de una sola pared como material 1-D, y terminando con el grafito, como material 3-D, Figura 7. El grafeno llena el espacio faltante para los nanomateriales de carbono 2-D (Pumera, Ambrosi, Bonanni, Chng, y Poh, 2010).

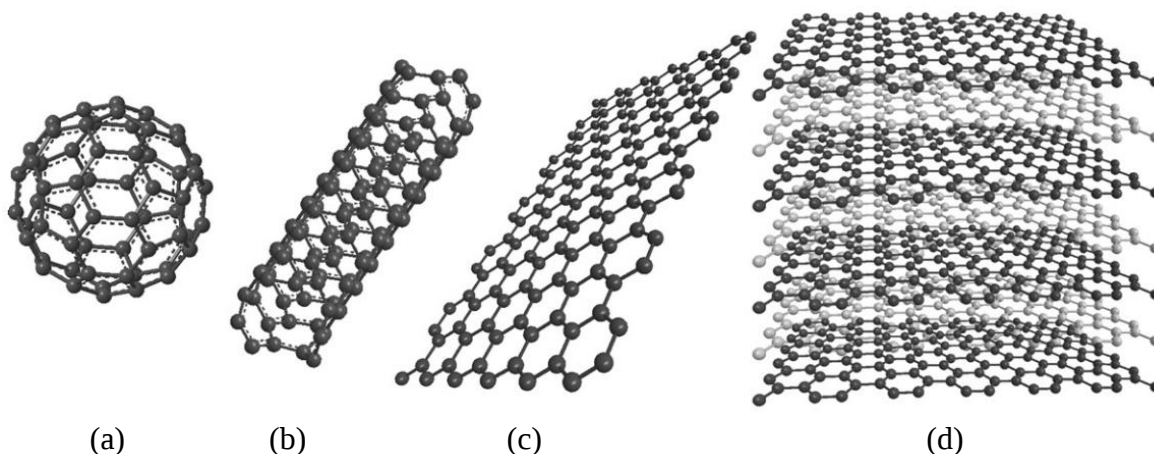


Figura 7. Estructuras con enlaces de carbón sp^2 . a) Fullerenos, b) Nano tubos de carbono de una sola pared, c) grafeno y d) grafito.

Fuente: Pumera et al. (2010)

3.6 BIOSENSORES PARA LA DETECCIÓN DE GLIFOSATO

En la actualidad se han propuesto diferentes biosensores electroquímicos para la detección de glifosato, como el nanobiosensor electroquímico para glifosato y su metabolito AMPA, desarrollado por Songa et al. (2009). El biosensor fue desarrollado por deposición electroquímica de poli (2,5-dimetoxianilina) (PDMA) dopado con poli (4-ácido estirenosulfónico) en la superficie de un electrodo de oro, con posterior inmovilización de peroxidasa de rábano picante (HRP) en la película nanocompuesta, PDMA-PSS. La HRP fija en la película PDMA-PSS cataliza la reducción de peróxido de hidrógeno y su inhibición se emplea como indicador en la detección de glifosato y AMPA. La película PDMA-PSS mejoró la sensibilidad del biosensor y la transferencia de electrones entre la enzima y la superficie del electrodo. Los límites de detección de glifosato y AMPA para este biosensor fueron 0,16 mg/L y 1,0 mg/L, respectivamente.

Por otro lado, Oliveira et al. (2012), desarrollaron un biosensor basado en peroxidasa de atemoya inmovilizada en nanoarcilla modificada para la determinación de glifosato por el método de inhibición enzimática. El efecto inhibitorio del herbicida resulta en un decremento de la corriente de respuesta de la hidroquinona que fue usada como sustrato fenólico para obtener la señal base. El biosensor fue construido usando grafito en polvo, nanotubos con multicapas de carbón, peroxidasa inmovilizada en nanoarcilla y aceite mineral, además de un cable de cobre para establecer el contacto eléctrico externo. Obtuvieron una concentración de respuesta de glifosato entre 0,10 y 4,55 mg/L con un límite de detección de 30 µg/L. Además, según los autores, la construcción del sensor fue sencilla, económica y se obtuvo estabilidad a largo plazo, un rango satisfactorio con un límite de detección bajo y buena reproducibilidad para la cuantificación del glifosato.

También se pueden utilizar otros materiales para la detección de glifosato, por ejemplo, Simões, Mattoso, y Vaz (2006) comprobaron por métodos electroquímicos y ópticos, la detección de este compuesto usando polímeros conductivos (Polianilina y Polipirrol) modificados con carbón para la creación de los electrodos. Se demostró que, debido a la alta afinidad del herbicida por la polianilina, al colocarse en contacto una solución que contenga glifosato, decrece el pH de la solución, proporcionando electrones para el dopaje de la polianilina, así por ciclo voltamperométrico se obtiene una medida de la cantidad de flujo de corriente.

Moraes, Mascaro, Machado, y Brett (2010) utilizaron un electrodo de carbón vítreo modificado con película de nanotubos de ftalocianina de cobre/carbono de múltiples paredes (GC/MWCNT/CuPc) para la determinación de glifosato. Donde, por medio del método Cíclico Amperimétrico y la espectroscopía de impedancia electroquímica, se muestra que el glifosato es absorbido por el metal de la molécula ftalocianina de cobre, formando complejos de iones de glifosato-cobre que permiten determinar la cantidad de glifosato. Se obtuvo una concentración de respuesta de glifosato entre 0,83 y 9,90 mg/L con un límite de detección de 2,02 µg/L.

4 METODOLOGÍA

4.1 UBICACIÓN

Esta investigación se realizó en la ciudad de Cali, Colombia, en la Universidad del Valle, sede Meléndez, en el laboratorio de Biosensores de la estación de biología durante los semestres 2017A y 2017 B.

4.2 MATERIALES Y REACTIVOS

Herbicida agrícola Panzer 480 SL (Invesa, con una concentración de sal de glifosato (isopropilamina) de 480 g/L). Ferrocianuro de potasio trihiratado ($K_3Fe(CN)_6$) fue obtenido de los laboratorios HiMedia (India). Solución búfer de fosfato (PBS 1X) se preparó con fosfato dibásico de sodio ($NaHPO_4$), fosfato de potasio (KH_2PO_4), cloruro de potasio (KCl), y cloruro de sodio (NaCl), obtenidos del centro Chem (USA). Solución de sulfato de cobre (23.5 bh%, como fertilizante) se adquirió de una tienda de suplementos agronómicos (Campofert S.A.S., Colombia).

Cinta Kapton (poliamida) con grosor de $\approx 30.4 \mu m$ y ancho de $\approx 50 mm$ fue obtenida en McMaster-Carr co (USA). Tinta Ag/AgCl fue obtenida en DuPont (USA). Baterías (9 V) se adquirieron en una tienda local de electrónicos.

4.3 FABRICACIÓN DEL SENSOR

4.3.1 Selección de materiales

Se han utilizado materiales como níquel, plata y oro (Songa et al., 2009) en estudios previos para el desarrollo de sensores, sin embargo, se seleccionaron grafeno sintetizado en cinta kapton, y cobre para la fabricación de los electrodos debido a su bajo costo y facilidad de acceso.

No se realizó un estudio de selectividad, debido a que se han encontrado estudios que confirman la afinidad entre el glifosato y el cobre (Moraes et al., 2010), además no se dispone de los materiales para realizar estos estudios.

4.3.2 Fabricación de electrodos

Se diseñó un sistema de tres electrodos (de trabajo, auxiliar y de referencia, Figura 8) y se grabó como electrodos DLEG, (por sus siglas en inglés, *Direct Laser Engraved Graphene*), como se muestra en los siguientes pasos. Primero, una pieza de cinta Kapton (Poliamina) se pega en una base de papel fotográfico y se ubica en una máquina de grabado láser (*HTPOW 1000mw Mini USB Laser Engraver* (HTPOW Laser Limited, China)). El modelo diseñado en un software gráfico fue grabado en la superficie de la cinta Kapton para formar electrodos DLEG altamente conductivos (Figura 9 a). La alta resistencia de la hoja DLEG tiene un

impacto directo en la velocidad de transferencia de carga de los electrodos y en la sensibilidad del sensor. Las condiciones de grabado fueron: distancia entre el rayo láser y la superficie de cinta Kapton 13 cm, tiempo de grabado 21 ms, intensidad de láser 40 mW y diámetro del sensor 4,8 mm (Tehrani y Bavarian, 2016).

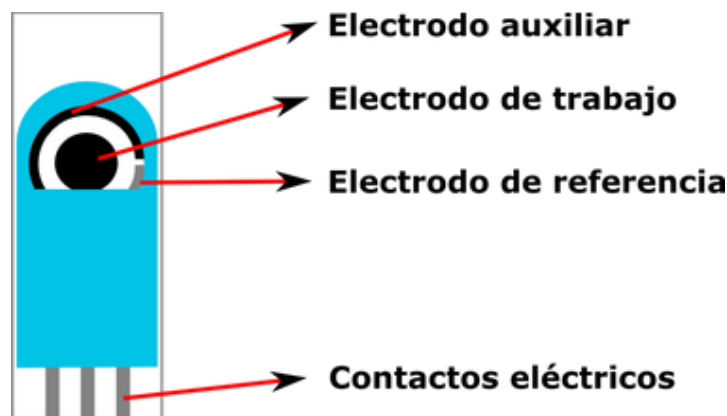


Figura 8. Partes de un sistema de tres electrodos.

Fuente: (Yerga, 2012)

Se utilizó una tinta de cloruro de plata Ag/AgCl en el electrodo de referencia para mejorar la conductividad durante el uso repetitivo del sensor (Figura 9 b) y se secó bajo las siguientes condiciones:

- A temperatura ambiente durante 10 minutos (T amb).
- A 90°C durante 5 minutos (Horneado) (Grouchko, Kamyshny, Mihailescu, Anghel, y Magdassi, 2011).

Finalmente, se aplicó una capa de esmalte, que sirve como aislante (Figura 9 c).

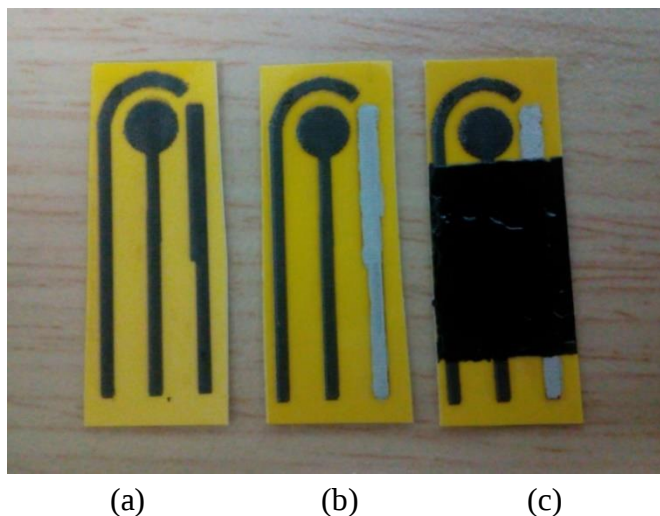


Figura 9. Prototipo de sensor con sistema grabado de tres electrodos de grafeno. a) Diseño grabado en cinta Kapton, b) Aplicación de tinta Ag/AgCl en el electrodo de referencia, c) Aislante.

Fuente: Elaboración propia.

4.3.3 Deposición de nano materiales

Se conectaron una moneda de cobre y el electrodo de trabajo al ánodo y cátodo, respectivamente, de una batería de 9V. La moneda y el área circular del electrodo de trabajo se sumergieron en una solución de sulfato de cobre 0,25 M durante el tiempo especificado (0, 3, 10, 30 y 60 s). Se lavó el electrodo de trabajo con agua destilada para retirar el exceso de cobre.

4.4 CARACTERIZACIÓN ELECTROQUÍMICA

Se utilizó la técnica de Voltametría Cíclica por medio de un potenciostato *E-Corder 821 High Resolution Laboratory Data Recorder* (eDAQ Pty Ltd, Australia), conectado a un computador con un software *EChem* (eDAQ Pty Ltd, Australia) y con una solución 4 mM de ferrocianuro de potasio y 1 M de nitrato de potasio; para caracterizar el área superficial electroactiva de sensores con tiempos de electrodeposición 0, 3, 10, 30 y 60 s, horneados y secados a temperatura ambiente. Se emplearon velocidades de barrido de 50, 100, 150 y 200 mV/s (Figura 10), límites de voltaje de 2 V y rango de corriente de 200 uA a 1 mA.

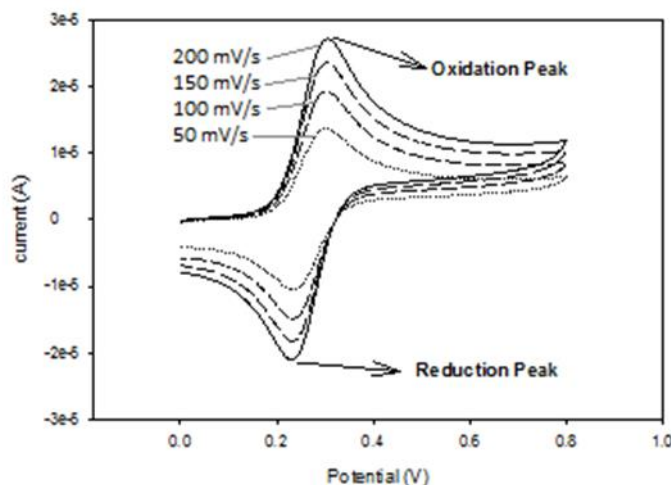


Figura 10. Voltamograma representativo de la técnica de voltametría cíclica en una solución 4,6 mM Fe(CN)₆/1M KNO₃, con picos de óxido-reducción y el efecto de las diferentes velocidades de barrido de potencial sobre la corriente.

Fuente: Vanegas (2015)

El área electroactiva de los sensores se determinó por medio de la ecuación de Randles-Sevcik (Wang, 2006).

$$i_p = 2,69 \times 10^5 n^{3/2} A C (vD)^{1/2}$$

Ecuación 1. Modelo de Randles-Sevcik.

Donde i_p es el pico de oxidación, n es el número de electrones transferidos en la reacción de óxido-reducción, A es la superficie electroactiva del electrodo, C es la concentración molar de la solución de trabajo, v es la velocidad de barrido de potencial y D es el coeficiente de difusión.

Una gráfica de i_p vs $v^{1/2}$ produce una curva lineal, cuya pendiente permite calcular el valor de A , pues n , C y D son constantes conocidas (Figura 11).

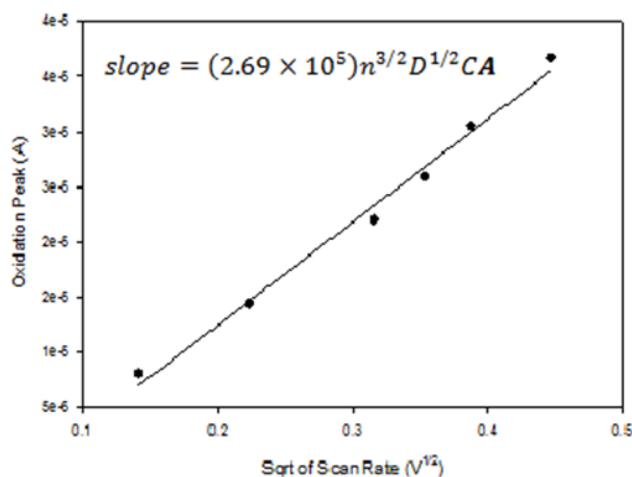


Figura 11. Correlación lineal representativa entre la corriente del pico de oxidación y la raíz cuadrada de la velocidad de barrido.

Fuente: (Vanegas, 2015)

4.5 FACTOR DE REPRODUCIBILIDAD

Se evaluó la reproducibilidad del método de fabricación de los sensores en base a la respuesta electroquímica obtenida inmediatamente después de su elaboración. Para ello se hicieron corridas de voltametría cíclica y se evaluó la forma de los voltamogramas para determinar si correspondían al comportamiento electroquímico típico de un sensor interfacial limitado por difusión (Wang, 2006). Los sensores que no presentaron dicho comportamiento fueron descartados y solo se continuaron los estudios de detección utilizando los sensores que mostraban la respuesta apropiada en el voltamograma.

4.6 DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL DE OXIDORREDUCCIÓN

Se utilizó la técnica de Diferencial de Pulso con un potenciostato (eDAQ), auxiliado por el software *EChem*, con velocidad de barrido de 10 mV/s, ancho y altura de los pulsos 200 ms y 2 mV, respectivamente, 1000 pasos, periodo de muestreo 20 ms y límites de voltaje de 2V; para determinar el voltaje donde se obtiene la mayor corriente para sensores horneados con tiempos de electrodeposición 0, 3 y 10 s. Se preparó una solución PBS (pH 7,46), con

concentraciones de glifosato de 0, 2, 4, 6, 8 y 10 μM . El voltaje de la reacción se determinó como aquel donde se presentó la corriente máxima en los voltamogramas.

4.7 CURVA DE CALIBRACIÓN

Con los datos de la técnica de Diferencial de Pulso para la determinación del potencial de oxidorreducción, se graficaron los picos de mayor voltaje en función de la concentración de glifosato aplicado, obteniendo una curva de calibración directa, donde la pendiente de esta es la sensibilidad (S) del sensor, de acuerdo con Moraes et al. (2010).

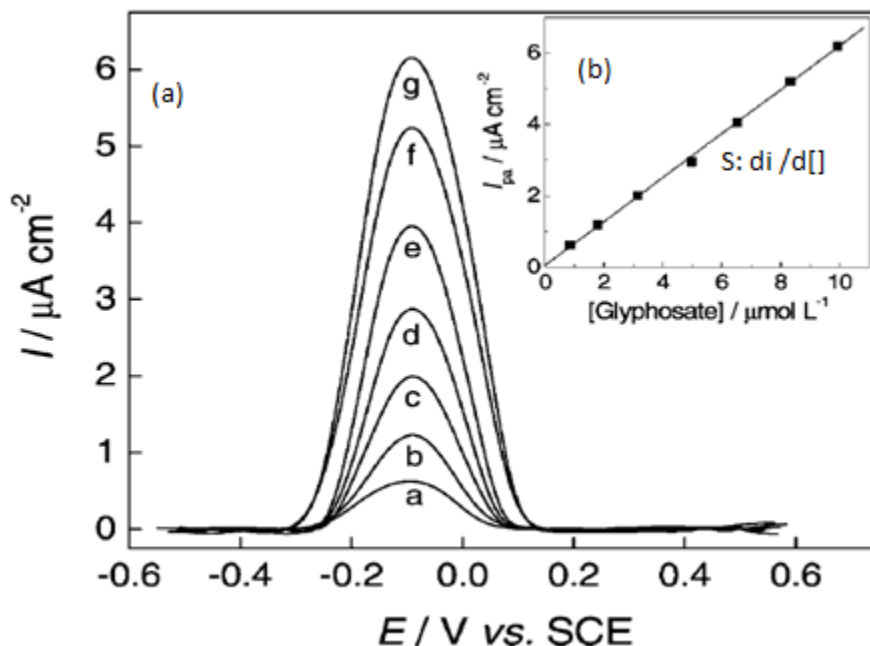


Figura 12. (a). Representación de una corrida en DPV con inyecciones de glifosato (a, 0.83 μM , b, 1.66, c, 3.32, d, 4.97, e, 6.62, f, 8.26, g, 9.90 $\mu\text{mol L}^{-1}$; (b). Curva de calibración del sensor.

Fuente: (Moraes et al., 2010)

También se empleó la técnica de cronoamperometría, por medio de un potenciostato (eDAQ), con un software *eDAQ Chart* (eDAQ Pty Ltd, Australia), se estableció un tiempo de estabilización del sensor en una solución PBS (pH 7,46) de 30 minutos, con posteriores aplicaciones de 10 μL de glifosato 2mM, cada 2 minutos y medio para obtener soluciones de 0, 2, 4, 6, 8 y 10 μM . Con esta técnica se elaboró la curva de calibración (gráfica de corriente en función de la concentración de glifosato) de sensores horneados, con tiempos de electrodeposición de 0, 3 y 10 s, en presencia de glifosato; se determinó el tiempo de respuesta (calculado por el promedio de los tiempos para alcanzar el 95% de estabilidad en cada deposición o pulso; estos tiempos son determinados por una regresión no lineal (Ecuación 2) de la gráfica de corriente en función del tiempo (Figura 13), la sensibilidad (S) (estimada por medio de la pendiente de la curva de calibración) y el límite de detección inferior (basado en la corriente mínima que alcanza el sensor, Ecuación 3) (Ronkainen,

Halsall, y Heineman, 2010). Las condiciones de trabajo fueron: frecuencia 10 Hz, duración de pulso 1 ms y voltaje aplicado -100 mV.

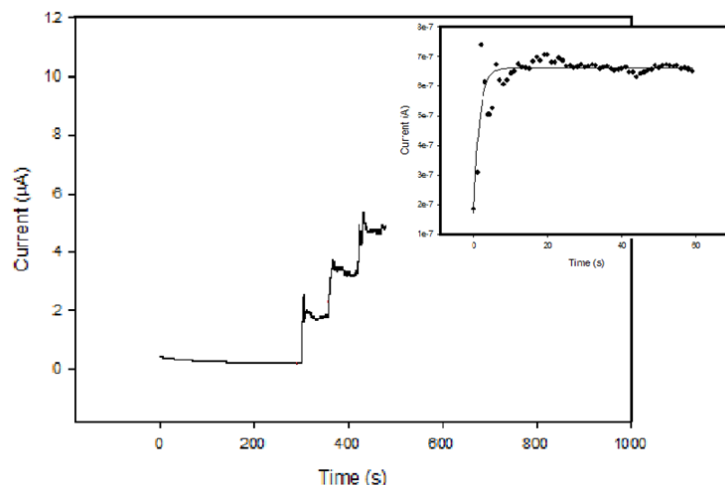


Figura 13. Representación de una corrida cronoamperométrica con ampliación de un pulso.

Fuente: Vanegas (2015)

La secuencia del pulso se correlaciona con la siguiente ecuación (Vanegas, 2015):

$$i = i_0 + a(1 - \exp^{-bt})$$

Ecuación 2. Regresión no lineal para determinar el tiempo de respuesta.

Donde i es la corriente obtenida con la técnica de cronoamperometría, i_0 corriente inicial o línea base, a es el cambio total en la corriente, b es la constante de cambio y t es el tiempo.

Para determinar el límite de detección inferior del sensor, es necesario partir de la curva de calibración de éste (Figura 10Figura 11 b) y utilizar la Ecuación 3 (Vanegas, 2015).

$$LOD = 3\sigma/S$$

Ecuación 3. Límite inferior de detección del sensor.

Donde LOD es el límite de inferior de detección del sensor, σ es la desviación estándar de las corrientes más bajas detectadas por el sensor y S es la pendiente de la curva de calibración.

4.8 PRUEBA DE CONCEPTO

Se realizó una prueba para determinar la concentración de glifosato en muestras simuladas de leche materna con el sensor desarrollado, mediante la técnica de cronoamperometría, con las condiciones especificadas anteriormente. Primero se determinó la curva de calibración del sensor. Posteriormente se realizaron 2 aplicaciones de 20 µL de leche materna en 20 mL

de solución PBS. Se estableció dos minutos y medio como el tiempo de estabilización entre aplicaciones.

De forma similar, se realizó una prueba con leche materna contaminada (2mM), agua destilada y agua destilada contaminada (2mM).

A partir de la corriente obtenida se puede calcular la concentración en la solución de 20 mL de solución PBS con el glifosato añadido, por medio del cambio de la corriente respecto a la sensibilidad del sensor, Ecuación 4.

$$C = \frac{i_f - i_i}{S}$$

Ecuación 4. Concentración calculada a partir de la corriente.

Donde C es la concentración en la solución, i_f es la corriente obtenida o corriente final, i_i es la corriente después de la estabilización y S es la sensibilidad del sensor.

Además, la concentración de la solución inicial puede ser calculada a partir del volumen aplicado, por medio de un balance de materia del glifosato.

$$V_{gly}C_{gly} + V_{PBS}C_{PBS} = V_fC_f$$

Ecuación 5. Balance de materia de la aplicación de glifosato en una solución PBS.

Donde V_{gly} es el volumen de la solución inicial de glifosato, C_{gly} es la concentración de la solución inicial de glifosato, V_{PBS} es el volumen de la solución PBS, C_{PBS} es la concentración de la solución PBS, V_f es el volumen de la solución final y C_f es la concentración de la solución final.

Sin embargo, la solución PBS inicialmente no tiene glifosato, por lo que su concentración es 0 y se obtiene la siguiente expresión para determinar la concentración de la solución inicial de glifosato.

$$C_{gly} = \frac{V_fC_f}{V_{gly}}$$

Ecuación 6. Determinación de la concentración de la solución

4.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se definió un diseño factorial $2^{5,2}$, con factores: concentración de las nanopartículas de cobre, asociadas a los tiempos de electrodeposición; y configuraciones de la tinta de cloruro de plata, asociadas al método de fabricación del electrodo de referencia; y niveles 0, 3, 10, 30 y 60 s; y horneado y secado a temperatura ambiente, respectivamente. Por medio de la ANOVA y un análisis de Tuckey se determinó si existe algún efecto significativo del área electroactiva

del sensor sobre los tratamientos empleados, con el software Microsoft Excel (2010). Se llevaron a cabo tres repeticiones por cada celda experimental.

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y ELECTROQUÍMICA

La Figura 14 muestra las micrografías de barrido electrónico (SEM) de la superficie de los electrodos de grafeno grabados con láser (panel a), así como de nanopartículas de cobre electrodepositadas sobre la plataforma de grafeno (panel b). El panel a, muestra una topografía homogénea característica de las capas de grafeno superpuestas. El tamaño promedio de partícula en la superficie decorada con cobre (panel b) es de 110 ± 71 nm con menos de 1.0% de partículas con tamaño mayor a 500 nm.

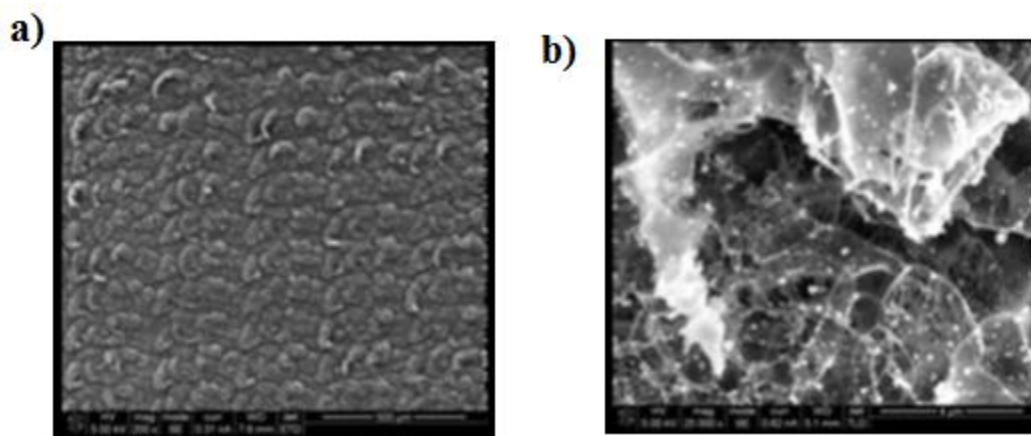


Figura 14. Caracterización morfológica de los electrodos grabados con láser. (a) SEM de baja magnificación de los electrodos de grafeno. (b) SEM de alta resolución de los electrodos de grafeno funcionalizados con cobre.

Fuente: Proyecto de cooperación internacional “Rapid, low-cost nano-biosensors for developing risk analytical tools in rural Colombia”

La técnica de voltametría cíclica se empleó para evaluar el efecto del método de secado del electrodo de referencia sobre el comportamiento electroquímico del sensor, reflejado en los voltamogramas obtenidos, Figura 15.

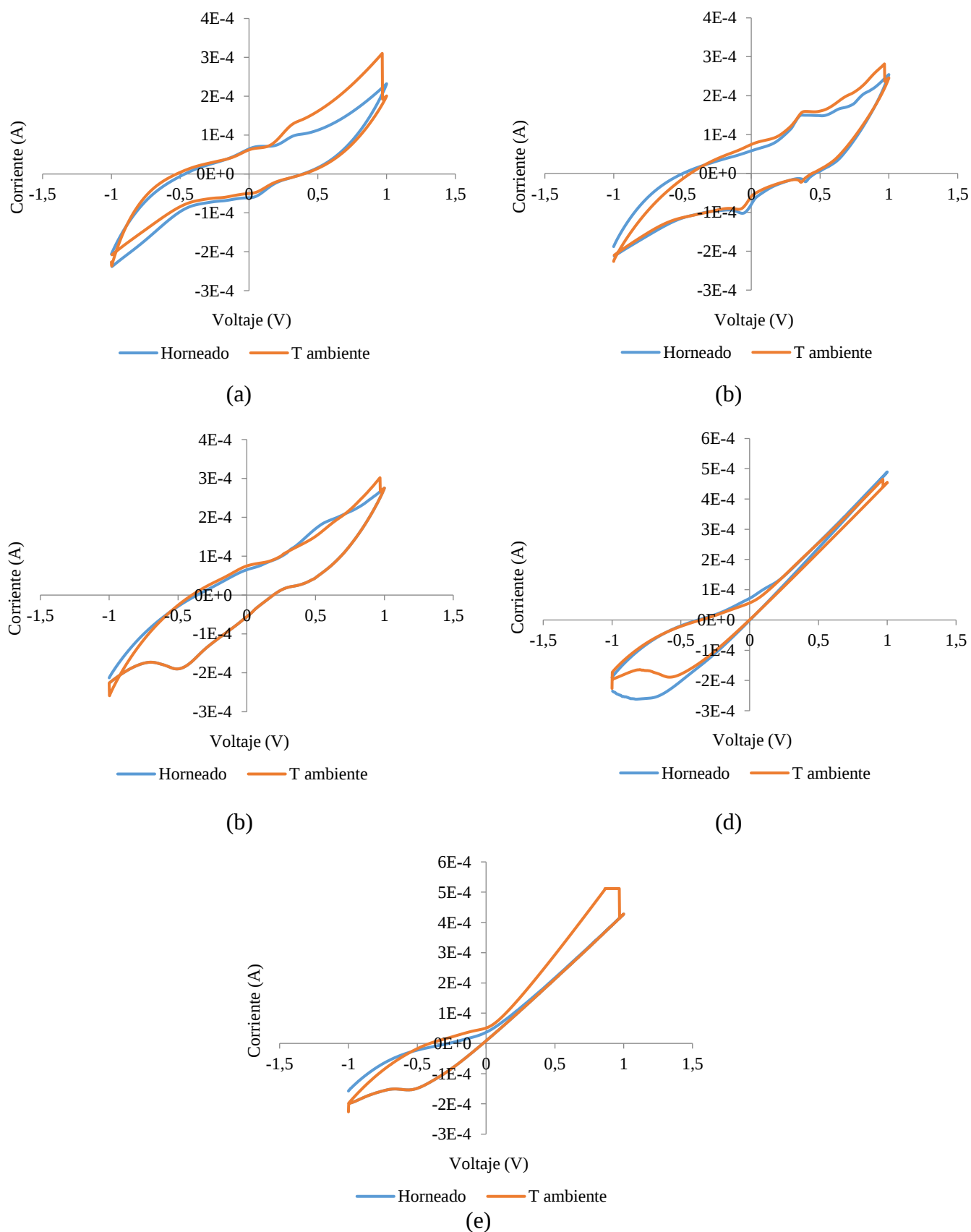


Figura 15. Curvas representativas: voltamogramas obtenidos por voltametría cíclica en ferrocianuro de potasio, de los sensores con los siguientes tiempos de electrodeposición: a) 0 s, b) 3 s, c) 10 s, d) 30 s y e) 60 s. Velocidad de escaneo 100 mV/s.

Fuente: Elaboración propia.

Las Figura 15 a, b y c, correspondientes a los tiempos de electrodeposición de 0, 3 y 10 s, muestran el comportamiento del voltamograma representativo para la técnica de voltametría cíclica, con picos de óxido reducción, presentado en la Figura 10. Por otro lado, las Figura 15 d y e, con tiempos de electrodeposición de 30 y 60 s, presentaron un comportamiento diferente, con un solo pico de reducción. Esto se debe posiblemente a una saturación de cobre en el electrodo de trabajo, lo que aumenta la resistencia eléctrica, obstaculizando el paso de la corriente en la superficie del sensor. De acuerdo a Štulík, Pacáková, Le, y Hennisen (1988), la intensidad de corriente registrada por el sensor se ve afectada por parámetros termodinámicos y cinéticos como lo son: la estabilidad del complejo analito-ión cúprico, la velocidad de formación del complejo, la velocidad de formación y disolución de la capa de óxido/hidróxido (capa pasivante), la velocidad de transporte del analito y el Cu^{+2} en la solución y en la capa pasivante (Sierra, Méndez, Sarria, y Cortés, 2008). Por lo cual, es posible que se presente una disminución de la velocidad de formación, como de disolución en la capa pasivante del sensor al aumentar el tiempo de electrodeposición.

En la Figura 15 no se observan diferencias en el comportamiento presentado entre los dos métodos de fabricación, para cada tiempo de electrodeposición.

Posteriormente, se analizó el cambio en el comportamiento electroquímico de los sensores, debido al tiempo de electrodeposición empleado en la deposición de cobre. Para esto, se graficaron los voltamogramas de los sensores con 0, 3 y 10 s de electrodeposición, Figura 16. Las curvas para 30 y 60 s no se tuvieron en cuenta en este análisis debido a que no es posible realizar su caracterización con la ecuación de Randles-Sevcik (Ecuación 1), por la diferencia en su comportamiento electroquímico.

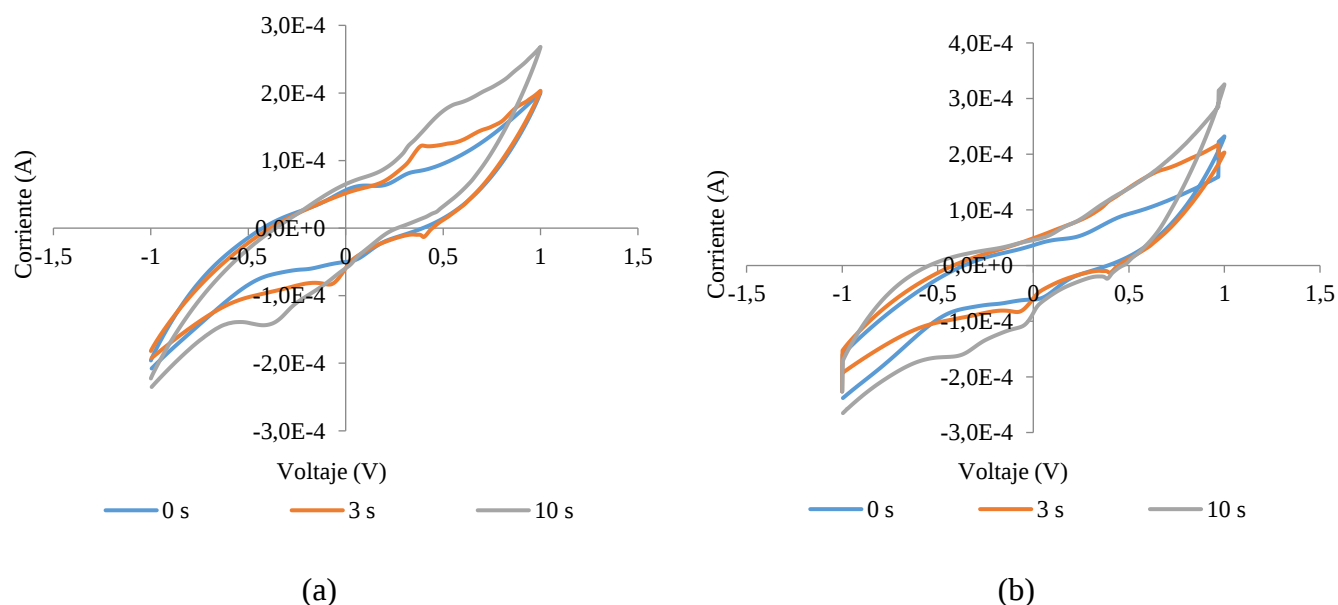


Figura 16. Curvas representativas: voltamogramas obtenidos por voltametría cíclica de los sensores (a) horneados y (b) secados a temperatura ambiente. Velocidad de escaneo 100 mV/s.

Fuente: Elaboración propia.

Las Figura 16 a y b muestran que la corriente de los picos de oxidación de los voltamogramas aumenta y la corriente de los picos de reducción disminuye, a medida que el tiempo de electrodeposición se incrementa. Esto se debe a las propiedades de conducción de las nanopartículas de cobre; De Wael et al. (2007), demostraron con ftalocianina de cobre, que alrededor de $-0,1$ V se presenta un proceso de oxidación del cobre, donde éste pasa de Cu^{2+} a Cu^+ proporcionando una disminución de corriente, lo que se evidencia en las Figura 16 a y b, con 3 segundos de electrodeposición.

El comportamiento descrito es semejante en los dos métodos de secado del electrodo de referencia, pero se pueden distinguir cuantitativamente por medio del cálculo del área electroactiva del sensor.

Como se mencionó anteriormente, los sensores con tiempo de electrodeposición 0, 3 y 10 s presentaron un voltamograma semejante al característico de la técnica voltametría cíclica (Figura 10). Por lo tanto, para estos sensores, se obtuvieron los voltamogramas con diferentes velocidades de barrido (Figura 17 a), donde la corriente de los picos de reducción disminuye a medida que la velocidad de barrido aumenta. Se graficó la corriente de los picos de reducción respecto a la velocidad de barrido en la Figura 17 b, donde se observa una relación lineal. Se utilizó la pendiente de la regresión lineal para calcular el área electroactiva de los sensores (Ecuación 1).

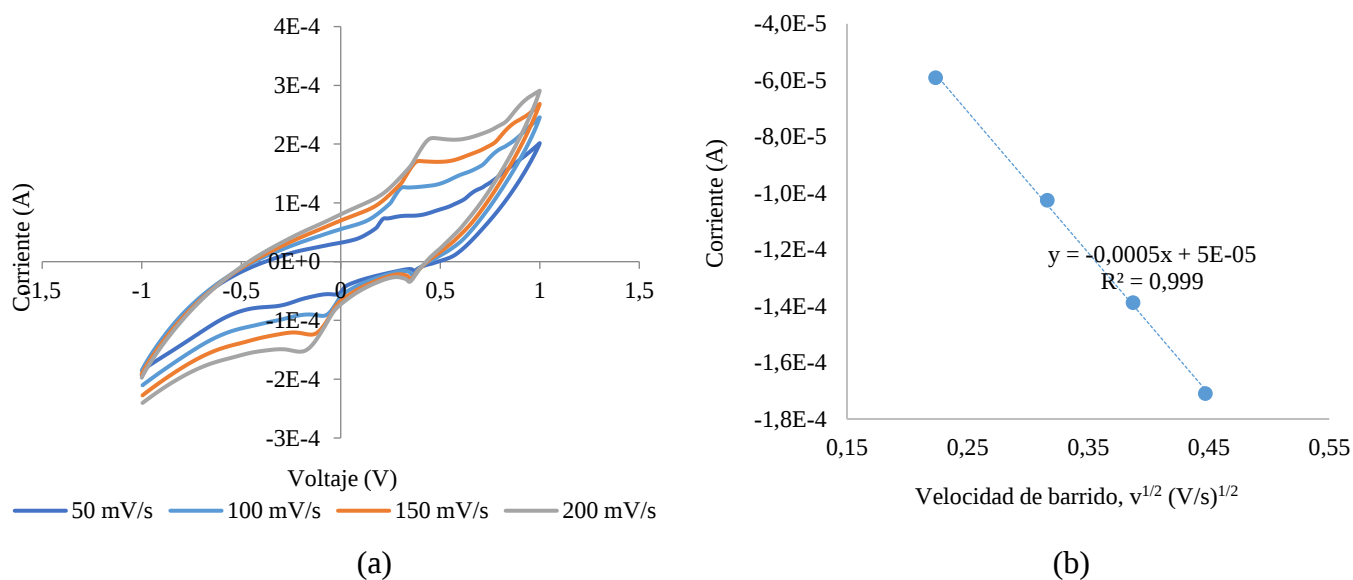


Figura 17. (a) Voltamogramas representativos de la técnica de voltametría cíclica de los sensores fabricados, a diferentes velocidades de barrido. (b) Relación entre la corriente de los picos de reducción y la raíz cuadrada de la velocidad de barrido.

Fuente: Elaboración propia.

En la Figura 11 se muestra el comportamiento representativo entre los picos de la corriente obtenida en los voltamogramas de la técnica de voltametría cíclica, con una tendencia positiva. Sin embargo, en la Figura 17 b, se obtuvo una pendiente negativa debido a que se relacionaron los picos de reducción y no los picos de oxidación.

En la Figura 18 se muestra un diagrama de barras para comparar el área electroactiva de todos los sensores. La mayor área electroactiva fue la obtenida para el sensor horneado, con 3 s de electrodeposición.

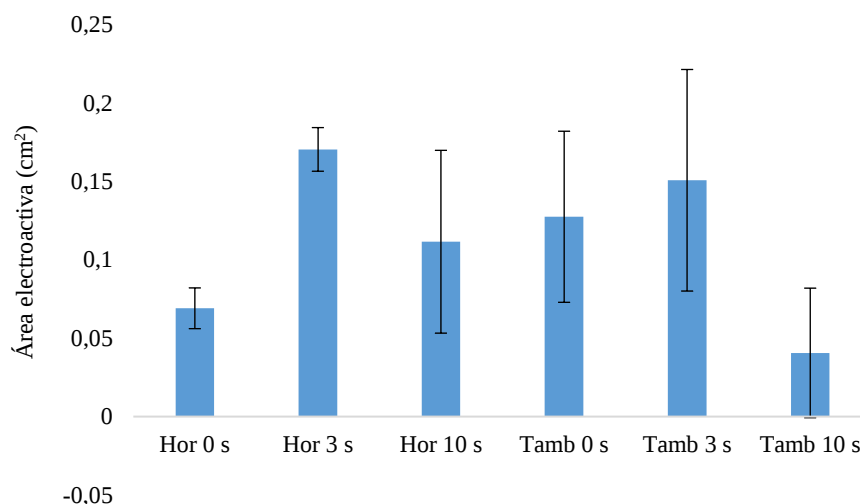


Figura 18. Comparación entre el área electroactiva de los sensores horneados (Hor), y secados a temperatura ambiente (Tamb), con diferentes tiempos de electrodeposición (0, 3 y 10 s).

Fuente: Elaboración propia.

Se realizó una ANOVA al área electroactiva y se obtuvieron diferencias significativas ($p < 0,05$), por lo que se evaluaron las diferencias de los métodos mediante la Prueba de Tukey. Se presentaron diferencias entre todos los tratamientos, excepto entre el método de secado horneado, con 10 s de electrodeposición y el secado a temperatura ambiente, con 0 s de electrodeposición. Por lo tanto, los sensores horneados con 3 s de electrodeposición tienen la mayor área electroactiva y su diferencia con el resto de tratamientos es significativa.

Se puede observar un par de picos de oxidación y reducción bien definidos para los sensores de grafeno, con cobre (3 y 10 s de electrodeposición) y sin cobre (0 s de electrodeposición) en las Figura 16 a y b, lo que indica que se logró el paso de corriente desde el cobre al grafeno. Además, la corriente en presencia de cobre (3 segundos de electrodeposición) aumentó, al igual que el área electroactiva; es decir que el cobre mejora las propiedades conductivas del sensor. Por otro lado, se seleccionó el grafeno como material para la fabricación de los sensores, debido a que cuenta con propiedades fisicoquímicas únicas, como alta área electroactiva, excelente conductividad eléctrica, y bajo costo. Además, el grafeno presenta ventajas frente a los nanotubos de carbono: no contiene impurezas metálicas, que pueden

dominar la electroquímica del material; y en la producción de grafeno se utiliza grafito, que es de bajo costo y accesible (Pumera et al., 2010).

5.2 FACTOR DE REPRODUCIBILIDAD

De acuerdo a la respuesta de los sensores fabricados, se obtuvo un valor de reproducibilidad de 1/3, es decir que, de cada 3 sensores fabricados, 1 de ellos presentó el comportamiento electroquímico típico de sensor interfacial limitado por difusión.

5.3 DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL DE ÓXIDO REDUCCIÓN

En primera instancia, se evaluó la afinidad del cobre por el glifosato; para esto, se utilizó la técnica Voltametría Diferencial de Pulso (DPV) con sensores sin electrodepositar y sensores electrodepositados a 3 segundos, en ausencia y presencia de glifosato a $10 \mu\text{mol L}^{-1}$, Figura 19.

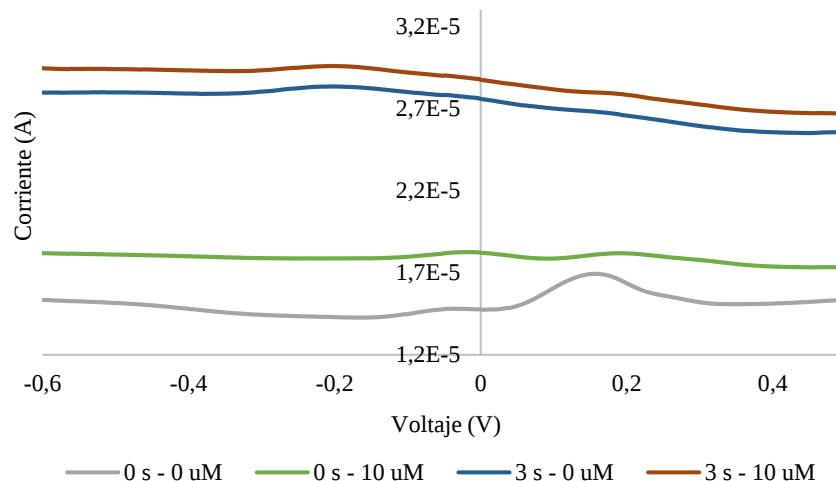


Figura 19. Voltagrama de diferencia de pulso en solución PBS (pH 7,4) para sensores: Sin electrodepositar en ausencia de glifosato (línea gris), Sin electrodepositar en presencia de glifosato (línea verde), electrodepositado a 3 s en ausencia de glifosato (línea azul), electrodepositado a 3 s en presencia de glifosato (línea marrón).

Al igual que en el análisis realizado con la técnica de voltametría cíclica, se observa que la electrodeposición de cobre influyó sobre la corriente obtenida. Además, la corriente en presencia de glifosato aumenta debido a la oxidación del cobre por la interacción entre los iones cobre y el glifosato en medio neutro. En la detección electroquímica del glifosato a través del uso de electrodos de cobre, los grupos funcionales del glifosato, como los amino, carboxil y fosfonato se enlazan a los iones cobre formando compuestos coordinados. Esta interacción ocurre en soluciones de pH cercano al neutro. Los compuestos solubles formados glifosato- Cu^{2+} , tienen iones de cobre y por lo tanto la cantidad de glifosato puede ser determinada, de forma indirecta (Moraes et al., 2010).

Posteriormente, se graficaron los voltagramas obtenidos por medio de la técnica DPV para los sensores sin deposición de cobre y con deposición de cobre, es decir, con tiempos de 0 y 3 s de electrodeposición, respectivamente, Figura 20. El voltaje de la reacción del glifosato con el cobre se determinó como el voltaje donde se presentó la corriente máxima.

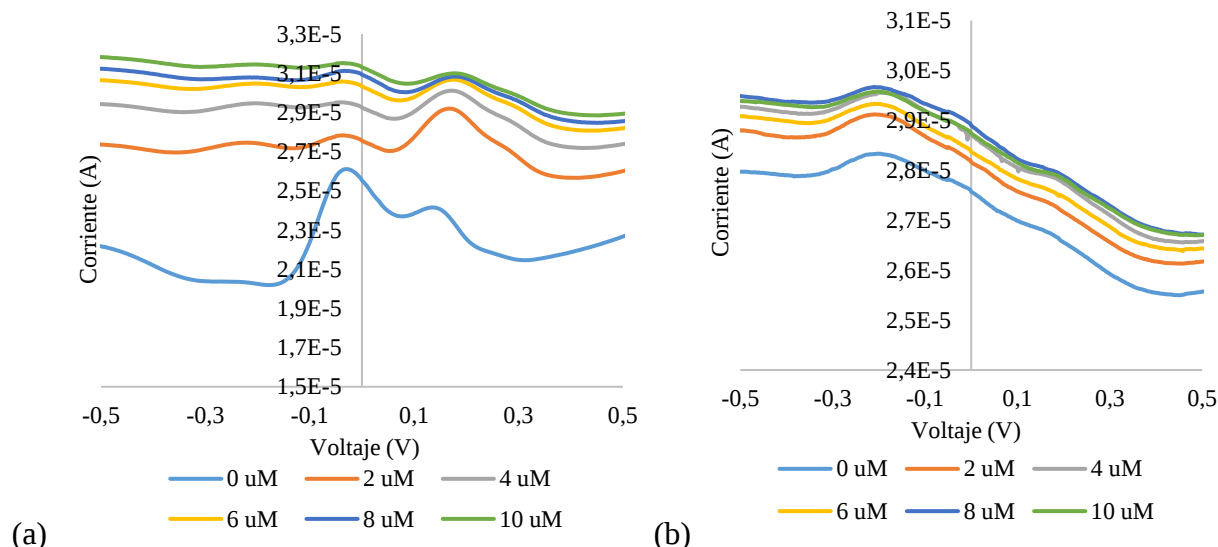


Figura 20. Voltagramas representativos de la técnica voltametría diferencial de pulsos de los sensores (a) sin electrodeposición y (b) con 3 segundos de electrodeposición.

Fuente: Elaboración propia.

Los picos obtenidos para el sensor sin y con electrodeposición de cobre son diferentes, lo que permite confirmar que la reacción entre el cobre y el glifosato se está produciendo. De la Figura 20 b, se observa que este reacción se presenta alrededor de -0,19 V; además, a medida que la concentración de glifosato aumenta, la corriente de respuesta aumenta.

Sin embargo, debido a la baja estabilidad presentada por el sensor en la técnica, se decidió utilizar la técnica de cronoamperometría.

5.4 CURVA DE CALIBRACIÓN

En la Figura 21 se muestra una curva de calibración representativa de los sensores obtenida con la técnica diferencial de pulso.

Dado que la Figura 21 presenta poca linealidad entre los datos (R^2 : 0,674) y que los sensores fueron muy inestables en esta técnica, se descarta la calibración de los sensores por medio de esta técnica.

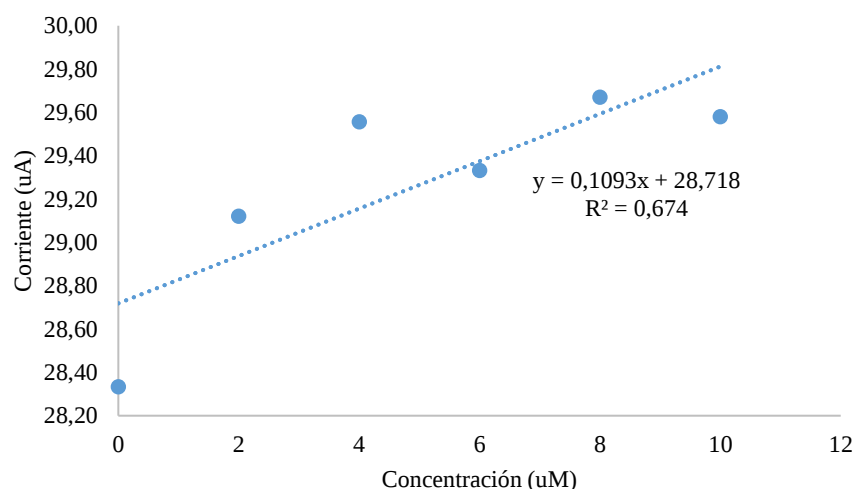


Figura 21. Curva de calibración representativa del sensor obtenida con DPV.

Fuente: Elaboración propia.

La Figura 22 muestra la gráfica obtenida con la técnica de cronoamperometría. En la Figura 22 a se muestra la corriente a lo largo del periodo de estabilización (hasta 30 minutos), con la posterior aplicación de glifosato, donde cada punto naranja representa el aumento de 1 μM en la solución. En la Figura 22 b se calculó el promedio de la corriente obtenida en cada inyección de glifosato, permitiendo graficar la curva de calibración del sensor, respecto a la concentración del analito.

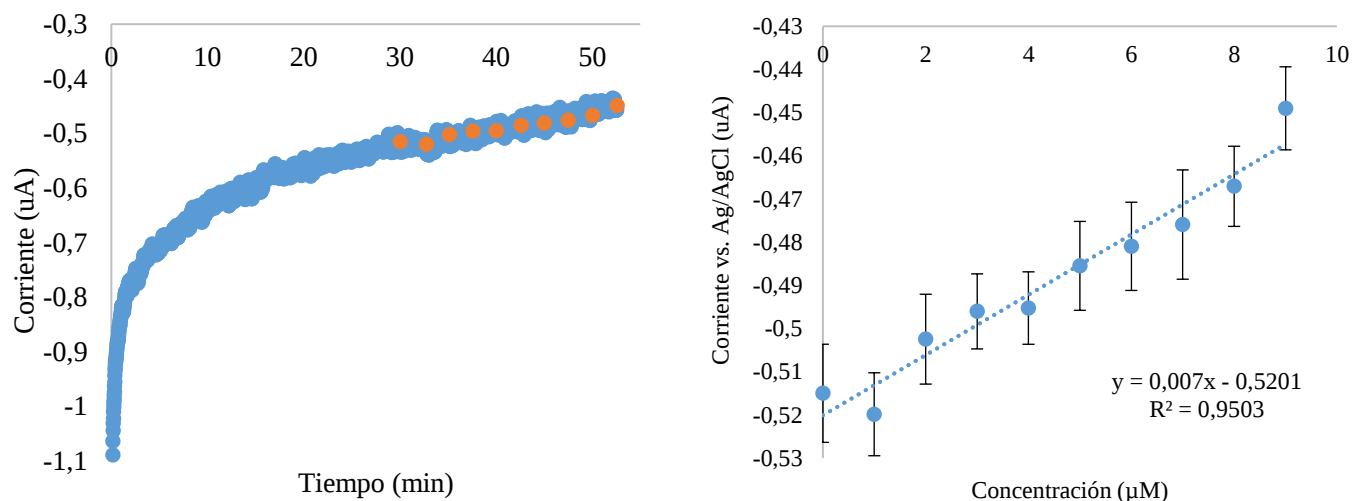


Figura 22. (a) Respuesta de un sensor con la técnica cronoamperometría y (b) curva de calibración representativa de un sensor con 3 s de deposición de cobre.

Fuente: Elaboración propia.

Para comprobar la reacción entre el glifosato y el cobre, se evaluaron sensores sin electrodepositar y electrodepositados a 3 y 10 segundos, y su sensibilidad se comparó en la Figura 23. Los sensores con 3 s de electrodeposición fueron los que mejor detectaron el glifosato.

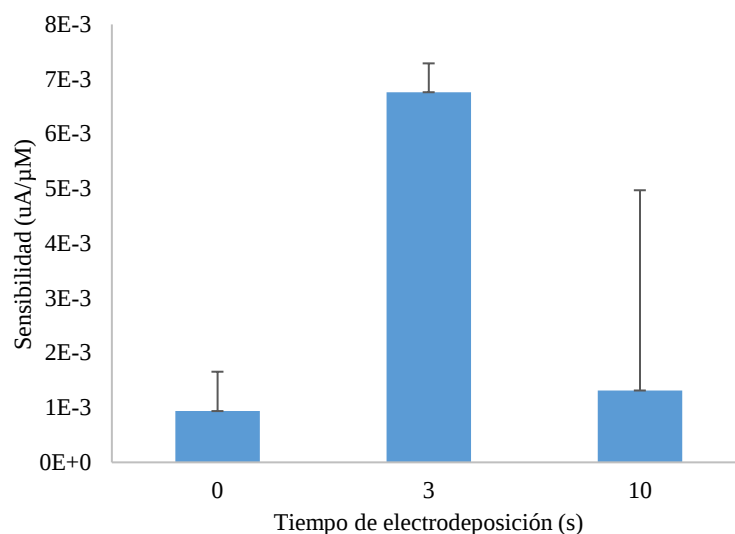


Figura 23. Comparación de la sensibilidad en sensores con tiempos de electrodeposición: 0, 3 y 10 s.

Fuente: Elaboración propia.

Para determinar el tiempo de reacción de los sensores, es necesario aproximar cada pulso a la Ecuación 2; por medio de una regresión no lineal (Figura 24) y la interacción entre las variables.

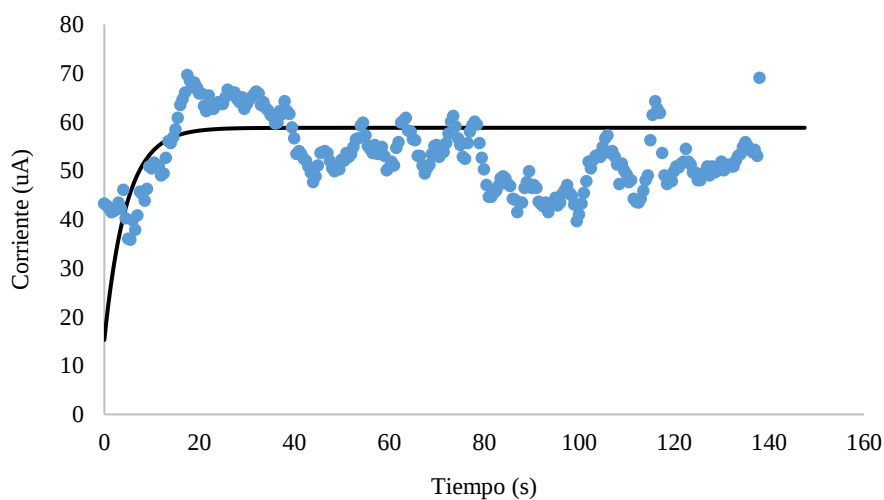


Figura 24. Regresión no lineal de la corriente de un pulso para determinar t95.

Fuente: Elaboración propia.

Se obtuvo una sensibilidad de $6,8 \pm 0,5 \text{ nA}/\mu\text{M}$, límite de detección $4,29 \pm 0,64 \mu\text{M}$ ($0,725 \pm 0,108 \text{ mg kg}^{-1}$) y tiempo de respuesta $139 \pm 59 \text{ s}$. como promedio de los sensores evaluados; el tiempo de respuesta nos corrobora que es un sensor de detención temprana.

De acuerdo al Codex Alimentarius el rango límite máximo de residuos en los alimentos para el glifosato, está comprendido entre 0,05 y 500 mg kg⁻¹ dependiendo de cada alimento (FAO, 2017).

5.5 PRUEBA DE CONCEPTO

Mediante la técnica de cronoamperometría, se presentó una respuesta a las aplicaciones de leche materna y leche materna contaminada con 2 de 5 sensores. Por medio de la Ecuación 4, se obtuvieron concentraciones de $0,27 \pm 0,34 \mu\text{M}$ y $1,13 \pm 0,60 \mu\text{M}$ en la primera y segunda inyección de leche materna, respectivamente, de acuerdo con la curva de calibración: Sensibilidad: $7,1 \pm 2,1 \text{ nA}/\mu\text{M}$. Sin embargo, debido a que las concentraciones obtenidas con se encuentran por debajo del límite de detección ($3,32 \pm 1,35 \mu\text{M}$), no es posible reportar un cambio en la concentración para el sensor.

Para las dos aplicaciones de leche materna contaminada con glifosato, se obtuvieron concentraciones de $4,05 \pm 0,15 \mu\text{M}$ y $5,81 \pm 0,21 \mu\text{M}$, respectivamente, con la ecuación 9. Los sensores utilizados presentaron un límite de detección de $4,04 \pm 2,26 \mu\text{M}$ y sensibilidad $5,9 \pm 2,9 \text{ nA}/\mu\text{M}$. Estos datos corresponden a 4,1 y 2,9 mM en la leche contaminada (Ecuación 6), obteniendo una concentración menor con la segunda inyección de glifosato. Este error se debe posiblemente a que la leche materna no estaba homogenizada, permitiendo la formación de gradientes de concentración de sus componentes.

Los resultados obtenidos fueron resumidos en la Tabla 1.

Tabla 1. Concentración obtenida con aplicaciones de leche materna y leche materna contaminada.

	Leche maternal		Leche materna contaminada	
	1ra aplicación	2da aplicación	1ra aplicación	2da aplicación
Límite de detección (μM)		3,32		4,04
Sensibilidad ($\text{nA}/\mu\text{M}$)		7,08		5,94
Concentración en 20 mL de solución PBS (μM)	0,27	1,13	4,05	5,81
Concentración en la solución inicial (mM)	<LOD	<LOD	4,05	2,90

Donde <LOD representa Menor al límite de detección.

Por otra parte, para las pruebas con agua destilada sin contaminar y contaminada, se obtuvieron cuatro resultados por debajo del LOD ($4,79 \pm 2,44 \mu\text{M}$) para el agua sin contaminar; y cuatro resultados para la contaminada, uno por debajo del LOD ($6,58 \pm 2,19 \mu\text{M}$) y el otro con un error significativo. Es necesario realizar más pruebas para mejorar la estabilidad del sensor.

6 COSTOS DEL SENSOR

Se determinó el costo de cada sensor, basado en una inversión inicial en equipos y en materiales para la producción de los sensores; y en costos operacionales, que incluye el costo por mano de obra y servicios. En la Tabla 2 se muestra en detalle el costo de cada uno de los elementos mencionados. Se asumió una producción de 25 sensores semanales, lo que equivale a 2400 sensores al año. Además, se asumió una vida útil de 3 años para los equipos y se realizó el cálculo de materiales y costos operacionales para un año. Teniendo en cuenta estos factores, cada sensor tiene un costo de \$5.400. Sin tener en cuenta el costo del operario, el costo del sensor se reduce a \$1.700. Adicionalmente, sin el costo de los equipos este valor disminuye a \$346. Estos valores fueron recopilados en la Tabla 3.

Tabla 2. Costos relacionados con la fabricación del sensor.

Descripción	Cantidad	Costo (\$)
Equipos		
Computador	1 und.	1.400.000
Potenciostato	1 und.	3.000.000
UPS	1 und.	1.000.000
Láser de grabado	1 und.	517.000
Balanza analítica	1 und.	2.670.000
Plancha de agitación y calentamiento	1 und.	790.000
Total equipos		9.377.000
Materiales		
Papel fotográfico	50 hojas	28.900
Cinta de Kapton	1 rollo 3 m	70.000
Esmalte	3 frascos de 10 mL	43.140
Moneda de cobre	1 und.	100
Pila 9V	1 und.	19.900
Solución Buffer de fosfato (PBS)	50 L	50.000
Tinta de cloruro de plata Ag/AgCl	200 mL	350.000
Sulfato de cobre	1 kg	15.000
Total materiales		577.040
Costos operacionales		
Mano de obra	1 operario	8.856.000
Electricidad		248.825
Agua		4.825
Total costos operacionales		9.109.650

Tabla 3. Costos del sensor.

Descripción	Costo (\$)
Sensor	5.358
Sensor sin el operario	1.668
Sensor sin el operario ni los equipos	346

Además, al cotizar sensores serigrafiados de la compañía *DropSens* (España) similares a los desarrollados (sin área modificada), y comparándolos con los fabricados, se observa que el desarrollo de los sensores constituye un proyecto viable.

Tabla 4. Comparación de costos del sensor.

Sensor	Costo (\$)
<i>DropSens</i>	12.600
Elaborados	346

7 CONCLUSIONES

- Se desarrolló un prototipo de sensor de bajo costo con la técnica de impresión láser de grafeno, con aplicación directa de tinta de cloruro de plata y electrodeposición de nanopartículas de cobre, con características de desempeño adecuadas y comparables los límites establecidos por la FAO para algunos alimentos.
- Se obtuvo una variabilidad alta en pruebas de concepto en muestras de leche materna, debido a la complejidad de la matriz evaluada y a la necesidad de pretratamientos para el análisis. Además, para las pruebas con agua destilada, los resultados se encontraron por debajo del LOD, o con una variabilidad alta.
- Se recomienda continuar estudios con los sensores fabricados, con énfasis en ensayos de selectividad con posibles interferencias de componentes químicos y en cuanto al mecanismo de adquisición de señal para realizar las mediciones in situ, y no en laboratorio.

8 RECOMENDACIONES

- Realizar más ensayos de selectividad comparando respuestas con posibles interferencias de componentes químicos en las pruebas electroquímicas, a un voltaje de 100 mV.
- Posiblemente la mejor manera de procesar estos datos es a través de algoritmos de aprendizaje automático que permita clasificar rápidamente los resultados del sensor en rangos de concentración del herbicida.

9 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arcila, J., y Villegas, F. (1995). *Uso de madurantes*. El cultivo de la caña en la zona azucarera de Colombia. CENICAÑA., Cali, Colombia.
- ASDL. (S.f.). *Analytical Electrochemistry: The Basic Concepts*. : Analytical Sciences Digital Library (ASDL).
- Bøhn, T., Cuhra, M., Traavik, T., Sanden, M., Fagan, J., y Primicerio, R. (2014). Compositional differences in soybeans on the market: Glyphosate accumulates in Roundup Ready GM soybeans. *Food Chemistry*, 153, 207-215.
- Campoy, C., Jimenez, M., Olea-Serrano, M., Frias, M. M., Canabate, F., Olea, N., . . . Molina-Font, J. (2001). Analysis of organochlorine pesticides in human milk: preliminary results. *Early Human Development*, 65, S183-S190.
- Cordero Heredia, D., y Sánchez, F. (2007). Regulaciones Internacionales del Glifosato. *Red de Acción en Plaguicidas y sus Alternativas para América Latina RAPAL, Coordinación Uruguay, Montevideo*.
- De Wael, K., Peeters, K., Bogaert, D., Buschop, H., Vincze, L., y Adriaens, A. (2007). Electrochemical and spectroscopic characterization of a gold electrode modified with 3, 4', 4'', 4''' copper (II) tetrasulphonated phthalocyanine. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 603(2), 212-218.
- FAO. (2017). *Residuos de plaguicidas en los alimentos y piensos. 158 - Glifosato.*, Food and Agriculture Organization (FAO). Recuperado de http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/standards/pestres/pesticide-detail/es/?p_id=158
- Greenhalgh, R., Baron, R., Desmoras, J., Engst, R., Esser, H., y Klein, W. (1980). Definition of persistence in pesticide chemistry. *International Union of*.
- Grouchko, M., Kamysny, A., Mihailescu, C. F., Anghel, D. F., y Magdassi, S. (2011). Conductive inks with a “built-in” mechanism that enables sintering at room temperature. *ACS nano*, 5(4), 3354-3359.
- Henao Muñoz, L. M., Montes Rojas, C. M., y Bernal Bautista, M. H. (2015). Acute toxicity and sublethal effects of the mixture glyphosate (Roundup® Active) and Cosmo-Flux®411F to anuran embryos and tadpoles of four Colombian species. *Revista de Biología Tropical*, 63, 223-233.
- ICA. (s.f.). *Laboratorios Registrados y autorizados*: Instituto Colombiano de Agricultura.
- Ju, H., Xueji, Z., y Wang, J. (2011). *NanoBiosensing: Principles, Development and Application*: Springer Science & Business Media.
- Koskinen, W. C., Marek, L. J., y Hall, K. E. (2016). Analysis of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in water, plant materials and soil. *Pest management science*, 72(3), 423-432.
- Krüger, M., Schledorn, P., Schrödl, W., Hoppe, H.-W., Lutz, W., y Shehata, A. A. (2014). Detection of glyphosate residues in animals and humans. *Journal of Environmental & Analytical Toxicology*, 4(2), 1.
- Lavecchia, T., Tibuzzi, A., y Giardi Maria, T. (2010). Biosensors for Functional Food Safety and Analysis. In Springer (Ed.), *Bio-Farms for Nutraceuticals* (pp. 267-281).
- Michael, A. C., y Borland, L. (2006). *Electrochemical methods for neuroscience*: CRC Press.
- Ministerio de Ambiente, V. y. D. T. (2007). *Resolución Número 1435*.
- MNCN. (s.f.). *Cromatografía de gases*: Museo Nacional de Ciencias Naturales (MNCN).
- Moraes, F. C., Mascaro, L. H., Machado, S. A., y Brett, C. (2010). Direct electrochemical determination of glyphosate at copper phthalocyanine/multiwalled carbon nanotube film electrodes. *Electroanalysis*, 22(14), 1586-1591.

- Myers, J. P., Antoniou, M. N., Blumberg, B., Carroll, L., Colborn, T., Everett, L. G., . . . Benbrook, C. M. (2016). Concerns over use of glyphosate-based herbicides and risks associated with exposures: a consensus statement. *Environ Health*, 15, 19. doi: 10.1186/s12940-016-0117-0
- Nivia, E. (2001). *Las fumigaciones aéreas sobre cultivos ilícitos si son peligrosas*. Universidad de California, Davis, EE.UU. Recuperado de http://www.biodiversidadla.org/Principal/Secciones/Documentos/Biodiversidad_en_America_Latina/Las_fumigaciones_aereas_sobre_cultivos_ilicitos_si_son_peligrosas
- Nollet, L. M. L. (2004). *Handbook of Food Analysis: Residues and other food component analysis*: Taylor & Francis.
- Oliveira, G. C., Moccelini, S. K., Castilho, M., Terezo, A. J., Possavatz, J., Magalhães, M. R., y Does, E. F. (2012). Biosensor based on atemoya peroxidase immobilised on modified nanoclay for glyphosate biomonitoring. *Talanta*, 98, 130-136.
- Osatinsky, R. (2007). ¿ Que es la electroforesis capilar? *Bioquímica y Patología Clínica*, 71(2), 60-66.
- Pumera, M., Ambrosi, A., Bonanni, A., Chng, E. L. K., y Poh, H. L. (2010). Graphene for electrochemical sensing and biosensing. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 29(9), 954-965.
- Ronkainen, N. J., Halsall, H. B., y Heineman, W. R. (2010). Electrochemical biosensors. *Chemical Society Reviews*, 39(5), 1747-1763.
- Sierra, E. V., Méndez, M. A., Sarria, V. M., y Cortés, M. T. (2008). Electrooxidación de glifosato sobre electrodos de níquel y cobre. *Quim. Nova*, 31(2), 220-226.
- Simões, F. R., Mattoso, L. H. C., y Vaz, C. M. P. (2006). Conducting polymers as sensor materials for the electrochemical detection of pesticides. *Sensor Letters*, 4(3), 319-324.
- Songa, E. A., Waryo, T., Jahed, N., Baker, P. G., Kgarebe, B. V., y Iwuoha, E. I. (2009). Electrochemical nanobiosensor for glyphosate herbicide and its metabolite. *Electroanalysis*, 21(3-5), 671-674.
- Štulík, K., Pacáková, V., Le, K., y Hennisen, B. (1988). Amperometric flow detection with a copper working electrode—response mechanism and application to various compounds. *Talanta*, 35(6), 455-460.
- Tehrani, F., y Bavarian, B. (2016). Facile and scalable disposable sensor based on laser engraved graphene for electrochemical detection of glucose. *Scientific Reports*, 6.
- TESTBIOTECH. (2013). High levels of residues from spraying with glyphosate found in soybeans in Argentina, from https://www.testbiotech.org/sites/default/files/TBT_Background_Glyphosate_Argentina_0.pdf
- Tuantranont, A. (2013). *Applications of Nanomaterials in Sensors and Diagnostics*. Alemania.
- UNL. (2010). *Informe acerca del grado de toxicidad del glifosato*.: Universidad Nacional del Litoral.
- UNODC. (2016). *Monitoreo de territorios afectados por cultivos ilícitos 2015*. Colombia.
- Vanegas, D. (2015). *Nanomaterial mediated biosensors for agricultural and food safety applications*. University of Florida.
- Vargas Meza, R. (1999). *Fumigación y Conflicto: Políticas antidrogas y deslegitimación del Estado en Colombia: Tercer mundo*.

- Varona, M., Henao, G. L., Díaz, S., Lancheros, A., Murcia, A., Rodríguez, N., y Álvarez, V. H. (2009). Evaluación de los efectos del glifosato y otros plaguicidas en la salud humana en zonas objeto del programa de erradicación de cultivos ilícitos. *Biomédica*, 29(3), 456-475.
- Viswanathan, S., Radecka, H., y Radecki, J. (2009). Electrochemical biosensors for food analysis. *Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly*, 140(8), 891-899.
- Wang, J. (2006). *Analytical electrochemistry*: John Wiley & Sons.
- WHO. (2005). *Glyphosate and AMPA in Drinking-water*: World Health Organization.
- WHO. (2015). *IARC Monographs Volume 112: evaluation of five organophosphate insecticides and herbicides*: World Health Organization.
- Winfiel, T. W., Bashe, W. J., y Baker, T. V. (1990). *METHOD 547. DETERMINATION OF GLYPHOSATE IN DRINKING WATER BY DIRECT-AQUEOUS INJECTION HPLC, POST-COLUMN DERIVATIZATION, AND FLUORESCENCE DETECTION*.
- Yerga, D. (2012). Electroodos serigrafiados como plataforma analítica, from <https://quimicosonador.wordpress.com/2012/03/23/electrodos-serigrafiados-como-plataforma-analitica/>
- Zhang, N., Wilkop, T., Lee, S., y Cheng, Q. (2007). Bi-functionalization of a patterned Prussian blue array for amperometric measurement of glucose via two integrated detection schemes. [10.1039/B611357E]. *Analyst*, 132(2), 164-172. doi: 10.1039/B611357E