

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL  
FACULTAD DE BIOQUÍMICA Y CIENCIAS BIOLÓGICAS



Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctora en Ciencias Biológicas

# Desarrollo de biosensores acoplados a la telefonía móvil para monitoreo ambiental

**Lic. Joana Macagno**

Director de Tesis:  
**Dr. Claudio L. A. Berli**

Co - Directora de Tesis:  
**Dra. María Lucila Satuf**

Lugar de realización:  
Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química  
INTEC (UNL - CONICET)

**2023**

*“Lo más difícil es tomar la decisión de hacer algo, el resto es simplemente perseverar. Los miedos son tigres de papel. Puedes hacer cualquier cosa que decidas hacer. Puedes actuar para cambiar y controlar tu vida; y el procedimiento, el proceso es su propia recompensa”.*

---

Amelia Earhart

# Agradecimientos

Deseo expresar mi agradecimiento a todas las personas e instituciones que colaboraron para la concreción de esta Tesis.

A la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas por permitirme ser parte de su comunidad.

Al CONICET, la UNL y la Agencia Nacional de Promoción de la Investigación, el Desarrollo Tecnológico y la Innovación (Agencia I+D+i) por el apoyo financiero.

A los miembros del Jurado, por su interés y disposición para participar en la evaluación del presente trabajo.

A Claudio Berli y María Lucila Satuf, por su dedicación y compromiso en mi formación académica y en la dirección de mi Tesis doctoral. Su guía permanente, incontable cantidad de conocimiento y experiencia compartidos, y su inmensa calidez humana, han sido una parte fundamental en mi crecimiento personal y profesional. Les agradezco por presentarme nuevas áreas de conocimiento, por proveerme un espacio para desarrollar el pensamiento crítico con libertad intelectual, por afrontar cada desafío con actitud superadora, por la motivación constante y el apoyo para llevar adelante cada proyecto.

Al INTEC por haberme albergado durante este tiempo, y a su gran comunidad por convertir la cotidianidad laboral en una andanza entrañable. A los integrantes del Grupo de Fotorreactores y Tecnologías Ambientales y del Grupo de Microfluídica, con quienes comparto esta hermosa tarea de investigar, quienes compartieron sus conocimientos y me brindaron su ayuda con la mejor predisposición.

A los investigadores del Grupo Santafesino de Microfluídica (GSaM), por compartir su dominio en diversas disciplinas en pos de la generación de nuevos conocimientos, fomentando el trabajo en equipos multidisciplinarios y augurando un clima de trabajo ameno y colaborativo. Y, por sobre todo, por hacer todo lo anterior contagiando entusiasmo.

A las amigas que coseché durante este tiempo: tan distintas y tan fundamentales todas, hermosos ejemplos de superación. Gracias por su contención, apoyo y por los tantísimos consejos.

Finalmente, a mis papás: por haberme inculcado los valores que hoy defiendo incansablemente, por haberme dado siempre las herramientas para crecer y por ser mi sostén permanente en cada paso.

# Aportes Científico-Tecnológicos

## Publicaciones:

- **Macagno, J.**, Gerlero, G. S., Satuf, M. L., & Berli, C. L. A. (2023). Field-deployable aptasensor with automated analysis of stain patterns for the detection of chlorpyrifos in water. *Talanta*, 252, 123782.
- Schaumburg, F., Vidoceovich, J. P., Gerlero, G. S., Pujato, N., **Macagno, J.**, Kler, P. A., & Berli, C. L. A. (2022). A free customizable tool for easy integration of microfluidics and smartphones. *Scientific Reports*, 12(1), 8969.
- **Macagno, J.**, Lescano, M. R., & Berli, C. L. A. (2019). Milli-channel array for direct and quick reading of root elongation bioassays. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 178, 51 – 57.
- Satuf, M. L., **Macagno, J.**, Manassero, A., Bernal, G., Kler, P. A., & Berli, C. L. A. (2019). Simple method for the assessment of intrinsic kinetic constants in photocatalytic microreactors. *Applied Catalysis B: Environmental*, 241, 8-17.

## Protección de la propiedad intelectual:

- Berli, C. L. A, **Macagno, J.**, Lescano, M. R. Dispositivo de medición de la longitud de raíces de semillas germinadas. Modelos de utilidad presentado en el INPI (Instituto Nacional de la Propiedad Intelectual), solicitud: 20200100987. Entidades beneficiarias: UNL y CONICET.

# Índice general

<b>Lista de Abreviaturas y Símbolos</b>	<b>7</b>
<b>Resumen</b>	<b>10</b>
<b>Abstract</b>	<b>12</b>
<b>Introducción</b>	<b>13</b>
El problema de la contaminación ambiental . . . . .	13
Actividades productivas y uso de agroquímicos . . . . .	14
Dispositivos de microfluídica . . . . .	18
<b>Objetivos</b>	<b>24</b>
<b>1. <i>Aptasensor</i></b>	<b>25</b>
1.1. Introducción . . . . .	25
1.1.1. Relevancia de la detección de clorpirifós . . . . .	25
1.1.2. Técnicas de análisis de plaguicidas . . . . .	26
1.1.3. Biosensores para plaguicidas: detección . . . . .	27
1.1.4. Biosensores para plaguicidas: transducción . . . . .	28
1.1.5. Microdispositivos basados en papel para determinaciones analíticas	30
1.1.6. Análisis de patrones y el efecto del anillo de café . . . . .	32
1.2. Objetivos . . . . .	33
1.3. Materiales y métodos . . . . .	33
1.3.1. Reactivos . . . . .	33
1.3.2. Selección del aptámero . . . . .	34
1.3.3. Síntesis de nanopartículas de oro (AuNPs) . . . . .	34
1.3.4. Diseño y fabricación de las tarjetas . . . . .	35
1.3.5. Detección de clorpirifós (CPS) . . . . .	35
1.3.6. Obtención y análisis de datos . . . . .	36
1.3.7. Evaluación de especificidad e interferencias . . . . .	36
1.3.8. Desempeño de la plataforma . . . . .	38
1.3.9. Detección de CPS en agua de río . . . . .	38
1.4. Resultados y discusión . . . . .	39
1.4.1. Mecanismo de detección . . . . .	39
1.4.2. Sistema de lectura . . . . .	39
1.4.3. Detección cuantitativa de CPS . . . . .	41
1.4.4. Desempeño analítico del biosensor . . . . .	42
1.4.5. Análisis de especificidad e interferencias . . . . .	45
1.4.6. Desempeño del biosensor en diferentes condiciones de operación .	46

1.4.7. Detección de CPS en muestras de agua de río . . . . .	48
1.5. Conclusiones . . . . .	49
<b>2. <i>Plant-chip</i></b>	<b>50</b>
2.1. Introducción . . . . .	50
2.1.1. Ensayos de fitotoxicidad en plantas . . . . .	50
2.1.2. Diseño de dispositivos . . . . .	51
2.2. Objetivos . . . . .	52
2.3. Materiales y métodos . . . . .	52
2.3.1. Materiales . . . . .	52
2.3.2. Fabricación y armado de los dispositivos . . . . .	52
2.3.3. Preparación de los bioensayos . . . . .	54
2.3.4. Ensayos de validación del dispositivo . . . . .	54
2.3.5. Cálculo de indicadores toxicológicos . . . . .	56
2.3.6. Integración a <i>appuente</i> . . . . .	57
2.4. Resultados y discusión . . . . .	58
2.4.1. Funcionamiento del dispositivo . . . . .	58
2.4.2. Parámetros toxicológicos para la exposición a glifosato (GFS) . . . . .	58
2.4.3. Evaluación de muestras reales . . . . .	62
2.4.4. Integración con <i>appuente</i> . . . . .	64
2.5. Conclusiones . . . . .	65
<b>3. <i>FDA-chip</i></b>	<b>67</b>
3.1. Introducción . . . . .	67
3.1.1. Definición de calidad del suelo . . . . .	67
3.1.2. Clasificación y selección de indicadores . . . . .	68
3.1.3. Tecnologías de biorremediación . . . . .	69
3.1.4. Medición de la actividad hidrolítica . . . . .	70
3.2. Objetivos . . . . .	72
3.3. Materiales y métodos . . . . .	72
3.3.1. Fabricación del dispositivo . . . . .	72
3.3.2. Procesamiento de las muestras . . . . .	74
3.3.3. Método de lectura en el dispositivo . . . . .	75
3.3.4. Muestras de suelo . . . . .	75
3.3.5. Muestras de un sistema de biopurificación . . . . .	75
3.3.6. Construcción de curvas de calibrado . . . . .	77
3.4. Resultados y discusión . . . . .	77
3.4.1. Determinación cuantitativa . . . . .	77
3.4.2. Muestras de suelo . . . . .	77
3.4.3. Monitoreo de biolechos . . . . .	78
3.5. Conclusiones . . . . .	79
<b>Conclusiones</b>	<b>80</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>82</b>

# Lista de Abreviaturas y Símbolos

## Abreviaturas

Abreviatura	Definición
2,4 – D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
<i>AChE</i>	Acetilcolinesterasa
<i>AIDC</i>	Identificación y captura automática de los datos
<i>AMPA</i>	Ácido aminometilfosfónico
<i>ANOVA</i>	Análisis de la varianza
<i>AuNP</i>	Nanopartícula de oro
<i>CBR</i>	Carbaril
<i>CE50</i>	Concentración efectiva media
<i>COP</i>	Contaminante orgánico persistente
<i>CPS</i>	Clorpirifós
<i>CPO</i>	Clorpirifós-oxon
<i>CR</i>	<i>Coffee-ring</i>
<i>CUP</i>	Agroquímico de uso corriente
<i>CV</i>	Coefficiente de variación
<i>DCV</i>	Diclorvos
<i>DE</i>	Desvío estándar
<i>DDT</i>	Dicloro difenil tricloroetano
<i>ELISA</i>	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
<i>ER</i>	Elongación radicular
<i>F</i>	Fluoresceína
<i>FDA</i>	Diacetato de fluoresceína
<i>FTT</i>	Fenitrotión
<i>GFS</i>	Glifosato
<i>GSV</i>	Gray-scale-value
<i>HPLC</i>	Cromatografía líquida de alta eficiencia
<i>HR</i>	Humedad relativa
<i>HSL</i>	Hue-saturation-lightness
<i>HSV</i>	Hue-saturation-value
<i>ID</i>	Disco interno
<i>IER</i>	Índice de elongación radicular
<i>IG</i>	Índice de germinación
<i>INTA</i>	Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
<i>FeCoAgro</i>	Federación de Cooperativas Argentinas
<i>LOC</i>	<i>Lab-on-a-Chip</i>
<i>LOD</i>	Límite de detección

<b>Abreviatura</b>	<b>Definición</b>
<i>LOQ</i>	Límite de cuantificación
<i>LSPR</i>	Resonancia de plasmones superficiales localizados
<i>NPM</i>	Nanopartícula metálica
<i>OA</i>	Anillo externo
<i>OC</i>	Organoclorado
<i>OMS</i>	Organización Mundial de la Salud
<i>ONUAA</i>	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
<i>OP</i>	Organofosforado
<i>PAD</i>	Dispositivo analítico basado en papel
<i>PAH</i>	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
<i>PC</i>	Técnica empleando <i>Plant-chip</i>
<i>PLA</i>	Ácido poliláctico
<i>PMM</i>	Pirimifos-metil
<i>PMMA</i>	Polimetil metacrilato
<i>POA</i>	Proceso de oxidación avanzada
<i>POC</i>	<i>Point-of-care</i>
<i>RGB</i>	Red-green-blue
<i>RSD</i>	Desvío estándar relativo
<i>SELEX</i>	<i>Systematic evolution of ligands by exponential enrichment</i>
<i>SENASA</i>	Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria
<i>T</i>	Temperatura
<i>TC</i>	Técnica convencional
<i>TCP</i>	3,5,6-tricloro piridinol
<i>TEM</i>	Microscopía de transmisión electrónica
<i>TMP</i>	3,5,6-tricloro-2-metoxi piridina
<i>TP</i>	Técnica portátil empleando <i>FDA-chip</i>
<i>UHPLC</i>	Cromatografía líquida de ultra alta eficiencia
<i>US DA</i>	<i>United States Department of Agriculture</i>
<i>US EPA</i>	<i>United States Environmental Protection Agency</i>
<i>Var %</i>	Porcentaje de variación
$\epsilon_R(\%)$	Error relativo porcentual
$\mu$ PAD	Dispositivo analítico microfluídico basado en papel

## Símbolos

<b>Símbolo</b>	<b>Definición</b>
Ag	Plata
As	Arsénico
Au	Oro
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
Cu	Cobre
HAuCl <sub>4</sub>	Ácido cloroáurico
HCl	Ácido clorhídrico
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sulfato de potasio
NaCl	Cloruro de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio



---

<b>Símbolo</b>	<b>Definición</b>
NO <sub>2</sub>	Dióxido de nitrógeno
Pb	Plomo
SO <sub>2</sub>	Dióxido de azufre
ZnSO <sub>4</sub>	Sulfato de zinc
$\lambda$	Longitud de onda

# Resumen

Para preservar los recursos naturales y la capacidad productiva del país, como así también proteger a los organismos vivos, es fundamental conocer el impacto de las prácticas agrícolas y, particularmente, del uso de agroquímicos en el ambiente. Surge, entonces, la necesidad de contar con herramientas de análisis que posibiliten el monitoreo efectivo de indicadores de referencia. En este contexto, cobra importancia el desarrollo de dispositivos de sensado que puedan ser empleados directamente en el sitio de muestreo. Una estrategia efectiva para la obtención de portabilidad y disminución del costo operativo de los ensayos analíticos es el acople de los dispositivos a la telefonía móvil, lo cual permite incorporar aplicaciones capaces de guiar al usuario, proveer información espacio-temporal y, fundamentalmente, integrar la realización del ensayo con la toma y procesamiento de los datos.

Los biosensores son dispositivos de análisis que basan su estrategia de reconocimiento en un elemento biológico y han demostrado ser una alternativa eficaz a los métodos convencionales de detección de agroquímicos. Por su parte, los bioensayos proveen información valiosa sobre el impacto ambiental que generan las prácticas agrícolas intensivas sobre los recursos naturales. En la actualidad, la implementación de los biosensores y de los bioensayos como técnicas de monitoreo se ve limitada por dos factores principales: (i) el costo operativo y (ii) el requerimiento de equipamiento de laboratorio.

En esta Tesis, se desarrollaron tres plataformas analíticas que permiten la determinación de diferentes parámetros ambientales en los sitios de muestreo, con bajos costos y sin la necesidad de equipamiento sofisticado. Una de las plataformas consiste en un biosensor basado en papel que permite la detección cuantitativa de un plaguicida en muestras de agua. Se empleó un sistema de detección compuesto por aptámeros y nanopartículas de oro. La estrategia aplicada consiste en analizar el patrón que deja una gota evaporada de la mezcla de reacción sobre el sitio de detección. Por otra parte, se adaptó un bioensayo de germinación a un sistema de medición directa y automatizado de la longitud radicular. La implementación aportó una simplificación significativa en la toma de datos y fue eficiente para el cálculo de parámetros toxicológicos. Además, posibilitó la toma de imágenes durante la incubación, es decir, en tiempo real, lo que aportó información sobre la evolución temporal de la elongación radicular. El último desarrollo corresponde a la evaluación de la calidad de suelos y muestras de biolechos en base a su actividad microbiana, mediante una prueba enzimática colorimétrica. El bioensayo se adaptó a un dispositivo capaz de realizar una medición cuantitativa del color prescindiendo del uso de un espectrofotómetro. La construcción de los dispositivos se realizó mediante técnicas de microfabricación, como el micromaquinado láser y el prototipado en papel, y empleando materiales asequibles y económicos. Los diseños consideraron las demandas particulares de los ensayos y priorizaron la reutilización de los dispositivos, incorporando compartimentos que pueden reemplazarse y disponerse fácilmente. En todas las aplicaciones, los datos fueron obtenidos mediante la toma de imágenes con un teléfono celular. El procesa-

---

miento se automatizó en un programa desarrollado en Python o mediante la integración de los dispositivos a una aplicación móvil, llamada *appuente*, capaz de guiar al usuario, asistir en la toma de imágenes, realizar el análisis e informar el resultado final. Las ventajas son notables: las plataformas permiten realizar las determinaciones en el sitio de muestreo para obtener información relevante sobre indicadores de contaminación que originalmente requieren de técnicas de análisis costosas. La disminución de la demanda instrumental, sumado a la automatización provista por el acople a la telefonía móvil, da como resultado herramientas portátiles de monitoreo ambiental.

# Abstract

In order to preserve natural resources and the productive capacity of the country, as well as to protect living organisms, it is essential to know the impact of agricultural practices and, in particular, the use of agrochemicals on the environment. Therefore, there is a need for analytical tools that enable the detection of effective reference indicators. In this context, the development of sensing devices to be used directly at the sampling site becomes important. An effective strategy to achieve portability and reduce the test operating cost is coupling analytical devices with mobile phones, which allows the incorporation of applications to guide the user, provide spatio-temporal information and, mainly, integrate the test performance with data collection and processing.

Biosensors are analytical devices that base their recognition strategy on a biological element and have demonstrated to be an effective alternative to conventional agrochemical detection methods. Bioassays provide valuable information about the environmental impact of intensive agricultural practices on natural resources. At present, the implementation of biosensors and bioassays as monitoring techniques is limited to: (i) the operating cost and (ii) the laboratory equipment requirement.

In this Thesis, three analytical platforms were developed that allow the determination of different environmental parameters at sampling sites, at low costs, and without the need of laboratory equipment. One of the platforms consists of a paper-based biosensor that allows the quantitative detection of a pesticide in water samples. A detection system composed of aptamers and gold nanoparticles was used. The applied strategy is based on a geometric analysis of the pattern left by a reaction mixture droplet after evaporation. On the other hand, a germination bioassay was adapted to a direct and automated root length measurement system. The platform provided a significant simplification in data collection and was efficient for the evaluation of toxicological parameters. In addition, it enabled imaging during incubation, i.e. in real time, which provided information of the temporal evolution of the root elongation process. The last development corresponds to a device for soil quality evaluation, which detects microbial activity by means of a colorimetric enzymatic test. The bioassay was adapted to a device capable of performing quantitative color measurements without using a spectrophotometer. The devices were constructed by microfabrication techniques, such as laser micromachining and paper prototyping, and employing affordable and inexpensive materials. The designs considered the particular assays demands and prioritized the devices reusability, incorporating compartments that can be replaced and discarded. In all applications, data were obtained by imaging with a smartphone. Processing was automated in a program developed in Python or by integrating a smartphone application, called *appuente*, capable of guiding and assisting the user in image acquisition, performing the analysis, and reporting the final result.

# Introducción

Para prevenir el deterioro del ambiente es primordial conocer su estado. Es por eso que resultan de suma importancia los avances científicos y tecnológicos tendientes a mejorar los métodos de detección y las estrategias de monitoreo de parámetros ambientales. En el presente capítulo, se realiza una breve introducción sobre el problema de la contaminación y las implicancias de las actividades productivas intensivas. A continuación, se presenta el marco referencial del desarrollo de plataformas analíticas portátiles adecuadas para el monitoreo ambiental. Finalmente, se exponen los objetivos de la Tesis.

## El problema de la contaminación ambiental

El Siglo XX ha traído consigo enormes avances científicos y tecnológicos, así como mejoras en la calidad de vida humana y la longevidad. Sin embargo, estos avances han ido acompañados de ciertos peligros producidos por la introducción al ambiente de agentes contaminantes (Markert et al., 2000). Se denomina contaminante ambiental a cualquier sustancia o materia física, química, biológica o radiológica que se presenta en una concentración superior a la considerada segura y que, por ende, es capaz de ejercer efectos adversos sobre los ecosistemas y los organismos vivos que lo habitan. El efecto perjudicial sobre el entorno puede ser ejercido de manera directa o indirecta sobre el aire, agua, suelo o los organismos vivos. Los contaminantes ambientales en la naturaleza suelen implicar mezclas complejas, factores de partición, transformaciones químicas e interacciones abióticas y bióticas; los efectos biológicos y medioambientales son complejos y pueden ser aditivos, sinérgicos e incluso antagónicos (D'Surney and Smith, 2005).

Aunque las contaminaciones son una constante histórica en toda actividad productiva -la sociedad humana siempre ha alterado el aire, el suelo y el agua de la Tierra-, su alcance, escala y gravedad alcanzaron niveles sin precedentes con la llegada de la era industrial. El auge de la industrialización se produjo a principios de los 70. Poco después, ya se había identificado al primer grupo de compuestos capaces de producir cáncer en los humanos, los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs, del inglés *polycyclic aromatic hydrocarbon*) (Neff, 1980). Estos compuestos se producen como resultado del calentamiento de la materia orgánica a altas temperaturas, como el humo del tabaco, el hollín, la producción de conservantes de la madera, la combustión de leña, los alimentos ahumados, el café tostado, la carne a la brasa y los gases de combustibles fósiles.

Las principales fuentes de energía de la humanidad proceden del petróleo, el gas, el carbón y la madera. Los principales subproductos del uso de combustibles fósiles son el dióxido de azufre ( $SO_2$ ), el dióxido de carbono ( $CO_2$ ), el dióxido de nitrógeno ( $NO_2$ ) y los hidrocarburos parcialmente oxidados. El proceso de quema de combustibles fósiles en centrales térmicas, fábricas, hogares y vehículos de motor emite enormes cantidades de los contaminantes mencionados.

---

Por otra parte, los efluentes domésticos, es decir, todo lo que se descarta en las viviendas por el desagüe, acaba en las cuencas hidrográficas, lo que puede afectar a la salud de las personas, a la fauna terrestre y acuática, a las plantas, a la atmósfera y a la calidad del agua. Una fuente típica de contaminantes ambientales son los productos de uso doméstico, como productos de limpieza, tensioactivos, tratamientos para el césped y el jardín, pinturas, selladores e incluso medicamentos (D'Surney and Smith, 2005; Chung and Brooks, 2019).

Además, otras actividades no reguladas, como el desarrollo de proyectos masivos en el espacio subterráneo para transporte u otras utilidades, liberan sustancias contaminantes que se exponen al ambiente sin el tratamiento necesario para prevenir una fuente puntual de contaminación. Las rocas que se extraen pueden estar contaminadas con diversos elementos inorgánicos peligrosos y tóxicos, como el arsénico (As), y metales pesados, como plomo (Pb), que si bien se encuentran en baja concentración, cobran importancia porque la generación de escombros es masiva (Tabelin et al., 2018).

Lo que resulta claro es que las actividades humanas y el rápido desarrollo de las industrias alteran el estado y composición natural del ambiente y representan una potencial amenaza para los ecosistemas naturales y para la salud pública. Se han registrado numerosos brotes de enfermedades causadas por la presencia de sustancias tóxicas en alimentos y en cursos de agua, como así también derrames accidentales de desechos industriales o de efluentes sin el tratamiento adecuado (Kumar et al., 2015; Meredith et al., 2016). Estos episodios dieron cuenta de la importancia de conocer y controlar el estado del ambiente. Es por eso que la concentración límite permisible de muchas sustancias se encuentra regulada por entes internacionales como la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (ONUAA), *United States Environmental Protection Agency* (US EPA) y la Organización Mundial de la Salud (OMS). En Argentina, el ente regulador es el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA). La comunidad científica, por su parte, ha realizado avances pertinentes al desarrollo de numerosas técnicas de monitoreo de parámetros e indicadores ambientales de referencia (Justino et al., 2017; Kung et al., 2019; Majdinasab et al., 2021). En efecto, actualmente se realizan grandes esfuerzos para desarrollar herramientas de análisis capaces de proveer información fáctica y confiable en el sitio de muestreo, en tiempo real, con baja demanda operativa y sin necesidad de equipamiento sofisticado. El monitoreo de indicadores cuantitativos es fundamental, porque la contaminación ambiental puede ser un fenómeno evidente en algunos casos y pasar desapercibida en otros.

## Actividades productivas y uso de agroquímicos

El incremento en la demanda mundial de alimentos acompaña al crecimiento poblacional, y ha impulsado a los sistemas agropecuarios a aumentar la producción y a maximizar el rendimiento de los cultivos. La ONUAA indicó, en su último informe del año 2020, que la producción global de cereales primarios se incrementó en un 52 % en los últimos 20 años, lo que representa 9,3 billones de toneladas anuales. El porcentaje de tierra habitable del planeta empleada por la agricultura es de aproximadamente el 50 % y no ha presentado grandes incrementos en el último tiempo, lo que deja entrever que la productividad ha crecido considerablemente. En la Figura 1 pueden observarse aumentos en los rendimientos obtenidos en la producción de cereales que acompañan el crecimiento poblacional. Se han implementado nuevas técnicas de cultivo y de manejo del agua y

se emplean semillas con mejoramiento genético. Sin embargo, el factor principal en el aumento de la productividad es el empleo de agroquímicos, en particular, de plaguicidas. Se estima que un tercio de la producción mundial se perdería sin su aporte (Abhilash and Singh, 2009; Verma and Bhardwaj, 2015; Rapini and Marrazza, 2016; Alfonso et al., 2017), por lo que su contribución a la productividad es indiscutible.

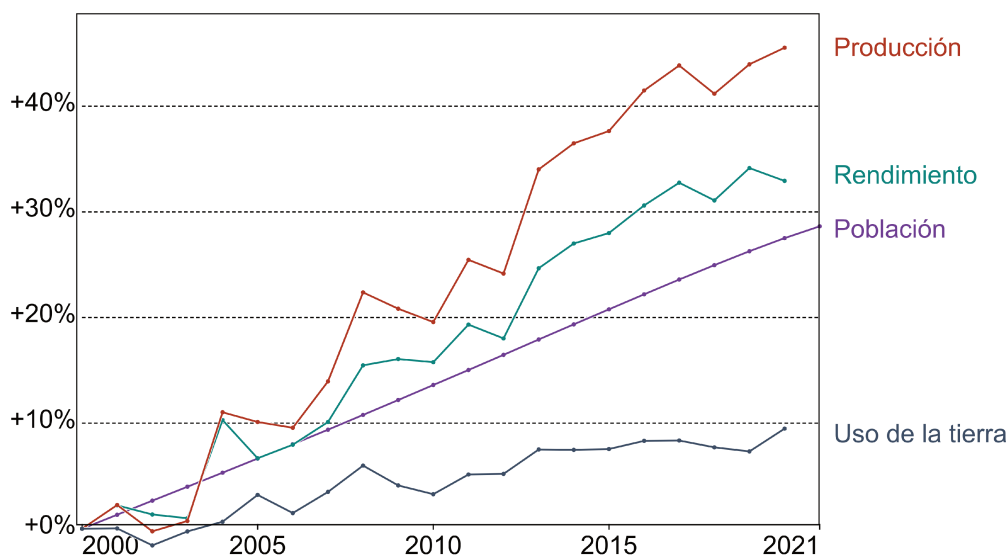


Figura 1: Incrementos porcentuales globales de factores relacionados con la producción de cereales en el período 2000-2021. Los cereales incluyen trigo, arroz, maíz, cebada, avena, centeno, mijo, sorgo, trigo sarraceno y cereales mixtos. Modificado de (Ritchie et al., 2022a). Fuente: Our World in Data basado en Banco Mundial, ONUAA.

Los plaguicidas son formulaciones químicas que se emplean solas o combinadas para controlar las enfermedades y plagas que afectan a los cultivos. La ONUAA los define como: cualquier sustancia que se utilice para prevenir, aniquilar, atraer, repeler o controlar alguna plaga, incluyendo animales o plantas indeseados durante el proceso de producción, almacenamiento, transporte, distribución y procesamiento de comida, *commodities* de agricultura o alimento para animales, para usar como regulador del crecimiento de las plantas, defoliador, disecante, inhibidor de la germinación o sustancias aplicadas a los cultivos antes o después de la cosecha. El término normalmente excluye fertilizantes, nutrientes, aditivos y drogas animales.

Los plaguicidas están compuestos por, al menos, un ingrediente activo y por otros compuestos que se denominan inertes. El componente principal es el ingrediente activo por ser responsable de afectar la actividad biológica directa o indirectamente, o de la regulación del metabolismo o crecimiento de organismos vivos capaces de producir enfermedades o afectar el desarrollo de los cultivos. Los compuestos inertes, por su parte, juegan roles centrales en la actuación y efectividad del producto final: actúan como solventes para posibilitar la penetración del ingrediente activo en las hojas de las plantas; simplifican la aplicación evitando la formación de durezas, bloque o espuma; extienden la duración; mejoran la seguridad durante la aplicación o protegen al compuesto activo de la degradación por exposición a la luz solar. Que se los denomine inertes, no hace referencia a que no puedan ser tóxicos.

El uso y administración de los agroquímicos está en constante evaluación por entes regulatorios como la ONUAA, la US EPA, la OMS y el SENASA. Las cantidades máximas

admitidas son revisadas y actualizadas periódicamente según estudios científicos que demuestran la capacidad de alterar los recursos ambientales y poner en riesgo la salud de los organismos vivos. Esto ha llevado a que se revoque la tolerancia de sustancias, y que tanto el uso como comercialización estén prohibidos en determinados países (Mateo-Sagasta et al., 2017).

El uso de sustancias químicas en los cultivos se registró, por primera vez, en 1939 cuando Paul Müller descubrió el potencial del compuesto organoclorado dicloro difenil tricloroetano (DDT) como insecticida, y rápidamente se convirtió en el más vendido en todo el mundo (Ware, 1974). Para 1990, el uso de agroquímicos a nivel mundial era de 2,3 millones de toneladas al año. La cifra continuó en aumento y en 2010 se alcanzaron las 4 millones de toneladas. Como se observa en la Figura 2, los agroquímicos son utilizados en cantidades considerables por la gran mayoría de los países, según un reporte publicado en 2019. En los últimos 25 años, el consumo de agroquímicos en nuestro país aumentó en un 900 % y los incrementos en los rendimientos rondan el 50 % (Etchegoyen et al., 2017).

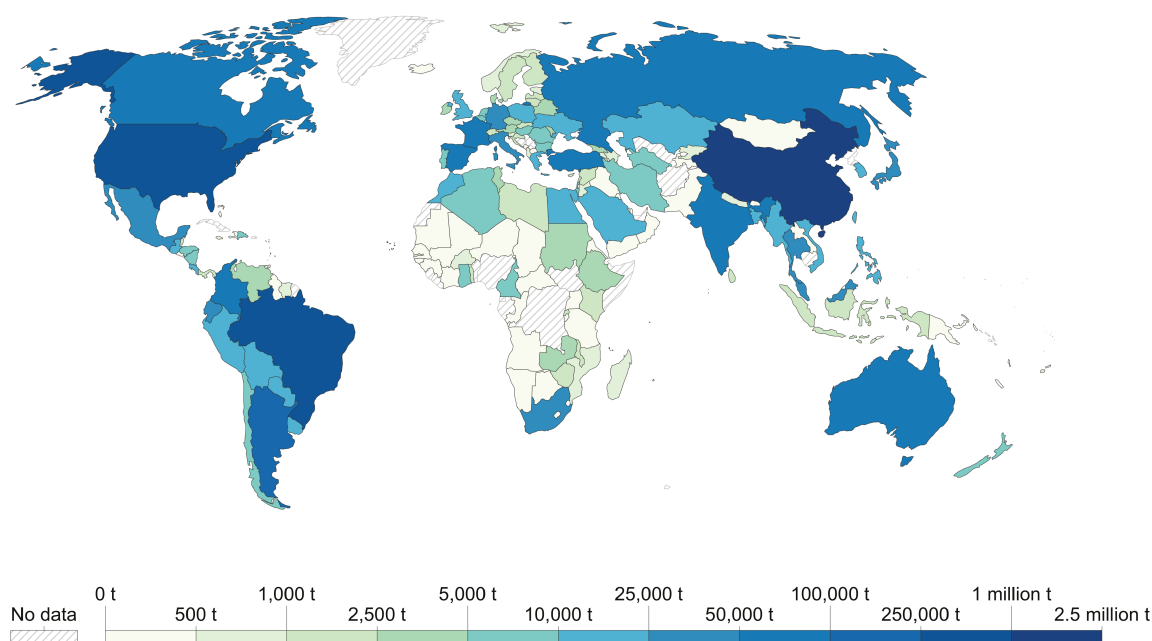


Figura 2: Toneladas de agroquímicos consumidas anualmente por los países en 2019. Reproducido de Ritchie et al. (2022b) con permiso de Our World in Data.

Actualmente, hay más de 800 ingredientes activos reportados que pertenecen a más de 100 grupos diferentes y están disponibles comercialmente en un amplio rango de productos (Liu et al., 2013). Los plaguicidas utilizan diferentes mecanismos moleculares para atacar a los organismos. En función de qué organismos afectan, los compuestos pueden dividirse en herbicidas, utilizados para el control de malezas; fungicidas, para evitar la proliferación de enfermedades producidas por hongos; e insecticidas, para el control de insectos y parásitos (Rapini and Marrazza, 2016). Estos compuestos también pueden clasificarse en función de su estructura química. Los organoclorados (OCs) fueron los primeros compuestos en ser comercializados (Lepori et al., 2013), dentro de ellos se encuentra el DDT y sus análogos, que se destacan por su baja solubilidad en agua, elevada presión de vapor y amplio espectro (Rapini and Marrazza, 2016). Los OCs son considerados contaminantes orgánicos persistentes (COPs) ya que se determinó que sus moléculas



pueden permanecer activas por más de 30 años. Su aplicación era común en la década del 50. Para 1970, sus efectos tóxicos ya constituían una gran preocupación a nivel mundial (Verma and Bhardwaj, 2015). Es por eso que, en los últimos años, han sido reemplazados por alternativas más seguras y efectivas, con mejores tasas de biodegradación como los organosforados (OPs) y neonicotinoides (Kalyabina et al., 2021). Sin embargo, estos compuestos no son totalmente inocuos ya que su uso indiscriminado y su capacidad de acumulación han generado efectos tóxicos en organismos no blanco (Verma and Bhardwaj, 2015; Kumar et al., 2015; Alfonso et al., 2017).

El desarrollo de formulaciones modernas, conocidas como agroquímicos de uso corriente (CUPs, del inglés *current-use pesticides*), pretende evitar tres características principales: la persistencia, la bioacumulación y la toxicidad. Si bien se logran obtener algunas ventajas, es común que el desarrollo de CUPs genere contaminantes emergentes, cuyos efectos toxicológicos no han sido completamente evaluados (Kalyabina et al., 2021).

Otro grave problema es ocasionado por un defecto de las técnicas de aplicación de los plaguicidas, ya que muchas de ellas son altamente ineficientes (Menger et al., 2020). Gran parte del producto aplicado se distribuye en el aire, el suelo y el agua, incluso a grandes distancias de los sitios de aplicación (Kumar et al., 2015; Majdinasab et al., 2021). En la Figura 3 se sintetizan los diferentes mecanismos de distribución de los compuestos en el ambiente.

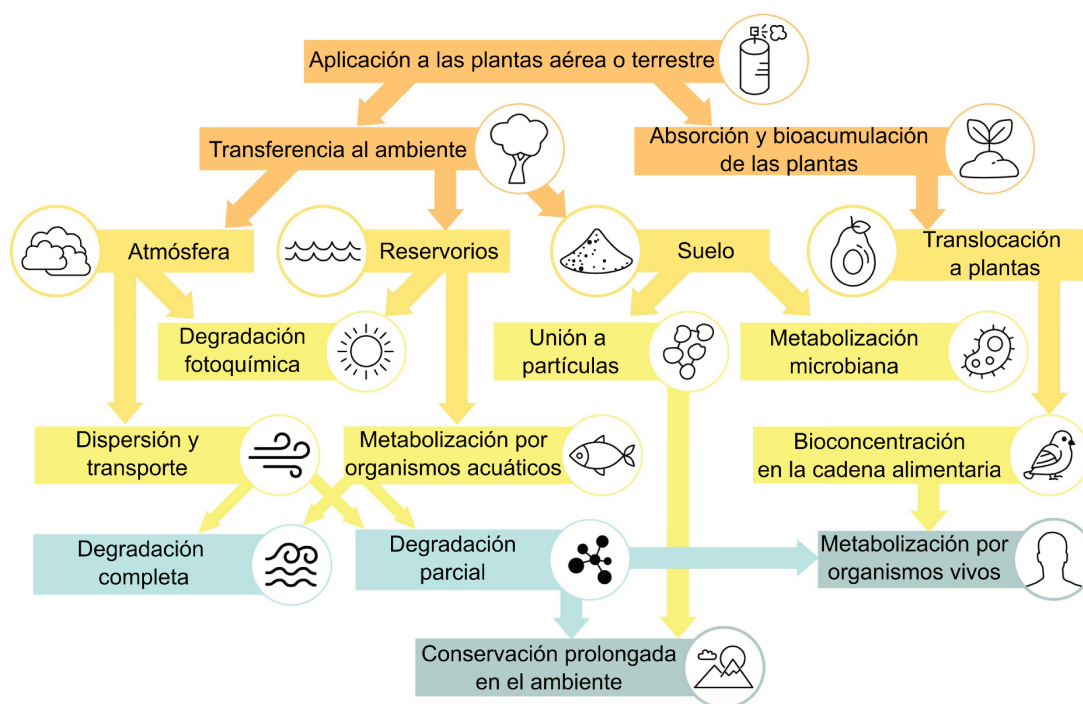


Figura 3: Representación esquemática de las vías de transporte, diseminación y transformación de los agroquímicos. Reproducido de Kalyabina et al. (2021) con permiso de Elsevier.

Las aplicaciones aéreas son la principal fuente de contaminación del aire. Con las precipitaciones, las partículas estabilizadas en la fase sólido-gas se transportan a los cursos de agua. Por otro lado, el flujo de agua de las lluvias permite la remoción y arrastre de los plaguicidas depositados en el suelo, consecuencia de la aplicación terrestre (Kalyabina et al., 2021). Más aún, los compuestos suelen ser poco solubles y, dependiendo de las condiciones climáticas, son capaces de volatilizarse desde el suelo o las masas de agua, lo

---

que permite que el ciclo se retroalimente. Liu et al. (2018) realizó un estudio en el mar de Bohai y reportó que la principal fuente de los CUPs trifluralina y clorpirifós en la atmósfera es la volatilización desde el agua superficial.

La contaminación de las capas superficiales del suelo ocurre durante la aplicación directa: dependiendo de las condiciones climáticas y de las propiedades del suelo, llegan a las capas más profundas y pueden alcanzar las aguas subterráneas. Las moléculas disueltas o unidas a partículas del suelo, pueden acumularse en los sedimentos de los ríos. La composición del suelo es un factor importante: por ejemplo, la presencia de ácidos húmicos y de arcilla coloidal permite la adsorción de determinados compuestos químicos (Pulagurala et al., 2018). En todos los intercambios y trayectos, los contaminantes están sometidos a transformaciones mediante las cuales pueden ser total o parcialmente degradados. Los procesos químicos, como reacciones oxidativas y fotoquímicas, les permiten ser transportados por las diferentes vías con el inconveniente adicional de que se pueden generar compuestos de degradación causantes de la denominada segunda contaminación ambiental. Por otro lado, la biorremediación natural llevada a cabo por microorganismos no siempre es capaz de degradar completamente los contaminantes (Huang et al., 2018).

La contaminación debida al mal uso de agroquímicos y la falta de reglamentación representan otro problema alarmante (Rapini and Marrazza, 2016; Zhao et al., 2018; Lescano et al., 2022). La liberación accidental al ambiente –ocasionada por derrames o fugas desde sitios de almacenamiento o tratamiento de efluentes– puede conducir a su persistencia durante mucho tiempo (Katagi, 2006; Kumar et al., 2015; Jiao et al., 2016; Etchegoyen et al., 2017). Otro aspecto a considerar es la liberación al ambiente de efluentes sin un adecuado tratamiento, originados en las fábricas y también luego de su aplicación, tanto en el descarte de los líquidos remanentes como en el lavado y desecho de envases (Lepori et al., 2013; Lescano et al., 2022).

## Dispositivos de microfluídica

El campo de la microfluídica se originó para abordar necesidades de los análisis químicos a inicios de 1990 y los primeros dispositivos fueron empleados en cromatografía gaseosa y electroforesis capilar (Widmer et al., 1984; Manz et al., 1992; Harrison et al., 1992). A partir de allí, se desarrollaron avances conceptuales y técnicos que permitieron encontrar aplicaciones en otros campos de investigación y configuraron la disciplina (Whitesides, 2006). Los sistemas miniaturizados dieron origen a plataformas versátiles, de alto rendimiento, mejorada sensibilidad y eficiencia que posibilitaron disminuir costos, tiempos experimentales e incrementar la precisión de los ensayos por la manipulación precisa y por la reducción de pasos necesarios para completar un procedimiento (Stanley et al., 2016).

Los dispositivos *Lab-on-a-chip* (LOC) se construyen empleando la tecnología microfluídica y constituyen verdaderos sistemas analíticos miniaturizados que integran múltiples funciones de laboratorio y son capaces de realizar determinaciones de manera rápida y eficiente. Su implementación resulta muy útil porque prescinden del uso de equipamiento sofisticado, costoso y voluminoso, y requieren de menor cantidad de muestra y de reactivos que los métodos convencionales. Más aún, son portátiles y fáciles de usar, por lo que resultan ideales para aplicaciones fuera del laboratorio.

Al proveer una solución integral, los dispositivos LOC tienen una amplia gama de aplicaciones en diversas áreas, tal como se resume en la Figura 4. Los análisis relacio-

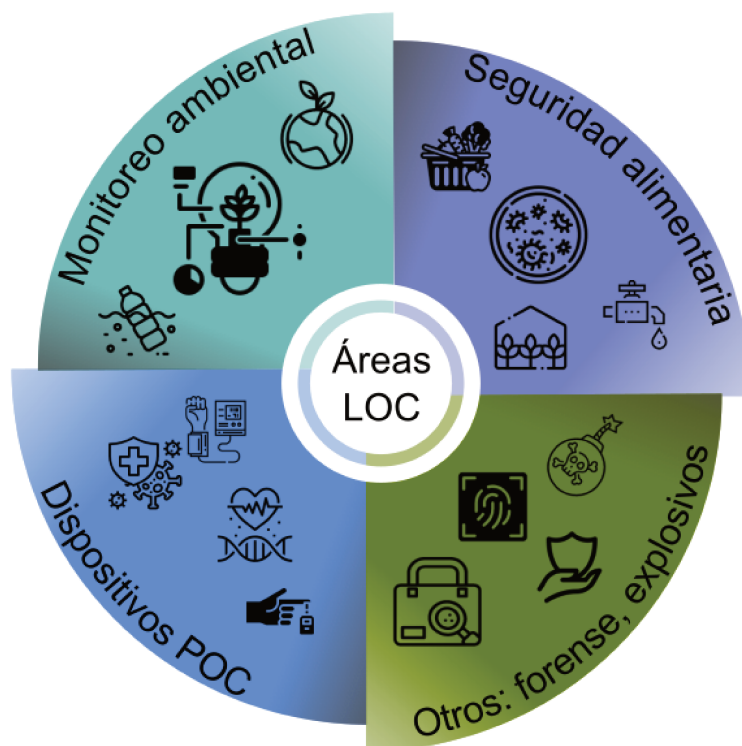


Figura 4: Áreas de aplicación de los dispositivos de microfluídica LOC.

nados con la seguridad alimentaria, permiten detectar contaminantes, toxinas y otros componentes no deseados en materias primas, alimentos procesados y bebidas. Dentro de las aplicaciones en medicina, uno de los campos más destacados es el de los dispositivos *Point-of-care* (POC) (McCracken and Yoon, 2016; Quesada-González and Merkoçi, 2017; Xing et al., 2022). Dichos dispositivos permiten la detección de enfermedades de manera rápida y precisa en el sitio donde se encuentra el paciente, que puede ser una sala de emergencias o un centro de atención primaria de la salud, en zonas rurales o remotas. Algunas de las determinaciones más comunes son: medición de glucosa en sangre para el control de la diabetes; medición de lípidos en sangre, como colesterol y triglicéridos, para evaluar el riesgo cardiovascular; determinación de gases en sangre, como oxígeno y dióxido de carbono, para evaluar la función pulmonar y la oxigenación del cuerpo; pruebas de coagulación para prevenir o tratar una hemorragia; pruebas de detección rápida de enfermedades infecciosas, como la gripe, la hepatitis B y C o el COVID-19; y determinación de biomarcadores para el diagnóstico y seguimiento de enfermedades como el cáncer y las enfermedades cardiovasculares. Estas determinaciones requieren de ensayos de biología celular y molecular o análisis de moléculas biológicas, como proteínas y ADN, que también son usados en investigación de ciencias biológicas.

Por otra parte, el monitoreo ambiental incluye la detección de contaminantes, la evaluación de posibles alteraciones de los ecosistemas y el control de indicadores de referencia mediante bioensayos o biosensores. Un biosensor es un dispositivo para la determinación de analitos que está compuesto por dos elementos principales: el elemento de reconocimiento biológico, o biorreceptor, encargado de interactuar con el analito; y el transductor, capaz de convertir el evento de reconocimiento en una señal medible (Verma and Bhardwaj, 2015). Por otro lado, los bioensayos son pruebas que permiten evaluar la actividad biológica de una muestra mediante los organismos vivos presentes en ella, con el fin de

determinar su toxicidad y evaluar los posibles riesgos ambientales (Ekelund and Häder, 2018). Esta evaluación considera los diferentes factores, como el pH, la solubilidad, la biodisponibilidad, y los posibles efectos antagónicos o sinérgicos presentes en el ambiente (Farré and Barceló, 2003). Los bioensayos pueden emplear una amplia variedad de organismos, como plantas (Bagur-González et al., 2011), algas (Feng et al., 2016), animales (Masin et al., 2018), microorganismos (Figueredo et al., 2015), células y organismos unicelulares (Wieczerzak et al., 2016). Las aplicaciones ambientales de la microfluídica constituyen, sin lugar a duda, un área de investigación emergente que resulta de gran interés para diversas disciplinas (Grossmann et al., 2011; Park et al., 2017; Clark et al., 2020). Los avances en este campo se pueden clasificar en: dispositivos analíticos para monitoreo ambiental, herramientas para estudios toxicológicos, microrreactores para tratamiento de contaminantes y plataformas para investigación de procesos ambientales (Zhu et al., 2022). La clasificación puede variar según la visión de diferentes autores. Sin embargo, lo que resulta indiscutible es la capacidad de la disciplina para atender las demandas principales de un monitoreo ambiental efectivo (Meredith et al., 2016; Pol et al., 2017).



Figura 5: Esquema representativo del desarrollo de un dispositivo LOC a partir de la información reportada en Zhu et al. (2022).

La obtención de una plataforma basada en la tecnología LOC requiere de un proceso de desarrollo que se ilustra en la Figura 5. El diseño de los dispositivos es un aspecto fundamental. Satisfacer las demandas específicas de los ensayos es solamente uno de los puntos porque, además, resulta fundamental la selección de los materiales de fabricación. En general, los materiales deben ser livianos, asequibles y económicos; dependiendo de cada aplicación, se debe considerar la compatibilidad con los sistemas biológicos y la resistencia a determinados reactivos (Pol et al., 2017; Kung et al., 2019). Por otra parte, se deben seleccionar técnicas capaces de prototipar los diseños, con la resolución necesaria para generar dispositivos compactos y ergonómicos. Uno de los objetivos principales es

---

tener un mejor control general del proceso, reduciendo la cantidad de pasos y de intervenciones del usuario. En este sentido, resulta fundamental la integración del análisis y del pre-tratamiento de la muestra en el dispositivo (Pol et al., 2017). Respecto al análisis en sí, permite prescindir de equipos sofisticados y costosos, como cromatógrafos o espectrofotómetros; para el pre-tratamiento, por su parte, se omite el requerimiento de equipamiento voluminoso, como puede ser una centrífuga o algún sistema de filtrado.

Paralelamente, el primer teléfono inteligente o *smartphone*, fue desarrollado por IBM en 1993. Desde allí, sus capacidades han evolucionado notablemente y se han convertido en los dispositivos más utilizados en la vida diaria de las personas. Su uso se ha duplicado en los últimos 7 años y se estima que la cantidad de usuarios para finales de 2023 será de 6,9 billones, lo cual corresponde a aproximadamente un 86 % de la población mundial. Actualmente, los teléfonos inteligentes cuentan con procesadores multi-núcleos, almacenamiento interno, canales de comunicación y cámaras. Cuando se combina la tecnología microfluídica con la comunicación móvil, la herramienta adquiere la capacidad de sustituir instrumentos de laboratorio convencionales. Las prestaciones adicionales más importantes son la capacidad de procesamiento *in situ* y de transferencia de datos con información espacio-temporal (Xing et al., 2022). Estas características, sumadas a las mencionadas anteriormente, posibilitan la obtención de dispositivos autónomos y portátiles, factibles de ser empleados directamente por el usuario final para la obtención de resultados de manera rápida y sencilla, resultando herramientas ideales para el monitoreo ambiental.

El desarrollo de las plataformas de microfluídica acopladas a teléfonos celulares es reciente. Las primeras adaptaciones a dispositivos de papel se registraron en 2008 (Martinez et al., 2008; Lu et al., 2009). Desde allí, dado el alto potencial científico y comercial, las implementaciones se fueron expandiendo a otros materiales (Yetisen et al., 2013; Erickson et al., 2014; McCracken and Yoon, 2016; Schaumburg et al., 2022) como se muestra en la Figura 6.

Una de las principales formas de utilizar los teléfonos en las plataformas de análisis microfluídicas es como detectores de una señal originada por el mecanismo de sensado. Las cámaras ópticas de alta resolución se utilizan como detectores visuales de la señal mediante la captura de imágenes o videos, que pueden procesarse para obtener información en distintos lapsos de tiempo. Esto es de utilidad en análisis colorimétricos, donde la presencia del analito se evidencia por un cambio o una generación de color, como muchas de las pruebas bioquímicas (Qian et al., 2022), y en técnicas que analizan longitudes, formas o patrones que se evidencian por modificaciones en la geometría o en las intensidades de color. También se pueden realizar ensayos de fluorescencia, que suelen requerir del agregado de fuentes de luz específicas y del diseño de cajas de lectura. En este último punto, fueron importantes los avances en impresión 3D (Waheed et al., 2016). Actualmente, se pueden prototipar acoples de manera rápida y sencilla, con costos razonables. Esta tecnología ha permitido, además, implementar modificaciones ópticas para reemplazar las técnicas convencionales de evaluación de contaminación empleando microscopios (Chan et al., 2021; Ayardulabi et al., 2021).

Otro aporte fundamental de los teléfonos celulares es la capacidad de automatizar el análisis de datos empleando programas genéricos o desarrollados específicamente para la técnica. Respecto a los genéricos, hay numerosas aplicaciones gratuitas y programas de software libre, siendo el más utilizado el ImageJ. Investigaciones recientes se centraron en el desarrollo de aplicaciones específicas capaces de procesar automáticamente las señales de los dispositivos de microfluídica y mostrar al usuario el resultado final (Quesada-González and Merkoçi, 2017; Schaumburg et al., 2022). Los análisis pueden ser cuan-

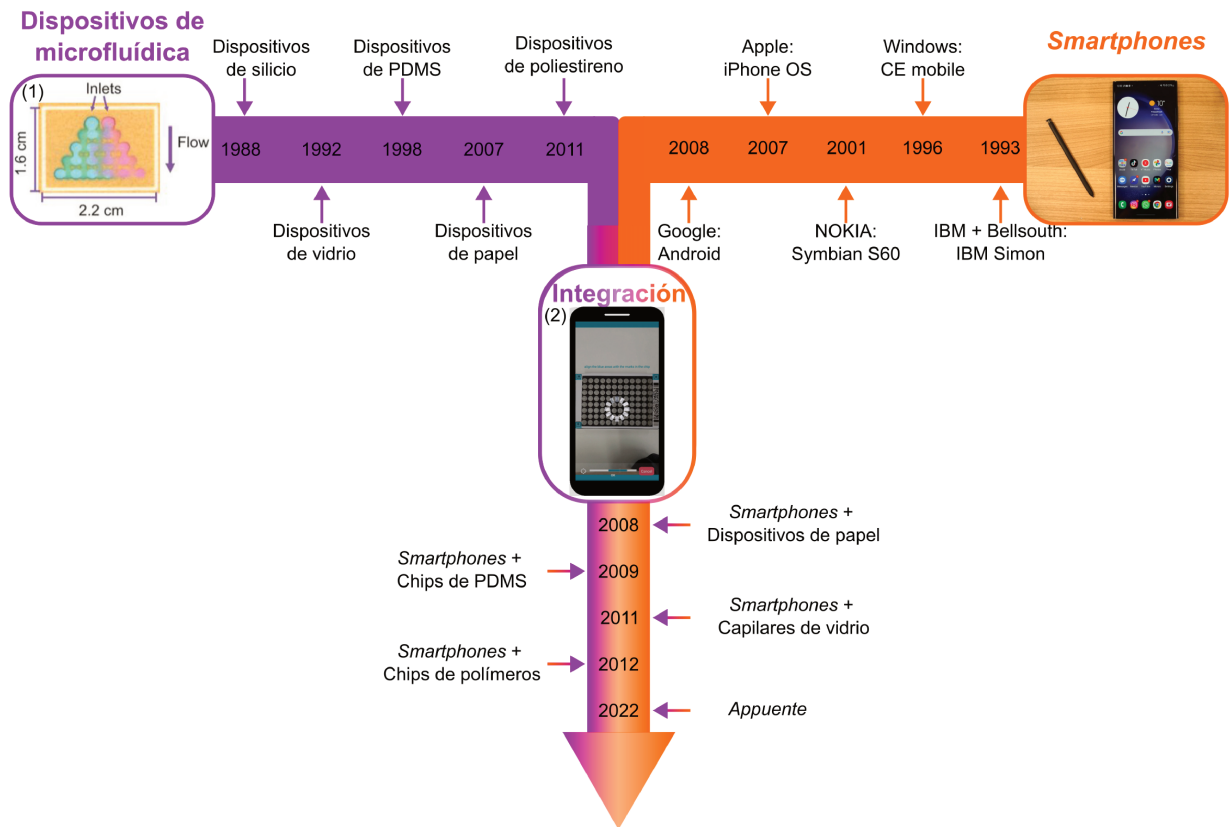


Figura 6: Evolución temporal del desarrollo de dispositivos microfluídicos e integración con la telefonía móvil. Figura modificada de [Yang et al. \(2016\)](#). (1) Reproducción de [Mora et al. \(2019\)](#) con permiso de Elsevier. (2) Reproducción de [Schaumburg et al. \(2023\)](#) con permiso de ACS Publications.

titativos, semi-cuantitativos o cualitativos. En general, emplean métodos matemáticos sencillos para extraer la información. Las imágenes se convierten en colores digitales como el RGB, HSV, HSL o GSV, y sus valores son utilizados para detectar el analito o para identificar regiones, bordes o límites que permitan realizar las mediciones necesarias para el ensayo. Las aplicaciones diseñadas a medida son capaces de analizar las interferencias y ruidos de fondo de las imágenes e incluir algoritmos que permitan mejorar la relación señal-ruido para conseguir bajar los límites de detección de los ensayos y aumentar su sensibilidad. Incluso, son capaces de determinar líneas de corte de manera adaptativa al detectar diferentes exposiciones o calidades del sustrato. Por ejemplo, en el procesamiento de imágenes de fluorescencia en el trabajo de [Chung et al. \(2021\)](#) se logra detectar una copia de virus en un microlitro de una muestra de agua empleando un algoritmo capaz de identificar porciones de papel de distinta calidad y variaciones en la emisión de fluorescencia.

En otros trabajos, además de las funciones mencionadas, los teléfonos inteligentes se emplean como dispositivos de interfase. Es decir, para controlar y modificar el experimento durante su operación valiéndose de instrumentos analíticos conectados vía Wi-Fi, Bluetooth, micro-USB o intercambiando información en tiempo real con la nube. Además, son capaces de actuar como fuentes de energía para los microdispositivos analíticos ([Schaumburg et al., 2020](#)). Es importante destacar la participación de la inteligencia artificial como una tecnología emergente que permite clasificar resultados de

---

manera precisa y cuantitativa mediante el análisis de las imágenes y es capaz de integrar todas las funciones mencionadas para lograr dispositivos autónomos y eficientes.

Las herramientas portátiles deben garantizar la reproducibilidad y confiabilidad de mediciones realizadas con potenciales variaciones ambientales. Es por eso que resulta fundamental la incorporación de controles fiables y adecuados. Más aún, los pasos de toma de muestra y descarte de los residuos generados, donde entra en juego también la seguridad del operador, deben ser considerados en las plataformas.

# Objetivos

El objetivo general de la presente Tesis es el desarrollo de dispositivos analíticos miniaturizados para ser utilizados en el monitoreo de la calidad de agua y suelos. En particular, se plantea el diseño y la fabricación de sistemas portables, económicos y fáciles de utilizar. Se propone además acoplar los dispositivos a la telefonía móvil con dos fines principales: usar el teléfono como sistema de lectura de los ensayos y explotar las capacidades de gestión de datos y conexión a las redes de información.

Se busca obtener plataformas integradas con dispositivos de biosensado compactos, reutilizables y fabricados con materiales livianos y asequibles, que constituyan herramientas ideales para la medición de indicadores ambientales a campo.

Los objetivos específicos consisten en el desarrollo de los siguientes dispositivos:

- Un biosensor basado en aptámeros específicos para el reconocimiento de un insecticida en agua (Capítulo 1).
- Un sistema eficiente para la implementación de un bioensayo de germinación de semillas (Capítulo 2).
- Una plataforma portable para un ensayo enzimático de detección de actividad bacteriana en suelos (Capítulo 3).



# Capítulo 1

## *Aptasensor*

### 1.1. Introducción

En el presente capítulo se describe el desarrollo de un biosensor portátil que emplea un aptámero específico como elemento de reconocimiento biológico, en este caso para el insecticida clorpirifós (CPS). A este tipo de sensores se los suele denominar *Aptasensors*. La plataforma de detección está conformada por una tarjeta de análisis codificada en papel de filtro Whatman, denominada *CR Code Card*, y por un programa, denominado *CR Code Analysis*, desarrollado para el procesamiento de imágenes tomadas con un teléfono celular. El sistema permite cuantificar la presencia del insecticida en muestras reales de agua. Los resultados del presente capítulo fueron publicados en: [Macagno et al. \(2023\)](#).

#### 1.1.1. Relevancia de la detección de clorpirifós

El CPS, o dietil O-3, 5, 6-tricloro-2-piridil fosforotioato, es un insecticida OP ampliamente utilizado en la agricultura de extensión, en la producción frutihortícola y en las viviendas para combatir plagas domésticas ([Jiao et al., 2016](#); [Alfonso et al., 2017](#)). El CPS controla un gran espectro de insectos, pero también se utiliza como acaricida y nematocida ([Nandhini et al., 2021](#)). Su costo es competitivo ([Sankar et al., 2020](#)) y es aplicado en todo el mundo a 55 *comodities* diferentes. El CPS fue introducido en el mercado por *Dow Chemical Company*, en 1965. Actualmente, los OPs representan el 36 % del mercado mundial de plaguicidas ([Nandhini et al., 2021](#)). En nuestro país, el CPS y la cipermetrina representan alrededor del 30 % del consumo de insecticidas ([Mestre et al., 2019](#); [Tames et al., 2020](#)).

El CPS, como todos los OPs, es un compuesto neurotóxico. Su mecanismo de acción consiste en generar cambios en la estructura y función de la acetilcolinesterasa (AChE), una enzima presente en animales e insectos. Si la AChE no funciona adecuadamente, se acumula el neurotransmisor acetilcolina en las sinapsis, afectando tanto el sistema nervioso central como el periférico, se produce una sobreestimulación colinérgica, los nervios se estimulan en exceso y se atrofian ([Liendro et al., 2015](#); [Verma and Bhardwaj, 2015](#)). En animales y humanos, el hígado es el órgano principal de metabolización del CPS, donde es transformado a uno de los metabolitos más comunes, el clorpirifós-oxon (CPO). El CPO es un compuesto aún más tóxico, ya que se comporta como un inhibidor enzimático 300 veces más potente que el CPS ([Nandhini et al., 2021](#)).

El CPS es un compuesto biodegradable con una persistencia en el ambiente corta a moderada. El tiempo de vida media varía de 10 a 120 días, dependiendo de la aplicación,

del tipo de ecosistema, de los microorganismos del suelo y de las condiciones climáticas (Nandhini et al., 2021). Los microorganismos juegan un rol central en la degradación del CPS, que puede realizarse en condiciones tanto aeróbicas como anaeróbicas. En ambos casos, se detectó el metabolito primario 3,5,6-tricloro piridinol (TCP), producto de una reacción de hidrólisis. El TCP se encontró tanto en suelo como en agua y, por tener una mayor solubilidad que el CPS y una vida media de entre 65 y 360 días, la US EPA lo clasificó en 1997 como un compuesto móvil, persistente y tóxico. La incorporación a la materia orgánica del suelo se produce por la degradación del TCP a 3,5,6-tricloro-2-metoxi piridina (TMP), que también puede generar CO<sub>2</sub> (Racke, 1993). A la degradación metabólica microbiana, se le suman procesos abióticos que tienen lugar en la matriz del suelo, como la hidrólisis química, la declorinación y la oxidación. Varios estudios mostraron que una parte del CPS que entra en contacto con la parte foliar de las plantas puede ser asimilado (Romeh and Hendawi, 2013). Y, si bien puede volatilizarse y metabolizarse, se detectó CPS en muestras de frutas cosechadas, después de más de 60 días de la aplicación del insecticida (Putnam et al., 2003).

Las propiedades que se mencionaron resultan suficientes para causar preocupación por el impacto de la incorporación del CPS en el ambiente. A las características innatas del compuesto se le suman numerosos reportes que datan de su uso incorrecto, es decir, en proporciones y concentraciones que exceden las cantidades recomendadas. El principal problema que causa el CPS es la contaminación del agua (Tahara et al., 2005; Kumar et al., 2015; Alfonso et al., 2017). Estudios de diferentes países indican su presencia tanto en aguas subterráneas (Rapini and Marrazza, 2016; Alfonso et al., 2017; Etchegoyen et al., 2017) como superficiales (Palma et al., 2008; Liendro et al., 2015; Etchegoyen et al., 2017; Alvarez et al., 2019). La comercialización de CPS fue recientemente prohibida en Estados Unidos y en la Unión Europea (US EPA, 2021). Sin embargo, en otros países su venta es libre y no controlada. Por consiguiente, el seguimiento de los niveles de concentración de CPS en el agua resulta una necesidad imperiosa.

### 1.1.2. Técnicas de análisis de plaguicidas

Las técnicas analíticas convencionales para la detección de plaguicidas están basadas en métodos espectrofotométricos y cromatográficos; por ejemplo, la cromatografía gaseosa o líquida de alta eficacia acoplada a electroforesis capilar o espectrometría de masas. Estas técnicas presentan límites de detección bajos, son confiables, altamente selectivas y precisas, pero sus requerimientos instrumentales y operativos las hacen imprácticas para realizar mediciones *in situ* y en tiempo real, demandas principales del monitoreo ambiental (Justino et al., 2017; Majdinasab et al., 2021). Las muestras deben ser transportadas hasta un laboratorio especializado. Una vez allí, se sigue un protocolo riguroso y de varios pasos que comienza con el acondicionamiento de la muestra. Cada etapa agrega complejidad, demanda tiempo y aumenta la posibilidad de cometer errores. El costo operativo es elevado y se requiere de personal entrenado. Más aún, se debe considerar el tiempo desde el envío de la muestra hasta la recepción del informe con los resultados (Liu et al., 2013; Verma and Bhardwaj, 2015; Kumar et al., 2015; Zhao et al., 2018). Es decir, las técnicas convencionales resultan útiles como métodos confirmatorios, pero sus características son poco compatibles con el monitoreo ambiental. En este contexto, los biosensores han surgido como alternativa simple, efectiva y portátil para la detección de una gran variedad de analitos, dentro de los que se incluyen los agroquímicos (Jiao et al., 2016; Weerathunge et al., 2019; Soongsong et al., 2021; Nana et al., 2021; Bordbar et al., 2021).

### 1.1.3. Biosensores para plaguicidas: detección

La mayoría de los plaguicidas están diseñados para prevenir procesos enzimáticos determinantes de la viabilidad de los organismos que afectan. Es por eso que el mecanismo de inhibición enzimática ha sido ampliamente utilizado en el desarrollo de biosensores (Liu et al., 2012; Qian and Lin, 2015; Kim et al., 2018; Fu et al., 2019b). Si bien la detección enzimática alcanza límites de detección adecuados, la selectividad suele estar comprometida. Por ejemplo, la medición de la AChE, una de las más reportadas, es incapaz de distinguir entre sustancias de la misma clase. Otras limitaciones están asociadas a la estabilidad enzimática. Para que un sensor se pueda utilizar en el sitio de muestreo, debe ser capaz de tolerar las diferentes condiciones ambientales. En condiciones desfavorables, las enzimas disminuyen su actividad y pueden incluso desnaturalizarse y perder completamente su función. Estas características representan una limitación práctica que puede llevar a respuestas inestables y con baja reproducibilidad. Además, la actividad enzimática puede ser alterada por la presencia de otros químicos o compuestos tóxicos presentes en la muestra, como así también por cambios de pH o fuerza iónica. Por lo tanto, es fuertemente recomendado el estudio de otros tipos de elementos de reconocimiento biológico (Majdinasab et al., 2021).

Los mecanismos de detección no enzimáticos destacados por mejorar la selectividad y sensibilidad emplean anticuerpos o aptámeros. El mecanismo de detección más usual es la interacción antígeno-anticuerpo, se los conoce como inmunosensores y su principal ventaja es la alta afinidad y especificidad de la interacción (Talan et al., 2018; Islam et al., 2019). Los agroquímicos son en general moléculas pequeñas que se comportan como haptenos para el sistema inmunológico, es por eso que deben acoplarse a proteínas transportadoras para estimular la generación de anticuerpos. Actualmente, hay disponibles anticuerpos comerciales para diversos compuestos que pueden emplearse para el desarrollo de biosensores. Sin embargo, las limitaciones de este mecanismo están asociadas a las características físicas: al ser proteínas grandes, poseen baja solubilidad y estabilidad (Majdinasab et al., 2021). La alternativa a estas limitaciones fue la generación de fragmentos de anticuerpos que se realizan mediante procesos complejos de generación de proteínas recombinantes, producción *in vitro* de genes sintéticos o técnicas de despliegue de fagos (Justino et al., 2017). Otro tipo de ensayo, que resulta de la combinación de anticuerpos y enzimas, es el ensayo por inmunosorción ligado a enzimas (ELISA, del inglés *Enzyme-linked immunosorbent assay*). Se reportan bajos límites de detección y muy buena especificidad. Pero se suman los requerimientos de ambos elementos de reconocimiento y se obtienen plataformas que requieren múltiples pasos de incubación (Kumar et al., 2015).

Si bien, en las aplicaciones de monitoreo ambiental, la mayoría de los biosensores son enzimáticos o inmunológicos, recientemente se han incorporado los sensores basados en aptámeros (Kim et al., 2019). La posibilidad de modificar su estructura mediante una síntesis de bajo costo, aporta un grado de versatilidad mayor que el de las otras plataformas (Gopinath et al., 2014; Liu et al., 2019; McConnell et al., 2020; Majdinasab et al., 2021). Los aptámeros se reportaron por primera vez a inicios de los 90 por dos grupos independientes (Tuerk and Gold, 1990; Ellington and Szostak, 1990) y desde entonces se ha trabajado en el desarrollo de diversas aplicaciones analíticas y biomédicas. Son moléculas artificiales que se obtienen por un proceso de selección *in vitro* denominado SELEX (por las siglas en inglés de *Systematic evolution of ligands by exponential enrichment*) a partir de una biblioteca artificial de secuencias (Zhang et al., 2016). El resultado

del proceso es la obtención de cadenas simples de ADN o ARN capaces de unirse a los analitos para los cuales fueron desarrollados con alta sensibilidad y selectividad. Como consecuencia del avance en las tecnologías de selección rápidas y automatizadas, no hay límites en la obtención de secuencias de reconocimiento específico (Kwon et al., 2015). Se obtuvieron aptámeros específicos para moléculas tanto biológicas como sintéticas, de diversos tamaños. Dentro de los analitos se incluyen proteínas, compuestos sintéticos (Kwon et al., 2015), iones metálicos (Li et al., 2009), biomarcadores (Wang et al., 2019; Zhou et al., 2020), compuestos orgánicos (Zhang et al., 2016) y hasta células completas, por ejemplo bacterias patógenas (Fang et al., 2014). Los aptámeros se encuentran en solución predominantemente sin una estructura definida y la afinidad hacia el analito deriva de su capacidad de plegarse y adquirir una estructura tridimensional que le permite formar un complejo estable con la molécula que reconoce. La formación del complejo se logra mediante diversas interacciones: hidrofóbicas, puentes de hidrógeno, *stacking* aromático y fuerzas de *van der Waals*.

Los biosensores que utilizan aptámeros como elemento de reconocimiento biológico, representan una alternativa atractiva y prometedora principalmente al uso de anticuerpos porque su obtención es más económica, no requiere del uso de animales y es ideal para moléculas de bajo peso molecular como los agroquímicos (McConnell et al., 2020; Majdinasab et al., 2021; Futane et al., 2023). Otra ventaja es que son moléculas pequeñas que presentan buena estabilidad, su funcionalidad no es afectada por cambios térmicos y, una vez obtenida la secuencia, pueden ser sintetizadas con alta reproducibilidad y pureza por empresas especializadas, a costos razonables (Song et al., 2008). Más aún, las modificaciones químicas precisan de procedimientos más sencillos que los anticuerpos y permiten probar diferentes estrategias de reconocimientos (Gopinath et al., 2014). Las características mencionadas no solo los hacen ideales para el desarrollo de herramientas de monitoreo, sino también para acoplarlos a diferentes métodos de transducción (Daniel et al., 2013; Cheng et al., 2018; Citartan and Tang, 2019; Weerathunge et al., 2019; Zhao et al., 2021; Yue et al., 2021).

### 1.1.4. Biosensores para plaguicidas: transducción

La interacción entre el aptámero y su analito induce cambios que pueden detectarse de diferentes maneras. De acuerdo al tipo de señal que se genera, los sensores basados en aptámeros pueden clasificarse en electroquímicos, fluorescentes o colorimétricos. La principal ventaja de los biosensores electroquímicos es su alta sensibilidad. Además, se han desarrollado sistemas con tiempos de respuesta cortos (Liu et al., 2020) y bajo costo (Phoonsawat et al., 2022). Sin embargo, los procesos de fabricación aún requieren de técnicas complejas (Jiao et al., 2017; Roushani et al., 2018), procesos de inmovilización (Kumar et al., 2015) y de la modificación de los aptámeros para poder acoplarse a la conversión de la señal (Fu et al., 2019a; Liu et al., 2020). Por otra parte, se han desarrollado plataformas de alto rendimiento que involucran mediciones de fluorescencia (Cheng et al., 2018; Chen et al., 2021) pero que requieren de múltiples pasos y de personal entrenado. Además, necesitan una fuente de luz y acoples especiales para poder reemplazar instrumentos voluminosos (Majdinasab et al., 2021). Los sistemas de detección electroquímicos y fluorescentes han mostrado buen desempeño analítico pero requieren de la funcionalización del aptámero y aún no son totalmente adecuados para el monitoreo ambiental.

En la detección colorimétrica, la señal puede ser capturada por un instrumento óptico

o simplemente a ojo desnudo en determinaciones cualitativas o semi-cualitativas (Morboli et al., 2017). El principio de detección más utilizado cuando se emplean aptámeros es el cambio de color de nanopartículas de oro (AuNPs). El creciente interés por los nanomateriales y sus características particulares ha fomentado la evolución de técnicas de síntesis para la obtención de coloides estables de tamaño y forma controlados (Zeng et al., 2011; Majdinasab et al., 2021), que se han empleado en diversas aplicaciones, incluidas la terapéutica, la medicina forense, la obtención de imágenes y la detección. En particular, el uso de AuNPs en el desarrollo de herramientas de monitoreo ambiental ha sido notable en los últimos años (Sadiq et al., 2022).

Las AuNPs tienen una alta relación superficie/volumen, se pueden funcionalizar con moléculas orgánicas y biológicas, y presentan propiedades catalíticas y eléctricas únicas (Amendola et al., 2017). Sin embargo, la característica principal de las AuNPs, que explica su uso extendido en el desarrollo de sensores, proviene de su naturaleza metálica y del tamaño comúnmente utilizado, entre 2 y 100 nm de diámetro. Las nanopartículas metálicas (NPMs) permiten monitorear un evento de reconocimiento en tiempo real como consecuencia del fenómeno óptico que experimentan al interactuar con la luz. El fenómeno se denomina resonancia de plasmones superficiales localizados (*Localized surface-plasmon resonance*, LSPR) y les permite exhibir un color que depende de su tamaño, forma y estado de agregación (Willems and Van Duyne, 2007). En las NPMs que son más pequeñas que la longitud de onda ( $\lambda$ ) de la luz incidente, su nube electrónica es capaz de interactuar con el campo eléctrico y moverse en función del mismo. Al propagarse la luz, la nube de las NPMs vibra absorbiendo energía de la onda lumínica, lo que se conoce como plasmón. El pico de absorción que se observa, en general, tiene mayor  $\lambda$  a medida que aumenta el tamaño de la partícula. Además, depende del metal utilizado, de la morfología de la agregación, de las modificaciones de superficie y del índice de refracción del medio (Njoki et al., 2007). El pico corresponde a la región de la luz absorbida por el sistema y convertida en energía cinética que se utiliza, precisamente, para poner los electrones de conducción a oscilar. La absorción de los metales oro (Au), cobre (Cu) y plata (Ag) se encuentra dentro del rango espectral visible e infrarrojo cercano, por lo tanto son los más investigados por su potencial aplicación en sensores colorimétricos (Langer et al., 2015). Las AuNPs de 13 nm de diámetro presentan en solución un color rojo vinoso que se produce por su interacción con longitudes de onda de 520 nm y la consecuente absorción en el rango visible del verde azulado. En las AuNPs de mayor tamaño, el pico de absorción se corre hacia los 600 nm y presentan colores azules y violetas, por absorber los colores amarillos y anaranjados.

El efecto LSPR se utiliza para el principio de detección basado en la desestabilización coloidal, sin necesidad de funcionalizar las AuNPs ni de introducir modificaciones a los aptámeros (Weerathunge et al., 2019; Liu et al., 2020). Se lo denomina *label-free* y es un método de detección muy utilizado precisamente por su simplicidad (Gopinath et al., 2014). Las AuNPs en solución están estabilizadas por iones negativos que se adsorben en su superficie y forman una doble capa eléctrica que genera repulsión electrostática entre las partículas coloidales. La agregación ocurre cuando el potencial de la doble capa no es suficiente o la doble capa es muy delgada (alta concentración de sal); en estas condiciones, las partículas se atraen entre sí mediante fuerzas de *van der Waals*, que predominan sobre las de repulsión electrostática. Una forma muy eficiente de conferir estabilidad coloidal es recubrir las partículas con polímeros, de modo que la repulsión estérica entre los residuos poliméricos de diferentes partículas siempre asegura que la atracción de *van der Waals* sea despreciable (Hunter, 2013). Las moléculas de ADN simple

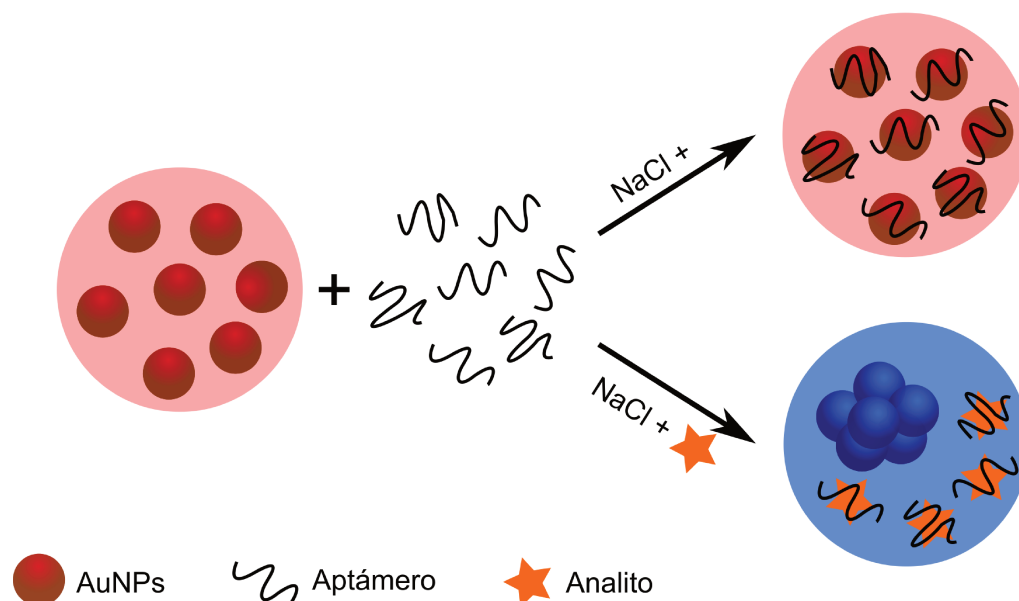


Figura 1.1: Principio de detección colorimétrica *label-free* empleando AuNPs y aptámeros.

cadena de los aptámeros pueden adherirse a las AuNPs, aparentemente por interacciones hidrofóbicas (Nelson and Rothberg, 2011), formando complejos que les proveen estabilidad ante la inducción de la agregación con sales (Li and Rothberg, 2004). Es decir éstos evitan la agregación de las AuNPs ante agentes desestabilizantes, como el cloruro de sodio (NaCl), y la solución mantiene su color rojo. Sin embargo, cuando se encuentra presente la molécula de reconocimiento, los aptámeros se unen a la misma y las AuNPs quedan desprotegidas, se agregan ante la presencia de NaCl y se produce un cambio de color por el corrimiento del pico de absorción. Dependiendo del nivel de agregación de las nanopartículas, el cambio es gradual hacia el azul y se puede relacionar con la concentración de analito (Chen et al., 2014; Cheng et al., 2018; Weerathunge et al., 2019; Soongsong et al., 2021). En la Figura 1.1 se muestra un esquema representativo del proceso.

Si bien este sistema es simple, rápido y económico, para poder realizar una lectura precisa del cambio de color y obtener una medida cuantitativa, es necesario utilizar un espectrofotómetro (Bala et al., 2017; Cheng et al., 2018; Soongsong et al., 2021; Huang et al., 2021).

### 1.1.5. Microdispositivos basados en papel para determinaciones analíticas

El papel ha jugado un rol significativo en el análisis químico por muchos años. Las primeras aplicaciones consistieron en separaciones cromatográficas y electroforéticas (Müller and Clegg, 1949; Toennies and Kolb, 1951; Kunkel and Tiselius, 1951). En los 80 surgió el ejemplo más prominente en el análisis bioquímico: el test de embarazo, un dispositivo de flujo lateral que permite la lectura del resultado en minutos y puede realizarse sin asistencia médica (Yetisen et al., 2013). En las últimas dos décadas, el uso del papel ha sido reintroducido y ha tomado un rol protagónico en el diseño y fabricación de dispositivos

de microfluídica. En 2007 se publicó un trabajo del grupo de George Whitesides, de la Universidad de Harvard, que provocó un gran impacto (Martinez et al., 2007). En él se reporta el primer dispositivo analítico microfluídico basado en papel ( $\mu$ PAD, por las siglas en inglés de *Microfluidic paper-based analytical device*), un dispositivo de biosensado simultáneo de glucosa y proteínas empleando solo 5  $\mu$ l de orina. En el trabajo, se describe el método de grabado del papel por deposición de un polímero hidrofóbico que permite la obtención de canales milimétricos y la definición de zonas de detección. Se demuestra que, mediante una estrategia simple y rápida, se pueden obtener diferentes geometrías para manipular el flujo y poder realizar reacciones químicas y análisis bioquímicos en el dispositivo. Además, se han identificado numerosos desarrollos que no son puramente del área de microfluídica pero que utilizan los fundamentos. Es por eso que, para reconocer el gran campo de aplicaciones, el nombre de la técnica se redujo simplemente a dispositivo analítico basado en papel (PAD, del inglés *Paper-based analytical device*) (Martinez et al., 2007; Yetisen et al., 2013; Desmet et al., 2016).

En el área del monitoreo ambiental, el uso del papel como sustrato de fabricación de dispositivos también ha adquirido relevancia en los últimos años (Chen et al., 2014; Sicard et al., 2015; Meredith et al., 2016; Morbioli et al., 2017). El papel de celulosa es un sustrato asequible en la gran mayoría de los países y en una amplia variedad de presentaciones. La abundancia de celulosa (más del 50% de la biomasa), su bajo costo y biodegradabilidad, y las alternativas de prototipado simple y a gran escala, ofrecen ventajas comerciales y ambientales muy atractivas (Ahmed et al., 2016). Además, es un sustrato liviano (10 mg/cm<sup>2</sup> aprox.) Es por eso que el uso de papel ha resurgido y se ha consolidado como una alternativa interesante frente al uso de otros sustratos tradicionales como el vidrio, el silicio o los compuestos poliméricos (Meredith et al., 2016).

Otra característica fundamental del papel y los sustratos porosos, es el transporte de fluidos por acción capilar sin necesidad de fuentes externas de energía (Elizalde et al., 2015; Schaumburg et al., 2018; Mora et al., 2019). Si bien esta característica resulta favorable para cualquier tipo de aplicaciones, es de particular interés para los dispositivos portátiles que pretenden prescindir de cualquier equipamiento adicional. Por otra parte, la morfología de la red de microfibras aumenta la relación de superficie/volumen y la capacidad de carga, lo que resulta útil para realizar reacciones químicas o de detección. Además, como polímero natural biocompatible, el papel de celulosa puede utilizarse como soporte para células o microorganismos sin causar efectos adversos.

Desde la introducción del concepto de  $\mu$ PAD, se desarrollaron diversas técnicas de fabricación que se basan en dos estrategias principales: el uso de un láser o la generación de delimitaciones hidrofóbicas. Con la primera se puede realizar un grabado o un corte sobre el papel. El grabado implica la eliminación de un determinado grosor de sustrato de papel mediante un láser de CO<sub>2</sub>, lo cual permite la modificación de la superficie para localizar reactivos o ajustar la velocidad de absorción. Por su parte, el corte permite la definición de canales o de PADs independientes. En cuanto a la segunda estrategia, en el trabajo de Martinez et al. (2007) se obtienen barreras por litografía, los bordes son nítidos y bien definidos. Sin embargo, el proceso de fabricación es complejo y costoso, y requiere de equipamiento y del reactivo fotorresistente. Es por eso que, desde entonces, se han desarrollado varias alternativas. La impresión con cera es un método económico y ampliamente utilizado, el proceso de fabricación es muy simple, de alto rendimiento y permite el prototipado a gran escala. La definición está limitada por el derretimiento de la cera, por lo cual su utilización también dependerá de la precisión que requiera el dispositivo (Carrilho et al., 2009). El inconveniente principal que afronta este método es

que las impresoras de cera fueron discontinuadas del mercado en 2017. Como alternativa, se utilizan impresoras convencionales de escritorio con diferentes tintas hidrofóbicas que se pueden adaptar a las necesidades del dispositivo (Yamada et al., 2015). Otras técnicas de impresión, como la serigrafía y la flexografía, también son excelentes para la producción a gran escala de dispositivos de papel (Olkkonen et al., 2010; Cate et al., 2015). Sin embargo, estas técnicas requieren una infraestructura costosa y no son fácilmente adaptables a nuevos diseños de dispositivos.

### 1.1.6. Análisis de patrones y el efecto del anillo de café

Una gota apoyada sobre una superficie recibe el nombre de gota sésil y conforma un sistema de tres fases. Las fases sólida, líquida y gaseosa están formadas por el sustrato de apoyo, la gota y el aire, respectivamente. A su vez, este sistema posee 3 interfaces: la interfaz líquido-vapor, ubicada sobre la superficie externa de la gota; la interfaz sólido-líquido, superficie mojada del sustrato; y la interfaz sólido-vapor, que corresponde a la porción que no está en contacto con la gota (Li, 2008). En la intersección de estas tres, encontramos la línea de contacto, es decir, el perímetro de la gota sobre la superficie. Respecto a la forma, dependerá de la tensión superficial del líquido y de la naturaleza de la superficie (Yang et al., 2022). En el caso del agua como componente principal, se produce la fijación de la gota en la superficie por su elevada tensión superficial. La gravedad modifica la forma de la gota si esta tiene un radio mayor a 1 mm, aproximadamente. El balance de fuerzas produce que, en una superficie moderadamente hidrofílica, la gota adquiera una forma semi-esférica. Sin embargo, al aumentar el grado de hidrofobicidad de las superficies, la gota se confina adquiriendo una forma cada vez más esférica para disminuir su área de contacto (Yang et al., 2022). Precisamente, la definición del ángulo de contacto se utiliza para caracterizar la hidrofobicidad de los materiales. Con un valor mayor a  $90^\circ$ , se considera que la superficie es hidrofóbica.

La evaporación de una gota sésil es un fenómeno común en la naturaleza. La disminución gradual del volumen de líquido es consecuencia de la diferencia entre la presión de vapor en el ambiente y la presión de vapor inmediatamente por encima de la gota, que induce la aparición de un flujo difusivo (Li, 2008). La presencia de solutos no volátiles en la gota conlleva a la formación de un residuo en forma de anillo en la línea de contacto. El efecto es consecuencia de que la tasa de evaporación es mayor en la línea de contacto, lo cual induce un flujo radial hacia afuera en el interior de la gota. Este fenómeno se denomina efecto del anillo de café (CR, del inglés *Coffee-ring effect*), y fue descrito por primera vez por Deegan et al. (1997). En el caso de las soluciones coloidales, la formación del CR es consecuencia del desplazamiento de partículas en la periferia de la gota y se observa tanto en sustratos sólidos como porosos (Nilghaz et al., 2015).

Diferentes modificaciones en la composición coloidal o en las condiciones externas de las gotas conducen a la alteración o incluso a la supresión del efecto CR. La formación del CR genera inconvenientes en numerosas aplicaciones prácticas, en procesos de impresión por inyección de tinta, fabricación de pinturas, síntesis de estructuras ordenadas, entre otros; es por eso que se han estudiado numerosas estrategias para suprimirlo (Li et al., 2015; Zang et al., 2019). En contraste, otros estudios indican el aprovechamiento del efecto del CR para separaciones cromatográficas, preparación de fluidos biológicos, procedimientos de pre-concentración y otros mecanismos donde el flujo capilar posibilita la manipulación de muestras biológicas (Li et al., 2015).

Asimismo, las alteraciones del efecto CR se han empleado en diferentes sensores para



la detección de analitos, por ejemplo para determinar proteínas (Wen et al., 2013), ácidos nucleicos (Li et al., 2015) y glucosa (Zhang et al., 2018), y se están explorando otros usos de la información contenida en los patrones de las gotas evaporadas para técnicas de diagnóstico (Sefiane et al., 2021). En el trabajo de Trantum et al. (2014) se detecta en 10 min la presencia de un bacteriófago por la alteración del patrón de deposición de partículas de 1  $\mu\text{m}$  funcionalizadas con el anticuerpo correspondiente.

El análisis de patrones como señal de detección, en reemplazo de mediciones de color, tiene la ventaja de ser relativamente tolerante a las variaciones de la luz exterior, lo que permite lecturas mediante cámaras normales de teléfonos celulares y sin requisitos especiales de iluminación.

Se describe a continuación el desarrollo de una plataforma de biosensado portátil, robusta y específica, para la detección de CPS en agua. Se emplea un mecanismo de sensado sencillo sobre una tarjeta de papel que permite el reemplazo de la lectura colorimétrica por el análisis del patrón producido por la evaporación de gotas que contienen la muestra de agua y los reactivos: solución coloidal de AuNPs, aptámeros como elemento de reconocimiento biológico y NaCl como inductor de la agregación. De esta manera, el sistema prescinde de una fuente de iluminación externa específica y puede ser acoplado a la toma de imágenes con un teléfono celular y al posterior análisis automatizado mediante un programa especializado, lo que lo convierte en una herramienta adecuada para su uso efectivo fuera del laboratorio y para la recolección de datos de utilidad en el monitoreo ambiental.

## 1.2. Objetivos

Desarrollar un dispositivo de sensado portátil basado en aptámeros para la detección cuantitativa de CPS en agua. El cumplimiento de este objetivo implica la realización del diseño conceptual del dispositivo, la fabricación de prototipos sobre sustratos porosos, la adaptación de la reacción de detección sobre papel y la realización de pruebas con muestras reales y en diferentes ambientes, para determinar su aplicabilidad a campo.

## 1.3. Materiales y métodos

### 1.3.1. Reactivos

El CPS PESTANAL<sup>®</sup>, el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) PESTANAL<sup>®</sup> y el ácido cloroáurico ( $\text{HAuCl}_4$ ) fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (Buenos Aires, Argentina). El citrato de sodio fue provisto por Anedra (Buenos Aires, Argentina). El diclorvos (DCV), fenitrotión (FTT), pirimifos-metil (PMM), carbaril (CBR) y glifosato (GFS) se obtuvieron de Chem Service (Buenos Aires, Argentina). La laminadora y los polímeros translúcidos de laminación tamaño carnet (130 x 90 mm y 150  $\mu\text{m}$  de espesor) se compraron en DASA (Buenos Aires, Argentina). El aptámero se obtuvo liofilizado y se disolvió en agua MilliQ estéril a la concentración recomendada por el fabricante. Se preparó un solución stock de CPS en etanol que se conservó a 4 °C. Para la preparación de todas las soluciones de trabajo, se empleó agua MilliQ.

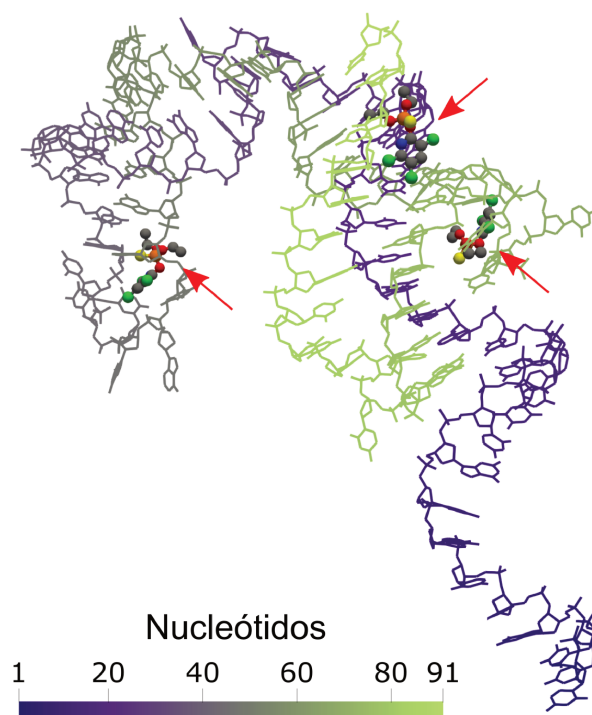


Figura 1.2: Visualización de la estructura 3D del aptámero y los sitios de unión más probables. Las moléculas de CPS se señalan con una flecha roja.

### 1.3.2. Selección del aptámero

El aptámero específico para CPS es una secuencia de ADN de 91 nucleótidos (5'-C CTGCCACGCTCCGCAAGCTTAGGGTTACGCCTGCAGCGATTCTTGATCGCG CTGCTGGTAATCCTTCTTTAAGCTTGGCACCCGCATCGT-3') desarrollada por [Lei et al. \(2012\)](#) y utilizada posteriormente por varios grupos que diseñaron biosensores empleando diferentes estrategias de detección ([Jiao et al., 2016](#); [Roushani et al., 2018](#); [Cheng et al., 2018](#); [Liu et al., 2020](#); [Soongsong et al., 2021](#)). La síntesis y purificación de grado HPLC (por las siglas en inglés de cromatografía líquida de alto desempeño, *High-performance liquid chromatography*) fue realizada por la empresa Genbiotech (Buenos Aires, Argentina). No se implementaron modificaciones a la secuencia original publicada.

La caracterización estructural del aptámero se realizó en colaboración con el Dr. Fernando E. Herrera del Depto. de Física (FBCB - UNL), y se siguió la metodología publicada por [Zhang et al. \(2014\)](#). Brevemente, se generó un modelo 3D de la estructura ([Popenda et al., 2012](#)) a partir de la predicción de la estructura secundaria con MFOLD ([Zuker, 2003](#)). Las moléculas del analito se crearon con PyMOL Molecular Graphics System. El modelado se realizó con Visual Molecular Dynamics ([Humphrey et al., 1996](#)), y la visualización con ParaView ([Ahrens et al., 2005](#)). Se obtuvo una representación de la estructura del aptámero con los sitios de unión, tal como se muestra en la Figura 1.2.

### 1.3.3. Síntesis de nanopartículas de oro (AuNPs)

Para la síntesis de las AuNPs se utilizó la técnica de reducción de oro, de  $\text{Au}^{+3}$  a  $\text{Au}^0$  atómico, en presencia de citrato, que actúa como reductor y estabilizante coloidal. El método, originalmente publicado por [Turkevich et al. \(1951\)](#), ha sido ampliamente

utilizado y optimizado para la obtención de nanopartículas estables, esféricas y con baja dispersión de tamaño, de entre 10 y 50 nm de diámetro (Sadiq et al., 2022). Para la obtención de AuNPs de 13 nm, se colocó sobre una placa térmica un Erlenmeyer con una manta térmica y un sistema de reflujo acoplado, y se agregaron 200 ml de agua ultra pura que se calentó hasta ebullición homogénea. En este punto, se agregaron 400  $\mu$ l de solución de HAuCl<sub>4</sub> 50  $\mu$ g/ml y 650  $\mu$ l de solución de citrato de sodio 50  $\mu$ g/ml. Se observó la aparición de color azul intenso dentro del primer minuto de reacción que viró a rojo vinoso en los 2-3 minutos posteriores. A partir de allí, se continuó calentando por 30 minutos más.

La forma, tamaño y distribución de las partículas fue analizada mediante microscopía de transmisión electrónica (TEM). Se utilizó el microscopio de alta resolución, JEM-2100 plus (JEOL, Tokyo, Japón) equipado con un emisor LaB6 y operado con un voltaje de aceleración de 200 kV. La concentración de las AuNPs en solución se calculó de acuerdo con la Ley de Beer-Lambert a partir del espectro de absorción obtenido en un espectrofotómetro UV/VIS (PerkinElmer Lambda 35, USA).

### 1.3.4. Diseño y fabricación de las tarjetas

El programa *CR Code Analysis* se desarrolló en Python para diseñar las tarjetas, denominadas *CR Code Cards*, y para analizar las imágenes tomadas de los ensayos. El diseño de las tarjetas tuvo en cuenta la integración con el análisis automático a través de un programa especializado. Las tarjetas son rectangulares y contienen 4 sitios de análisis, identificados como: C1 y C2 para los controles, y Sa y Sb que se utilizan para analizar la muestra por duplicado. En las esquinas de las tarjetas se colocaron marcadores de referencia, o fiduciaros, que se obtuvieron de la biblioteca ArUco (Romero-Ramirez et al., 2018).

Las tarjetas se fabricaron sobre papel de filtro Whatman No. 1 (GE Healthcare, USA) y se empleó una impresora de cera ColorQube 8580 (Xerox, Norwalk, CT, Estados Unidos) para imprimir las marcas fiduciaras, los sitios de análisis y las referencias. Para la delimitación de los sitios de análisis, de forma circular, se aplicó una temperatura de 150 °C durante 1 min. El diámetro final de cada pocillo fue de 5 mm. Posteriormente, las tarjetas se laminaron para aumentar su robustez. A los polímeros translúcidos de laminación se les recortó un área cuadrada de la capa superior que abarca los cuatro sitios de detección. Luego, el conjunto se cubrió con papel blanco de impresora y se laminó a 65 °C, temperatura que no altera las marcas impresas en cera.

### 1.3.5. Detección de clorpirifós (CPS)

Todos los ensayos de detección de CPS se realizaron por cuadruplicado. El procedimiento fue el siguiente: se mezclaron en un tubo 30  $\mu$ l de aptámero con 80  $\mu$ l de AuNPs en la relación molar de 6:1. Luego, se agregaron 30  $\mu$ l de una solución de CPS en el rango de concentraciones de 0,048  $\mu$ M a 482  $\mu$ M. La solución se incubó a temperatura ambiente por 60 min. Cumplido el tiempo de incubación, se agregaron 20  $\mu$ l de una solución de NaCl 1 M. El volumen final fue de 160  $\mu$ l. Luego de 15 minutos, se tomaron 20  $\mu$ l que se colocaron sobre los sitios de análisis correspondientes de las tarjetas. Las gotas depositadas cubrieron completamente el pocillo de bordes hidrofóbicos. La evaporación de las gotas se realizó en condiciones controladas de temperatura ( $T$ ), 24 °C, y de humedad relativa ( $HR$ ), aproximadamente 30 %. La obtención y control de estas condiciones se detalla

en la Sección 1.3.8. Luego de la evaporación completa del líquido, se tomaron fotos de las tarjetas con un teléfono celular según las condiciones que se detallan en la Sección 1.3.6.

En todos los ensayos realizados, se incluyeron dos controles. El control positivo de agregación C1, en el cual el aptámero es reemplazado por agua MilliQ, permite verificar que las AuNPs son capaces de agregarse ante la adición de sal y que no se han estabilizado con algún compuesto presente en la muestra a analizar u otra variación experimental. El control negativo C2, al cual no se adiciona CPS, permite controlar el correcto funcionamiento del sistema de detección.

#### 1.3.6. Obtención y análisis de datos

Para la obtención de los datos, se toman imágenes de las tarjetas, una vez que las gotas depositadas sobre los sitios de análisis se evaporaron completamente. Se emplea la cámara de un teléfono celular con el flash encendido y y el resto de las configuraciones en sus valores predeterminados. En la Figura 1.3a se muestra el procedimiento. Como se observa, no es necesario alinear perfectamente la tarjeta o posicionar el teléfono paralelo al plano de la tarjeta. Tampoco se requieren dispositivos externos ni fuentes de iluminación particulares.

El desarrollo del programa *CR Code Analysis*, que se utilizó tanto para diseñar las tarjetas como para analizar las imágenes obtenidas de los ensayos, se realizó en colaboración con el Ing. Gabriel S. Gerlero del Centro de Investigación de Métodos Computacionales (CIMEC) (UNL - CONICET). La implementación hace uso de la biblioteca de código abierto OpenCV (Bradski, 2000) y del módulo ArUco (Romero-Ramirez et al., 2018).

El procesamiento de la imagen comienza con la identificación y captura automática de los datos (AIDC, por las siglas en inglés de *Automatic identification and data capture*). Se identifican la posición y orientación de los fiduciales en la imagen capturada para realizar una transformación de perspectiva mediante una proyección homográfica. Esto permite obtener una imagen estandarizada de la tarjeta. Si el primer paso no resulta suficiente para la determinación precisa de los sitios de análisis, se realiza una instancia adicional que consiste en aplicar la transformada de Hough para círculos (Illingworth and Kittler, 1987) que permite refinar la ubicación. A continuación, se realiza una transformación geométrica empleando el sistema de coordenadas polares  $r$ - $\theta$  con origen en el centro de cada disco, donde  $\theta$  es el ángulo polar y  $r$  es el radio. Se muestra un ejemplo representativo de este paso en la Figura 1.3b. Esta transformación simplifica el cálculo del promedio de las intensidades de la luz reflejada para todo ángulo polar  $\theta$ , en cada valor de radio  $r$ . De esta manera, se obtiene un gráfico como se muestra en la Figura 1.3c. La información obtenida se emplea para cuantificar el grado de supresión del efecto CR y así determinar la concentración de CPS en cada sitio de análisis por medio de una curva de calibrado.

#### 1.3.7. Evaluación de especificidad e interferencias

La especificidad del método de detección propuesto se evaluó reemplazando el CPS por otros plaguicidas, incluyendo insecticidas y herbicidas. Se evaluaron el DCV, FTT, 2,4-D, PMM, GFS y CBR. Las soluciones se prepararon en la concentración de máxima solubilidad en agua de cada compuesto.

Para estudiar el efecto de las interferencias, se prepararon mezclas binarias de CPS-2,4-D, CPS-GFS y CPS-FTT.

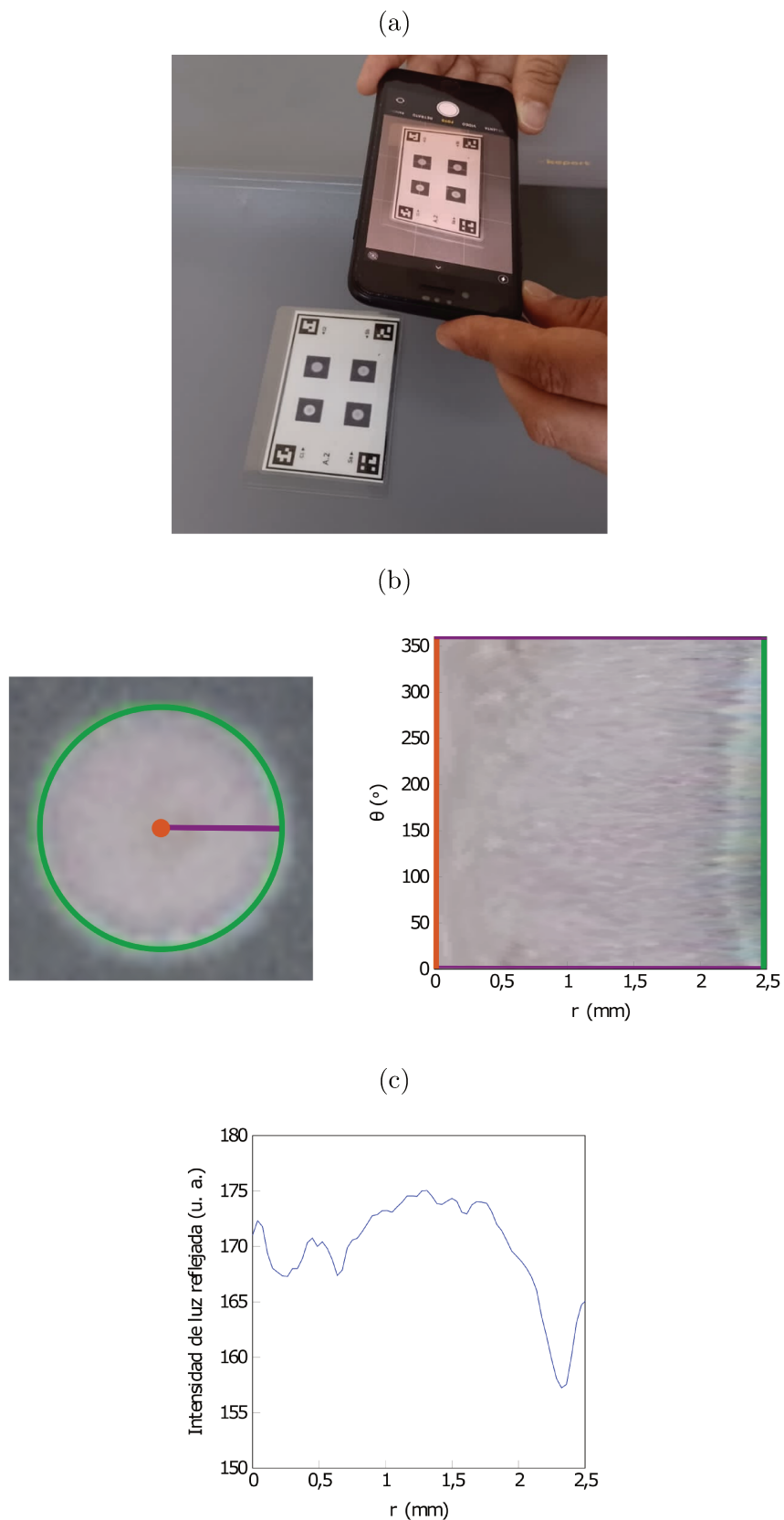


Figura 1.3: Proceso de obtención de datos en una *CR Code Card*. (a) Transformación geométrica de un disco de detección correspondiente a C2 (radio 2,5 mm). Las marcas y contornos se agregan para clarificar el cambio de perspectiva. (b) Transformación geométrica de un disco de detección correspondiente a C2 (radio 2,5 mm). Las marcas y contornos se agregan para clarificar el cambio de perspectiva. (c) Intensidad de luz reflejada promediada en  $\theta$  para cada posición radial  $r$  del patrón del C2.

#### 1.3.8. Desempeño de la plataforma

Para determinar la reproducibilidad de los ensayos bajo condiciones de operación variables, se analizaron los controles C1 y C2 empleando diferentes valores de  $T$  y  $HR$  durante la etapa de evaporación de las gotas sobre las *CR Code Cards*. Específicamente, se evaluaron tres  $T$ : 18, 24 y 30 °C, y dos niveles de  $HR$ : 30 % y 60 %. Estas condiciones se lograron colocando las tarjetas, con las gotas depositadas en los sitios de análisis, dentro de un contenedor con tapa, el cual se colocó a su vez en una estufa de laboratorio. La temperatura deseada se fijó con el controlador digital de la estufa. La  $HR$  de 60 % se alcanzó colocando una solución saturada de sulfato de potasio ( $K_2SO_4$ ) dentro del contenedor. Para lograr 30 % de  $HR$ , se emplearon perlas de sílica gel. Los parámetros se controlaron con un termo-higrómetro (Boeco, Alemania). Se registró el tiempo requerido para el secado completo de las gotas bajo cada condición ensayada.

Con el objeto de evaluar la influencia del pH de la muestra incógnita en la detección de CPS, se evaluaron los controles C1 y C2. Para ello, los 30  $\mu$ l correspondientes a la muestra, se reemplazaron por agua al pH requerido. Los valores de pH analizados estuvieron comprendidos entre 6 y 8, y se alcanzaron mediante el agregado de ácido clorhídrico (HCl) 0,12 M o de hidróxido de sodio (NaOH) 0,04 M, según corresponda.

Por otro lado, a fin de evaluar el desempeño del ensayo bajo diferentes condiciones de iluminación, se compararon las imágenes tomadas dentro del laboratorio (con luz artificial) y en el exterior. Para las imágenes adquiridas en el exterior, se evaluaron las siguientes condiciones: luz solar directa, luz solar indirecta (sombra homogénea) y luz solar indirecta con la tarjeta en un plano inclinado de 20° respecto al teléfono. Para cada condición, se evaluó además la opción con y sin flash.

En todos los ensayos descriptos en esta sección, se tomó una foto de la tarjeta una vez completa la evaporación de las gotas, las imágenes se analizaron con el programa *CR Code Analysis* y se compararon mediante indicadores estadísticos como el desvío estándar relativo (RSD, del inglés *Relative standard deviation*) o el porcentaje de variación (Var %). Los ensayos se realizaron por cuadruplicado en todas las variaciones mencionadas, excepto para las condiciones de  $T$  y la  $HR$ , que se hicieron por duplicado.

Por último, se evaluó la estabilidad del patrón generado en los sitios de detección de las tarjetas a lo largo del tiempo. Se tomaron fotos cada 24 h, durante 3 días, de 6 tarjetas que contenían dos sitios de detección para cada control. Se consideró como  $t=0$  al momento en el cual las gotas de cada tarjeta se habían secado completamente.

#### 1.3.9. Detección de CPS en agua de río

Se estudió la capacidad del biosensor para la identificación y cuantificación de CPS en muestras reales de agua. Para ello, se realizaron los ensayos con agua recolectada de la Laguna Setúbal (31°35'27''S 60°37'59''W), frente a la ciudad de Santa Fe, Argentina. Las muestras de agua se filtraron 3 veces a través de una membrana de nylon con un tamaño de poro de 0,22  $\mu$ m, luego de lo cual se les adicionó una cantidad conocida de CPS. Los resultados obtenidos se compararon con la técnica de Cromatografía líquida de ultra alta eficiencia (UHPLC, por las siglas en inglés de *Ultra high performance liquid chromatography*). El procedimiento de la técnica de referencia fue realizado por la Lic. María Rosa Repetti del PRINARC (Programa de Investigación y Análisis de Residuos y Contaminantes Químicos) (FIQ-UNL).

## 1.4. Resultados y discusión

### 1.4.1. Mecanismo de detección

A fin de verificar el correcto funcionamiento del mecanismo de detección basado en aptámeros, se realizaron mediciones espectrofotométricas de controles y de patrones de CPS en solución. Los resultados se muestran en la Figura 1.4.

En ausencia de aptámeros (C1), las AuNPs se agregan al añadir sal, cambiando el color de la solución de rojo a azul. Cuando los aptámeros se unen a las AuNPs (C2), evitan la desestabilización coloidal inducida por la sal, las AuNPs no se agregan y la solución permanece roja. En presencia de CPS (48  $\mu$ M), se distingue un estado intermedio en la zona espectral de agregación ( $\lambda$  de 600 a 700 nm, aproximadamente). Ésto indica que el aptámero específico de CPS se disocia parcialmente de las AuNPs para unirse a las moléculas de CPS. Por lo tanto, el aptámero seleccionado detecta satisfactoriamente al analito. En la Figura 1.4a se observan los colores de las soluciones coloidales obtenidas. Además, estos experimentos validan implícitamente las características de las AuNPs sintetizadas. En particular, todas las curvas de la Figura 1.4b presentan un pico de absorbancia en 520 nm, lo cual indica la presencia de oro.

Las AuNPs también se caracterizaron por TEM. Las imágenes mostraron la presencia de partículas cuasi-esféricas y bastante monodispersas, como se observa en la Figura 1.4c, con un diámetro promedio de  $13 \pm 2$  nm. Las AuNPs recién preparadas (suspensión coloidal sin agentes estabilizadores) se mantienen estables para su uso unos 45 días en almacenamiento refrigerado; este tiempo determina la vida útil del conjunto de detección, ya que los aptámeros específicos de CPS pueden conservarse varios meses.

### 1.4.2. Sistema de lectura

El análisis de las tarjetas con el programa *CR Code Analysis* permitió identificar los sitios de detección con gran precisión, aún en imágenes desalineadas. Esta característica es crucial para la cuantificación del efecto CR dentro de las pequeñas dimensiones de los sitios (los detalles se dieron en la Sección 1.3.6).

Como se ha descrito, cuando el CPS no está presente en la solución de prueba, las AuNPs se encuentran estabilizadas por la presencia de los aptámeros y la adición de sal no produce su agregación. Cuando se coloca una gota de esta solución en el sitio de detección, comienza inmediatamente la evaporación del agua de la superficie de la gota. Este proceso es más rápido en la zona de la línea de contacto de la gota, por lo que el líquido del interior de la gota fluye hacia el exterior para reponer la pérdida de agua en la periferia de la gota. Como consecuencia, se induce un perfil de concentración de partículas, con enriquecimiento de AuNPs en la región de la línea de contacto de la gota. Una vez que la gota se ha evaporado por completo, la distribución de AuNPs produce un patrón en forma de anillo. Es decir, se produce el efecto CR (Deegan et al., 1997). En consecuencia, la intensidad de la luz reflejada disminuye en los bordes del sitio de detección, debido a la mayor concentración de AuNPs que absorben la luz en la región periférica (curva roja en Figura 1.5).

Por el contrario, cuando el CPS está presente en la solución a evaluar, se produce la agregación de las AuNPs. El tiempo característico de este proceso es más corto que el tiempo de evaporación de las gotas, y se observa una deposición preferencial de los agregados en la zona central del sitio de detección, lo que significa que el efecto CR ha sido suprimido (Mampallil and Eral, 2018; Zang et al., 2019). En este caso, la intensidad

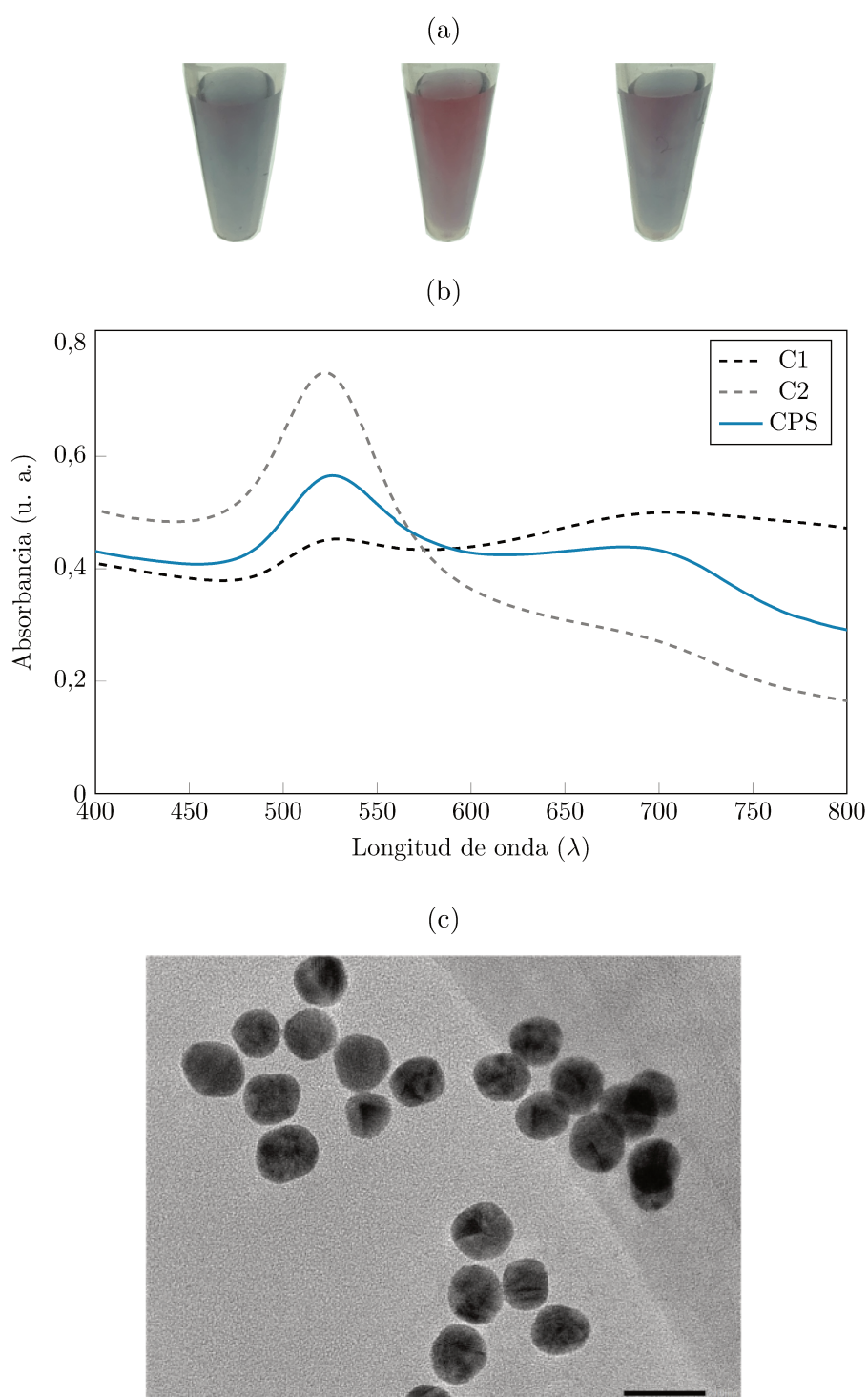


Figura 1.4: (a) Tubos con las soluciones coloreadas correspondientes a: C1, C2 y una muestra positiva de CPS (de izquierda a derecha). (b) Absorbancia en el espectro de luz visible de diferentes soluciones coloidales luego del agregado de NaCl: AuNPs (C1), AuNPs con aptámeros (C2), AuNPs con aptámeros más CPS. (c) Imagen de las AuNPs obtenida con el TEM (Escala = 20 nm).



de la luz reflejada es mayor en la zona anular exterior, donde la presencia de agregados de AuNPs que absorben la luz es menor (curva azul en Figura 1.5).

Para identificar los mecanismos que subyacen a la alteración del efecto CR inducida por la presencia del CPS se requiere más investigación. Se puede deducir que el patrón final es el resultado de la interacción de diferentes procesos, como la migración, agregación y adsorción de AuNPs sobre el sustrato, junto con los flujos internos asociados a la evaporación de las gotas. En particular, el sistema en estudio implica una complejidad adicional, ya que la captura del analito y la consiguiente desestabilización coloidal se producen a medida que avanza la evaporación de la gota (véase, por ejemplo, [Crivoi and Duan \(2013\)](#)). Para el propósito de esta Tesis, el hecho relevante es que existe una correlación entre la concentración de la molécula a detectar y el grado de alteración del patrón de la gota seca, que puede ser aprovechado como un sistema de lectura sensible para el biosensor propuesto.

Para el análisis cuantitativo de los patrones, se definieron dos regiones en los sitios de detección: un disco interno que abarca desde el centro hasta  $r = 0,5$  mm, denominado ID (*inner disk*); y el anillo externo, entre  $r = 1,75$  y  $r = 2,25$  mm, denominado OA (*outer annulus*). Dichas regiones se marcaron en el gráfico de la Figura 1.5. Asimismo, se definieron  $I_{OA}$  e  $I_{ID}$  como las intensidades de luz reflejadas promedio de OA y de ID, respectivamente. Luego, se calculó la relación entre esas intensidades como  $IR = I_{OA}/I_{ID}$ . El valor de  $IR$  permitió identificar adecuadamente los ensayos que presentaban una alteración del CR originado por la presencia de CPS. Y lo que es más relevante, permitió determinar cuantitativamente la concentración de analito, como se describe a continuación.

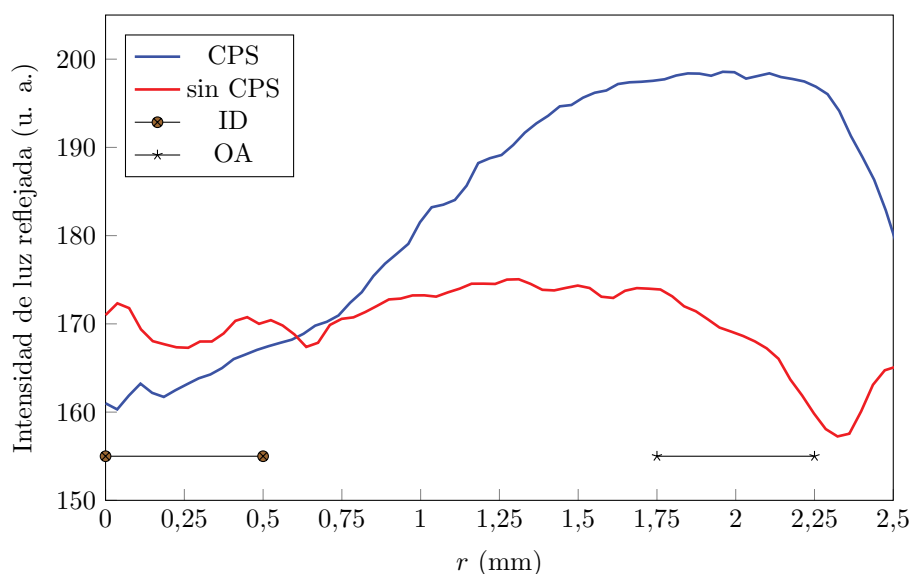


Figura 1.5: Intensidad de luz reflejada promediada en  $\theta$  en función de la coordenada radial. Las curvas corresponden al análisis del patrón de gotas secas de soluciones con (azul) y sin (rojo) CPS.

### 1.4.3. Detección cuantitativa de CPS

En primer lugar, es importante mencionar que, además del análisis de las imágenes descrito anteriormente, se exploraron cuidadosamente varios parámetros fisicoquímicos de la reacción para maximizar la respuesta del sensor. Por ejemplo, se optimizaron las

concentraciones y volúmenes de reactivos (AuNPs, aptámero, NaCl), los tiempos y la temperatura de incubación, y las condiciones de evaporación de las gotas ( $T$ ,  $HR$ ; véase la Sección 1.4.6 para más detalles). Los resultados que se presentan a continuación se obtuvieron a  $T = 24\text{ °C}$  y  $HR = 33\%$ .

Los ensayos se realizaron en un amplio rango de concentraciones de CPS, desde  $0,048$  hasta  $482\text{ }\mu\text{M}$ . A modo de verificación, también se registraron los colores obtenidos de la mezcla de reacción en solución, tal como se muestra en Figura 1.6a. Los patrones sobre el papel de las gotas secas se pueden apreciar en la Figura 1.6b. Se evidencia que la alteración del CR se incrementa gradualmente con la concentración de CPS (de izquierda a derecha). El patrón del CR con forma de anillo desaparece completamente para concentraciones de analito superiores a  $10\text{ }\mu\text{M}$ , aproximadamente. En contraste, para dichas concentraciones elevadas de CPS, aparece un patrón en forma de disco en el centro del sitio de detección.

La determinación cuantitativa de CPS en las tarjetas se realizó mediante el análisis automatizado empleando el programa *CR Code Analysis*. Los resultados se muestran en Figura 1.6c, donde se observa claramente la correlación entre la concentración de analito en las muestras y el cociente  $I_{OA}/I_{ID}$ . En particular, en el rango de concentraciones representado, el  $IR$  aumenta linealmente con el logaritmo de la concentración de CPS (nótese la escala logarítmica utilizada para el eje de abscisas, Figura 1.6c).

### 1.4.4. Desempeño analítico del biosensor

El límite de detección (LOD) se estimó como la concentración de CPS que produce una señal que es tres veces mayor que la señal de ruido del control negativo (C2), y el valor resultante fue  $\text{LOD} = 0,2\text{ }\mu\text{M}$ . El límite de cuantificación (LOQ) se estimó como la concentración de CPS que produce una señal que es diez veces mayor que la señal de ruido del control negativo (C2), y el valor resultante fue  $\text{LOQ} = 30\text{ }\mu\text{M}$ .

En la Tabla 1.1 se compara la sensibilidad de la plataforma presentada con la de otros sensores reportados en la bibliografía para la detección a campo del CPS. y se presentan las principales características de cada dispositivo. Considerando el LOD, el biosensor aquí propuesto presenta un rendimiento notable, siendo superado solamente por dispositivos que implican la utilización de equipos voluminosos (Soongsong et al., 2021; Cheng et al., 2018), necesarios para leer con precisión la señal del sensor o para procesar las muestras. Por el contrario, las imágenes de las *CR Code Cards* pueden ser analizadas aún cuando hubieran sido tomadas con luz ambiente variable (luz artificial, luz solar directa o indirecta), aspecto que se analiza más adelante en la Sección 1.4.6. Asimismo, es posible medir el analito en un amplio rango de concentraciones que abarca 5 órdenes de magnitud.

Disminuir el LOD es de interés para detectar niveles traza. Esta optimización podría lograrse mediante un ajuste del análisis matemático de las imágenes para captar con mayor exactitud las variaciones que se producen a bajas concentraciones de analito. En este sentido, la integración de algoritmos de aprendizaje automático podría mejorar la capacidad de predicción del análisis de patrones. Por otra parte, también podrían introducirse mejoras en el proceso de detección. Por ejemplo, el establecimiento de un microentorno definido para la evaporación de las gotas ayudaría a mejorar la robustez del sensor y, por tanto, el LOD, aunque comprometiendo su tamaño y portabilidad.

Aquí es oportuno subrayar que se está proponiendo un dispositivo portátil, menos sensible que los sensores más sofisticados o los equipos de laboratorio convencionales, pero que ofrece las ventajas de realizar detecciones sencillas, económicas, rápidas y en el sitio

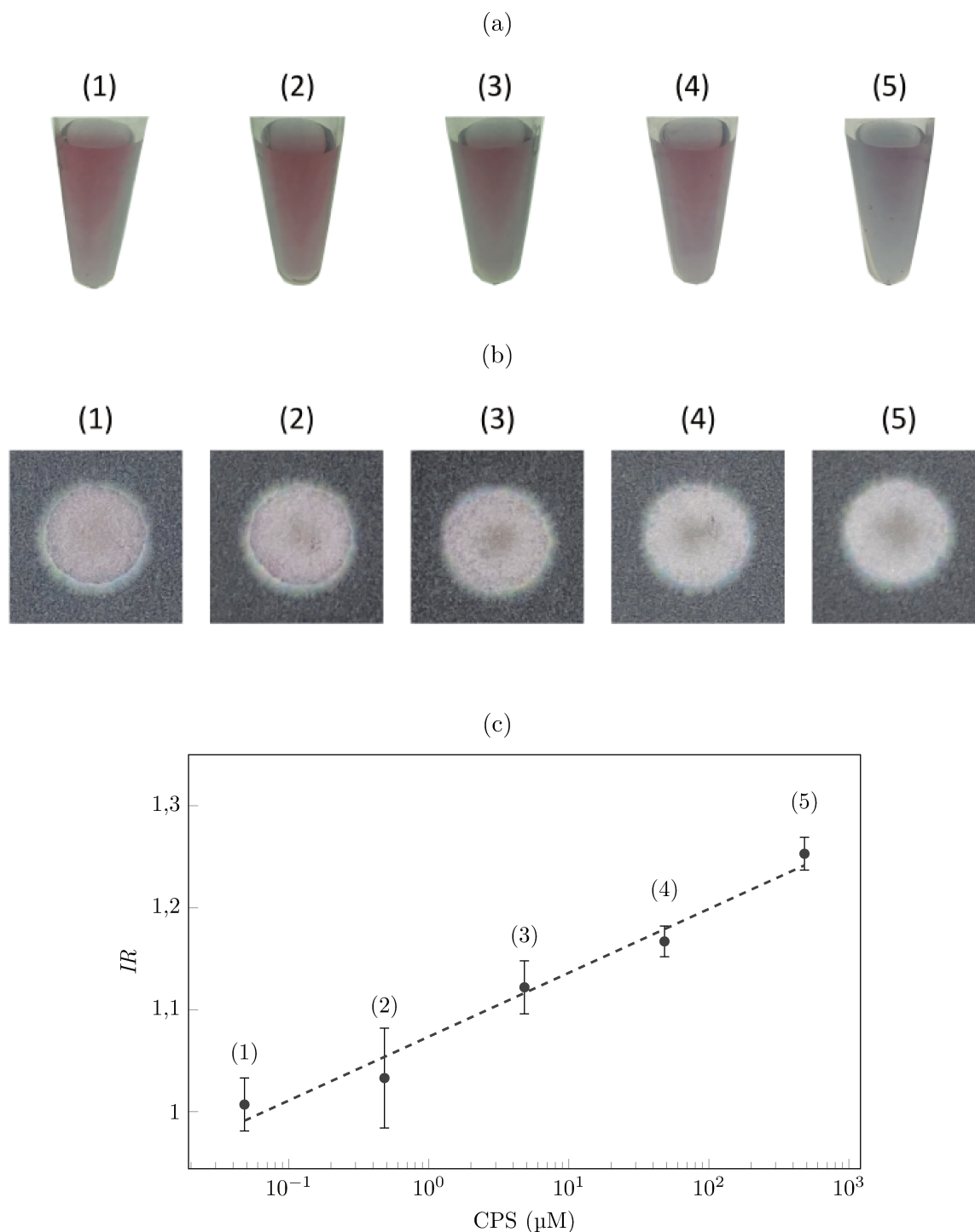


Figura 1.6: Resultados de los ensayos en muestras de agua con diferentes concentraciones de CPS, desde 0,048 hasta 482  $\mu\text{M}$  (identificadas del 1 al 5). (a) Tubos con las soluciones coloreadas (mecanismo basal de sensado colorimétrico). (b) Patrones obtenidos tras la evaporación de la gota sobre los sitios de detección (sistema de lectura aquí propuesto). (c) Cociente de intensidades en función de la concentración de CPS, utilizado como curva de calibrado para el ensayo sobre las tarjetas. Los círculos negros son los datos experimentales (las barras de error son desviaciones para  $n=4$ ) y la línea de puntos representa la regresión lineal (ecuación:  $IR = 0,027\ln[CPS] + 1,074$ ; coeficiente de correlación:  $R^2 = 0,98$ .)

Tabla 1.1: Bioensores portátiles reportados para la detección de CPS.

Elemento de reconocimiento biológico	Señal	Dispositivo de lectura	Requerimientos	LOD ( $\mu\text{M}$ )	Rango ( $\mu\text{M}$ )	Referencia
Aptámero	Colorimétrico	Espectrofotómetro	Incubación a 37 °C	32	100 – 600	<a href="#">Weerathunge et al. (2019)</a>
Enzima	Colorimétrico	Cámara teléfono celular	No especificado	25	0 – 71	<a href="#">Kim et al. (2018)</a>
Enzima	Colorimétrico	Lector colorimétrico	Acople óptico	9,4	14 – 285	<a href="#">Fu et al. (2019b)</a>
Aptámero	Patrón	Cámara teléfono celular	Ninguno	0,2	0,048 – 482	Este trabajo
Enzima	Colorimétrico	Cámara teléfono celular	Incubación a 37 °C	0,18	0,28 – 5,70	<a href="#">Sankar et al. (2020)</a>
Aptámero	Colorimétrico	Espectrofotómetro	Equipamiento de laboratorio	0,02	0,06 – 0,86	<a href="#">Soongsong et al. (2021)</a>
Aptámero	Fluorescencia	Cámara teléfono celular	Adaptador externo	0,002	0,002 – 28	<a href="#">Cheng et al. (2018)</a>

*Nota:* Los trabajos se ordenaron según valores decrecientes del LOD informado.

de muestreo. Estas características son de particular interés para el monitoreo ambiental, que pretende la obtención de datos actualizados y en grandes áreas de expansión para conocer el estado de la contaminación de manera dinámica (Meredith et al., 2016).

### 1.4.5. Análisis de especificidad e interferencias

En principio, la capacidad de la plataforma propuesta para detectar selectivamente moléculas de CPS está garantizada por la afinidad específica del aptámero diseñado (Figura 1.2). Sin embargo, moléculas de compuestos similares podrían desencadenar la desestabilización coloidal de las AuNPs, o incluso modificar los patrones obtenidos por diversos mecanismos alternativos, dando lugar a resultados falsos positivos. La especificidad del ensayo se evaluó comparando el  $IR$  de soluciones acuosas de compuestos empleados habitualmente como plaguicidas: DCV, FTT, 2,4-D, PMM, GFS y CBR. En todos los casos, se utilizó la concentración de máxima solubilidad en agua. En el caso del CPS, se utilizó  $85\ \mu\text{M}$ . El resultado de los ensayos se muestra en la Figura 1.7, donde es evidente que ninguno de estos compuestos altera significativamente el efecto CR ( $IR$  es aproximadamente uno).

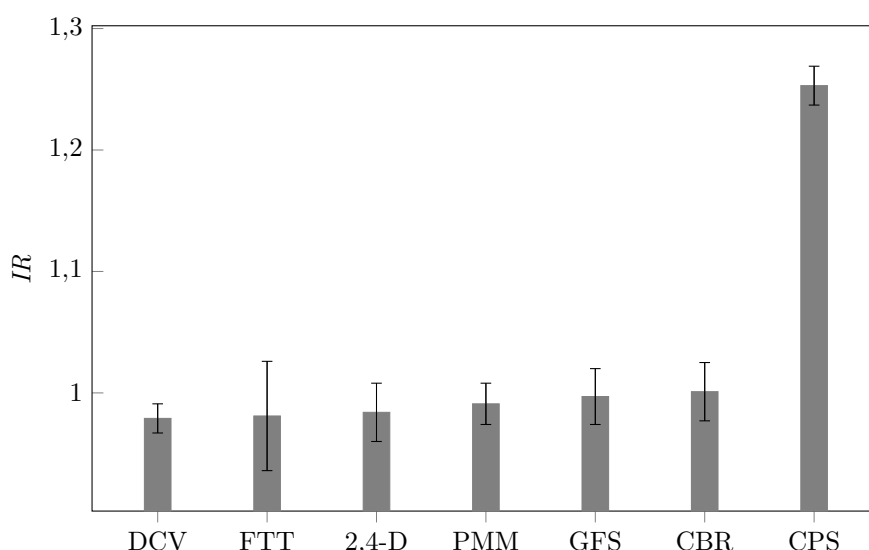


Figura 1.7: Valores de  $IR$  obtenidos con otros plaguicidas potencialmente presentes en muestras reales. Las interferencias se evalúan en la concentración de máxima solubilidad y se comparan con el CPS a  $85\ \mu\text{M}$ .

Además, se evaluaron posibles interferencias por la presencia de otros compuestos. Para ello, se analizaron mezclas binarias que contenían  $48\ \mu\text{M}$  de CPS más otro compuesto en su concentración de máxima solubilidad en agua. Los resultados de este estudio se presentan en la Tabla 1.2. No se observó ningún efecto de interferencia del 2,4-D. La concentración de CPS se sobrestimó en presencia de GFS y se subestimó en presencia de FTT. No obstante, la recuperación se situó siempre dentro del  $\pm 25\%$  de la cantidad esperada de CPS. Además, se debe tener en cuenta que los plaguicidas acompañantes se ensayaron en su máxima concentración posible. Por lo tanto, podemos afirmar que el biosensado implementado en las *CR Code Cards* es capaz de discriminar el CPS, y que los efectos de interferencia de otros plaguicidas (potencialmente presentes) son aceptables.

Tabla 1.2: Resultados del estudio de interferencias.

Composición de la mezcla	CPS agregado ( $\mu\text{M}$ )	CPS medido ( $\mu\text{M}$ ) <sup>a</sup>	Recuperación (%)
CPS + 2,4-D	48	$50 \pm 8$	105
CPS + GFS	48	$60 \pm 9$	125
CPS + FTT	48	$38 \pm 12$	82

<sup>a</sup> Valor  $\pm$  desvío estándar (DE), n=4.

### 1.4.6. Desempeño del biosensor en diferentes condiciones de operación

La Tabla 1.3 muestra la respuesta de los controles C1 y C2 bajo diferentes combinaciones de  $T$  y  $HR$ . Los patrones resultantes presentaron variaciones relativamente pequeñas, como indica la desviación estándar del  $IR$ , que fue de 5,6 % y 3,8 %, para C1 y C2, respectivamente. Se puede concluir que la respuesta del dispositivo se mantiene en un rango de condiciones ambientales que coincide con la mayoría de los escenarios encontrados fuera del laboratorio, en condiciones climáticas no extremas.

Tabla 1.3:  $IR$  de los controles evaluados en diferentes condiciones ambientales.

$T$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	$HR$ (%)	$IR$ C1 <sup>a</sup>	$IR$ C2 <sup>a</sup>	Tiempo de evaporación (min)
18	34	$1,29 \pm 0,01$	$0,97 \pm 0,03$	125
18	61	$1,16 \pm 0,01$	$0,98 \pm 0,01$	170
24	33	$1,25 \pm 0,08$	$0,92 \pm 0,01$	85
24	60	$1,14 \pm 0,02$	$0,94 \pm 0,02$	190
30	27	$1,15 \pm 0,02$	$0,93 \pm 0,03$	80
30	57	$1,26 \pm 0,01$	$0,95 \pm 0,07$	110
RSD		5,6 %	3,8 %	

<sup>a</sup> Valor  $\pm$  DE, n=2.

Además, se investigó la influencia del pH de la muestra. Se sabe que la agregación de las AuNPs se ve afectada en condiciones ácidas; sin embargo, existe un amplio rango de pHs (de 6 a 10, aproximadamente) en el que el potencial zeta de las AuNPs no cambia apreciablemente y, por tanto, el efecto pH sobre la agregación es despreciable, incluso en presencia de moléculas de ADN simple hebra (Sun et al., 2009). Para verificar que el biosensor no es afectado por el pH de las muestras, se evaluaron las respuestas de los controles en el rango de pH 6-8. Tal como se observa en la Tabla 1.4, los patrones dejados por las gotas no se alteraron significativamente ante las variaciones de pH. Para ambos controles, la variación de los valores de  $IR$  fue inferior al 4 %. Se determinó el pH 6 como límite inferior de trabajo debido a que la agregación de AuNPs puede aumentar significativamente a pHs inferiores, aun en presencia de cadenas simples de ADN (Park et al., 2019). El valor del rango superior (pH 8) es arbitrario, pero razonable para muestras de agua en escenarios ambientales. Hay otro aspecto relevante que debe mencionarse en relación con el pH de la muestra: su efecto potencial se atenúa en la práctica, ya que

sólo se añaden 30  $\mu\text{l}$  de la muestra a un volumen total de 160  $\mu\text{l}$ ; es decir, se produce una dilución 1/5 durante el procedimiento de análisis.

Tabla 1.4: *IR* de los controles evaluados a diferentes condiciones de pH de la muestra.

pH	IR C1 <sup>a</sup>	IR C2 <sup>a</sup>
6.11	1,22 $\pm$ 0,01	0,96 $\pm$ 0,01
6.52	1,23 $\pm$ 0,01	0,98 $\pm$ 0,06
7.06	1,24 $\pm$ 0,02	0,93 $\pm$ 0,01
7.62	1,22 $\pm$ 0,01	0,92 $\pm$ 0,02
8.12	1,21 $\pm$ 0,02	0,92 $\pm$ 0,01
RSD	1,4 %	3,9 %

<sup>a</sup> Valor  $\pm$  DE, n=4.

Por otra parte, se analizó la influencia de las condiciones de iluminación en la detección de los patrones formados en los sitios de detección. Cabe destacar que la robustez del sistema de lectura propuesto se basa en el análisis de patrones; es decir, el algoritmo tiene en cuenta la configuración espacial del patrón, por lo que se espera que las diferentes intensidades de luz ambiente no afecten el resultado, siempre que la tarjeta esté sometida a una iluminación uniforme. En la Tabla 1.5 se muestran los resultados de los controles bajo diferentes condiciones de iluminación. Las variaciones en relación

Tabla 1.5: *IR* de los controles bajo diferentes condiciones de iluminación.

n	Condición	C1		C2	
		<i>IR</i> <sup>a</sup>	Var. %	<i>IR</i> <sup>a</sup>	Var. %
0	Laboratorio	1,21 $\pm$ 0,04	—	0,95 $\pm$ 0,03	—
1	Luz solar directa c/flash	1,28 $\pm$ 0,03	3	0,92 $\pm$ 0,06	6
2	Luz solar directa s/flash	1,32 $\pm$ 0,06	6	0,91 $\pm$ 0,05	5
3	Luz solar indirecta c/flash	1,24 $\pm$ 0,03	3	0,94 $\pm$ 0,05	5
4	Luz solar indirecta s/flash	1,36 $\pm$ 0,05	5	0,91 $\pm$ 0,06	5
5	Luz solar indirecta c/flash, inclinado 20°	1,25 $\pm$ 0,04	4	0,94 $\pm$ 0,04	4
6	Luz solar indirecta s/flash, inclinado 20°	1,35 $\pm$ 0,01	10	0,92 $\pm$ 0,06	6

<sup>a</sup> Valor  $\pm$  DE, n=4.

*Nota:* La Var. % se calculó tomando como referencia los valores obtenidos en la condición de Laboratorio.

a los valores de *IR* obtenidos de la misma tarjeta dentro del laboratorio son pequeñas. Estos resultados confirman la robustez que aporta el uso de intensidades relativas como referencia para determinar variaciones en la concentración del analito. Como se ha mencionado anteriormente, el único requisito es que la iluminación sea homogénea en toda la superficie de la tarjeta. Para garantizar la reproducibilidad del ensayo, deben evitarse las sombras con irregularidades durante la obtención de imágenes, teniendo en cuenta que el flash LED incorporado en los teléfonos podría ser insuficiente para compensar la luz

externa no homogénea sobre los sitios de detección. Finalmente, el algoritmo de análisis de imágenes aplica una condición adicional antes de informar el resultado: la diferencia entre los valores de  $IR$  de los sitios Sa y Sb (duplicados de la muestra) no debe superar el 15 % para que el ensayo se considere válido.

Por último, se estudió la estabilidad a lo largo del tiempo del patrón formado en los sitios de detección, tomando fotos de las tarjetas a distintos tiempos a partir del secado completo de la gota. Los valores de  $IR$  se muestran en la Tabla 1.6. Se obtuvieron variaciones menores al 5 % en todos los casos, lo que demuestra la estabilidad de la lectura hasta 72 h. Esto significa que el operador no debe estar pendiente del secado de la gota para tomar inmediatamente la foto y que el tiempo extra que pase desde el secado completo no modificará los resultados.

Tabla 1.6: Variación del  $IR$  de los controles en función del tiempo luego del secado completo.

Control	Tiempo desde secado completo (h) <sup>a</sup>				RSD promedio <sup>b</sup>
	0	24	48	72	
C1	1,21 ± 0,07	1,20 ± 0,05	1,21 ± 0,05	1,19 ± 0,05	1,6 %
C2	0,95 ± 0,04	0,94 ± 0,03	0,94 ± 0,04	0,94 ± 0,04	0,8 %

<sup>a</sup> Valor ± DE, n=12.

<sup>b</sup> RSD promedio de los datos en función del tiempo para los 12 sitios de análisis.

#### 1.4.7. Detección de CPS en muestras de agua de río

La capacidad del biosensor para detectar el analito en muestras reales se evaluó empleando agua obtenida de la Laguna Setúbal. En primer lugar, se comprobó que los resultados de los controles C1 y C2 fueran similares a los obtenidos con agua ultrapura (datos no mostrados), lo que indica que el desarrollo del color y la formación del patrón no son afectados por la matriz del agua del río. En segundo lugar, se analizaron las muestras de agua de río filtradas a las cuales se les adicionó cantidades conocidas de CPS. Las concentraciones calculadas con la curva de calibración (Figura 1.6c) y los correspondientes porcentajes de recuperación se indican en Tabla 1.7. A modo de referencia, se incluyen en la tabla los resultados obtenidos por la técnica de referencia de UHPLC.

Tabla 1.7: Resultados de las determinaciones de CPS en agua de río.

CPS agregado (µM)	CPS detectado (µM) <sup>a</sup>		Recuperación (%)	
	Biosensor	UHPLC	Biosensor	UHPLC
0	No detectado	No detectado	-	-
47	46 ± 2	54 ± 4	98	115
117	130 ± 10	105 ± 8	112	89
234	226 ± 8	294 ± 19	96	126

<sup>a</sup> Valor ± DE, n=4.



La plataforma de detección fue capaz de detectar y cuantificar CPS en un amplio rango de concentraciones, con recuperaciones comparables a las de la técnica cromatográfica estándar. Este resultado refuerza la aplicabilidad potencial del sensor desarrollado para el monitoreo ambiental en los sitios de interés.

## 1.5. Conclusiones

En este capítulo se presentó un biosensor para la detección de CPS basado en la utilización de aptámeros y en la desestabilización coloidal de AuNPs. Se describió cómo la supresión del efecto CR puede utilizarse para una determinación cuantitativa y se diseñó una estrategia innovadora de detección que consiste en el análisis del patrón formado por una gota evaporada sobre un sustrato poroso. Se fabricó una tarjeta de papel de filtro con sitios de detección para colocar la solución a analizar y se utilizó la interpretación automática de imágenes tomadas con un teléfono celular.

En comparación con los métodos convencionales, la plataforma propuesta no requiere de equipamiento de laboratorio ni de personal altamente calificado, por lo cual puede emplearse directamente en los sitios de muestro. La muestra no debe transportarse hasta un sitio especializado, y el tiempo desde la toma de muestras hasta la obtención del resultado es menor a 3 h. Además, los costos también son considerablemente menores a los de un análisis convencional, por lo que resulta factible la obtención de una gran cantidad de datos distribuidos espacialmente para monitorear la contaminación ambiental.

Las ventajas del sistema de lectura, en relación a otros sistemas de detección portátiles que detectan cambio de color, es que la captura y el análisis automatizado del patrón no requiere condiciones especiales de iluminación ni el empleo de accesorios externos al teléfono celular. Cabe destacar que el programa *CR Code Analysis* realiza la alineación automática de las fotos, la identificación precisa de los sitios de detección y el análisis de alta precisión de los patrones de las gotas. Además, como el algoritmo tiene en cuenta la configuración espacial de dichos patrones, el sistema de lectura es independiente de la iluminación ambiente.

La síntesis de los reactivos es sencilla, las AuNPs no requieren de procesos de funcionalización y los aptámeros no deben ser modificados, lo que hace factible el desarrollo comercial de un kit de reactivos. Además, las tarjetas de papel impresas con cera son desechables, económicas y fáciles de fabricar. La combinación de estas características con las capacidades de los teléfonos inteligentes da como resultado un ensayo sencillo, factible de ser realizado por personal no entrenado. Por otra parte, el acople a la telefonía móvil no sólo proporciona resultados rápidos, sino que también permite la gestión de datos y la trazabilidad, que son atributos muy deseables para el seguimiento de contaminantes y sustancias peligrosas en el ambiente.

En un contexto más amplio, se puede concluir que los hallazgos aquí presentados son prometedores en dos direcciones principales: (i) desde el punto de vista fundamental, ya que la relación entre la desestabilización de coloides y los patrones de gotas evaporadas obtenidos sobre papel abre muchas posibilidades para la investigación, teniendo en cuenta las capacidades disponibles hoy en día para el análisis de imágenes y el manejo de datos, y (ii) desde el punto de vista tecnológico, ya que la combinación de la especificidad de los aptámeros con el análisis automatizado de patrones puede resultar aplicable, además del monitoreo ambiental, al diagnóstico médico y a determinaciones de analitos en diferentes matrices.

# Capítulo 2

## *Plant-chip*

### 2.1. Introducción

En este capítulo se describe el desarrollo del dispositivo *Plant-chip* que permite medir la elongación radicular en un bioensayo de germinación. Se evalúan muestras líquidas de diversos tipos y se realiza la validación del ensayo de acuerdo a las normas que lo rigen. Además, se realiza la toma y procesamiento de los datos mediante un teléfono celular empleando las herramientas provistas por la aplicación *appuente*. Los resultados del presente capítulo fueron publicados en los artículos: [Macagno et al. \(2019\)](#) y [Schaumburg et al. \(2022\)](#).

#### 2.1.1. Ensayos de fitotoxicidad en plantas

La presencia de compuestos contaminantes puede ser detectada por los cambios que causan en organismos vivos mediante la realización de bioensayos ([Zucconi et al., 1985](#); [Bagur-González et al., 2011](#); [Park et al., 2016](#)). Los ensayos de fitotoxicidad en plantas son un tipo de bioensayo de uso frecuente en el campo de la ecotoxicología desde la década del '70 ([Wang and Keturi, 1990](#); [Gopalan, 1999](#); [Lyu et al., 2018](#)). Hoy en día, su utilización sigue creciendo, pues han mostrado ser valiosos indicadores para realizar ensayos de monitoreo ambiental, para el control de tratamientos de remediación y de procesos de descontaminación, y para la evaluación de la toxicidad de compuestos puros solubles, mezclas complejas y aguas (superficiales, subterráneas, domésticas, industriales, lixiviados de suelos) ([Wang and Keturi, 1990](#); [Lyu et al., 2018](#); [Mtisi and Gwenzi, 2019](#)). La planta de lechuga, *Lactuca sativa*, es un organismo modelo que ha sido recomendado en normas nacionales e internacionales ([ISO, 2012](#); [US EPA, 1996](#); [OECD, 2003](#); [IRAM, 2008](#)) para la realización de los ensayos de fitotoxicidad por su alta sensibilidad ante la presencia de contaminantes. El bioensayo con semillas de *L. sativa* es una prueba estática de toxicidad aguda de 120 h de exposición, en condiciones de oscuridad, con temperatura y humedad controladas. Las semillas se colocan sobre un papel de germinación embebido con la muestra a analizar. En estas pruebas, cada condición evaluada debe contar con una cantidad de entre 80 y 100 semillas para tener significancia. Además, se deben realizar dos controles de toxicidad, positivo y negativo. Este último debe cumplir con un índice de germinación de, al menos, el 90%. En las pruebas, se pueden evaluar los efectos fitotóxicos de muestras líquidas en el proceso de germinación de las semillas. Los parámetros toxicológicos propuestos por [Zucconi et al. \(1985\)](#) y [Bagur-González et al. \(2011\)](#) permiten ponderar el efecto tóxico de los compuestos evaluados y se calculan a

partir de la germinación de la semilla y la longitud de la radícula.

Como se ha mencionado, la comunidad científica ha validado los ensayos de fitotoxicidad con semillas de lechuga por ser confiables, simples y económicos. El método convencional de realización emplea placas de Petri en las que se colocan las semillas sobre un papel de germinación embebido con la muestra líquida a evaluar. Las semillas comparten el mismo espacio para la elongación radicular, por lo que resulta común que las raíces crezcan unas sobre otras, entrelazadas y mezcladas entre sí. Esto requiere que, al finalizar el ensayo, sean necesarias las etapas de extracción cuidadosa, ordenamiento, alineación y medición de las plántulas. Es importante señalar que esta desventaja funcional tienen un alto costo operativo, es decir, los ensayos son sumamente demandantes: requieren mucho tiempo, son exigentes para el operador que, además, debe estar entrenado, y son propensos a la falta de reproducibilidad (Grossmann et al., 2011; Nezhad, 2014; Park et al., 2017; Clark et al., 2020; Zhu et al., 2022). Otro aspecto importante a considerar sobre la técnica tradicional es que los ensayos son a tiempo final, es decir, no se puede obtener información durante el proceso de crecimiento porque los datos se toman una vez cumplido el tiempo de germinación.

### 2.1.2. Diseño de dispositivos

El diseño del dispositivo *Plant-chip* evita los inconvenientes de la técnica convencional y propone la realización de los bioensayos toxicológicos en una plataforma novedosa, inspirada en un campo emergente de la microfluídica: *Soil-on-a-chip* (Stanley et al., 2016). La tecnología permite realizar un ajuste preciso de los microambientes necesarios para el análisis de procesos fisiológicos de organismos completos, órganos o células. Más aún, el control espacio-temporal junto a la toma de imágenes de alta resolución ofrece un potencial sin precedentes para el estudio de los eventos biológicos que ocurren en los seres vivos, desde plantas hasta microorganismos, analizados como organismos completos o a nivel celular, como así también de las interacciones entre diferentes reinos y con el ambiente (Sicard et al., 2015; Stanley et al., 2016; Clark et al., 2020). En los últimos años, se ha hecho uso de las técnicas de microfabricación para desarrollar dispositivos aptos para bioensayos. Particularmente, se han presentado plataformas que permiten el estudio de las raíces de plantas de interés en investigación científica (Grossmann et al., 2011; Nezhad, 2014; Park et al., 2017). La raíz es el órgano que funciona como interfase entre la planta y el suelo, se encarga de proporcionar agua y nutrientes minerales al resto del organismo, es capaz de responder a los cambios en las condiciones ambientales, como disponibilidad de agua, concentración de nutrientes, pH y salinidad. Las raíces son particularmente sensibles a daños, modificaciones y alteraciones de las características del medio circundante (Grossmann et al., 2011).

*Plant-chip* fue diseñado específicamente para realizar ensayos de fitotoxicidad con semillas de *L. sativa* y propone reemplazar la técnica convencional que se realiza germinando 20 semillas en una placa de Petri. El dispositivo contiene 20 mili-canales individuales que permiten el crecimiento radicular y la medición directa con una regla o mediante la captura de una imagen. Los materiales transparentes utilizados para su fabricación permiten la observación directa y la toma de datos sin necesidad de plataformas sofisticadas. Más aún, las lecturas pueden realizarse sin interrumpir el ensayo en curso, lo que permite la información continua del evento biológico y la obtención de información cuantitativa muy valiosa.

La validación del dispositivo para los bioensayos y el aprovechamiento de las ventajas

adicionales que provee el uso de la plataforma se realizó en dos etapas. En la primera, se estudió el cumplimiento de las condiciones que establecen las normas que rigen el ensayo. Para ello, se realizaron los controles de toxicidad. Luego, se evaluaron diferentes concentraciones del herbicidas GFS y muestras reales de un efluentes sometido a un tratamiento de descontaminación. Los ensayos se realizaron en paralelo en los dos sistemas: TC corresponde a la técnica convencional que emplea placas de Petri y se lo consideró como el método de referencia; y PC a la alternativa propuesta con el dispositivo *Plant-chip*, que disminuye el costo operativo y facilita la obtención de datos. Con los resultados obtenidos, se calcularon los indicadores toxicológicos correspondientes. Para éstos ensayos, se utilizaron los prototipos 1 y 2 (ver Figura 2.1), fabricados empleando tres láminas de polimetil metacrilato (PMMA) un polímero termoplástico que presenta excelentes características ópticas, compatible con los sistemas biológicos (Hou et al., 2017) y con una resistencia mecánica adecuada para ser micromaquinado por ablación láser.

Una vez verificado el correcto funcionamiento del dispositivo, se diseñó un nuevo prototipo, el prototipo 3 ilustrado en la Figura 2.2, que se integró a la plataforma *appuente*, lo cual permite la toma de datos mediante una aplicación en un teléfono celular y el posterior procesamiento automatizado. Se realizaron ensayos del control negativo de toxicidad y se tomaron datos en función del tiempo.

## 2.2. Objetivos

El objetivo es el desarrollo de un dispositivo para la realización de un bioensayo que emplea semillas de *L. sativa* y su validación para la determinación de indicadores toxicológicos de contaminación. Además, se pretende la obtención de una plataforma que permita la lectura directa y el análisis sistemático de la elongación radicular mediante el acople a la toma y procesamiento de datos con una aplicación específica, práctica y fácil de usar.

## 2.3. Materiales y métodos

### 2.3.1. Materiales

Las semillas de *L. sativa* fueron provistas por el programa Pro-Huerta del INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Argentina) y por FeCoAgro (Federación de Cooperativas Argentinas, Argentina). Se almacenaron en oscuridad a 4°C hasta su uso. Los ensayos convencionales se realizaron en placas de Petri descartables. Para todos los ensayos se utilizó el papel de germinación 0859 (Munktell®, Suiza). Se utilizó la formulación comercial de GFS Credit® (Nufarm S.A., Argentina). Todas las diluciones y los controles negativos de toxicidad se realizaron con agua MilliQ.

Las láminas de PMMA de diferentes espesores fueron adquiridas en Acrimev (Santa Fe, Argentina) y cortadas con un láser de  $CO_2$  de la plataforma PLS (Scottsdale, Estados Unidos).

### 2.3.2. Fabricación y armado de los dispositivos

Todos los prototipos están compuestos por tres capas rectangulares. Las capas inferior y superior están fabricadas en PMMA de 4 mm de espesor. La capa superior posee una

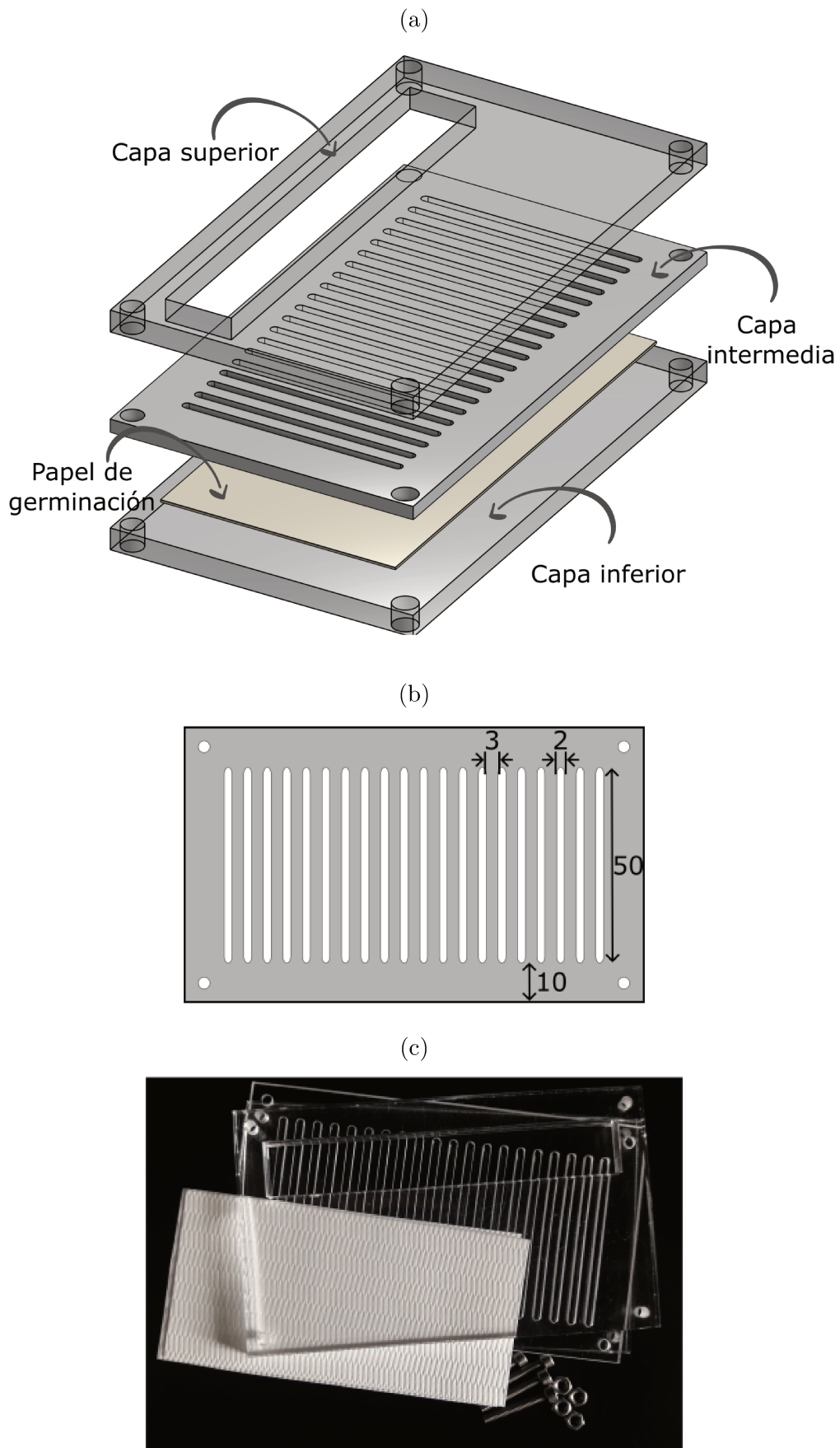


Figura 2.1: Prototipo 1. (a) Vista expandida del sistema multicapa. (b) Detalles de la capa intermedia con las 20 ranuras, las dimensiones están en mm. (c) Imagen de los componentes del dispositivo sin ensamblar.

ventana rectangular que abarca todos los canales y posee un ancho de 15 mm, tal como se observa en la Figura 2.1.a. Esta ventana, permite la colocación de las semillas y el crecimiento de la parte aérea de la plántula. La capa intermedia posee 20 rendijas de 2 mm de ancho. Entre la capa inferior y la intermedia se coloca una lámina de papel de germinación que abarca completamente los canales y que, posteriormente, se embeberá con la solución a evaluar. Las capas se ensamblan entre sí mediante tornillos de acero inoxidable que se colocan en los 4 extremos. De esta manera, las capas inferior y superior actúan como paredes y definen los canales. Una vez ensamblado el dispositivo, se utiliza la ventana para agregar la muestra a analizar y para sembrar las semillas. Todos los dispositivos son reutilizables, la lámina de papel es la única parte del dispositivo que debe reemplazarse para volver a realizar un ensayo.

En los prototipos 1 y 2 la capa intermedia está fabricada con PMMA de 2 mm. Difieren entre sí en la longitud de los canales, los cuales son de 50 y 80 mm, respectivamente. Las dimensiones del prototipo 1 son 70 x 117 mm y las del 2, 100 x 117 mm. En la Figura 2.1 se muestra en detalle el prototipo 1. Se debe notar que la disposición de las capas es idéntica para todos los dispositivos.

En el prototipo 3 (Figura 2.2), las dimensiones de las capas inferior y superior son idénticas al prototipo 2 y la capa intermedia fue fabricada con una impresora 3D empleando como sustrato ácido poliláctico (PLA) color negro. Se utilizó vinilo autoadhesivo blanco para realizar 3 marcas de alineación y papel de oficina blanco para imprimir el código de identificación del ensayo. Estas incorporaciones se detallan en la Sección 2.3.6.

### 2.3.3. Preparación de los bioensayos

Los ensayos se realizaron siguiendo las indicaciones de la norma [US EPA \(1996\)](#). Las soluciones líquidas a evaluar se agregaron a razón de 0,5  $\mu\text{l}/\text{mm}^2$  de papel de germinación. Para TC, se recortaron discos de papel de filtro de 90 mm de diámetro; para PC, se prepararon rectángulos de 100 x 50 mm para el prototipo 1 y de 100 x 80 mm para los prototipos 2 y 3.

Se seleccionaron semillas de idéntica apariencia, color y tamaño que se colocaron empleando una pinza de acero inoxidable. Para TC, las semillas se distribuyeron de manera equidistante sobre el disco de papel. Para PC, se colocó una semilla por canal.

Los dispositivos y las placas de Petri se incubaron durante 120 h en condiciones controladas de temperatura,  $24 \pm 2^\circ\text{C}$ . Los dispositivos se colocaron en una estufa en posición horizontal, dentro de una cámara húmeda (recipiente cerrado con agua en la base) lo que permitió mantener constantes las condiciones de humedad. Todos las muestras y condiciones ensayadas se realizaron por cuadruplicado ( $n= 80$ ).

### 2.3.4. Ensayos de validación del dispositivo

Los controles positivos y negativos de toxicidad se realizaron con una solución de sulfato de zinc ( $\text{ZnSO}_4$ ) 1000 mg/l y con agua ultrapura, respectivamente. Se prepararon 6 diluciones seriadas de GFS en las concentraciones desde 0,01 hasta 1000 mg/l. Por otra parte, se emplearon muestras provenientes del tratamiento de un efluente real de una planta productora de agroquímicos. Todos los ensayos se realizan en paralelo en los dos sistemas: TC y PC.

El efluente inicialmente contenía prometrina, imidacloprid, GFS, atrazina, ácido aminometilfosfónico (AMPA) y carbendazim en altas concentraciones. Sobre este efluente,

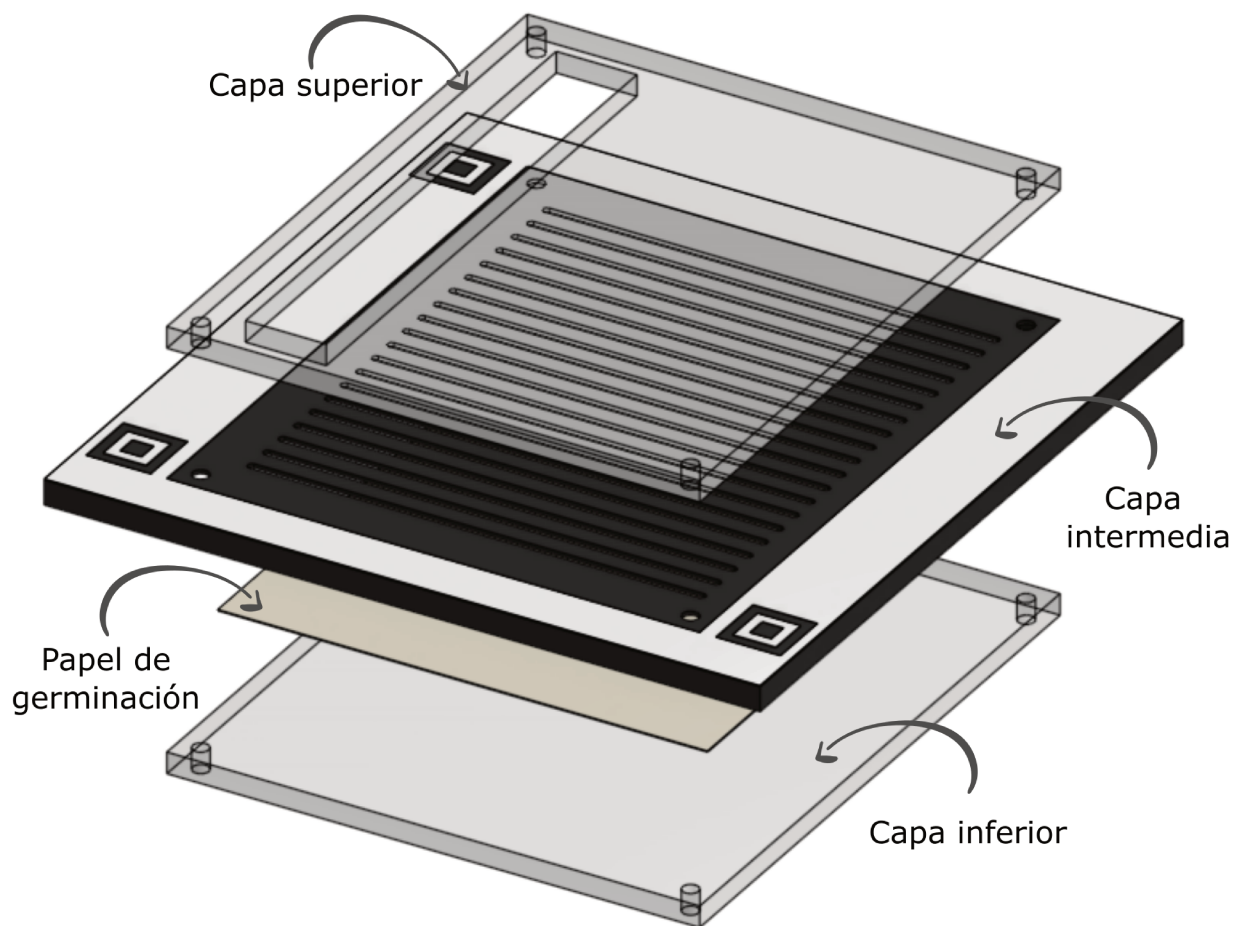


Figura 2.2: Vista expandida del prototipo 3.

se aplicó un proceso de oxidación avanzada (POA) con radiación UV y  $H_2O_2$  como tratamiento de descontaminación. El pH inicial fue de 5,7 y la concentración empleada de  $H_2O_2$  empleada fue de 520 mg/l. El periodo de tratamiento fue de 8 h y se tomaron muestras desde el tiempo inicial cada 2 h.

Una vez finalizado el período de incubación del ensayo de germinación, se procedió a la toma de datos. En el caso de TC, se tomaron con una pinza cada una de las semillas germinadas y se las colocó sobre una mesada limpia. Luego, se colocó sobre ellas una tapa transparente de acrílico con el objetivo de que las raíces queden planas sobre la mesada. Finalmente, se colocó una regla a modo de referencia y se tomó una foto. Para PC, se colocó el dispositivo sobre un panel LED de 12 W. En ambos casos, las fotos fueron tomadas con la cámara de un teléfono celular y posteriormente analizadas con el programa ImageJ<sup>®</sup> (National Institute of Health, Estados Unidos). Los datos extraídos fueron: la cantidad de semillas germinadas, determinada por la presencia o ausencia de raíz; y la longitud de la raíz, para lo cual se empleó como referencia la regla para TC y el largo del canal para PC, y se tomó la medida utilizando la herramienta *straight line* o *segmented line* de ImageJ<sup>®</sup>. El tratamiento estadístico de los datos obtenidos se realizó mediante el test de análisis de la varianza (ANOVA), seguido por una prueba de Duncan con un nivel de significancia del 95 %. Se evaluó la respuesta y se utilizó el factor “sistema” para comparar las mediciones entre TC y PC, y un factor adicional particular de cada ensayo. Dichos factores fueron: “concentración” para las evaluaciones de GFS, “muestra” para el

seguimiento del tratamiento del efluente, y “tiempo” para las mediciones con *appuente* (ver sección 2.3.6).

### 2.3.5. Cálculo de indicadores toxicológicos

El índice de elongación radicular (IER), se calculó como:

$$IER = \frac{ER - ERc}{ERc}$$

donde  $ER$  es el promedio de la elongación radicular obtenida para cada muestra y  $ERc$  es el promedio del control negativo de toxicidad. El valor de IER varía de  $-1$  a  $1$  y representa estadísticamente el alargamiento residual normalizado de la raíz de las semillas germinadas. De acuerdo con Bagur-González et al. (2011), la obtención de un  $IER < 0$  indica que las muestras sufren toxicidad, es decir, que hay inhibición de la elongación radicular. La toxicidad se clasifica de acuerdo al valor obtenido en la siguiente escala:

- de  $-0,25$  a  $0$ : toxicidad baja.
- de  $-0,50$  a  $-0,25$ : toxicidad media.
- de  $-0,75$  a  $-0,50$ : toxicidad alta.
- de  $-1,00$  a  $-0,75$ : toxicidad muy alta.

Por otro lado, los valores de IER mayores a  $0$  indican una estimulación del crecimiento. El índice de germinación (IG), se calculó de la siguiente manera:

$$IG(\%) = \frac{N \cdot ER}{Nc \cdot ERc} 100$$

donde  $N$  es el número efectivo de raíces germinadas para cada muestra y  $Nc$  el número de raíces germinadas empleando el control negativo de toxicidad. IG se utilizó para evaluar la variación en la respuesta ante las diferentes diluciones de GFS y las muestras tomadas durante el tratamiento del efluente. En trabajos previos (Zucconi et al., 1985; Ortega et al., 2000), se determinó el valor límite de IG a partir del cual una muestra deja de considerarse fitotóxica y resultó ser del  $60\%$ . Es decir, se considerará que hay fitotoxicidad si el IG no alcanza a superar dicho valor. En todos los gráficos de IG se mostrará una línea roja horizontal para  $IG = 60\%$  que permitirá identificar fácilmente el valor de corte.

Un aspecto relevante en toxicología es la relación entre la concentración de una sustancia tóxica en contacto con un organismo (plantas, animales, microorganismos, seres humanos) y los efectos nocivos que produce. Es por eso que se utiliza la curva que establece la relación dosis-respuesta para evaluar el riesgo que provocan las sustancias químicas en el ambiente. El objetivo de la obtención de esa curva es determinar la concentración efectiva media (CE50). La CE50 corresponde a la concentración necesaria de un compuesto para producir una alteración del  $50\%$  en una característica medible, respecto a un control negativo. Esta determinación suele ser el primer experimento que se realiza en un análisis toxicológico. Para el bioensayo propuesto, se construyó una curva dosis-respuesta de la  $ER$  en función de la concentración de GFS. Se realizó la curva de regresión que resulta adecuada para el comportamiento y se compararon los parámetros obtenidos con los dos sistemas.



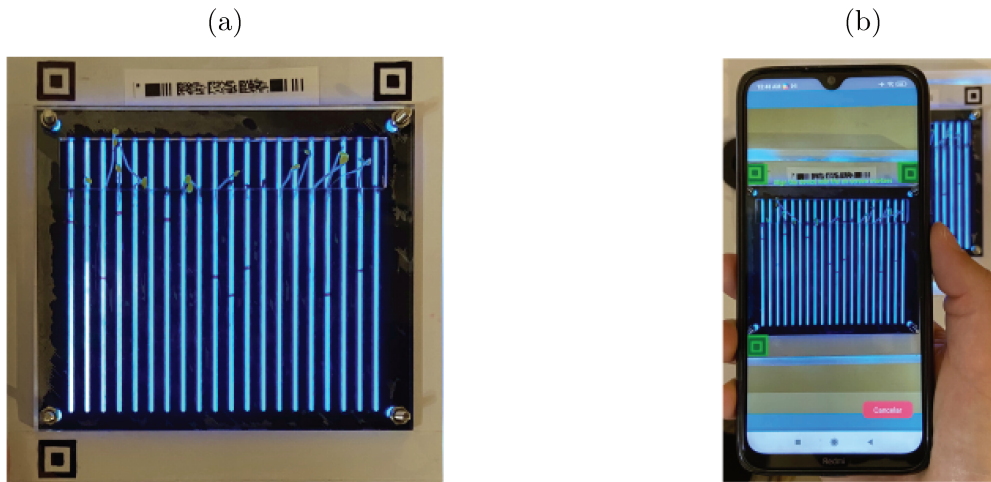


Figura 2.3: Prototipo 3. (a) Ensayo en curso con marcas rojas sobre los canales. (b) Toma automática de la imagen mediante *appuente*.

### 2.3.6. Integración a *appuente*

En nuestro grupo de investigación se realizan esfuerzos para desarrollar tecnologías de sensado acopladas a la telefonía móvil que pueden ser usadas directamente en los sitios de muestreo. Recientemente se desarrolló la plataforma *appuente*, que provee las herramientas necesarias para realizar la toma y procesamiento de datos de dispositivos de análisis mediante un teléfono celular. La integración entre *Plant-chip* y *appuente* se propone para mejorar y simplificar aún más el proceso de medición. Además, el sistema permite la obtención de datos en función del tiempo para conocer el proceso de elongación radicular. Para la integración, se diseñó el prototipo 3 (Figura 2.2), en el cual la capa intermedia se fabricó con PLA (Sección 2.3.2) de color negro con el fin de aumentar el contraste y mejorar la identificación automática y el posterior análisis de datos a partir de imágenes.

Se utilizó la plataforma *appuente* para desarrollar la aplicación móvil y el algoritmo de procesamiento de las imágenes. Además, se establecieron los datos generales y la geometría del chip y se generó tanto el código de identificación que se colocó sobre el dispositivo como el posicionamiento de las marcas de alineación.

La aplicación móvil guía al usuario tanto en la preparación del ensayo como en la toma de la imagen. En primer lugar, le solicita que escanee el código de identificación y que, a continuación, dibuje una marca sobre cada canal en la posición final de cada raíz empleando un marcador de color rojo. El resultado de este paso se muestra en la Figura 2.3a. Luego, se abre la cámara y se observa en la pantalla la ubicación de las tres marcas de alineación, como se observa en la Figura 2.3b. Cuando el usuario las alinea con las del dispositivo, la aplicación captura la foto automáticamente.

Por otra parte, se creó y validó el algoritmo de procesamiento *plantchip.m* en una versión de escritorio de GNU Octave. El algoritmo comienza identificando las ubicaciones de cada uno de los 20 canales del dispositivo, tras lo cual busca la posición relativa de la marca roja (o la ausencia de ella) en cada canal para obtener las longitudes de raíz correspondientes. Se eligió el color rojo porque contrasta con el fondo de color celeste y porque no es esperable encontrarlo en las raíces que se están analizando. Finalmente, la

aplicación muestra un informe que indica la longitud media determinada y la desviación estándar de los 20 canales analizados.

Para validar el funcionamiento de la plataforma *appuente*, se hicieron ensayos empleando los dispositivos *Plant-chip* en las mismas condiciones que las descritas en la Sección 2.3.4. Se realizaron ensayos de control negativo de toxicidad por cuadruplicado ( $n=80$ ) y se tomaron datos empleando la aplicación cada 8 h para monitorear el crecimiento. La iluminación se consiguió utilizando un panel LED de 12 W como luz de fondo, atenuada con una fina lámina de cartulina celeste. La plataforma *appuente* determinó las longitudes de las raíces y se compararon con las mediciones realizadas manualmente con el programa ImageJ<sup>®</sup> empleando las mismas imágenes. En todos los casos, se eliminaron del análisis los canales sin crecimiento detectable, menor a 5 mm, o con crecimiento incoherente.

## 2.4. Resultados y discusión

### 2.4.1. Funcionamiento del dispositivo

En primer lugar, es relevante señalar el resultado global: el dispositivo *Plant-chip* propuesto permitió la germinación de las semillas y la observación directa del crecimiento radicular, lo que significa que tanto el diseño como los materiales fueron adecuados para el bioensayo.

La toma de datos de los ensayos realizados en la placa de Petri requiere la extracción, ordenamiento y alineación de las raíces. En contraste, en el dispositivo *Plant-chip* las raíces crecen alineadas en los canales, donde se puede realizar la inspección óptica, ya sea a simple vista o tras la captura de imágenes, lo cual simplifica enormemente la obtención de los resultados, disminuyendo así tanto el tiempo de evaluación como las posibles fallas experimentales. La Figura 2.4 muestra imágenes de un ensayo control negativo al inicio y al final de la incubación, en el cual se observa el crecimiento alineado en *Plant-chip* y el entrecruzamiento de las raíces en la placa de Petri. En la Tabla 2.1 se muestran los valores de ER calculados para los controles de toxicidad positivo y negativo. Se obtuvieron valores similares en ambos sistemas, contenidos dentro del rango de error. Además, la prueba ANOVA para “sistema” de los controles arrojó un valor P mayor a 0,05, lo que confirma que el factor no tiene ningún efecto estadístico sobre la respuesta (ER).

El ancho de 2 mm de los mili-canales fue elegido como valor de compromiso entre dos límites: más anchos permitirían que la raíz incremente su curvatura, y más finos podrían producir un efecto de confinamiento que afecte el crecimiento de la raíz. Los resultados experimentales muestran que los valores de IER obtenidos con TC y PC son perfectamente comparables, lo que significa que el ancho elegido es el adecuado.

### 2.4.2. Parámetros toxicológicos para la exposición a glifosato (GFS)

En primer lugar, se realizó la prueba ANOVA considerando los factores “concentración” y “sistema”. Los resultados mostraron que el primer factor tiene un efecto estadísticamente significativo, el valor P obtenido fue inferior a 0,05. Esto indica que la concentración del herbicida posee un efecto significativo en el crecimiento, lo cual está de acuerdo con investigaciones previas (Belz and Duke, 2014; Bortolheiro et al., 2021). Se obtuvieron 5 grupos homogéneos estadísticamente diferentes. El último de ellos agrupó

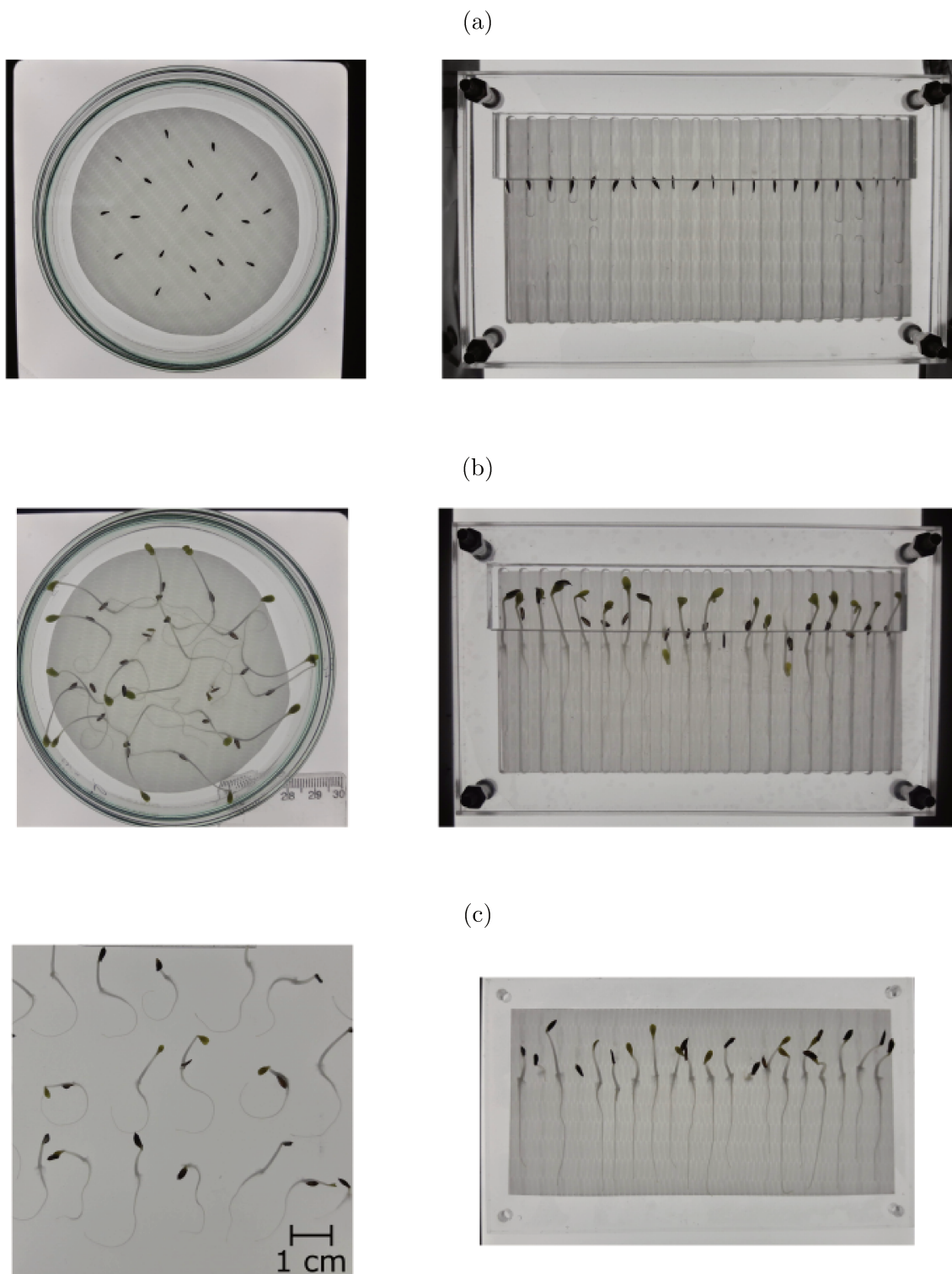


Figura 2.4: Evolución de un ensayo control negativo realizado en TC (izq.) y en PC (der.) en diferentes estadios: (a) tiempo inicial, (b) finalizada la incubación de 120 h y (c) estado final de las raíces.

Tabla 2.1: Resultados de los controles en los dos sistemas: TC y PC.

Control	ER (mm) <sup>a</sup>		CV <sup>b</sup>	
	TC	PC	TC	PC
Negativo	21,8 ± 6,4	17,4 ± 5,2	29,6	29,7
Positivo	2,5 ± 0,6	3,1 ± 1,0	23,8	33,1

<sup>a</sup> Valor ± DE, n=80.

<sup>b</sup> Coeficiente de variación.

a las dos concentraciones superiores. En cambio, para la comparación de TC y PC se obtuvo un valor P mayor a 0,05, lo que indica que la utilización de *Plant-chip* no afecta de manera significativa las mediciones. De esta manera, se verifica su desempeño para la utilización en un amplio rango de concentraciones con un herbicida de uso común.

A continuación, se analizaron los parámetros toxicológicos. Se graficó el IER y se observó una disminución de este índice a medida que aumenta la concentración de GFS, como se muestra en la Figura 2.5a. Si bien el resultado general es el esperado, es destacable que las mediciones en los dos sistemas coincidieron para el amplio rango evaluado. Los valores obtenidos del IG se presentan en la Figura 2.5b, donde se puede observar la similitud entre ambos sistemas en todo el rango de concentraciones. Además, se presenta una tabla comparativa con los niveles de toxicidad (según [Bagur-González et al. \(2011\)](#)) y de fitotoxicidad (según [Zucconi et al. \(1985\)](#); [Ortega et al. \(2000\)](#)) (Tabla 2.2). En el rango evaluado de concentraciones de GFS, se detectaron todos los niveles de toxicidad (Bajo, Moderado, Alto y Muy Alto) siendo los mismos para cada concentración de GFS en ambos sistemas. Además, también se puede observar que hay una estimulación de la elongación radicular para las dos concentraciones menores de GFS tanto para TC como para PC. Por último, se detecta fitotoxicidad en las mismas concentraciones de GFS para ambos sistemas.

Tabla 2.2: Resultados del bioensayo en presencia de GFS.

GFS (mg/l)	Nivel de Toxicidad		Fitotoxicidad <sup>a</sup>	
	TC	PC	TC	PC
0,01	> 0	> 0	-	-
0,1	> 0	> 0	-	-
1	Bajo	Bajo	-	-
10	Moderado	Moderado	Sí	Sí
100	Alto	Alto	Sí	Sí
1000	Muy alto	Muy alto	Sí	Sí

<sup>a</sup> Criterio: si  $IG < 60\%$  hay fitotoxicidad.

La curva dosis-respuesta de ER en función del logaritmo de la concentración de GFS muestra un comportamiento lineal que responde a la ecuación:

$$ER = a + b \ln(Cg)$$

donde  $ER$  corresponde a la longitud promedio de la raíz y  $Cg$  la concentración de GFS. Se aplicaron regresiones lineales para ambos sistemas, tal como se muestra en la Figu-

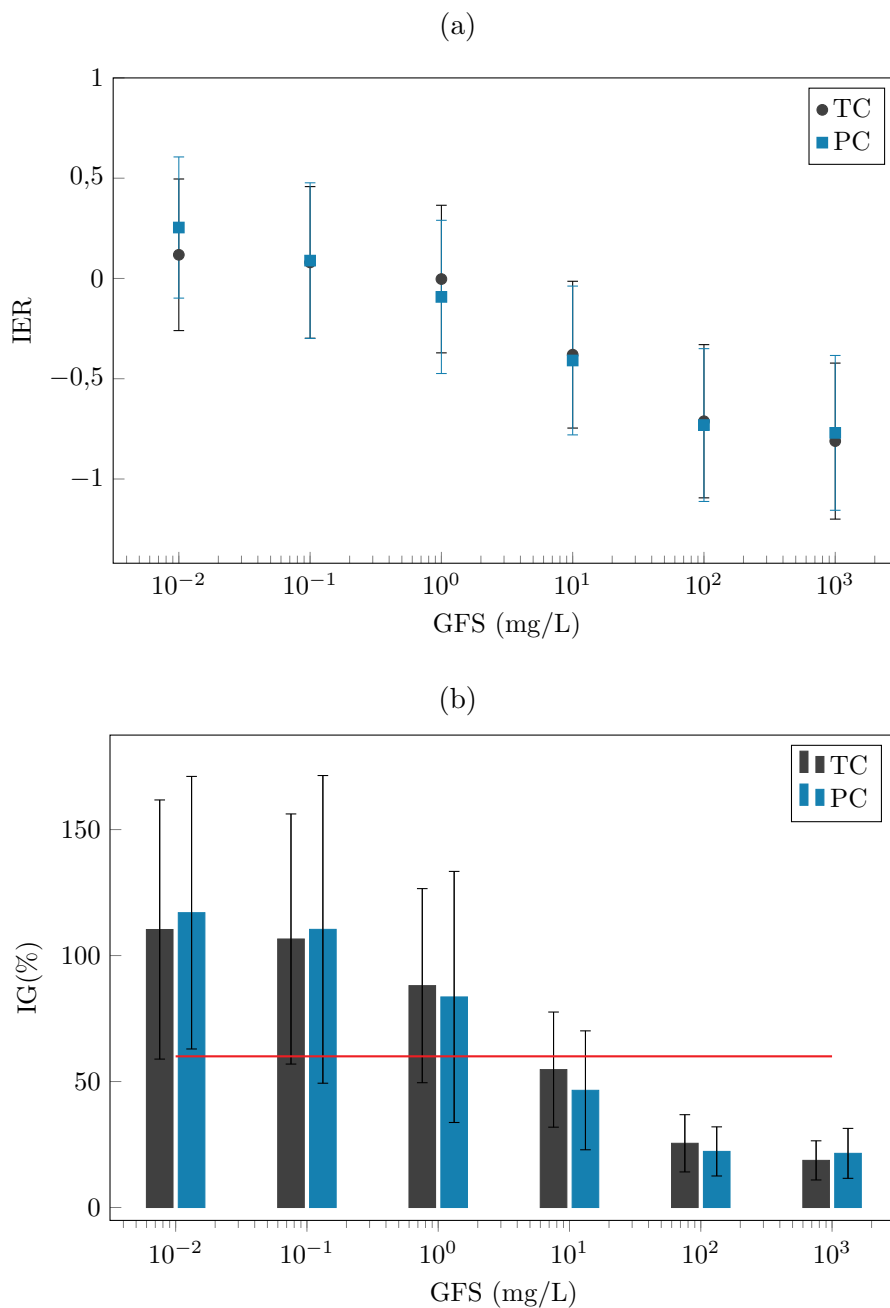


Figura 2.5: Valores de los parámetros toxicológicos: (a) IER e (b) IG (%) (la línea roja corresponde al valor del 60 %.), obtenidos para los sistemas TC y PC en función de las diferentes concentraciones de GFS evaluadas. Las barras de error corresponden al DE (n=80).

ra 2.6, y se obtuvieron valores de  $R^2$  de 0,95 y 0,92 para TC y PC, respectivamente. Se realizó la comparación estadística entre las pendientes y las ordenadas al origen obtenidas en la regresión mediante un ANOVA. Los valores P obtenidos fueron 0,58 y de 0,73, respectivamente, lo que indica que no hay diferencia estadísticamente significativa entre ellos. Éstos resultados indican que *Plant-chip* puede utilizarse para la determinación toxicológica del CE50.

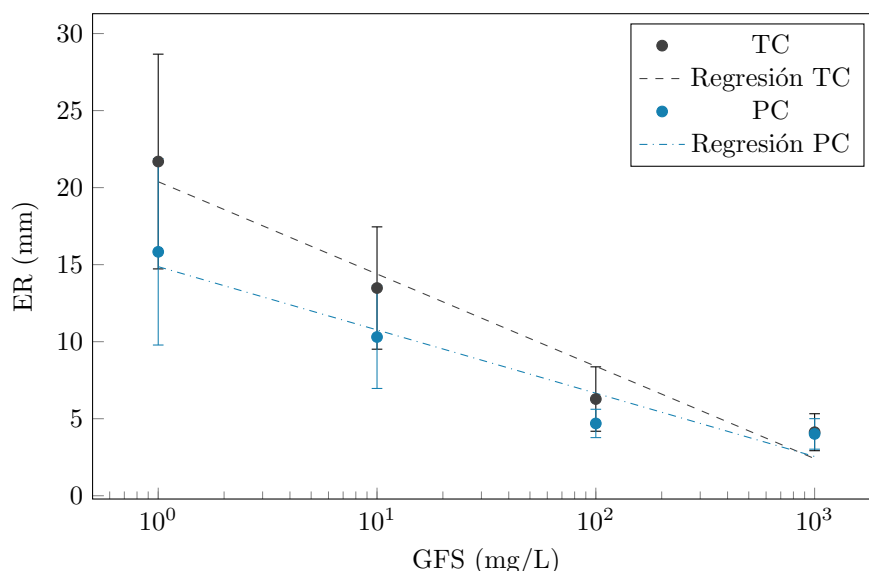


Figura 2.6: Promedio de ER en función de la concentración de GFS. Las barras de error corresponden al DE (n=80). Los símbolos representan los datos experimentales y las líneas punteadas las rectas de regresión. Los parámetros obtenidos son:  $a = 20,4$ ,  $b = -2,6$  y  $R^2 = 0,95$ , para TC; y  $a = 14,9$ ,  $b = -1,8$  y  $R^2 = 0,92$ , para PC.

### 2.4.3. Evaluación de muestras reales

El resultado del análisis estadístico del factor “sistema” arrojó un valor P mayor a 0,05 para todas las muestras analizadas. Esto indica que no hay una diferencia estadísticamente significativa en la respuesta (ER) obtenida con TC y PC. Además, se analizaron los valores obtenidos con las diferentes muestras y se obtuvo un valor P cercano a cero. Es decir, el test determinó que hay diferencia significativa entre las muestras tomadas a diferentes tiempos de tratamiento lo que indica un efecto significativo en el crecimiento. Se obtuvieron 4 grupos estadísticamente diferentes, uno de ellos agrupó a las muestras tomadas a las 4 y 6 h.

En la Figura 2.7 se muestran los parámetros toxicológicos calculados. La similitud en los valores obtenidos es evidente por el solapamiento de las barras de error en todas las muestras ensayadas. Por otra parte, en la Tabla 2.3 se observa que la clasificación según el nivel de toxicidad es consistente para ambos sistemas. Respecto al proceso de descontaminación, no logró superar la barrera de fitotoxicidad, el valor de IG se mantiene por debajo del 60%.

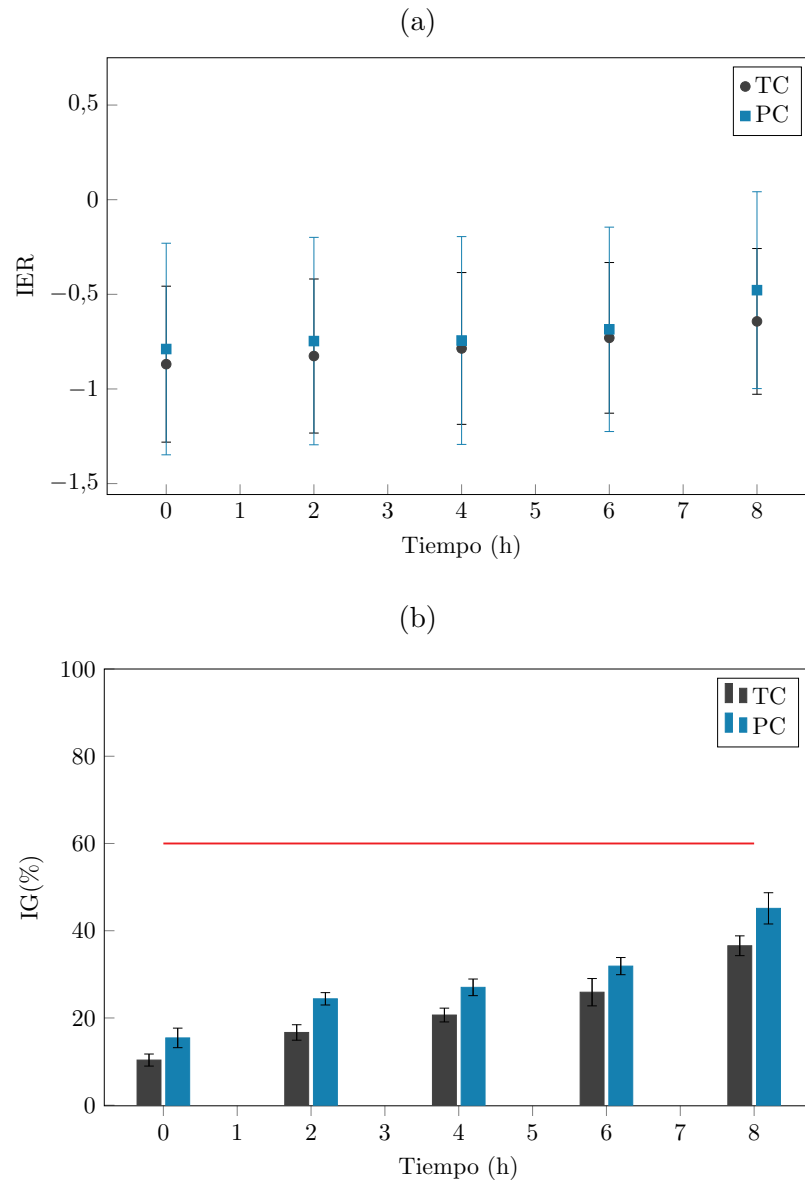


Figura 2.7: Valores de los parámetros toxicológicos: (a) IER e (b) IG (%) de las muestras tomadas a diferentes tiempos del tratamiento del efluente.

Tabla 2.3: Resultados del bioensayo para el tratamiento del efluente.

Muestra (h)	Nivel de Toxicidad		Fitotoxicidad <sup>a</sup>	
	TC	PC	TC	PC
0	Muy alto	Muy alto	Sí	Sí
2	Muy alto	Muy alto	Sí	Sí
4	Muy alto	Muy alto	Sí	Sí
6	Alto	Alto	Sí	Sí
8	Medio	Medio	Sí	Sí

<sup>a</sup> Criterio: si  $IG < 60\%$  hay fitotoxicidad.

### 2.4.4. Integración con *appuente*

La plataforma compuesta por el prototipo 3 y *appuente* se evaluó mediante un ensayo control negativo de toxicidad. Se prepararon 4 dispositivos ( $n = 80$ ) y se obtuvieron datos durante el periodo de incubación. Las mediciones manuales en ImageJ<sup>®</sup> se realizaron a partir de las imágenes tomadas desde la aplicación para eliminar la variación que pueda haber en la captura de las mismas. Los resultados obtenidos con ambos métodos de medición se muestran en la Figura 2.8. La posibilidad de adquirir datos durante el proceso, no es factible empleando la TC y con los prototipos 1 y 2 es posible, aunque resulta laboriosa. La plataforma propuesta permitió la correcta identificación de los canales y se pudo realizar un análisis adecuado de los datos. Más aún, se obtuvieron imágenes en función del tiempo que proveen valiosa información sobre el evento biológico, que fueron obtenidas sin la interrupción del ensayo y con mínima demanda operativa.

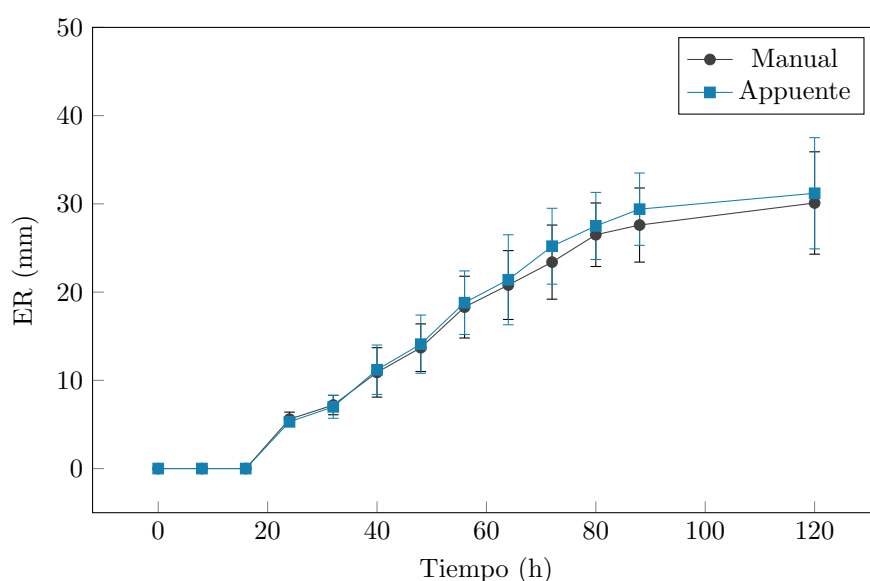


Figura 2.8: Evolución de ER para ensayo control negativo de toxicidad en *Plant-chip* en el cual se comparan las mediciones de manera manual y empleando *appuente*. Se muestran los promedios ( $n = 80$ ) obtenidos para diferentes tiempos de incubación.

Los resultados del análisis estadístico con la prueba ANOVA indican que el factor “tiempo” tiene un efecto estadísticamente significativo, el valor P obtenido fue muy cercano a 0, lo cual es esperable en condiciones controladas para una prueba de control negativo de toxicidad. Se realizaron un total de 10 mediciones en los tiempos de incubación de: 24, 32, 40, 48, 56, 64, 72, 80, 88 y 120 h. Se obtuvieron 8 grupos homogéneos estadísticamente diferentes, dos de ellos agruparon la toma de datos de dos tiempos. Uno de ellos contiene las mediciones tomadas en los tiempos de 24 y 32 h, y el otro las de 80 y 88 h. Por otra parte, el factor “sistema”, que contenía los tratamientos de mediciones: manual y *appuente*, arrojó un valor P de 0,66, lo que indica que no hay efecto sobre la variable de respuesta. Esto indica que el método de medición con *appuente* es tan confiable y preciso como la técnica manual realizada por un operador entrenado, aunque significativamente más sencillo y menos laborioso.

En la Tabla 2.4 se resumen los pasos necesarios para los ensayos de elongación de raíces en diferentes formatos: TC, PC y PC + *appuente*. Un procedimiento alternativo evitaría el paso requerido de realizar la marca roja sobre los canales. El desarrollo de un algoritmo



más complejo, que haga uso de las técnicas de *machine learning* podría ser capaz de detectar las raíces automáticamente y realizar las mediciones directamente, sin ninguna intervención del operador. Es decir, se simplificaría aún más el proceso de realización y obtención de datos del bioensayo. Como contrapartida, el tiempo de procesamiento sería mayor y se requerirían imágenes de alta resolución. Esto último implicaría la demanda de cámaras de alta resolución, que actualmente no están incorporadas en todos los teléfonos celulares del mercado.

Tabla 2.4: Pasos requeridos por el sistema convencional y las alternativas propuestas.

TC	PC	PC + <i>appuente</i>
Extracción de las raíces	Toma de la foto	Marca roja
Alineación de las raíces	Procesamiento de la imagen	Correr <i>appuente</i>
Toma de la foto	Toma de los datos	
Medición manual	Almacenamiento de los datos	
Registro de valores		
Procesamiento de los datos		
Almacenamiento los datos		

## 2.5. Conclusiones

El concepto de crear un microambiente adecuado para la germinación y crecimiento de múltiples semillas en simultáneo y en canales individuales se concretó con el diseño y la fabricación de los prototipos de *Plant-chip*. Se emplearon materiales biocompatibles y adecuados para fabricar los diseños propuestos. Se obtuvo una plataforma novedosa para realizar bioensayos de toxicidad que presenta notables ventajas en comparación con el formato estándar de placa de Petri.

Los dispositivos se han evaluado exhaustivamente para determinar el cumplimiento de los requisitos establecidos por las normas que lo regulan. Además, se validó su utilización mediante la comparación del sistema tradicional con la nueva propuesta en: una solución pura de GFS en un rango de concentraciones de 6 órdenes de magnitud y en muestras reales del tratamiento de un efluente. Los indicadores toxicológicos calculados a partir de ER muestran valores consistentes entre TC y PC.

Por otra parte, el proceso de fabricación de los dispositivos y el empleo de materiales asequibles y económicos dan como resultado un bajo costo de producción, aún en escala laboratorio. Sin embargo, la ventaja que provee la tecnología propuesta radica en la sistematización, porque permite reducir la cantidad de pasos necesarios para la obtención del resultado (Tabla 2.4). Esto resulta en una disminución considerable del tiempo requerido, de la posibilidad de cometer errores y del costo operativo.

A partir de los primeros prototipos, se realizó una funcionalización que permitió el acople a la telefonía celular y al procesamiento automatizado de los datos. Más aún, se realizó un monitoreo en tiempo real de la elongación radicular. Es importante destacar que la plataforma también permite la obtención continua de datos. Esto es de particular interés en procesos dependientes del tiempo. La adquisición de imágenes pueden realizarse con diferentes medios ópticos, dependiendo de la calidad requerida para el posterior procesamiento. Además, se pueden realizar otras adaptaciones para observar otros órga-

nos vegetales en detalle. Todas estas mejoras son factibles de realizarse y proporcionarían beneficios para otros campos de investigación relacionados con la caracterización fenotípica de semillas modificadas genéticamente o con la descripción macroscópica de eventos biológicos. Finalmente, se puede concluir que la plataforma desarrollada ofrece una clara mejora respecto a la tecnología existente y que se vislumbran nuevas aplicaciones en diferentes campos de aplicación científica y tecnológica.

# Capítulo 3

## *FDA-chip*

### 3.1. Introducción

En el presente capítulo se describe el desarrollo de un dispositivo para la realización de un bioensayo enzimático denominado hidrólisis del diacetato de fluoresceína (FDA), el cual permite determinar la actividad microbiana en suelos. La plataforma de detección está formada por un dispositivo realizado en PMMA, denominado *FDA-chip*, el cual se acopla a la telefonía móvil mediante el algoritmo *FDA reader*, desarrollado en *appuente*. Se evalúan muestras de suelos sometidos a diferentes usos y muestras provenientes de un proceso de biorremediación. El sistema permite obtener una medición cuantitativa de un parámetro de interés en el monitoreo del ambiente. La determinación *in situ* evita el traslado de las muestras al laboratorio y el acople a la telefonía móvil permite la gestión de datos en tiempo real.

#### 3.1.1. Definición de calidad del suelo

El suelo es la delgada capa que recubre la superficie de la tierra, la base de la agricultura y de las comunidades vegetales naturales. Los efectos de la intervención antropogénica en el ambiente se evidencian en los recursos del suelo, o recursos edáficos, que se consideran no renovables. La implementación de prácticas agrícolas poco sustentables durante mucho tiempo ocasionó una disminución de la capacidad productiva (Kumar et al., 2014; Doran and Zeiss, 2000) y las estimaciones son particularmente desfavorables para las regiones subdesarrolladas, como los países de Sudamérica, África y el Sudeste Asiático (Bindraban et al., 2012). De todos modos, la preocupación es global e incluye también sectores de Europa, como la región del Mediterráneo (Ferreira et al., 2022) y países desarrollados como Alemania (Baude et al., 2019).

El suelo constituye el lecho de desarrollo de la diversidad, actividad y productividad biológica. Las bacterias, hongos, algas y protozoos del suelo cumplen un rol catabólico primario que resulta fundamental en la degradación de residuos animales y vegetales, y mantienen un equilibrio nutricional que hace que el suelo sea fértil (Hillel and Hatfield, 2005).

Las tierras destinadas a la agricultura sufren alteraciones en el equilibrio microbiano capaces de ocasionar consecuencias ecológicas relevantes (Chowdhury et al., 2008; Riah et al., 2014; Arora and Sahni, 2016). Las sustancias activas, productos de degradación y demás componentes empleados en las formulaciones de los agroquímicos se acumulan en el suelo (Rapini and Marrazza, 2016). Además, las tierras destinadas a las agricultura

se usan de manera intensiva, sufren de erosión por el sobrepastoreo y el desmonte, se salinizan y desertifican (Borrelli et al., 2017).

El concepto de calidad de suelo fue definido en 1997 por el comité de calidad de suelo de la Soil Science Society of America Ad Hoc (S-581) como: la capacidad de un tipo específico de suelo para funcionar dentro de los límites naturales o determinados por el ecosistema, para sostener la productividad vegetal y animal, mantener o mejorar la calidad del agua y del aire, y apoyar la salud y el hábitat de los seres humanos (Karlen et al., 1997). Ese mismo año surgieron también definiciones que asocian la calidad de suelo con el cumplimiento de los requerimientos de las especies biológicas que lo habitan (Johnson et al., 1997). El concepto de salud del suelo intenta resaltar el concepto de que el suelo es un sistema vivo y dinámico y que las funciones específicas son llevadas a cabo por organismos vivos que requieren ser conservados. Actualmente, muchos autores consideran los conceptos de calidad de suelo y de salud del suelo como sinónimos y, si bien se emplean los dos términos, es más común el primero. El Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (US DA, del inglés *United States Department of Agriculture*) emitió en 2001 una guía para evaluar la calidad del suelo donde lo define simplemente como la capacidad de funcionar (USDA, 2001).

Es importante destacar que el concepto de calidad de suelo supone equilibrar las necesidades productivas con las de mantenimiento del ambiente y está fuertemente asociado con el desarrollo de sistemas sustentables de gestión del suelo. Resulta evidente que, para prevenir el deterioro ambiental, es primordial conocer su estado y para ello es fundamental la selección de indicadores adecuados, confiables y representativos.

#### 3.1.2. Clasificación y selección de indicadores

En la evaluación de la calidad del suelo se pueden incluir indicadores físicos, como el contenido de agua, la porosidad y densidad; químicos, por ejemplo el pH, la conductividad y los niveles de nitratos; y biológicos, donde se incluyen mediciones de micro y macro-organismos, la composición microbiana y la actividad enzimática. A su vez, los indicadores pueden responder a propiedades inherentes o dinámicas del suelo. Las primeras son el resultado del proceso formativo que responde al clima y la topografía y suelen ser levemente alteradas por el uso. Algunas de ellas son la textura, la composición mineral, el tipo de drenaje y profundidad de la roca madre. Por otra parte, las propiedades dinámicas sí dependen del uso y se pueden ver afectadas por las actividades antropogénicas en períodos tan cortos como una etapa de siembra.

Dentro de las características fundamentales que debe cumplir un indicador de calidad del suelo, vale mencionar su sensibilidad a los disturbios tanto antrópicos como climáticos, y su correlación con funciones benéficas básicas del suelo. Por otra parte, no debe requerir una observación en un plazo demasiado extenso que provea los resultados a destiempo. Además, la medición de un parámetro resulta útil si permite elucidar las causas que generan tal resultado. Por ejemplo, una técnica analítica convencional puede resultar precisa para medir nutrientes y compuestos de degradación, pero es costosa y poco práctica para el monitoreo y no proporciona información sobre las causas de los resultados obtenidos. Este ejemplo permite mencionar el costo y la demanda operativa como características importantes que deben considerarse para seleccionar indicadores de calidad de suelo.

Es importante aclarar que la selección particular de parámetros dependerá de cada caso de estudio y considerará las aplicaciones y el uso de la muestra de suelo a evaluar. Sin embargo, en la mayoría de los casos, resulta fundamental actuar a tiempo. Es por

eso que los parámetros de mayor interés son los que permiten detectar las alteraciones del suelo lo antes posible. Es decir, determinar el impacto que se está produciendo para implementar las modificaciones pertinentes que permiten remediar, aplacar o revertir el daño. A dichos parámetros se los denomina indicadores tempranos de degradación. En este aspecto, los parámetros físicos y químicos son poco útiles, ya que sólo se alteran cuando el suelo sufre un cambio realmente drástico (Filip, 2002). Por el contrario, los parámetros biológicos y bioquímicos son sensibles a las ligeras modificaciones que puede sufrir el suelo en presencia de cualquier agente nocivo (Dick, 1994; Gil-Sotres et al., 2005). En particular, las mediciones de actividad enzimática se consideran indicadores tempranos de las alteraciones funcionales (Dick, 1994; Chowdhury et al., 2008; Riah et al., 2014).

Las actividades de descomposición de las fuentes orgánicas y de los ciclos de nutrientes, son llevadas a cabo por enzimas específicas. Se asume que las enzimas presentes en el suelo son principalmente de origen microbiano, que la contribución de animales y plantas es escasa (Dick, 1994) y que, si bien son provistas por organismos vivos, un gran porcentaje se estabiliza en matrices sólidas. Las enzimas del suelo se consideran factores tanto inherentes como dinámicos. La presencia y abundancia de determinadas enzimas está determinada por la composición del suelo, es decir la textura. En suelos arcillosos, es común la generación de complejos enzimáticos. En contraste, los suelos arenosos poseen menor capacidad de retención de agua y suelen presentar niveles más disminuidos de actividad basal. Por otra parte, la actividad enzimática es fuertemente modificada por la incorporación de sustancias orgánicas, como los plaguicidas o los fertilizantes, y por la adopción de diferentes prácticas de preparación y mantenimiento del suelo para prácticas agrícolas. La presencia de sustancias químicas que son el producto de reacciones enzimáticas producen una inhibición de retroalimentación, como ocurre con las fosfatasa y ureasas; los metales pesados suelen producir un efecto tóxico; la compactación produce una disminución del oxígeno presente y afecta a las enzimas aeróbicas, pero incrementa la saturación de agua y puede incrementar la actividad de enzimas de los procesos de desnitrificación. Estos ejemplos indican que las enzimas son excelentes factores dinámicos. Para una correcta interpretación de las mediciones enzimáticas, es importante controlar la variación temporal y contar con una medición de referencia interna para cada tipo de aplicación (USDA, 2001).

### 3.1.3. Tecnologías de biorremediación

Los sistemas de biopurificación, llamados biolechos o camas biológicas, constituyen una tecnología de biorremediación centrada en la prevención de la contaminación. Estos sistemas están diseñados para descontaminar líquidos con alta concentración de plaguicidas (Dias et al., 2020; Saez et al., 2022). Los biolechos poseen material biológicamente activo, denominado biomezcla, compuesto por suelo, material lignocelulósico y un sustrato orgánico humidificado. Esta biomezcla se caracteriza por poseer una alta actividad microbiana, lo cual permite la degradación de los agroquímicos.

Las primeras camas biológicas se implementaron en Suecia en respuesta a la necesidad de minimizar la contaminación ambiental por el uso de plaguicidas (Torstensson and Castillo, 1997). La construcción es simple y económica, y consiste en realizar una excavación, que puede o no estar impermeabilizada, o determinar el uso de un contenedor. La profundidad necesaria es de 60 cm. El método sueco original propone armarlas de la siguiente manera: colocar en el fondo una capa de arcilla de 10 cm y por encima la bio-

mezcla de paja, turba y tierra (50:25:25) rellenando los 50 cm de profundidad restantes, por último, cubrir la superficie con pasto (Castillo et al., 2008). Cada componente cumple una función particular. La arcilla provee una capa de baja permeabilidad y, al tener una alta capacidad de absorción, se logra aumentar el tiempo de retención de las sustancias. La biomezcla constituye el lecho biológico y debe tener una buena capacidad de absorción y elevada actividad microbiana, para poder degradar los plaguicidas. El pasto en la superficie aumenta la eficiencia del sistema porque ayuda a regular la humedad y el transporte de líquidos.

Las camas biológicas son sistemas efectivos que emplean materiales asequibles y los requerimientos para el armado son simples. Es por eso que han suscitado interés en todo el mundo. Su implementación en diversos países se realizó con modificaciones del diseño original para adaptarlas a las condiciones, prácticas y necesidades particulares de cada lugar. Surgieron nuevas líneas de trabajo en numerosos grupos de investigación que realizan estudios a escala piloto, incorporan materiales regionales y trabajan de manera intensiva en la adaptación y adopción de la tecnología (Coppola et al., 2007; Dias et al., 2020; Papazlatani et al., 2022). Particularmente en Argentina, se estudia el reemplazo de la turba por residuos fluviales generados en el Delta del Río Paraná por acumulación de nutrientes (Benedetto et al., 2004) y la utilización de rastrojo como fuente de material lignocelulósico (Lescano et al., 2018, 2022). Esta última incorporación es particularmente interesante porque los residuos de cultivos abundan en los campos de uso agrícola. Además, se analizan diferentes estrategias para mejorar la eficiencia incrementando la actividad biológica mediante la técnica de bioaumentación (Saez et al., 2018) o la incorporación de lombrices como parte del mecanismo de degradación (Lescano et al., 2020).

Un aspecto clave en la implementación de esta tecnología es el monitoreo de su funcionamiento. La capacidad degradativa y la efectividad de una cama biológica se ven afectadas por parámetros físico-químicos como la composición, homogeneidad, edad, humedad y temperatura de la mezcla. Para controlar la degradación de las sustancias contaminantes, se emplean habitualmente métodos químicos de extracción y cuantificación, como las técnicas de HPLC, que se adaptan para las muestras de biolechos (Rivero et al., 2016; Vareli et al., 2018). Algunos indicadores físicos, como la humedad y el pH, se miden mediante diferentes instrumentos portátiles disponibles en el mercado. Además, se realizan evaluaciones ecotoxicológicas mediante bioensayos capaces de cuantificar los efectos negativos de los plaguicidas sobre organismos no blanco. Se emplean lombrices (Masin et al., 2018), plantas (Lyu et al., 2018; Nobili et al., 2022) y crustáceos (Huete-Soto et al., 2017) como bioindicadores y también se realizan mediciones enzimáticas, comúnmente de actividad hidrolítica y fenoloxidasas (Tortella et al., 2012; Lescano et al., 2022; Saez et al., 2022).

#### 3.1.4. Medición de la actividad hidrolítica

El 90 % de la energía en el ecosistema del suelo se procesa a través de los microorganismos descomponedores (Green et al., 2006). El ensayo de hidrólisis del FDA permite cuantificar la actividad hidrolítica microbiana y es considerado una medida indirecta muy útil para evaluar la capacidad degradativa del suelo. El FDA es un sustrato incoloro que, por acción de numerosas enzimas hidrolíticas microbianas, se transforma en un producto de color amarillo, la fluoresceína (F), tal como se muestra en la Figura 3.1. Las enzimas implicadas son las lipasas, proteasas y esterasas que se encuentran en descomponedores primarios, como bacterias y hongos (Riah et al., 2014). El resultado del ensayo se informa

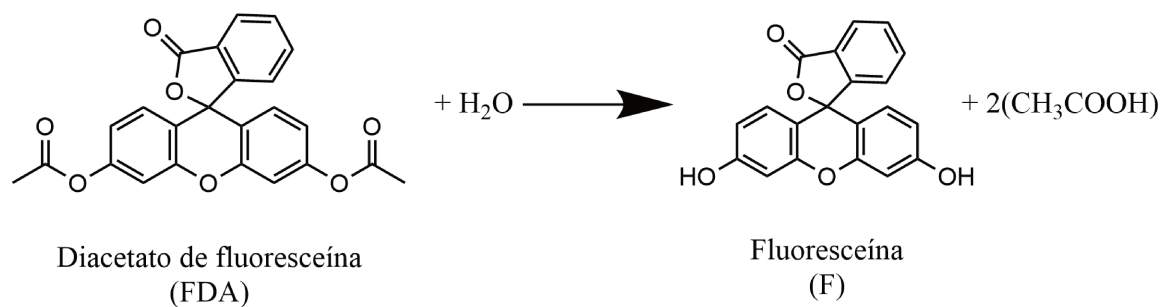


Figura 3.1: Reacción de hidrólisis del FDA

como  $\mu\text{g}$  de F liberada por gramo de suelo por hora ( $\mu\text{g}/\text{g}/\text{h}$ ).

La técnica original de hidrólisis del FDA, publicada por [Schnürer and Rosswall \(1982\)](#), implica la incubación de la muestra de suelo con el sustrato enzimático FDA durante 1 h a temperatura ambiente, la detención de la reacción con cloroformo, la centrifugación de la mezcla de reacción y la posterior medición del color generado en el sobrenadante empleando un espectrofotómetro. Esta técnica se usa para el análisis de riesgo del empleo de agroquímicos ([Riah et al., 2014](#); [Tao et al., 2021](#)), de la presencia de microplásticos y la eficiencia de diferentes estrategias de remediación ([Palansooriya et al., 2022](#)), del efecto de la salinidad para plantaciones de arroz ([Sritongon et al., 2022](#)) y de producción de fertilizantes orgánicos ([Muscolo et al., 2019](#)).

Además, varios grupos de investigación han propuesto adaptaciones con el objetivo de optimizar las determinaciones ([Adam and Duncan, 2001](#); [Green et al., 2006](#); [Schumacher et al., 2015](#)). En algunos estudios se propone una modificación en la utilización del solvente orgánico que se utiliza para detener la reacción enzimática una vez finalizado el tiempo de incubación. En el trabajo de [Adam and Duncan \(2001\)](#), se emplean muestras de suelos de diferente composición textural (arena, arcilla y sedimentos) y se propone el reemplazo de acetona por cloroformo/metanol (2:1) porque mejora la detección en muestras de baja actividad microbiana. En los trabajos de [Green et al. \(2006\)](#) y [Schumacher et al. \(2015\)](#) se emplean suelos clasificados según [NRCS \(2005\)](#). En el primer trabajo, se analizan diversas variables experimentales, obtienen los parámetros cinéticos de la reacción, proponen realizar una incubación estática y validan el empleo de la técnica para estudios de bioecosistemas y calidad de suelo. En el segundo, se propone disminuir el tiempo de incubación y el volumen del reactivo de detención de la reacción, lo cual disminuye el costo operativo y económico y la generación de residuos contaminantes. En el trabajo de [Lescano et al. \(2018\)](#), se realiza la adaptación de la técnica para el monitoreo de biolechos, se detalla el procedimiento de preparación de las muestras y se emplea acetona para detener la reacción enzimática.

La técnica convencional de hidrólisis del FDA requiere del uso de equipamiento de laboratorio para obtener un líquido libre de partículas para realizar la medición de absorbancia. Para ello, se utiliza una centrífuga y un sistema de filtrado. Posteriormente, se emplea un espectrofotómetro para medir la absorbancia de las muestras a 490 nm. El uso de este equipamiento dificulta la realización de mediciones en los sitios de muestreo y, consecuentemente, las muestras de monitoreo deben ser trasladadas a un centro analítico.

La estrategia propuesta en esta Tesis consiste en el diseño de un dispositivo capaz de cumplir con las demandas de la técnica convencional y prescindir del equipamiento de laboratorio. Además, se pretende disminuir el costo operativo, simplificar el proceso y la cantidad de pasos a realizar. Se implementó un sistema de filtrado por gravedad *in situ*

empleando un pistón de algodón para reemplazar el uso de la centrífuga. Por otra parte, la medición espectrofotométrica se reemplazó por el análisis de imágenes tomadas con un teléfono celular. Se utilizaron las herramientas provistas por la plataforma *appuente* para: (i) diseñar una aplicación móvil capaz de guiar al usuario durante todo el proceso (agregado de reactivos, periodo de incubación, filtración de la muestra, y toma de una imagen del dispositivo para el posterior procesamiento); (ii) desarrollar un algoritmo adecuado para el procesamiento de los datos a partir de la imagen tomada. Es importante destacar que la integración con *appuente* provee la capacidad adicional de gestionar los datos en tiempo real y de recopilar información espacio-temporal.

## 3.2. Objetivos

El objetivo del presente capítulo es la obtención de una plataforma de análisis capaz de medir la hidrólisis del FDA en muestras de suelo en el sitio de muestro. Esto implica el desarrollo de un dispositivo portátil y compacto que cumpla con los requerimientos de la técnica convencional y que permita realizar el ensayo sin necesidad de emplear equipamiento de laboratorio.

## 3.3. Materiales y métodos

### 3.3.1. Fabricación del dispositivo

Para la fabricación del *FDA-chip* se emplearon láminas de PMMA transparente que se prototiparon mediante corte y fresado láser (Lasers Cuyana, Mendoza, Argentina). El dispositivo está conformado por tres capas rectangulares de 50 x 70 mm y diferentes espesores: la capa inferior de 3 mm y la intermedia de 4 mm conforman la base y los bordes de las cavidades que actúan como celdas de lectura, respectivamente; la capa superior es de 2 mm. El ensamblado del dispositivo se realizó mediante pegado con etanol en un horno a 75 °C durante 5 min. Se muestra un esquema en la Figura 3.2. En la parte superior del dispositivo, se colocó una máscara que contiene las marcas de alineación que empleará *FDA reader* (ver Sección 3.3.3) y ventanas rectangulares de 3 x 10 mm sobre los canales. La máscara se fabricó con el *plotter* de corte Cameo 4 (Silhouette America, Lehi, USA) empleando vinilo autoadhesivo color negro. En la parte inferior, se fijó un cuadrado de 30 x 30 mm fabricado con un polímero translúcido que permite obtener una superficie adecuada para difundir la luz de entrada a las celdas de medición. Se utiliza luz blanca provista por la pantalla de un teléfono celular.

El dispositivo posee tres celdas de 50 mm de largo, 3 mm de ancho y 4 mm de espesor que corresponden al blanco de reactivos (celda 1), blanco de muestra (celda 2) y muestra incógnita (celda 3), como se indica en la Figura 3.3a. En un extremo de las celdas se ubica un puerto de acceso para un tip de micropipeta de 5 ml (epT.I.P.S.<sup>®</sup>, Eppendorf QualityTM), mientras que en el otro extremo se ubica un canal de venteo para permitir el flujo del líquido. El sistema de filtrado se implementó en el mismo tip de 5 ml, al cual se le colocaron 150 mg de algodón comercial comprimido, formando un pistón de 20 mm, como puede observarse en la Figura 3.3b.



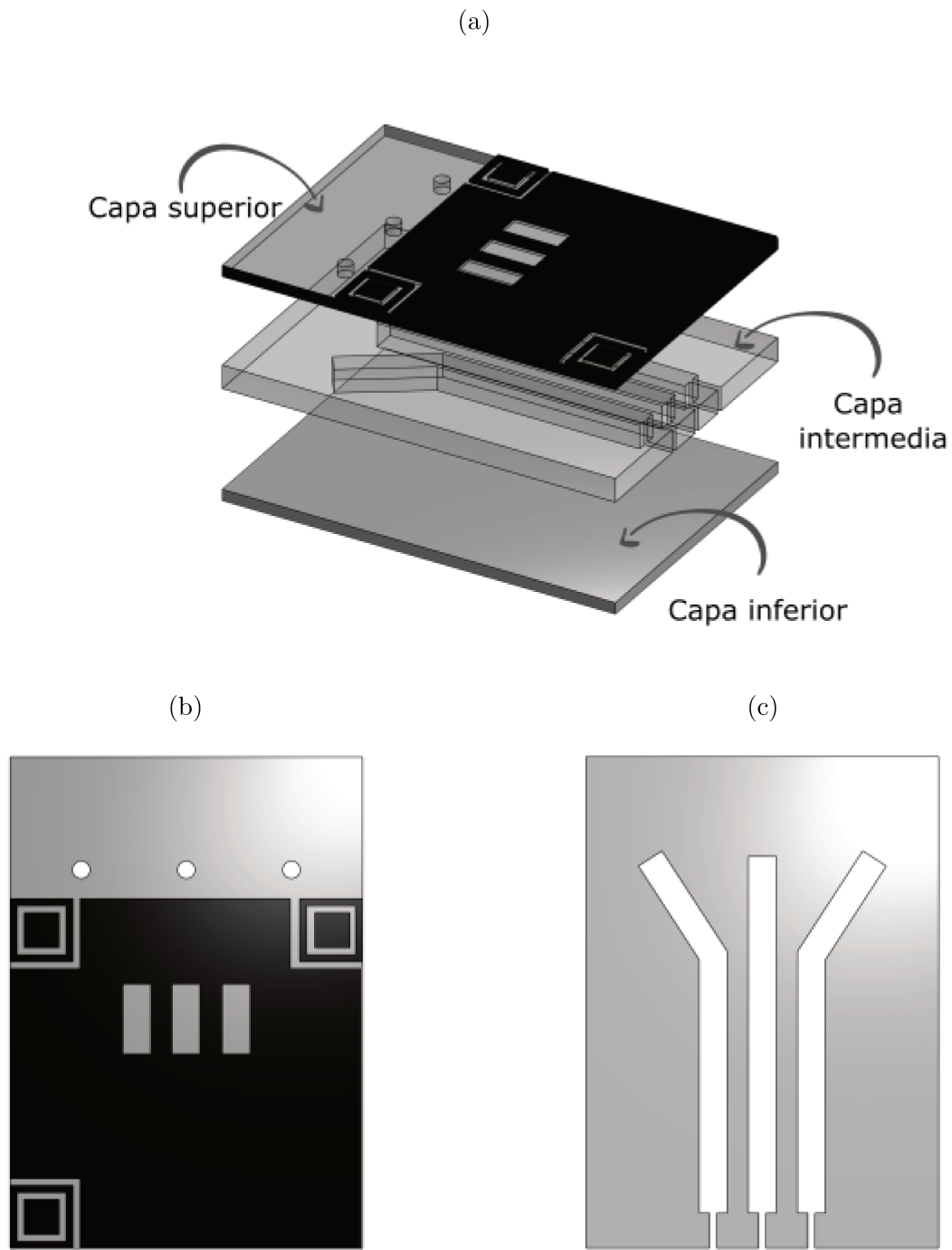


Figura 3.2: Representación esquemática del dispositivo *FDA-chip*: (a) vista expandida, vista frontal de la capa (b) superior e (c) intermedia.

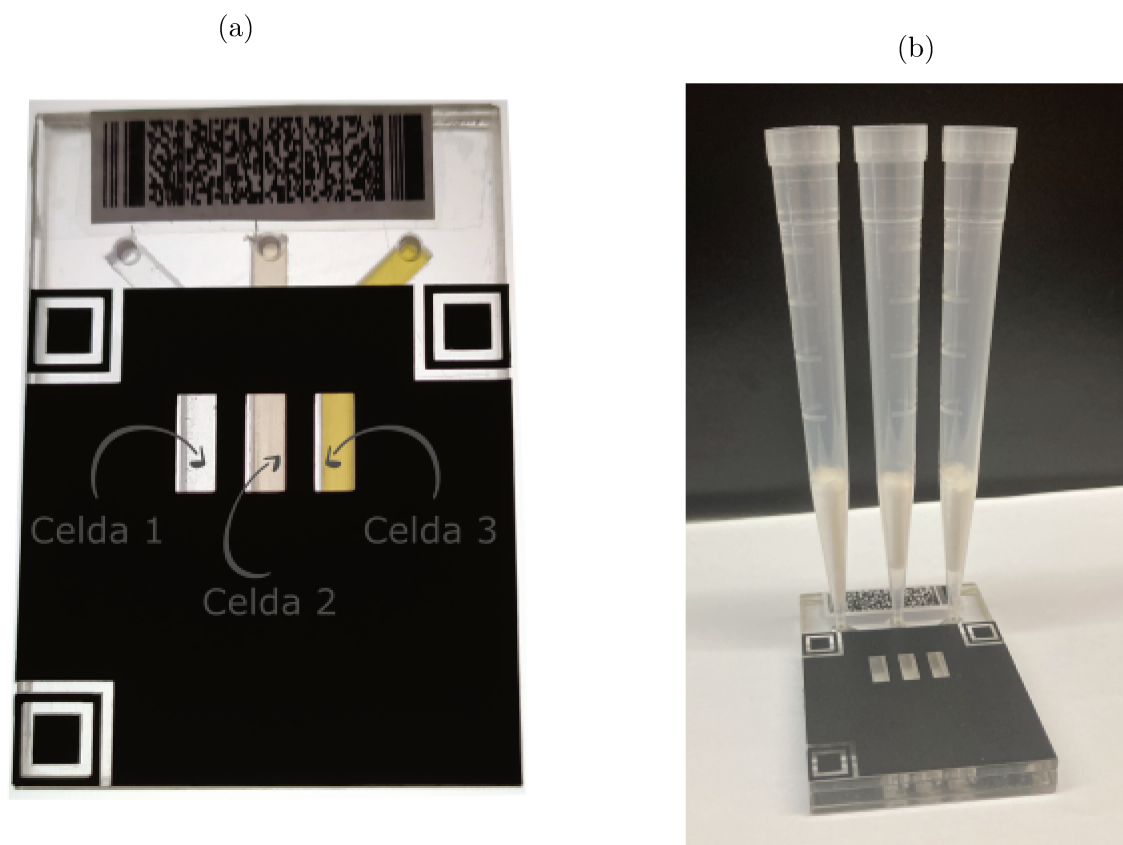


Figura 3.3: Identificación de componentes de *FDA-chip*: (a) celdas de lectura y (b) sistema de filtrado acoplado al dispositivo.

### 3.3.2. Procesamiento de las muestras

Las muestras se analizaron en paralelo con los dos métodos propuestos: la técnica convencional (TC) y la técnica portátil (TP) que emplea el *FDA-chip* y el procesamiento de datos mediante *appuente*. El procedimiento inicial es idéntico para ambos métodos. Se pesó 1 g de suelo por duplicado, para cada una de las muestras evaluadas. El material se colocó en tubos de centrifuga y se le adicionaron 6 ml de buffer fosfato de potasio 60 mM de pH 7,6 y 100  $\mu$ l de sustrato enzimático FDA 1000  $\mu$ g/ml. Los tubos se incubaron por 60 min a temperatura ambiente. Para el blanco de muestra, se procedió de igual forma pero sin el agregado del FDA. El blanco de reactivos contiene solamente el buffer fosfato y el sustrato enzimático en los volúmenes indicados. Luego de la incubación, se homogeneizaron los tubos y se dividió el contenido en partes iguales para proceder con las dos técnicas.

La TC se realizó de la siguiente manera. A los tubos se le agregaron 3 ml de acetona, se mezclaron manualmente y se centrifugaron a 2000 rpm durante 10 min. Con el sobrenadante obtenido, se midió la absorbancia a 490 nm empleando un espectrofotómetro UV-vis Perkin Elmer<sup>®</sup>.

En el procesamiento con la TP, los tubos se sometieron a agitación manual por 1 min. La suspensión obtenida se colocó en el tip de filtrado acoplado al dispositivo. El líquido filtrado fluye directamente hacia las celdas correspondientes. Resulta importante destacar que la técnica realizada en el *FDA-chip* omite el agregado del solvente orgánico.

### 3.3.3. Método de lectura en el dispositivo

La detección colorimétrica requiere un emisor de luz y un detector de la luz transmitida a través de la muestra. Para estos fines se utilizaron dos teléfonos celulares. El dispositivo de PMMA se colocó sobre la pantalla de un teléfono iPhone SE 2020 que actúa como fuente de luz. El color se ajustó mediante la aplicación Flashlight (iHandy Ltd.) y se utilizó el color blanco (RGB: 255, 255, 255). La intensidad de la iluminación se llevó al 100%. El segundo teléfono se utilizó para tomar imágenes de la luz transmitida a través de las celdas del dispositivo, a una distancia de 8 cm, tal como se muestra en la Figura 3.4a. Este teléfono opera guiado mediante una aplicación específica denominada *FDA reader*, la cual se creó en la plataforma *appuente* desarrollada en nuestro grupo. Este trabajo se realizó en colaboración con el Dr. Federico Schaumburg del INTEC (UNL - CONICET). La toma de la imagen se realiza de manera automática una vez que el usuario posiciona correctamente las marcas de alineación en la pantalla e inmediatamente después se realiza el análisis e informe del resultado (Figura 3.4b). El algoritmo de procesamiento de imágenes se programó en Octave. Brevemente, se analiza la intensidad del canal azul del espacio de color RGB, para las tres celdas en paralelo. Para el análisis de muestras incógnita, en la celda 1 se coloca el blanco de reactivos ( $I_b$ ), en la celda 2 el blanco de muestra ( $I_{bm}$ ) y en la celda 3 la muestra a evaluar ( $I_m$ ). La señal de la muestra se calcula como una absorbancia equivalente:

$$Abs_{eq} = [-\log(I_m/I_b)] - [-\log(I_{bm}/I_b)]$$

El algoritmo utiliza una curva de calibrado previamente registrada (ver Sección 3.3.6) y el resultado se reporta en unidades de  $\mu\text{g/g/h}$ .

### 3.3.4. Muestras de suelo

Las muestras de suelo se tomaron de diferentes regiones de la provincia de Santa Fe. Se utilizó un suelo de referencia (S1), recolectado del predio donde se sitúa el INTEC ( $31^\circ 38' 7,6''\text{S}$   $60^\circ 40' 15,2''\text{W}$ ). S1 no recibió tratamientos con plaguicidas ni fue sometido a ningún tipo de práctica agrícola.

La segunda muestra consistió en un suelo de uso agrícola (S2). S2 se obtuvo de un campo ubicado en Campo Andino ( $29^\circ 42' 59''\text{S}$   $60^\circ 5' 35''\text{W}$ ), el cual se empleó para el monocultivo de soja por un periodo de 20 años consecutivos. El principal plaguicida aplicado es el herbicida GFS, por lo que los microorganismos presentes en esta muestra están adaptados a su degradación. Este tipo de suelos resulta de interés para la preparación de camas biológicas destinadas a la descontaminación de líquidos o efluentes que contienen agroquímicos, incluso en concentraciones elevadas.

La tercera muestra es un suelo empleado para la producción frutihortícola (S3). La muestra se obtuvo de una quinta ubicada en la localidad de Ángel Gallardo ( $31^\circ 33' 9,8''\text{S}$   $60^\circ 40' 31,3''\text{W}$ ).

### 3.3.5. Muestras de un sistema de biopurificación

Los biolechos utilizados en los ensayos fueron preparados empleando como base el suelo S2. Este trabajo se realizó en colaboración con la Dra. Maia R. Lescano del INTEC (UNL - CONICET). La Caja I se preparó utilizando 100% suelo. Para la preparación de la Caja II, como material lignocelulósico se dispuso de cáscaras de maní provistas por

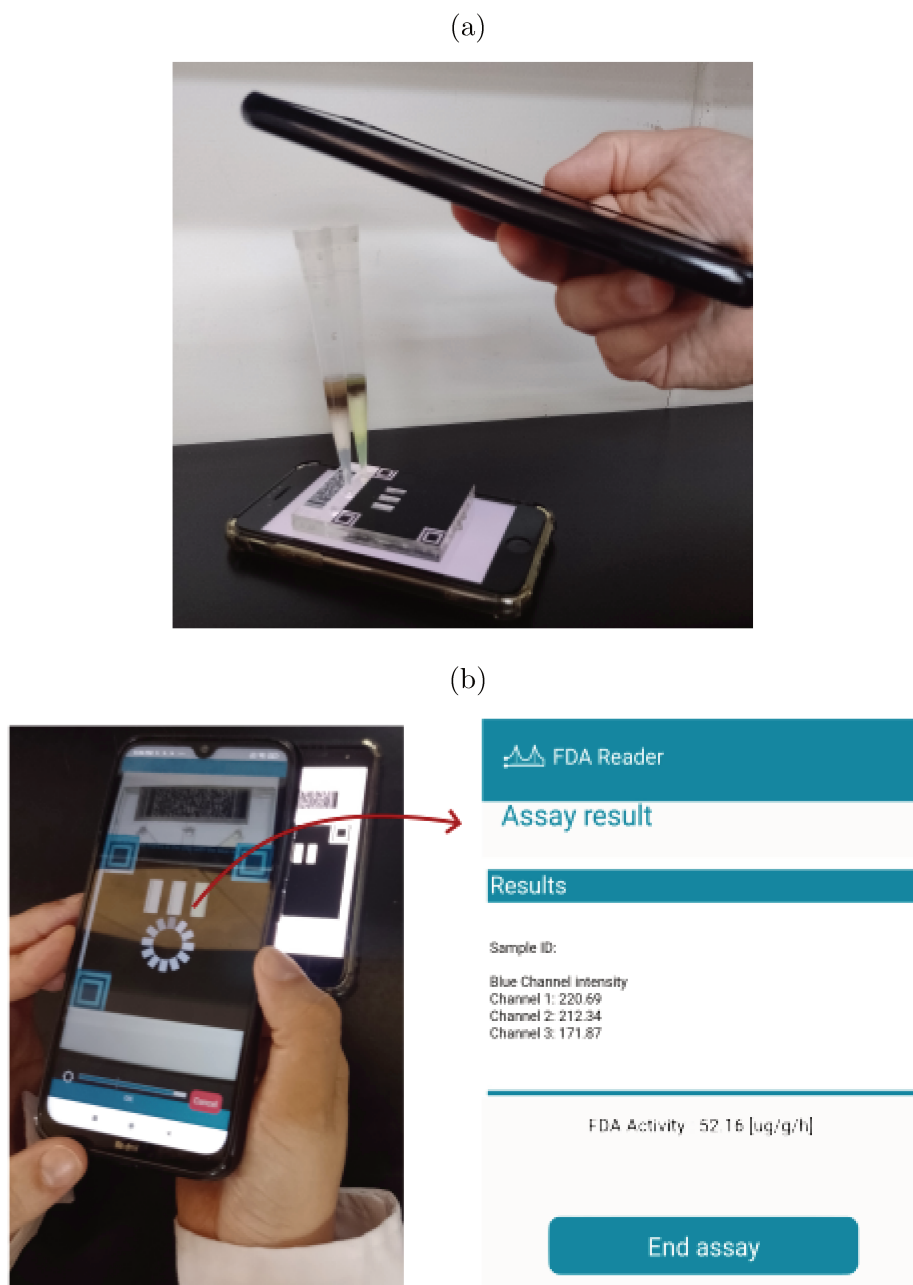


Figura 3.4: Toma de datos con *FDA-chip*: (a) proceso de medición y (b) procesamiento de la lectura e informe del resultado obtenido.

una industria manicera de la localidad de Hernando, Santa Fe, las cuales se trituraron hasta alcanzar una longitud de entre 3 y 4 mm. La proporción de la Caja II fue de 50:50 suelo y cáscaras de maní trituradas.

A las cajas se les agregó una solución líquida compuesta por tres plaguicidas de uso extendido en Argentina que poseen elevada persistencia en suelo y toxicidad. Se utilizó el herbicida comercial atrazina GESAPRIM<sup>®</sup> 90 WDG 90 % p/p, y los insecticidas imidacloprid Punto 35<sup>®</sup> al 35 % p/v y tiametoxam Timerol<sup>®</sup> 75 WG 75 % p/p. La concentración final preparada fue de 10 mg de contaminante por kg de biomezcla, lo que simula un derrame accidental que puede ocurrir en el lugar de preparación de los agroquímicos. Las muestras de biolecho se tomaron luego del agregado de los plaguicidas y al día 90 del proceso de biopurificación.

### 3.3.6. Construcción de curvas de calibrado

Se preparó una solución stock de fluoresceín sódica de 2000 µg/ml con buffer fosfato de potasio 60 mM a pH 7,6. Los estándares se prepararon empleando el buffer como diluyente y el pH se controló antes de su uso.

Para TC, la medición de  $A$  a 490 nm se realizó empleando un espectrofotómetro UV-vis Perkin Elmer<sup>®</sup>. El cálculo de  $Abs_{eq}$  para TP, se realizó con *FDA reader*.

## 3.4. Resultados y discusión

### 3.4.1. Determinación cuantitativa

La medición de la hidrólisis del FDA se calcula a partir de la F liberada por la muestra a evaluar. El valor de concentración de F se verá afectado por la cantidad de muestra (g) y por un factor de dilución que corresponde con el volumen (ml) de líquido que se le agregó durante el procedimiento (buffers, sustrato FDA y el solvente para detener la reacción).

Las curvas de calibrado obtenidas para ambas técnicas se muestran en la Figura 3.5. Para las mediciones en el *FDA-chip* las celdas del dispositivo se cargaron de la siguiente manera: celda 1, buffer; celdas 2 y 3, se completan con el mismo estándar. Se tomaron fotos de cada estándar con *appuente* por triplicado. Es por eso que se obtuvieron seis mediciones de cada estándar evaluado. Como puede observarse, el procesamiento colorimétrico realizado por *FDA reader* permitió la obtención de una curva de calibrado en el mismo rango de concentraciones de F que el obtenido por la TC.

### 3.4.2. Muestras de suelo

Los resultados obtenidos del análisis de las muestras de suelo se presentan en la Tabla 3.2. El error relativo porcentual ( $\epsilon_R$  (%)) entre ambos métodos presenta variaciones menores al 10 % para S2 y S3, lo cual demuestra que el acuerdo es muy satisfactorio. Sin embargo, se observa una notable diferencia en el valor de hidrólisis del FDA obtenido para S1. Esta disparidad podría deberse a diversos factores, como la posible disminución de sensibilidad del método propuesto ante valores bajos de F, o a un filtrado ineficiente que resulta en un procesamiento incorrecto de los resultados. Estos aspectos deben ser analizados en mayor profundidad para obtener una comprensión más exhaustiva.

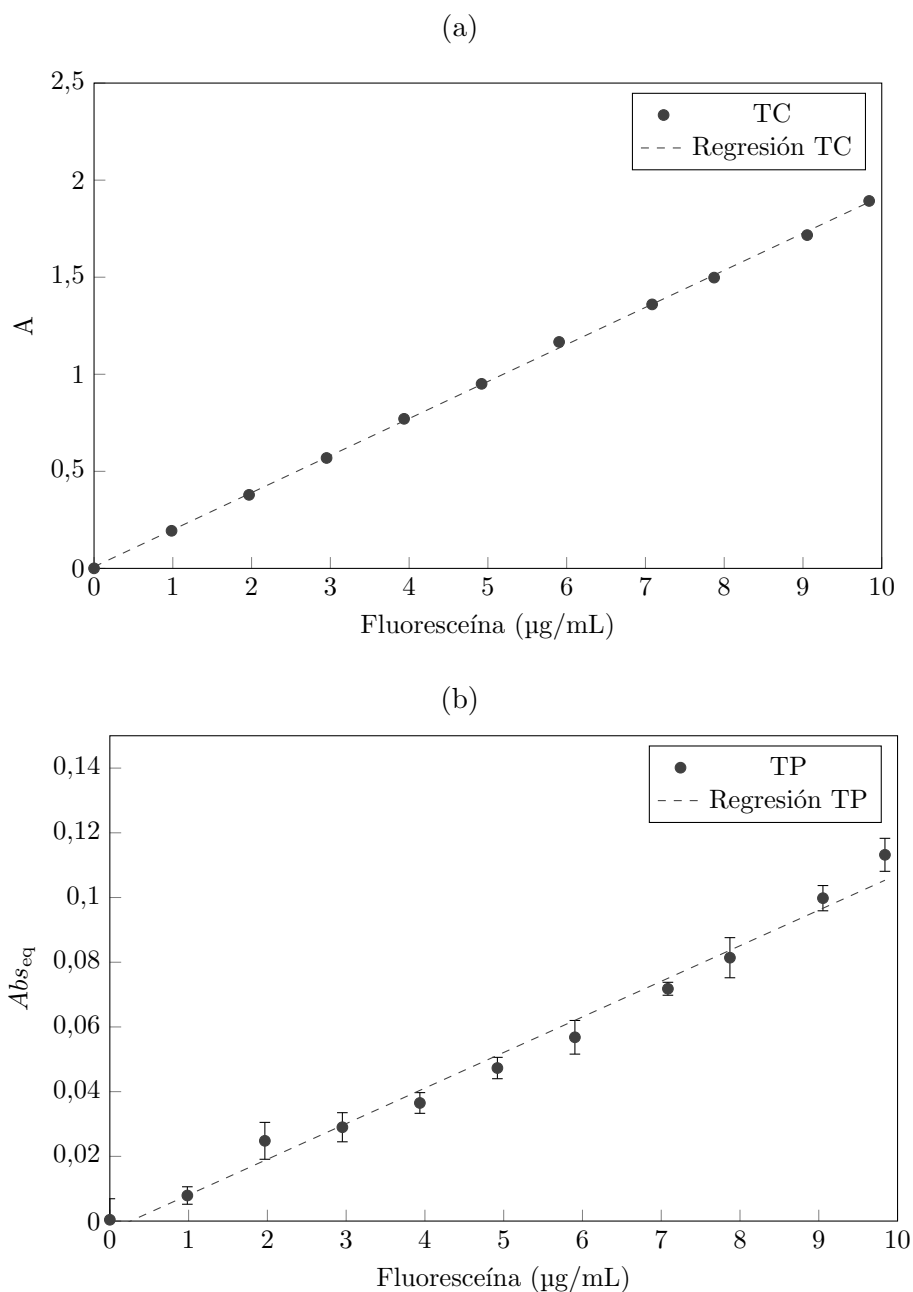


Figura 3.5: Curvas de calibrado obtenidas para el cálculo de la concentración de F en el filtrado. (a) Ecuación para la TC:  $A = 0,191 \cdot F + 0,008$ . Coeficiente de correlación:  $R^2 = 0,99$ . (b) Ecuación para la TP:  $A = 0,011 \cdot F - 0,003$ . Coeficiente de correlación:  $R^2 = 0,98$ . Las barras de error corresponden al DE (n=6).

### 3.4.3. Monitoreo de biolechos

Los resultados obtenidos en las muestras de los biolechos empleando la TC y la TP se muestran en la Tabla 3.2. El error relativo porcentual entre ambas técnicas no supera el 20% en todos los casos, lo cual es un resultado razonable si se tiene en cuenta la variabilidad inherente a este tipo de ensayos.

Tabla 3.1: Resultados obtenidos para las muestras de suelo.

Muestra	Hidrólisis del FDA ( $\mu\text{g/g/h}$ )		$\epsilon_R(\%)$
	TC	TP	
S1	$18 \pm 1$	$29 \pm 1$	61 %
S2	$49 \pm 2$	$45 \pm 2$	8 %
S3	$33 \pm 1$	$34 \pm 1$	-3 %

<sup>a</sup> Valor  $\pm$  DE, n=3

Tabla 3.2: Resultados obtenidos para las muestras de biolechos.

Caja	Día	Hidrólisis del FDA ( $\mu\text{g/g/h}$ )		$\epsilon_R(\%)$
		TC	TP	
I	0	$61 \pm 1$	$53 \pm 2$	-13 %
I	90	$39 \pm 6$	$42 \pm 4$	10 %
II	0	$100 \pm 8$	$80 \pm 2$	-20 %
II	90	$49 \pm 2$	$59 \pm 8$	20 %

<sup>a</sup> Valor  $\pm$  DE, n=2

### 3.5. Conclusiones

Se desarrolló una plataforma portátil para la medición de la actividad hidrolítica en muestras de suelo que consiste en el dispositivo *FDA-chip* integrado a la telefonía móvil mediante *FDA reader*. Su implementación fue validada empleando muestras de suelo y de biolechos. La característica principal del sistema propuesto es que prescinde del uso de equipamiento, por lo tanto la determinación de la actividad hidrolítica no depende de las instalaciones provistas por un laboratorio.

El filtrado de la muestra se realiza *in situ* a través de un acople que contiene un pistón de algodón, sin requerir de una centrífuga de mesada. El análisis de las imágenes tomadas mediante *appuente* evita el uso de un espectrofotómetro para medir la absorbancia de las muestras coloreadas. Adicionalmente, la plataforma desarrollada permite disminuir el costo y el tiempo total de los ensayos porque se simplifican los pasos respecto a la técnica convencional, se omite el agregado de un solvente orgánico, se integran la toma y el procesamiento de datos, y el informe de resultados se realiza de manera automática. Estas características la convierten en una herramienta novedosa y muy eficiente para el monitoreo ambiental.

# Conclusiones

En esta Tesis, se presentaron plataformas para la realización de ensayos de detección correspondientes a diferentes indicadores de contaminación. Las plataformas están constituidas por dispositivos acoplados a la telefonía móvil.

Se desarrollaron tres dispositivos para el análisis de parámetros biológicos que resultan de interés para el monitoreo ambiental de agua y suelos. Mediante estrategias innovadoras de detección, se diseñaron sistemas capaces de sustituir las técnicas analíticas convencionales que poseen una excelente sensibilidad pero que, por su alta demanda técnica e instrumental, requieren el transporte de las muestras hasta un laboratorio especializado para ser procesadas. Se concretaron diseños adecuados que lograron reproducir los microambientes requeridos para la obtención de datos confiables. En cuanto a la fabricación de los dispositivos, se realizó a escala laboratorio empleando diferentes técnicas de microfabricación y se obtuvieron bajos costos de producción. Además, se emplearon materiales biocompatibles y se lograron diseños compactos. Por otra parte, el diseño consideró no solo la disminución o supresión de reactivos sino también la reutilización de los sistemas de detección. Tal es así que las partes que deben reemplazarse entre un análisis y otro, se disminuyeron al mínimo posible.

El desarrollo de cada dispositivo cumplió con una etapa de evaluación exhaustiva de los prototipos que permitió validar los materiales seleccionados y optimizar los diseños con el objetivo de prescindir de equipamiento de laboratorio y de simplificar el procedimiento. Las evaluaciones se realizaron con muestras ambientales reales y en diferentes condiciones experimentales, y se obtuvieron rangos de trabajo adecuados para las aplicaciones propuestas.

Los dispositivos se integraron a la telefonía móvil. En todos los casos, los datos fueron obtenidos a partir de imágenes tomadas con teléfonos celulares, sin necesidad de acoples o fuentes específicas de luz. El procesamiento de los datos se automatizó en un programa desarrollado en Python o mediante la integración a *appuente*, lo que permitió disminuir considerablemente el costo operativo.

Las ventajas son notables: las plataformas permiten realizar las determinaciones en el sitio de muestreo para obtener información relevante sobre indicadores de contaminación que originalmente requieren de técnicas de análisis costosas. La disminución de la demanda instrumental, sumado a la automatización provista por el acople a la telefonía móvil, da como resultado herramientas portátiles de monitoreo ambiental.

Sin embargo, se vislumbran otros desafíos, tanto científicos como tecnológicos. En cuanto al primero, resultaría necesario seguir trabajando en el desarrollo de algoritmos más avanzados para procesar los datos de las imágenes. Si bien los algoritmos utilizados en la Tesis permitieron la detección de los diferentes parámetros, aún se pueden mejorar para aumentar la precisión y reducir los errores en la detección. Además, resulta interesante la generación de plataformas integradas que permitan realizar varios análisis en simultáneo, incluso de indicadores de otra naturaleza, como los físicos y químicos, para poder obtener



información más completa del ecosistema en estudio. Por otra parte, resulta fundamental la integración de las plataformas con sistemas de información geográfica de entidades e instituciones reguladoras, para la generación de mapas dinámicos de la calidad del agua y suelos. Esto permitiría obtener una visión más amplia del estado ambiental de la zona de estudio y ayudaría en la toma de decisiones para la gestión ambiental. En cuanto a los desafíos tecnológicos, resulta importante mejorar la estandarización en la producción de los reactivos y aumentar la estabilidad de los mismos para asegurar la fiabilidad y consistencia de los ensayos. Resolver estos desafíos es crucial para permitir la producción masiva de estas plataformas y garantizar su acceso y utilidad en diversos contextos de monitoreo ambiental.

# Bibliografía

- Abhilash, P. & Singh, N. (2009). Pesticide use and application: an indian scenario. *Journal of Hazardous Materials*, 165(1-3), 1–12 <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.10.061>.
- Adam, G. & Duncan, H. (2001). Development of a sensitive and rapid method for the measurement of total microbial activity using fluorescein diacetate (FDA) in a range of soils. *Soil biology and biochemistry*, 33(7-8), 943–951 [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(00\)00244-3](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(00)00244-3).
- Ahmed, S., Bui, M.-P. N., & Abbas, A. (2016). Paper based chemical and biological sensors: Engineering aspects. *Biosensors and Bioelectronics*, 77, 249–263 <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.09.038>.
- Ahrens, J., Geveci, B., & Law, C. (2005). ParaView: An end-user tool for large data visualization. *The visualization handbook*, 717(8).
- Alfonso, L.-F., Germán, G. V., del Carmen, P. C. M., & Hossein, G. (2017). Adsorption of organophosphorus pesticides in tropical soils: The case of karst landscape of northwestern Yucatan. *Chemosphere*, 166, 292–299 <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.09.109>.
- Alvarez, M., Du Mortier, C., Jaureguiberry, S., & Venturino, A. (2019). Joint probabilistic analysis of risk for aquatic species and exceedence frequency for the agricultural use of chlorpyrifos in the Pampean region, Argentina. *Environmental toxicology and chemistry*, 38(8), 1748–1755 <https://doi.org/10.1002/etc.4441>.
- Amendola, V., Pilot, R., Frascioni, M., Maragò, O. M., & Iatì, M. A. (2017). Surface plasmon resonance in gold nanoparticles: a review. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 29(20), 203002.
- Arora, S. & Sahni, D. (2016). Pesticides effect on soil microbial ecology and enzyme activity-an overview. *Journal of Applied and Natural Science*, 8(2), 1126–1132 <https://doi.org/10.31018/jans.v8i2.929>.
- Ayardulabi, R., Khamespanah, E., Abbasinia, S., & Ehtesabi, H. (2021). Point-of-care applications of smartphone-based microscopy. *Sensors and Actuators A: Physical*, 331, 113048 <https://doi.org/10.1016/j.sna.2021.113048>.
- Bagur-González, M. G., Estepa-Molina, C., Martín-Peinado, F., & Morales-Ruano, S. (2011). Toxicity assessment using *Lactuca sativa* L. bioassay of the metal (loid) s As, Cu, Mn, Pb and Zn in soluble-in-water saturated soil extracts from an abandoned mining site. *Journal of soils and sediments*, 11(2), 281–289 <https://doi.org/10.1007/s11368-010-0285-4>.

- Bala, R., Dhingra, S., Kumar, M., Bansal, K., Mittal, S., Sharma, R. K., & Wangoo, N. (2017). Detection of organophosphorus pesticide—malathion in environmental samples using peptide and aptamer based nanoprobe. *Chemical Engineering Journal*, *311*, 111–116 <https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.11.070>.
- Baude, M., Meyer, B. C., & Schindewolf, M. (2019). Land use change in an agricultural landscape causing degradation of soil based ecosystem services. *Science of the Total Environment*, *659*, 1526–1536 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.12.455>.
- Belz, R. G. & Duke, S. O. (2014). Herbicides and plant hormesis. *Pest management science*, *70*(5), 698–707 <https://doi.org/10.1002/ps.3726>.
- Benedetto, A., Klasman, R., & Boschi, C. (2004). Use of river waste in growing media for ornamental herbaceous perennials. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, *79*(1), 119–124 <https://doi.org/10.1080/14620316.2004.11511723>.
- Bindraban, P. S., et al. (2012). Assessing the impact of soil degradation on food production. *Current Opinion in Environmental Sustainability*, *4*(5), 478–488. Terrestrial systems <https://doi.org/10.1016/j.cosust.2012.09.015>.
- Bordbar, M. M., Sheini, A., Hashemi, P., Hajian, A., & Bagheri, H. (2021). Disposable paper-based biosensors for the point-of-care detection of hazardous contaminations—A Review. *Biosensors*, *11*(9), 316 <https://doi.org/10.3390/bios11090316>.
- Borrelli, P., et al. (2017). An assessment of the global impact of 21st century land use change on soil erosion. *Nature communications*, *8*(1), 2013 <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02142-7>.
- Bortolheiro, F. P. d. A. P., Brunelli-Nascentes, M. C., Boaro, C. S. F., & Silva, M. d. A. (2021). Can low doses of glyphosate stimulate common bean growth? *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, *56*(2), 150–162 <https://doi.org/10.1080/03601234.2020.1853456>.
- Bradski, G. (2000). The OpenCV Library. *Dr. Dobb's Journal*, *25*, 120–126.
- Carrilho, E., Martinez, A. W., & Whitesides, G. M. (2009). Understanding wax printing: a simple micropatterning process for paper-based microfluidics. *Analytical chemistry*, *81*(16), 7091–7095 <https://doi.org/10.1021/ac901071p>.
- Castillo, M. D. P., Torstensson, L., & Stenström, J. (2008). Biobeds for environmental protection from pesticide use: A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*(15), 6206–6219 <https://doi.org/10.1021/jf800844x>.
- Cate, D. M., Adkins, J. A., Mettakoonpitak, J., & Henry, C. S. (2015). Recent developments in paper-based microfluidic devices. *Analytical chemistry*, *87*(1), 19–41 <https://doi.org/10.1021/ac503968p>.
- Chan, C.-W., et al. (2021). “barcode” cell sensor microfluidic system: Rapid and sample-to-answer antimicrobial susceptibility testing applicable in resource-limited conditions. *Biosensors and Bioelectronics*, *192*, 113516 <https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.113516>.

- Chen, G.-H., Chen, W.-Y., Yen, Y.-C., Wang, C.-W., Chang, H.-T., & Chen, C.-F. (2014). Detection of mercury (II) ions using colorimetric gold nanoparticles on paper-based analytical devices. *Analytical Chemistry*, *86*(14), 6843–6849 <https://doi.org/10.1021/ac5008688>.
- Chen, J., Chen, X., Wang, P., Liu, S., & Chi, Z. (2021). Aggregation-induced emission luminogen@manganese dioxide core-shell nanomaterial-based paper analytical device for equipment-free and visual detection of organophosphorus pesticide. *Journal of Hazardous Materials*, *413*, 125306 <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125306>.
- Cheng, N., et al. (2018). Aptasensor based on fluorophore-quencher nano-pair and smartphone spectrum reader for on-site quantification of multi-pesticides. *Biosensors and Bioelectronics*, *117*, 75–83 <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.06.002>.
- Chowdhury, A., Pradhan, S., Saha, M., & Sanyal, N. (2008). Impact of pesticides on soil microbiological parameters and possible bioremediation strategies. *Indian Journal of microbiology*, *48*, 114–127 <https://doi.org/10.1007/s12088-008-0011-8>.
- Chung, S., et al. (2021). Norovirus detection in water samples at the level of single virus copies per microliter using a smartphone-based fluorescence microscope. *Nature Protocols*, *16*(3), 1452–1475 <https://doi.org/10.1038/s41596-020-00460-7>.
- Chung, S.-s. & Brooks, B. W. (2019). Identifying household pharmaceutical waste characteristics and population behaviors in one of the most densely populated global cities. *Resources, Conservation and Recycling*, *140*, 267–277 <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2018.09.024>.
- Citartan, M. & Tang, T.-H. (2019). Recent developments of aptasensors expedient for point-of-care (POC) diagnostics. *Talanta*, *199*, 556–566 <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.02.066>.
- Clark, N. M., et al. (2020). Novel imaging modalities shedding light on plant biology: Start small and grow big. *Annual review of plant biology*, *71*, 789–816 <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050718-100038>.
- Coppola, L., Castillo, M. d. P., Monaci, E., & Vischetti, C. (2007). Adaptation of the biobed composition for chlorpyrifos degradation to southern europe conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*(2), 396–401 <https://doi.org/10.1021/jf062744n>.
- Crivoi, A. & Duan, F. (2013). Elimination of the coffee-ring effect by promoting particle adsorption and long-range interaction. *Langmuir*, *29*(39), 12067–12074 <https://doi.org/10.1021/la402544x>.
- Daniel, C., Mélaïne, F., Roupioz, Y., Livache, T., & Buhot, A. (2013). Real time monitoring of thrombin interactions with its aptamers: insights into the sandwich complex formation. *Biosensors and Bioelectronics*, *40*(1), 186–192 <https://doi.org/10.1016/j.bios.2012.07.016>.
- Deegan, R. D., Bakajin, O., Dupont, T. F., Huber, G., Nagel, S. R., & Witten, T. A. (1997). Capillary flow as the cause of ring stains from dried liquid drops. *Nature*, *389*(6653), 827–829 <https://doi.org/10.1038/39827>.

- Desmet, N., Touchant, K., Seuntjens, P., Tang, T., & Bronders, J. (2016). A hybrid monitoring and modelling approach to assess the contribution of sources of glyphosate and ampa in large river catchments. *Science of The Total Environment*, *573*, 1580–1588.
- Dias, L. d. A., Gebler, L., Niemeyer, J. C., & Itako, A. T. (2020). Destination of pesticide residues on biobeds: State of the art and future perspectives in latin america. *Chemosphere*, *248*, 126038 <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126038>.
- Dick, R. P. (1994). Soil enzyme activities as indicators of soil quality. *Defining soil quality for a sustainable environment*, *35*, 107–124 <https://doi.org/10.2136/sssaspecpub35.c7>.
- Doran, J. W. & Zeiss, M. R. (2000). Soil health and sustainability: managing the biotic component of soil quality. *Applied soil ecology*, *15*(1), 3–11 [https://doi.org/10.1016/S0929-1393\(00\)00067-6](https://doi.org/10.1016/S0929-1393(00)00067-6).
- D'Surney, S. J. & Smith, M. D. (2005). Chemicals of environmental concern. In P. Wexler (Ed.), *Encyclopedia of Toxicology (Second Edition)* (pp. 526–530). New York: Elsevier, second edition edition <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B0123694000002064>.
- Ekelund, N. G. & Häder, D.-P. (2018). Environmental monitoring using bioassays. In *Bioassays* (pp. 419–437). Elsevier <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811861-0.00021-8>.
- Elizalde, E., Urteaga, R., & Berli, C. L. A. (2015). Rational design of capillary-driven flows for paper-based microfluidics. *Lab on a Chip*, *15*(10), 2173–2180 <https://doi.org/10.1039/C4LC01487A>.
- Ellington, A. D. & Szostak, J. W. (1990). In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*, *346*(6287), 818–822 <https://doi.org/10.1038/346818a0>.
- Erickson, D., et al. (2014). Smartphone technology can be transformative to the deployment of lab-on-chip diagnostics. *Lab on a Chip*, *14*(17), 3159–3164 <https://doi.org/10.1039/C4LC00142G>.
- Etchegoyen, M. A., Ronco, A. E., Almada, P., Abelando, M., & Marino, D. (2017). Occurrence and fate of pesticides in the Argentine stretch of the Paraguay-Paraná basin. *Environmental monitoring and assessment*, *189*(2), 63 <https://doi.org/10.1007/s10661-017-5773-1>.
- Fang, Z., Wu, W., Lu, X., & Zeng, L. (2014). Lateral flow biosensor for DNA extraction-free detection of salmonella based on aptamer mediated strand displacement amplification. *Biosensors and Bioelectronics*, *56*, 192–197 <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.01.015>.
- Farré, M. & Barceló, D. (2003). Toxicity testing of wastewater and sewage sludge by biosensors, bioassays and chemical analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *22*(5), 299–310 [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(03\)00504-1](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(03)00504-1).
- Feng, C.-Y., Wei, J.-F., Li, Y.-J., Yang, Y.-S., Wang, Y.-H., Lu, L., & Zheng, G.-X. (2016). An on-chip pollutant toxicity determination based on marine microalgal swimming inhibition. *Analyst*, *141*(5), 1761–1771 <https://doi.org/10.1039/C5AN02384J>.

- Ferreira, C. S., Seifollahi-Aghmiuni, S., Destouni, G., Ghajarnia, N., & Kalantari, Z. (2022). Soil degradation in the European Mediterranean region: Processes, status and consequences. *Science of The Total Environment*, *805*, 150106, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150106>.
- Figueredo, F., Abrevaya, X. C., & Cortón, E. (2015). A new *P. putida* instrumental toxicity bioassay. *Environmental Monitoring and Assessment*, *187*, 1–13 <https://doi.org/10.1007/s10661-015-4499-1>.
- Filip, Z. (2002). International approach to assessing soil quality by ecologically-related biological parameters. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, *88*(2), 169–174 [https://doi.org/10.1016/S0167-8809\(01\)00254-7](https://doi.org/10.1016/S0167-8809(01)00254-7).
- Fu, J., An, X., Yao, Y., Guo, Y., & Sun, X. (2019a). Electrochemical aptasensor based on one step co-electrodeposition of aptamer and GO-CuNPs nanocomposite for organophosphorus pesticide detection. *Sensors and Actuators B: Chemical*, *287*, 503–509 <https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.02.057>.
- Fu, Q., et al. (2019b). Ambient light sensor based colorimetric dipstick reader for rapid monitoring organophosphate pesticides on a smart phone. *Analytica Chimica Acta*, *1092*, 126–131 <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.09.059>.
- Futane, A., Narayanamurthy, V., Jadhav, P., & Srinivasan, A. (2023). Aptamer-based rapid diagnosis for point-of-care application. *Microfluidics and Nanofluidics*, *27*(2), 15 <https://doi.org/10.1007/s10404-022-02622-3>.
- Gil-Sotres, F., Trasar-Cepeda, C., Leirós, M., & Seoane, S. (2005). Different approaches to evaluating soil quality using biochemical properties. *Soil biology and biochemistry*, *37*(5), 877–887 <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.10.003>.
- Gopalan, H. (1999). Ecosystem health and human well being: the mission of the international programme on plant bioassays. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, *426*(2), 99–102 [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(99\)00048-2](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(99)00048-2).
- Gopinath, S. C., LakshmiPriya, T., & Awazu, K. (2014). Colorimetric detection of controlled assembly and disassembly of aptamers on unmodified gold nanoparticles. *Biosensors and Bioelectronics*, *51*, 115–123 <https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.07.037>.
- Green, V. S., Stott, D. E., & Diack, M. (2006). Assay for fluorescein diacetate hydrolytic activity: optimization for soil samples. *Soil Biology and Biochemistry*, *38*(4), 693–701 <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2005.06.020>.
- Grossmann, G., Guo, W.-J., Ehrhardt, D. W., Frommer, W. B., Sit, R. V., Quake, S. R., & Meier, M. (2011). The RootChip: an integrated microfluidic chip for plant science. *The plant cell*, *23*(12), 4234–4240 <https://doi.org/10.1105/tpc.111.092577>.
- Harrison, D. J., Manz, A., Fan, Z., Luedi, H., & Widmer, H. M. (1992). Capillary electrophoresis and sample injection systems integrated on a planar glass chip. *Analytical chemistry*, *64*(17), 1926–1932.

- Hillel, D. & Hatfield, J. L. (2005). *Encyclopedia of Soils in the Environment*, volume 3. Elsevier Amsterdam.
- Hou, X., et al. (2017). Interplay between materials and microfluidics. *Nature Reviews Materials*, 2(5), 1–15 <https://doi.org/10.1038/natrevmats.2017.16>.
- Huang, W., Wang, Y., Wang, L., Pan, C., & Shen, G. (2021). Colorimetric detection of ciprofloxacin in aqueous solution based on an unmodified aptamer and the aggregation of gold nanoparticles. *Analytical Methods*, 13(1), 90–98 <https://doi.org/10.3390/molecules23092313>.
- Huang, Y., Xiao, L., Li, F., Xiao, M., Lin, D., Long, X., & Wu, Z. (2018). Microbial degradation of pesticide residues and an emphasis on the degradation of cypermethrin and 3-phenoxy benzoic acid: a review. *Molecules*, 23(9), 2313 <https://doi.org/10.3390/molecules23092313>.
- Huete-Soto, A., Masís-Mora, M., Lizano-Fallas, V., Chin-Pampillo, J. S., Carazo-Rojas, E., & Rodríguez-Rodríguez, C. E. (2017). Simultaneous removal of structurally different pesticides in a biomixture: detoxification and effect of oxytetracycline. *Chemosphere*, 169, 558–567 <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.11.106>.
- Humphrey, W., Dalke, A., & Schulten, K. (1996). VMD: visual molecular dynamics. *Journal of molecular graphics*, 14(1), 33–38 [https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5).
- Hunter, R. J. (2013). *Zeta potential in colloid science: principles and applications*, volume 2. Academic press.
- Illingworth, J. & Kittler, J. (1987). The adaptive hough transform. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, PAMI-9(5), 690–698 <https://doi.org/10.1109/tpami.1987.4767964>.
- IRAM (2008). Environmental quality - biological methods. acute toxicity test method with lettuce seeds (*Lactuca sativa* L.). method on paper. *Instituto Argentino de Normalización y Certificación*, 29114.
- Islam, S., Shukla, S., Bajpai, V. K., Han, Y.-K., Huh, Y. S., Ghosh, A., & Gandhi, S. (2019). Microfluidic-based graphene field effect transistor for femtomolar detection of chlorpyrifos. *Scientific Reports*, 9(1), 1–7 <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36746-w>.
- ISO (2012). Soil quality—determination of the effects of pollutants on soil flora—part 2: Effects of contaminated soil on the emergence and early growth of higher plants. *International Organization for Standardization*. U.S. Environmental Protection Agency, 11269-2.
- Jiao, Y., Hou, W., Fu, J., Guo, Y., Sun, X., Wang, X., & Zhao, J. (2017). A nanostructured electrochemical aptasensor for highly sensitive detection of chlorpyrifos. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 243, 1164–1170 <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.12.106>.

- Jiao, Y., Jia, H., Guo, Y., Zhang, H., Wang, Z., Sun, X., & Zhao, J. (2016). An ultrasensitive aptasensor for chlorpyrifos based on ordered mesoporous carbon/ferrocene hybrid multiwalled carbon nanotubes. *RSC Advances*, *6*(63), 58541–58548 <https://doi.org/10.1039/C6RA07735H>.
- Johnson, D. L., et al. (1997). Meanings of environmental terms. *Journal of environmental quality*, *26*(3), 581–589 <https://doi.org/10.2134/jeq1997.00472425002600030002x>.
- Justino, C. I. L., Duarte, A. C., & Rocha-Santos, T. A. P. (2017). Recent progress in biosensors for environmental monitoring: A review. *Sensors*, *17*(12), 2918 <https://doi.org/10.3390/s17122918>.
- Kalyabina, V. P., Esimbekova, E. N., Kopylova, K. V., & Kratasyuk, V. A. (2021). Pesticides: formulants, distribution pathways and effects on human health—a review. *Toxicology reports*, *8*, 1179–1192 <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2021.06.004>.
- Karlen, D. L., Mausbach, M., Doran, J. W., Cline, R., Harris, R., & Schuman, G. (1997). Soil quality: a concept, definition, and framework for evaluation (a guest editorial). *Soil Science Society of America Journal*, *61*(1), 4–10 <https://doi.org/10.2136/sssaj1997.03615995006100010001x>.
- Katagi, T. (2006). Behavior of pesticides in water-sediment systems. In *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* (pp. 133–251). Springer [https://doi.org/10.1007/0-387-32885-8\\_4](https://doi.org/10.1007/0-387-32885-8_4).
- Kim, H. J., Kim, Y., Park, S. J., Kwon, C., & Noh, H. (2018). Development of colorimetric paper sensor for pesticide detection using competitive-inhibiting reaction. *BioChip Journal*, *12*(4), 326–331 <https://doi.org/10.1007/s13206-018-2404-z>.
- Kim, S. H., Thoa, T. T. T., & Gu, M. B. (2019). Aptasensors for environmental monitoring of contaminants in water and soil. *Current Opinion in Environmental Science & Health*, *10*, 9–21 <https://doi.org/10.1016/j.coesh.2019.09.003>.
- Kumar, P., Kim, K.-H., & Deep, A. (2015). Recent advancements in sensing techniques based on functional materials for organophosphate pesticides. *Biosensors and Bioelectronics*, *70*, 469–481 <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.03.066>.
- Kumar, S., et al. (2014). Long-term tillage and drainage influences on soil organic carbon dynamics, aggregate stability and corn yield. *Soil Science and Plant Nutrition*, *60*(1), 108–118 <https://doi.org/10.1080/00380768.2013.878643>.
- Kung, C.-T., Hou, C.-Y., Wang, Y.-N., & Fu, L.-M. (2019). Microfluidic paper-based analytical devices for environmental analysis of soil, air, ecology and river water. *Sensors and Actuators B: Chemical*, *301*, 126855 <https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.126855>.
- Kunkel, H. G. & Tiselius, A. (1951). Electrophoresis of proteins on filter paper. *The Journal of general physiology*, *35*(1), 89–118 <https://doi.org/10.1085/jgp.35.1.89>.



- Kwon, Y. S., Nguyen, V.-T., Park, J. G., & Gu, M. B. (2015). Detection of iprobenfos and edifenphos using a new multi-aptasensor. *Analytica chimica acta*, 868, 60–66 <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.02.020>.
- Langer, J., Novikov, S. M., & Liz-Marzán, L. M. (2015). Sensing using plasmonic nanostructures and nanoparticles. *Nanotechnology*, 26(32), 322001 <https://doi.org/10.1088/0957-4484/26/32/322001>.
- Lei, Z.-j., Zhang, C.-z., Liu, Y., Wang, L., Hu, Q.-h., & Liu, X.-j. (2012). Selection of chlorpyrifos-binding ssDNA aptamer by SELEX. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 1, 35.
- Lepori, E. C. V., Mitre, G. B., & Nassetta, M. (2013). Situación actual de la contaminación por plaguicidas en argentina. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 29, 25–43 <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=37028958002>.
- Lescano, M., Fussoni, N., Vidal, E., & Zalazar, C. (2022). Biodegradation of pesticide-contaminated wastewaters from a formulation plant employing a pilot scale biobed. *Science of The Total Environment*, 807, 150758 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150758>.
- Lescano, M. R., Masin, C. E., Rodríguez, A. R., Godoy, J. L., & Zalazar, C. S. (2020). Earthworms to improve glyphosate degradation in biobeds. *Environmental Science and Pollution Research*, 27, 27023–27031 <https://doi.org/10.1007/s11356-020-09002-w>.
- Lescano, M. R., Pizzul, L., Castillo, M., & Zalazar, C. S. (2018). Glyphosate and aminomethylphosphonic acid degradation in biomixtures based on alfalfa straw, wheat stubble and river waste. *Journal of environmental management*, 228, 451–457 <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.09.009>.
- Li, D. (2008). *Encyclopedia of microfluidics and nanofluidics*. Springer Science & Business Media.
- Li, H. & Rothberg, L. (2004). Colorimetric detection of DNA sequences based on electrostatic interactions with unmodified gold nanoparticles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(39), 14036–14039 <https://doi.org/10.1073/pnas.0406115101>.
- Li, L., Li, B., Qi, Y., & Jin, Y. (2009). Label-free aptamer-based colorimetric detection of mercury ions in aqueous media using unmodified gold nanoparticles as colorimetric probe. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 393(8), 2051–2057 <https://doi.org/10.1007/s00216-009-2640-0>.
- Li, Y., Zhao, Z., Lam, M. L., Liu, W., Yeung, P. P., Chieng, C.-C., & Chen, T.-H. (2015). Hybridization-induced suppression of coffee ring effect for nucleic acid detection. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 206, 56–64 <https://doi.org/10.1016/j.snb.2014.09.006>.
- Liendro, N., Ferrari, A., Mardirosian, M., Lescano, C. I., & Venturino, A. (2015). Toxicity of the insecticide chlorpyrifos to the South American toad *Rhinella arenarum* at larval developmental stage. *Environmental toxicology and pharmacology*, 39(2), 525–535 <https://doi.org/10.1016/j.etap.2014.12.022>.

- Liu, D., Chen, W., Wei, J., Li, X., Wang, Z., & Jiang, X. (2012). A highly sensitive, dual-readout assay based on gold nanoparticles for organophosphorus and carbamate pesticides. *Analytical chemistry*, *84*(9), 4185–4191 <https://doi.org/10.1021/ac300545p>.
- Liu, J., et al. (2020). Three-dimensional mesoporous dendritic fibrous nanosilica as a highly efficient DNA amplification platform for ultrasensitive detection of chlorpyrifos residues. *Sensors and Actuators B: Chemical*, *319*, 128246 <https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.128246>.
- Liu, L., Tang, J., Zhong, G., Zhen, X., Pan, X., & Tian, C. (2018). Spatial distribution and seasonal variation of four current-use pesticides (CUPs) in air and surface water of the bohai sea, china. *Science of the Total Environment*, *621*, 516–523.
- Liu, M., Khan, A., Wang, Z., Liu, Y., Yang, G., Deng, Y., & He, N. (2019). Aptasensors for pesticide detection. *Biosensors and Bioelectronics*, *130*, 174–184 <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.01.006>.
- Liu, S., Zheng, Z., & Li, X. (2013). Advances in pesticide biosensors: current status, challenges, and future perspectives. *Analytical and bioanalytical chemistry*, *405*(1), 63–90 <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6299-6>.
- Lu, Y., Shi, W., Qin, J., & Lin, B. (2009). Low cost, portable detection of gold nanoparticle-labeled microfluidic immunoassay with camera cell phone. *Electrophoresis*, *30*(4), 579–582 <https://doi.org/10.1002/elps.200800586>.
- Lyu, J., et al. (2018). Testing the toxicity of metals, phenol, effluents, and receiving waters by root elongation in *Lactuca sativa* L. *Ecotoxicology and environmental safety*, *149*, 225–232 <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.11.006>.
- Macagno, J., Gerlero, G. S., Satuf, M. L., & Berli, C. L. (2023). Field-deployable aptasensor with automated analysis of stain patterns for the detection of chlorpyrifos in water. *Talanta*, *252*, 123782 <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2022.123782>.
- Macagno, J., Lescano, M. R., & Berli, C. L. A. (2019). Milli-channel array for direct and quick reading of root elongation bioassays. *Ecotoxicology and environmental safety*, *178*, 51–57 <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.04.020>.
- Majdinasab, M., Daneshi, M., & Marty, J. L. (2021). Recent developments in non-enzymatic (bio) sensors for detection of pesticide residues: Focusing on antibody, aptamer and molecularly imprinted polymer. *Talanta*, *232*, 122397 <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122397>.
- Mampallil, D. & Eral, H. B. (2018). A review on suppression and utilization of the coffee-ring effect. *Advances in Colloid and Interface Science*, *252*, 38–54 <https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.12.008>.
- Manz, A., Harrison, D. J., Verpoorte, E. M., Fettinger, J. C., Paulus, A., Lüdi, H., & Widmer, H. M. (1992). Planar chips technology for miniaturization and integration of separation techniques into monitoring systems: capillary electrophoresis on a chip. *Journal of Chromatography A*, *593*(1-2), 253–258 [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(92\)80293-4](https://doi.org/10.1016/0021-9673(92)80293-4).

- Markert, B., Kayser, G., Korhammer, S., & Oehlmann, J. (2000). Distribution and effects of trace substances in soils, plants and animals. In *Trace Metals in the Environment*, volume 4 (pp. 3–31). Elsevier [https://doi.org/10.1016/S0927-5215\(00\)80004-1](https://doi.org/10.1016/S0927-5215(00)80004-1).
- Martinez, A. W., Phillips, S. T., Butte, M. J., & Whitesides, G. M. (2007). Patterned paper as a platform for inexpensive, low-volume, portable bioassays. *Angewandte Chemie*, *119*(8), 1340–1342 <https://doi.org/10.1002/ange.200603817>.
- Martinez, A. W., Phillips, S. T., Carrilho, E., Thomas III, S. W., Sindi, H., & Whitesides, G. M. (2008). Simple telemedicine for developing regions: camera phones and paper-based microfluidic devices for real-time, off-site diagnosis. *Analytical chemistry*, *80*(10), 3699–3707.
- Masin, C. E., Lescano, M. R., Rodríguez, A. R., Godoy, J. L., & Zalazar, C. S. (2018). Earthworms to assess the innocuousness of spent biomixtures employed for glyphosate degradation. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, *53*(8), 519–525 <https://doi.org/10.1080/03601234.2018.1462922>.
- Mateo-Sagasta, J., Zadeh, S. M., Turrall, H., & Burke, J. (2017). Water pollution from agriculture: a global review. Executive summary.
- McConnell, E. M., Nguyen, J., & Li, Y. (2020). Aptamer-based biosensors for environmental monitoring. *Frontiers in chemistry*, *8*, 434 <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.00434>.
- McCracken, K. E. & Yoon, J.-Y. (2016). Recent approaches for optical smartphone sensing in resource-limited settings: a brief review. *Analytical Methods*, *8*(36), 6591–6601 <https://doi.org/10.1039/C6AY01575A>.
- Menger, R. F., Bontha, M., Beveridge, J. R., Borch, T., & Henry, C. S. (2020). Fluorescent dye paper-based method for assessment of pesticide coverage on leaves and trees: a citrus grove case study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *68*(47), 14009–14014 <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c01835>.
- Meredith, N. A., Quinn, C., Cate, D. M., Reilly, T. H., Volckens, J., & Henry, C. S. (2016). Paper-based analytical devices for environmental analysis. *Analyst*, *141*(6), 1874–1887 <https://doi.org/10.1039/C5AN02572A>.
- Mestre, A. P., Amavet, P. S., Vanzetti, A. I., Moleón, M. S., Marcó, M. V. P., Poletta, G. L., & Siroski, P. A. (2019). Effects of cypermethrin (pyrethroid), glyphosate and chlorpyrifos (organophosphorus) on the endocrine and immune system of *Salvator merianae* (Argentine tegu). *Ecotoxicology and environmental safety*, *169*, 61–67 <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.10.057>.
- Mora, M. F., Garcia, C. D., Schaumburg, F., Kler, P. A., Berli, C. L. A., Hashimoto, M., & Carrilho, E. (2019). Patterning and modeling three-dimensional microfluidic devices fabricated on a single sheet of paper. *Analytical chemistry*, *91*(13), 8298–8303 <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b01020>.
- Morbioli, G. G., Mazzu-Nascimento, T., Stockton, A. M., & Carrilho, E. (2017). Technical aspects and challenges of colorimetric detection with microfluidic paper-based analytical devices ( $\mu$ PADs)-a review. *Analytica chimica acta*, *970*, 1–22 <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.03.037>.

- Mtisi, M. & Gwenzi, W. (2019). Evaluation of the phytotoxicity of coal ash on lettuce (*Lactuca sativa* L.) germination, growth and metal uptake. *Ecotoxicology and environmental safety*, 170, 750–762 <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.12.047>.
- Müller, R. & Clegg, D. (1949). Automatic paper chromatography. *Analytical Chemistry*, 21(9), 1123–1125.
- Muscolo, A., Papalia, T., Settineri, G., Romeo, F., & Mallamaci, C. (2019). Three different methods for turning olive pomace in resource: Benefits of the end products for agricultural purpose. *Science of the Total Environment*, 662, 1–7 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.210>.
- Nana, L., Ruiyi, L., Qinsheng, W., Yongqiang, Y., Xiulan, S., Guangli, W., & Zaijun, L. (2021). Colorimetric detection of chlorpyrifos in peach based on cobalt-graphene nanohybrid with excellent oxidase-like activity and reusability. *Journal of Hazardous Materials*, 415, 125752 <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125752>.
- Nandhini, A., Harshiny, M., & Gummadi, S. N. (2021). Chlorpyrifos in environment and food: a critical review of detection methods and degradation pathways. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 23(9), 1255–1277 <https://doi.org/10.1039/D1EM00178G>.
- Neff, J. M. (1980). Polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment. *Biol. Conserv.:(United Kingdom)*, 18(1).
- Nelson, E. M. & Rothberg, L. J. (2011). Kinetics and mechanism of single-stranded dna adsorption onto citrate-stabilized gold nanoparticles in colloidal solution. *Langmuir*, 27(5), 1770–1777 <https://doi.org/10.1021/la102613f>.
- Nezhad, A. S. (2014). Microfluidic platforms for plant cells studies. *Lab on a Chip*, 14(17), 3262–3274 <https://doi.org/10.1039/C4LC00495G>.
- Nilghaz, A., Zhang, L., & Shen, W. (2015). Coffee stains on paper. *Chemical Engineering Science*, 129, 34–41 <https://doi.org/10.1016/j.ces.2015.02.017>.
- Njoki, P. N., et al. (2007). Size correlation of optical and spectroscopic properties for gold nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry C*, 111(40), 14664–14669 <https://doi.org/10.1021/jp074902z>.
- Nobili, S., Masin, C. E., Zalazar, C. S., & Lescano, M. R. (2022). Bioremediation of hydrocarbon contaminated soil using local organic materials and earthworms. *Environmental Pollution*, 314, 120169 <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.120169>.
- NRCS (2005). National soil survey handbook, title 430-iv. *Natural Resources Conservation Service. U.S. Department of Agriculture*.
- OECD (2003). Terrestrial plant test: Guideline 208; seedling emergence and seedling growth test. *Organisation for Economic Cooperation and Development*.
- Olkkonen, J., Lehtinen, K., & Erho, T. (2010). Flexographically printed fluidic structures in paper. *Analytical chemistry*, 82(24), 10246–10250 <https://doi.org/10.1021/ac1027066>.

- Ortega, M. T., Aguado, J., Ordovás, M., & Moreno, E. C. (2000). Proposal of bioassays to detect phytotoxic factors in substrates and amendments. *Actas de horticultura*, *32*, 363–376.
- Palansooriya, K. N., et al. (2022). Biochar alters chemical and microbial properties of microplastic-contaminated soil. *Environmental Research*, *209*, 112807 <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.112807>.
- Palma, P., Palma, V., Fernandes, R., Soares, A., & Barbosa, I. (2008). Acute toxicity of atrazine, endosulfan sulphate and chlorpyrifos to *Vibrio fischeri*, *Thamnocephalus platyurus* and *Daphnia magna*, relative to their concentrations in surface waters from the Alentejo region of Portugal. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, *81*(5), 485–489 <https://doi.org/10.1007/s00128-008-9517-3>.
- Papazlatani, C. V., Karas, P. A., Lampronikou, E., & Karpouzas, D. G. (2022). Using bio-beds for the treatment of fungicide-contaminated effluents from various agro-food processing industries: Microbiome responses and mobile genetic element dynamics. *Science of The Total Environment*, *823*, 153744 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153744>.
- Park, J., et al. (2016). The sensitivity of an hydroponic lettuce root elongation bioassay to metals, phenol and wastewaters. *Ecotoxicology and environmental safety*, *126*, 147–153 <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.12.013>.
- Park, S., Lee, W. J., Park, S., Choi, D., Kim, S., & Park, N. (2019). Reversibly pH-responsive gold nanoparticles and their applications for photothermal cancer therapy. *Scientific reports*, *9*(1), 1–9 <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56754-8>.
- Park, Y.-H., Lee, N., Choi, G., & Park, J.-K. (2017). Plant array chip for the germination and growth screening of *Arabidopsis thaliana*. *Lab on a Chip*, *17*(18), 3071–3077 <https://doi.org/10.1039/C7LC00463J>.
- Phoonsawat, K., Agir, I., Dungchai, W., Ozer, T., & Henry, C. S. (2022). A smartphone-assisted hybrid sensor for simultaneous potentiometric and distance-based detection of electrolytes. *Analytica Chimica Acta*, *1226*, 340245 <https://doi.org/10.1016/j.aca.2022.340245>.
- Pol, R., Céspedes, F., Gabriel, D., & Baeza, M. (2017). Microfluidic lab-on-a-chip platforms for environmental monitoring. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *95*, 62–68 <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.08.001>.
- Popenda, M., et al. (2012). Automated 3D structure composition for large RNAs. *Nucleic acids research*, *40*(14), e112–e112 <https://doi.org/10.1093/nar/gks339>.
- Pullagurala, V. L. R., Rawat, S., Adisa, I. O., Hernandez-Viezcas, J. A., Peralta-Videa, J. R., & Gardea-Torresdey, J. L. (2018). Plant uptake and translocation of contaminants of emerging concern in soil. *Science of the Total Environment*, *636*, 1585–1596 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.375>.
- Putnam, R. A., Nelson, J. O., & Clark, J. M. (2003). The persistence and degradation of chlorothalonil and chlorpyrifos in a cranberry bog. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*(1), 170–176 <https://doi.org/10.1021/jf020744r>.

- Qian, S., Cui, Y., Cai, Z., & Li, L. (2022). Applications of smartphone-based colorimetric biosensors. *Biosensors and Bioelectronics: X*, *11*, 100173 <https://doi.org/10.1016/j.biosx.2022.100173>.
- Qian, S. & Lin, H. (2015). Colorimetric sensor array for detection and identification of organophosphorus and carbamate pesticides. *Analytical Chemistry*, *87*(10), 5395–5400.
- Quesada-González, D. & Merkoçi, A. (2017). Mobile phone-based biosensing: An emerging “diagnostic and communication” technology. *Biosensors and Bioelectronics*, *92*, 549–562 <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.10.062>.
- Racke, K. D. (1993). *Environmental fate of chlorpyrifos*. Springer [https://doi.org/10.1007/978-1-4612-4362-5\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4612-4362-5_1).
- Rapini, R. & Marrazza, G. (2016). Biosensor potential in pesticide monitoring. *74*, 3–31.
- Riah, W., Laval, K., Laroche-Ajzenberg, E., Mougin, C., Latour, X., & Trinsoutrot-Gattin, I. (2014). Effects of pesticides on soil enzymes: a review. *Environmental chemistry letters*, *12*, 257–273 <https://doi.org/10.1007/s10311-014-0458-2>.
- Ritchie, H., Roser, M., & Rosado, P. (2022a). Crop yields. *Our World in Data* <https://ourworldindata.org/crop-yields>.
- Ritchie, H., Roser, M., & Rosado, P. (2022b). Pesticides. *Our World in Data* <https://ourworldindata.org/pesticides>.
- Rivero, A., Niell, S., Cerdeiras, M. P., Heinzen, H., & Cesio, M. V. (2016). Development of analytical methodologies to assess recalcitrant pesticide bioremediation in biobeds at laboratory scale. *Talanta*, *153*, 17–22 <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.02.025>.
- Romeh, A. A. & Hendawi, M. Y. (2013). Chlorpyrifos insecticide uptake by plantain from polluted water and soil. *Environmental chemistry letters*, *11*, 163–170 <https://doi.org/10.1007/s10311-012-0392-0>.
- Romero-Ramirez, F. J., Muñoz-Salinas, R., & Medina-Carnicer, R. (2018). Speeded up detection of squared fiducial markers. *Image and vision Computing*, *76*, 38–47 <https://doi.org/10.1016/j.imavis.2018.05.004>.
- Roushani, M., Nezhadali, A., & Jalilian, Z. (2018). An electrochemical chlorpyrifos aptasensor based on the use of a glassy carbon electrode modified with an electropolymerized aptamer-imprinted polymer and gold nanorods. *Microchimica Acta*, *185*(12), 1–8 <https://doi.org/10.1007/s00604-018-3083-0>.
- Sadiq, Z., Safiabadi Tali, S. H., Hajimiri, H., Al-Kassawneh, M., & Jahanshahi-Anbuhi, S. (2022). Gold nanoparticles-based colorimetric assays for environmental monitoring and food safety evaluation. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, (pp. 1–36). <https://doi.org/10.1080/10408347.2022.2162331>.
- Saez, J. M., Bigliardo, A. L., Raimondo, E. E., Briceño, G. E., Polti, M. A., & Benimeli, C. S. (2018). Lindane dissipation in a biomixture: Effect of soil properties and bioaugmentation. *Ecotoxicology and environmental safety*, *156*, 97–105 <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.03.011>.

- Saez, J. M., González, S. K., Ocante, T. A., Bigliardo, A. L., Briceño, G. E., & Benimeli, C. S. (2022). Actinobacteria bioaugmentation and substrate evaluation for biobeds useful for the treatment of atrazine residues in agricultural fields. *Journal of Environmental Management*, *320*, 115870 <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.115870>.
- Sankar, K., Lenisha, D., Janaki, G., Juliana, J., Kumar, R. S., Selvi, M. C., & Srinivasan, G. (2020). Digital image-based quantification of chlorpyrifos in water samples using a lipase embedded paper based device. *Talanta*, *208*, 120408 <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120408>.
- Schaumburg, F., Kler, P. A., & Berli, C. L. A. (2018). Numerical prototyping of lateral flow biosensors. *Sensors and Actuators B: Chemical*, *259*, 1099–1107 <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.12.044>.
- Schaumburg, F., Kler, P. A., Carrell, C. S., Berli, C. L. A., & Henry, C. S. (2020). USB powered microfluidic paper-based analytical devices. *Electrophoresis*, *41*(7-8), 562–569 <https://doi.org/10.1002/elps.201900273>.
- Schaumburg, F., Pujato, N., Peverengo, L. M., Marcipar, I. S., & Berli, C. L. A. (2023). Coupling ELISA to smartphones for POCT of chronic and congenital chagas disease. *Talanta*, (pp. 124246). <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2022.124246>.
- Schaumburg, F., Vidoceovich, J. P., Gerlero, G. S., Pujato, N., Macagno, J., Kler, P. A., & Berli, C. L. A. (2022). A free customizable tool for easy integration of microfluidics and smartphones. *Scientific Reports*, *12*(1), 1–12.
- Schnürer, J. & Rosswall, T. (1982). Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter. *Applied and environmental microbiology*, *43*(6), 1256–1261 <https://doi.org/10.1128/aem.43.6.1256-1261.1982>.
- Schumacher, T. E., Eynard, A., & Chintala, R. (2015). Rapid cost-effective analysis of microbial activity in soils using modified fluorescein diacetate method. *Environmental Science and Pollution Research*, *22*, 4759–4762 <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3922-4>.
- Sefiane, K., Duursma, G., & Arif, A. (2021). Patterns from dried drops as a characterisation and healthcare diagnosis technique, potential and challenges: A review. *Advances in Colloid and Interface Science*, *298*, 102546 <https://doi.org/10.1016/j.cis.2021.102546>.
- Sicard, C., et al. (2015). Tools for water quality monitoring and mapping using paper-based sensors and cell phones. *Water research*, *70*, 360–369.
- Song, S., Wang, L., Li, J., Fan, C., & Zhao, J. (2008). Aptamer-based biosensors. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *27*(2), 108–117 <https://doi.org/10.1016/j.trac.2007.12.004>.
- Soongsong, J., Lerdsri, J., & Jakmunee, J. (2021). A facile colorimetric aptasensor for low-cost chlorpyrifos detection utilizing gold nanoparticles aggregation induced by polyethyleneimine. *Analyst*, *146*, 4848–4857 <https://doi.org/10.1039/D1AN00771H>.

- Sritongon, N., Sarin, P., Theerakulpisut, P., & Riddech, N. (2022). The effect of salinity on soil chemical characteristics, enzyme activity and bacterial community composition in rice rhizospheres in Northeastern Thailand. *Scientific Reports*, *12*(1), 20360 <https://doi.org/10.1038/s41598-022-24902-2>.
- Stanley, C. E., Grossmann, G., i Solvas, X. C., & deMello, A. J. (2016). Soil-on-a-chip: microfluidic platforms for environmental organismal studies. *Lab on a Chip*, *16*(2), 228–241 <https://doi.org/10.1039/C5LC01285F>.
- Sun, L., et al. (2009). Effect of pH on the interaction of gold nanoparticles with DNA and application in the detection of human p53 gene mutation. *Nanoscale research letters*, *4*(3), 216–220 <https://doi.org/10.1007/s11671-008-9228-z>.
- Tabelin, C. B., Igarashi, T., Villacorte-Tabelin, M., Park, I., Opiso, E. M., Ito, M., & Hiroyoshi, N. (2018). Arsenic, selenium, boron, lead, cadmium, copper, and zinc in naturally contaminated rocks: A review of their sources, modes of enrichment, mechanisms of release, and mitigation strategies. *Science of the Total Environment*, *645*, 1522–1553 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.103>.
- Tahara, M., Kubota, R., Nakazawa, H., Tokunaga, H., & Nishimura, T. (2005). Use of cholinesterase activity as an indicator for the effects of combinations of organophosphorus pesticides in water from environmental sources. *Water research*, *39*(20), 5112–5118 <https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.09.042>.
- Talan, A., Mishra, A., Eremin, S. A., Narang, J., Kumar, A., & Gandhi, S. (2018). Ultrasensitive electrochemical immuno-sensing platform based on gold nanoparticles triggering chlorpyrifos detection in fruits and vegetables. *Biosensors and Bioelectronics*, *105*, 14–21 <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.01.013>.
- Tames, F., Miglioranza, K. S., Rodriguez Nuñez, M., & Carreras, H. (2020). Indoor persistent organic pollutants in agricultural areas from Argentina. *Indoor air*, *30*(4), 725–734 <https://doi.org/10.1111/ina.12649>.
- Tao, K., et al. (2021). Kinetics and catalytic efficiency of soil fluorescein diacetate hydrolase under the pesticide parathion stress. *Science of The Total Environment*, *771*, 144835 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144835>.
- Toennies, G. & Kolb, J. J. (1951). Techniques and reagents for paper chromatography. *Analytical Chemistry*, *23*(6), 823–826.
- Torstensson, L. & Castillo, M. (1997). Use of biobeds in sweden to minimize environmental spillages from agricultural spraying equipment. *Pesticide Outlook (United Kingdom)*.
- Tortella, G., Rubilar, O., Castillo, M., Cea, M., Mella-Herrera, R., & Diez, M. (2012). Chlorpyrifos degradation in a biomixture of biobed at different maturity stages. *Chemosphere*, *88*(2), 224–228 <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.02.072>.
- Trantum, J. R., Baglia, M. L., Eagleton, Z. E., Mernaugh, R. L., & Haselton, F. R. (2014). Biosensor design based on marangoni flow in an evaporating drop. *Lab on a Chip*, *14*(2), 315–324 <https://doi.org/10.1039/C3LC50991E>.



- Tuerk, C. & Gold, L. (1990). Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*, *249*(4968), 505–510 <https://doi/10.1126/science.2200121>.
- Turkevich, J., Stevenson, P. C., & Hillier, J. (1951). A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discussions of the Faraday Society*, *11*, 55–75 <https://doi.org/10.1039/DF9511100055>.
- US EPA (1996). Ecological effects test guidelines. seed germination/root elongation toxicity test. OPPTS 850.4200. *U. S. Environmental Protection Agency. International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland, OPPTS 850.4200*.
- US EPA (2021). Tolerances and exemptions for pesticide chemical residues in food. 40 C.F.R. § 180. *U. S. Environmental Protection Agency*.
- USDA (2001). Soil quality test kit guide. *U. S. Department of Agricultural. Agricultural Research Service. Natural Resources Conservation Service*.
- Vareli, C. S., Pizzutti, I. R., Gebler, L., Cardoso, C. D., Gai, D. S., & Fontana, M. E. (2018). Analytical method validation to evaluate dithiocarbamates degradation in bio-beds in south of brazil. *Talanta*, *184*, 202–209 <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.03.009>.
- Verma, N. & Bhardwaj, A. (2015). Biosensor technology for pesticides—a review. *Applied biochemistry and biotechnology*, *175*(6), 3093–3119 <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1489-2>.
- Waheed, S., Cabot, J. M., Macdonald, N. P., Lewis, T., Guijt, R. M., Paull, B., & Breadmore, M. C. (2016). 3D printed microfluidic devices: enablers and barriers. *Lab on a Chip*, *16*(11), 1993–2013 <https://doi.org/10.1039/C6LC00284F>.
- Wang, W. & Keturi, P. H. (1990). Comparative seed germination tests using ten plant species for toxicity assessment of a metal engraving effluent sample. *Water, Air, and Soil Pollution*, *52*(3), 369–376 <https://doi.org/10.1007/BF00229444>.
- Wang, Y., et al. (2019). Label-free microfluidic paper-based electrochemical aptasensor for ultrasensitive and simultaneous multiplexed detection of cancer biomarkers. *Biosensors and Bioelectronics*, *136*, 84–90.
- Ware, G. W. (1974). Ecological history of ddt in arizona. *Journal of the Arizona Academy of Science*, *9*(2), 61–65 <https://doi.org/10.2307/40025631>.
- Weerathunge, P., et al. (2019). Dynamic interactions between peroxidase-mimic silver nanozymes and chlorpyrifos-specific aptamers enable highly-specific pesticide sensing in river water. *Analytica Chimica Acta*, *1083*, 157–165 <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.07.066>.
- Wen, J. T., Ho, C.-M., & Lillehoj, P. B. (2013). Coffee ring aptasensor for rapid protein detection. *Langmuir*, *29*(26), 8440–8446 <https://doi.org/10.1021/la400224a>.
- Whitesides, G. M. (2006). The origins and the future of microfluidics. *Nature*, *442*(7101), 368–373 <https://doi.org/10.1038/nature05058>.

- Widmer, H., Erard, J., & Grass, G. (1984). Automated monitor systems for the continuous surveillance of environmental samples. *International journal of environmental analytical chemistry*, 18(1-2), 1–10 <https://doi.org/10.1080/03067318408076987>.
- Wieczerek, M., Namieśnik, J., & Kudlak, B. (2016). Bioassays as one of the Green Chemistry tools for assessing environmental quality: A review. *Environment international*, 94, 341–361 <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.05.017>.
- Willems, K. A. & Van Duyne, R. P. (2007). Localized surface plasmon resonance spectroscopy and sensing. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 58, 267–297 <https://doi.org/10.1146/annurev.physchem.58.032806.104607>.
- Xing, G., Ai, J., Wang, N., & Pu, Q. (2022). Recent progress of smartphone-assisted microfluidic sensors for point of care testing. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, (pp. 116792). <https://doi.org/10.1016/j.trac.2022.116792>.
- Yamada, K., Henares, T. G., Suzuki, K., & Citterio, D. (2015). Paper-based inkjet-printed microfluidic analytical devices. *Angewandte Chemie International Edition*, 54(18), 5294–5310 <https://doi.org/10.1002/anie.201411508>.
- Yang, K., Peretz-Soroka, H., Liu, Y., & Lin, F. (2016). Novel developments in mobile sensing based on the integration of microfluidic devices and smartphones. *Lab on a Chip*, 16(6), 943–958 <https://doi.org/10.1039/C5LC01524C>.
- Yang, M., Chen, D., Hu, J., Zheng, X., Lin, Z.-J., & Zhu, H. (2022). The application of coffee-ring effect in analytical chemistry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, (pp. 116752). <https://doi.org/10.1016/j.trac.2022.116752>.
- Yetisen, A. K., Akram, M. S., & Lowe, C. R. (2013). Paper based microfluidic point-of-care diagnostic devices. *Lab on a Chip*, 13(12), 2210–2251 <https://doi.org/10.1039/C3LC50169H>.
- Yue, F., et al. (2021). Selection of broad-spectrum aptamer and its application in fabrication of aptasensor for detection of aminoglycoside antibiotics residues in milk. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 351, 130959 <https://doi.org/10.1016/j.snb.2021.130959>.
- Zang, D., Tarafdar, S., Tarasevich, Y. Y., Choudhury, M. D., & Dutta, T. (2019). Evaporation of a droplet: From physics to applications. *Physics Reports*, 804, 1–56 <https://doi.org/10.1016/j.physrep.2019.01.008>.
- Zeng, S., Yong, K.-T., Roy, I., Dinh, X.-Q., Yu, X., & Luan, F. (2011). A review on functionalized gold nanoparticles for biosensing applications. *Plasmonics*, 6(3), 491 <https://doi.org/10.1007/s11468-011-9228-1>.
- Zhang, C., et al. (2014). Organophosphorus pesticides detection using broad-specific single-stranded DNA based fluorescence polarization aptamer assay. *Biosensors and Bioelectronics*, 55, 216–219 <https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.12.020>.
- Zhang, D., Ma, B., Tang, L., & Liu, H. (2018). Toward quantitative chemical analysis using a ruler on paper: an approach to transduce color to length based on coffee-ring effect. *Analytical Chemistry*, 90(3), 1482–1486 <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b03790>.

- Zhang, Y., et al. (2016). Naked-eye quantitative aptamer-based assay on paper device. *Biosensors and Bioelectronics*, 78, 538–546 <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.12.003>.
- Zhao, F., Wu, J., Ying, Y., She, Y., Wang, J., & Ping, J. (2018). Carbon nanomaterial-enabled pesticide biosensors: design strategy, biosensing mechanism, and practical application. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 106, 62–83 <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.06.017>.
- Zhao, Y., et al. (2021). Emerging roles of the aptasensors as superior bioaffinity sensors for monitoring shellfish toxins in marine food chain. *Journal of Hazardous Materials*, 421, 126690 <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126690>.
- Zhou, J., et al. (2020). Determination of soluble CD44 in serum by using a label-free aptamer based electrochemical impedance biosensor. *Analyst* <https://doi.org/10.1039/C9AN01764J>.
- Zhu, X., Wang, K., Yan, H., Liu, C., Zhu, X., & Chen, B. (2022). Microfluidics as an emerging platform for exploring soil environmental processes: A critical review. *Environmental science & technology* <https://doi.org/10.1021/acs.est.1c03899>.
- Zucconi, F., Monaco, A., Forte, M., & Bertoldi, M. d. (1985). Phytotoxins during the stabilization of organic matter. *Composting of agricultural and other wastes/edited by JKR Gasser*.
- Zuker, M. (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic acids research*, 31(13), 3406–3415 <https://doi.org/10.1093/nar/gkg595>.