



**Encuentro
de Jóvenes
Investigadores**

DISPOSITIVO MICROFLUÍDICO PARA LA DETECCIÓN DE GLIFOSATO (GLIFOSTRIP) EN MUESTRAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

Wagner, Gisel E.

*Laboratorio de Sensores y Biosensores
Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, UNL
Directora: Fabiano, Silvia Noemí
Co-Directora: Kergaravat, Silvina Vanesa*

Área: Ciencias Naturales

Palabras claves: Herbicida, Tira reactiva, Aplicación ambiental y biológica.

INTRODUCCIÓN

El glifosato es el herbicida de amplio espectro comúnmente utilizado en Argentina. Suele usarse en el formato de sal, principalmente de isopropilamina en las formulaciones comerciales. Luego de las aplicaciones, este herbicida persiste en el ambiente y se degrada, siendo su principal metabolito el ácido aminometilfosfónico (AMPA), y una vez que ingresa a los cuerpos de agua se asocia a la fracción particulada y se deposita en los sedimentos (Ayarragaray y col., 2014; Paravani y col., 2016). Estudios de lixiviación y escurrimiento indican que puede ser transportado hacia las capas profundas del suelo o hacia cursos de agua superficiales cuando su aplicación se realiza previo a lluvias intensas (Sasal y col., 2017). La información sobre este herbicida es contradictoria ya que algunos organismos reguladores lo clasifican como peligroso y otros como seguro. Además, las normativas regulatorias son muy diferentes dependiendo de cada país. Sin embargo, diversos estudios con glifosato han documentado efectos adversos sobre el ecosistema y efectos genotóxicos y potencialmente carcinogénicos para el ser humano (Guyton y col., 2015). En los últimos años hubo un creciente interés en el desarrollo de herramientas analíticas prácticas y costo-efectivas, siendo las basadas en papel las más usadas debido a que es un insumo abundante, de bajo costo, sustentable, descartable y fácil de usar, conservar y transportar. Además, no requiere de un laboratorio de alta complejidad, instrumentación sofisticada ni personal entrenado (Attaallah y Amine, 2022). En este proyecto se propone el desarrollo de un dispositivo microfluídico basado en una tira reactiva para detectar glifosato (GlifoStrip) en matrices biológicas y ambientales. Mediante el GlifoStrip portátil, se podrá analizar la

Título del proyecto: Estrategias para el diagnóstico de enfermedades infecciosas de relevancia en Salud Humana y Animal (Zoonosis) mediante dispositivos analíticos microfluídicos basados en la incorporación de nano y/o micromateriales.

Instrumento: CAI+D 2020 PI TIPO I. Código: 50520190100130LI

Año convocatoria: 2020

Organismo financiador: CONICET

Director/a: Dra. Silvia Raquel Hernández





presencia de glifosato en muestras de agua *in situ* para estimar el impacto ambiental y detectar al herbicida en orina de animales de granja como componentes del ecosistema que intervienen en la cadena alimenticia para evaluar su exposición directa al glifosato.

OBJETIVO

Desarrollar un dispositivo microfluídico portátil (tira reactiva) basado en un ensayo de inhibición de la enzima peroxidasa (HRP) para detectar glifosato de manera rápida y eficiente en muestras biológicas y ambientales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

Se utilizaron reactivos de grado analítico: las partículas magnéticas modificadas con estreptavidina (PM-E) se adquirieron en Invitrogen Dynal AS.; la enzima HRP rotulada con biotina (HRP-B) en Invitrogen, cosustrato hidroquinona (HQ), sustrato (H_2O_2) y principio activo comercial de Glifosato Pestanal en Sigma. Como soporte se utilizó papel de filtro de celulosa Boeco de 84 g m^{-2} . Se usó el formulado comercial GlacoXAN TOTAL cuyo rótulo declara 43,8 g de glifosato como sal monopotásica (35,6 g corresponden al ácido N-fosfonometil glicina), inertes y coadyuvantes c.s.p. en 100 ml. Para las lecturas se utilizó una solución reguladora de fosfato de sodio (NaH_2PO_4/Na_2HPO_4) 0,1 M de pH 7,2.

Detección de glifosato mediante ensayos a la gota

La adición de los reactivos sobre el papel de filtro de celulosa se realizó adicionando volúmenes consecutivos de $0,1 \mu\text{L}$ de HRP ($9,19 \times 10^{-7} \text{ M}$), glifosato, HQ (0,4088 M) y H_2O_2 (0,4088 M), sin tiempo de interacción entre cada adición. Además del ensayo de glifosato se realizaron los ensayos de Blanco de enzima (HQ y H_2O_2) y Blanco de glifosato (HRP, HQ y H_2O_2). Luego de agregado el último reactivo se comenzó a percibir una coloración naranja en el papel, momento en el cual se procedió a tomar fotografías de cada uno de los ensayos. En la **Figura 1** se muestra una fotografía representativa del método utilizado para la detección de glifosato.

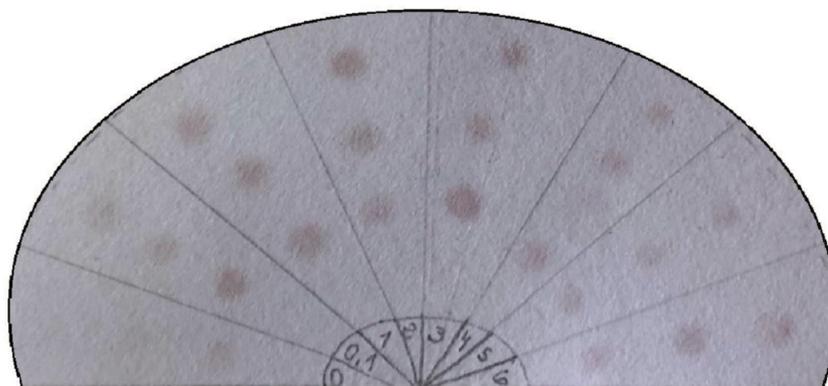


Figura 1. Fotografía representativa del método de detección de glifosato mediante ensayo a la gota sobre papel. Referencias: 0) Blanco de la Enzima. 0,1) Blanco del Glifosato. 1-6) Ensayo de glifosato en el rango de concentración de 0,01 a 0,5 ppm.



Los ensayos a la gota se realizaron para el estudio preliminar del sistema enzimático y para la optimización de las condiciones experimentales que posteriormente se aplicaron en el dispositivo microfluídico.

Detección de glifosato mediante dispositivo microfluídico

El dispositivo se diseñó a partir de un portaobjeto al cual se adhirieron mediante una cinta bifaz las tiras reactivas y los imanes correspondientes. El dispositivo se dividió en dos zonas principales la *zona de siembra* y *zona de reacción*. En la **Figura 2** se muestra el prototipo del dispositivo microfluídico.

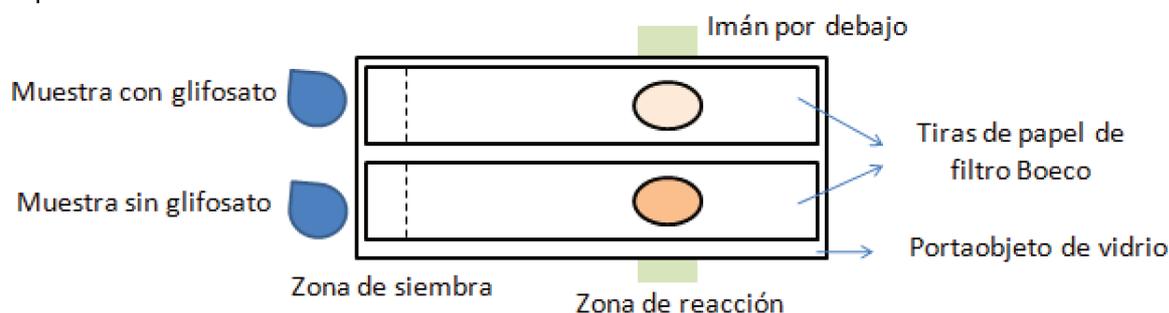


Figura 2. Prototipo del dispositivo microfluídico.

La adición de los reactivos sobre el papel de filtro de celulosa se realizó con la siguiente secuencia: 1) en la zona de reacción se depositó 0,3 mg/ml de PM-E, se dejó secar y se adicionó 0,28 nmol de HRP-B; 2) en la zona de siembra se colocó 20 μ l de muestra con y sin glifosato a 240 ppb en solución buffer de pH 7,2; 3) se realizó el revelado de la reacción agregando en la zona de reacción 55 nmol de una mezcla de HQ y H₂O₂; 4) se tomaron fotografías de cada uno de los ensayos.

Las fotografías capturadas a partir del ensayo a la gota y del dispositivo microfluídico se tomaron con la cámara (resolución 12 Mpx) de un celular iPhone 8, a una distancia de 21 cm del papel, sin flash, con zoom (50%). Se procesaron con el programa ImageJ, instalado en una laptop.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Método para detectar glifosato basado en ensayo a la gota

Inicialmente se realizó un ensayo a la gota, con adiciones sucesivas de los reactivos de la reacción enzimática, para conocer el comportamiento del sistema HRP con sus sustratos en presencia y ausencia de glifosato; y realizar una optimización preliminar de las condiciones experimentales que posteriormente se aplicarían en el dispositivo microfluídico. Luego de definidas las condiciones óptimas del método, se obtuvo una curva de calibración donde se relacionó la concentración de glifosato con la intensidad de la señal en píxeles (px). Las cifras de mérito obtenidas fueron: límite de detección (**LD**): 1 ppb; límite de cuantificación (**LC**): 19 ppb; **Rango lineal**: 19-75 ppb; **Sensibilidad**: $0,187 \pm 0,008$ px ppb⁻¹; **R²**: 0,9696. Se determinaron las precisiones intra-ensayo (un día) e inter-ensayo (3 días) a distintas



concentraciones de glifosato (5, 30 y 50 ppb). Se obtuvieron valores de precisiones aceptables, ya que los coeficientes de variación de los ensayos estuvieron comprendidos entre 7,8 - 12 % para la precisión intra-ensayo y entre 9,6 - 23,9 % para la precisión inter-ensayo (AOAC, 2006).

A partir de los resultados de evaluar el efecto matriz del formulado comercial "GlacoXAN" a distintas concentraciones se obtuvieron recuperaciones comprendidas entre un 95 y 115%, lo cual es aceptable según AOAC (2006). Por lo que se determinó ausencia de efecto matriz en el rango de concentraciones ensayadas de formulado comercial (5 a 50 ppb).

Método para detectar glifosato sobre el dispositivo microfluídico

A partir del conocimiento del sistema enzimático en presencia de glifosato obtenido en el ensayo a la gota; se procedió a optimizar las condiciones experimentales del dispositivo microfluídico mediante metodologías de superficie de respuesta, utilizando 240 ppb de glifosato, por ser el nivel aceptado según la normativa Argentina (Subsecretaría de Recursos Hídricos de la Nación, 2003). A partir del dispositivo microfluídico optimizado se pudo evidenciar una respuesta inhibitoria de la enzima en presencia de glifosato, lo cual demostraría la utilidad y aplicación del GlifoStrip desarrollado.

Conclusión: se validó la metodología basado en ensayo a la gota obteniendo buenos parámetros analíticos y demostrando ausencia de efecto matriz al evaluar el herbicida a partir de una formulación comercial. En base al conocimiento del sistema obtenido mediante este método, se procedió a desarrollar el Glifostrip basado en un dispositivo microfluídico para detectar glifosato. *Perspectiva:* Completar la validación del Glifostrip y evaluar la aplicabilidad del método en muestras de agua subterráneas y superficiales así como también en muestras de orina de ganado vacuno.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

AOAC, 2006. Peer Verified methods Program, Manual on policies and procedures, Arlington, VA.

Attaallah, R.; Amine, A., 2022. Highly selective and sensitive detection of cadmium ions by horseradish peroxidase enzyme inhibition using a colorimetric microplate reader and smartphone paper-based analytical device. *Microchemical Journal*, Volume 172, Part B, 2022.

Ayarragaray, M.; Regaldo, L.; Reno, U.; Gutiérrez, M.F.; Marino, D.; Gagnetten, A.M., (2014) Monitoreo de glifosato y ácido aminometilfosfónico (AMPA) en ambientes acuáticos cercanos a la ciudad de San Justo (Provincia de Santa Fe, Argentina). V Congreso SETAC Argentina. Neuquén, 22-25/10/14.

Guyton, K.Z.; Loomis, D.; Grosse, Y.; El Ghissassi, F.; Benbrahim-Tallaa, L.; Guha, N., Scoccianti, C.; Mattock, H.; Straif, K., 2015. *Lancet Oncology* 16: 490-491.

<https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/documento53.pdf>. Acceso el 13 agosto

Nacionales de calidad de agua ambiente correspondientes a glifosato. Disponible en:

Paravani, E. V.; Sasal, M. C.; Sione, S. M.; Gabioud, E. A.; Oszust, J. D.; Wilson, M. G.; Demonte, L.; Repetti, M. R., 2016. Determinación de la concentración de glifosato en agua mediante la técnica de inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA). *Rev. Int. Contam. Ambie.* 32 (4): 399-406.

Sasal, M.C.; Wilson, M.G.; Sione, S.M.; Beghetto, S.M.; Gabioud, E.A.; Oszust, J.D.; Paravani, E.V.; Demonte, L.; Repetti, M.R.; Bedendo, D.J.; Medero, S.L.; Goette, J.J.; Pautasso, N.; Schulz, G.A., 2017. Monitoreo de glifosato en agua superficial en Entre Ríos. La Investigación Acción Participativa como metodología de abordaje Prácticas de mitigación de contaminación por escurrimiento. 3er Simposio de malezas y herbicidas: 71-78.

Subsecretaría de Recursos Hídricos de la Nación. (2003). Desarrollos de niveles guía Nacionales de calidad de agua ambiente correspondientes a glifosato. Disponible en:

<https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/documento53.pdf>. Acceso el 18 agosto 2022.