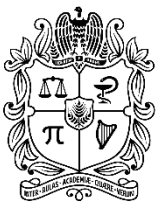


UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Determinación Electroquímica de Glifosato con Electrodos de Carbono Vítreo Modificados con PEDOT/Cu

Daniela Malaver Amaya

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Química
Bogotá D.C., Colombia
2024

Determinación Electroquímica de Glifosato con Electrodos de Carbono Vítreo Modificados con PEDOT/Cu

Daniela Malaver Amaya

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias Química

Directora:

Doctora Andrea del Pilar Sandoval Rojas

Línea de Investigación:

Electroquímica analítica

Grupo de Investigación:

Electroquímica y Termodinámica Computacional

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Química

Bogotá D.C., Colombia

2024

A mi abuela Clemencia

Entonces el dolor penetró con tanta fuerza en mi alma que mi corazón se estremeció y me sentí morir; en ese instante… bueno en ese instante, me desperté.

Fyodor Dostoevsky, El sueño de un hombre ridículo.

Agradecimientos

Primero, quiero agradecer a la Universidad Nacional de Colombia, una institución que, a pesar de las dificultades, mantiene su compromiso con la educación pública. En particular, agradezco a la Facultad de Ciencias por la financiación a través del Proyecto 53469 “Dispositivos Electroquímicos En Papel Para La Determinación De Glifosato”.

Mi especial gratitud a la profesora Andrea del Pilar Sandoval Rojas por su guía y apoyo durante este proceso. También extiendo mi agradecimiento al Grupo de Electroquímica y Termodinámica Computacional, donde encontré un espacio de trabajo y una comunidad de apoyo.

Agradezco al Grupo de Química Cuántica y Computacional por la colaboración con este proyecto, en especial con el candidato a doctor Jorge Puello Silva y el profesor Jorge Alí Torres en los cálculos computacionales, así como con el profesor Johan Fabian Galindo Cruz por sus valiosos consejos.

Adicionalmente, agradezco al Grupo de Estudios Para la Remediación y Mitigación de Impactos Negativos al Ambiente (GERMINA) por su disposición y orientación. En cada interacción recibí palabras sabias y cálidas. Agradezco en particular a los profesores Marco Fidel Suárez y Jesús Alberto Ágreda, y a los estudiantes Cristhian, María Camila y Jessica.

Finalmente, gracias a mis amigos y familia, cuyo apoyo fue esencial para alcanzar mis propósitos. Agradezco infinitamente a mi abuela Clemencia por todo el amor que recibí, su cariño ha sido una motivación en mi vida.

Resumen

Determinación Electroquímica de Glifosato con Electrodos de Carbono Vítreo Modificados con PEDOT/Cu

El glifosato es el herbicida más utilizado a nivel mundial, pero su uso genera preocupaciones debido a sus efectos adversos en el medio ambiente y la salud humana. Este estudio presenta un método de detección basado en técnicas electroquímicas, valoradas por su rapidez y rentabilidad en comparación con otras técnicas analíticas.

El método se fundamenta en la capacidad del glifosato para formar complejos con cobre, detectables mediante técnicas electroquímicas. Se utilizó un electrodo de carbono vítreo modificado con poli(3,4-etilendioxitiofeno) (PEDOT). Sobre esta superficie se redujo cobre electroquímicamente en una disolución reguladora de fosfatos con pH 7,4 y 1,4 M de cloruros.

La detección indirecta del glifosato se realizó mediante voltamperometría diferencial de pulso (VDP), que permite distinguir la corriente generada por la oxidación del cobre de las corrientes capacitivas. Se obtuvieron señales de oxidación asociadas al proceso de Cu(0) a Cu(I). La cuantificación del glifosato se realizó midiendo la diferencia de corriente entre los voltamperogramas de la disolución con glifosato y el blanco, utilizando parámetros optimizados: amplitud de pulso de 200 mV, tiempo de pulso de 50 ms y periodo de 0,8 s.

Se establecieron dos intervalos lineales, para concentraciones altas entre 6 y 500 mg kg^{-1} y para concentraciones bajas entre 0,02-0,10 mg kg^{-1}. Los límites de detección y cuantificación encontrados fueron de 0,010 mg kg^{-1} y 0,029 mg kg^{-1}, respectivamente.

Palabras clave: Voltamperometría de pulso diferencial, PEDOT, cobre, glifosato.

Abstract

Electrochemical Determination of Glyphosate with PEDOT/Cu-modified Glassy Carbon Electrodes

Glyphosate is the most widely used herbicide worldwide, but its use raises concerns due to its adverse effects on the environment and human health. This study presents a detection method based on electrochemical techniques, valued for their speed and cost-effectiveness compared to other analytical techniques.

The method is based on glyphosate's ability to form complexes with copper, which are detectable through electrochemical techniques. A glassy carbon electrode modified with poly(3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDOT) was employed. Copper was electrodeposited onto the modified electrode in a phosphate buffer solution (pH 7.4) containing 1.4 M chloride ions.

Glyphosate indirect detection was carried out using differential pulse voltammetry (DPV), which allows distinguishing the current generated by copper oxidation from capacitive currents. Oxidation signals associated with the Cu(0) to Cu(I) transition were obtained. Glyphosate quantification was achieved by measuring the current difference between the voltammograms of a solution containing glyphosate and a blank solution, with optimized parameters: 200 mV pulse amplitude, 50 ms pulse time, and 0.8 s period.

Two linear intervals were established: one for high concentrations (6–500 mg kg^{-1}) and another for low concentrations (0.02–0.10 mg kg^{-1}), with detection and quantification limits of 0.010 mg kg^{-1} and 0.029 mg kg^{-1}, respectively.

Keywords: Differential Pulse Voltammetry, PEDOT, copper, glyphosate.

Contenido

Pág.

Resumen VII

Lista de figuras XI

Lista de tablas XVI

Introducción 1

Bibliografía 6

1. Capítulo 1: Métodos Experimentales 11
1.1 Técnicas electroquímicas 11
1.1.1 Voltamperometría cíclica 11
1.1.2 Cronopotenciometría 13
1.1.3 Cronoamperometría 14
1.1.4 Voltamperometría de pulso diferencial (VPD) 14
1.2 Reactivos y Equipos 18
1.3 Procesos de limpieza 20
1.3.1 Limpieza de material de vidrio 21
1.3.2 Limpieza del electrodo de carbono vítreo (ECV) 21
1.3.3 Activación del electrodo de carbono vítreo en medio orgánico 24
1.4 Síntesis de PEDOT sobre ECV 25
1.5 Reducción de cobre sobre electrodo modificado ECV|PEDOT 30

Bibliografía 34

2. Capítulo 2: Optimización de los parámetros de modificación del electrodo de carbono vítreo y del electrolito soporte para la medida de glifosato. 37
2.1 Efecto del polímero y la estabilización del cobre 39
2.2 Optimización de los parámetros de modificación del electrodo 46
2.3 Efecto de la presencia de iones cloruros en la detección de glifosato 53
2.4 Morfología del electrodo 62
2.5 Estudio de repetibilidad de la modificación del electrodo. 68

Bibliografía 71

3. Capítulo 3: Optimización de los parámetros de la voltamperometría de pulso diferencial 79
3.1 Análisis del efecto de los parámetros por método SIMPLEX 79

3.2 Optimización de la señal por VPD para la detección de glifosato 85

Bibliografía 89

4. Capítulo 4: Parámetros analíticos en la determinación de glifosato 91
4.1 Curvas de calibración 91
4.1.1 Curva de calibración a altas concentraciones 91
4.1.2 Curva de calibración a bajas concentraciones 95
4.1.3 LOD y LOQ 98
4.1.4 Análisis de muestras de glifosato con los electrodos modificados 99

Bibliografía 103

5. Conclusiones 105

Bibliografía 108

A. Anexo: Participación en eventos científicos 120

Lista de figuras

Pág.
Figura 1-1: Diagrama Voltamperograma Cíclico 12
Figura 1-2: Diagrama de la aplicación de pulso de potencial sobre una rampa de potencial lineal en función del tiempo. Diagrama adaptado de la referencia (Scholz, F. 2015). 15
Figura 1-3: Diagrama de periodos de tiempo en que se mide la corriente total. Diagrama adaptado de la referencia (Scholz, F. 2015). 16
Figura 1-4: Ejemplo de los voltamperogramas de pulso diferencial obtenidos con el electrodo modificado en la disolución reguladora de pH con y sin glifosato. ΔI corresponde a la señal analítica de interés. 18
Figura 1-5: Montaje celda de cinco bocas. 20
Figura 1-6: Circuito eléctrico equivalente del electrodo de referencia en paralelo con el capacitor. Hecho con Visual Paradigm Online 20
Figura 1-7: Voltamperograma de la limpieza del electrodo de carbono vítreo (ECV) tomada a 250 mV s^{-1}. La gráfica corresponde a los barridos 1, 5, 10, 15 y 20, en el orden indicado por la flecha. 23
Figura 1-8: Voltamperograma de la VC de la limpieza del ECV tomada a 50 mV s^{-1} en 0,1 M de KOH. La gráfica corresponde a los barridos 1, 2 y 3. 23
Figura 1-9: Cronoamperograma del ECV en 0,1 M de KOH entre 0 V durante 30 s hasta 2 V durante 30 s. 24
Figura 1-10: Voltamperograma de la VC de activación del ECV en una disolución de 0,1 $NaClO_4$ en acetonitrilo seco y con adición de 10 µL de EDOT tomada a 250 mV s^{-1}. La gráfica corresponde a los barridos 1, 5, 10 y 15, en el orden indicado por la flecha. . 25
Figura 1-11: Gráfica de la cronopotenciometría de la síntesis de PEDOT sobre la superficie del ECV en disolución de 0,1 M de $NaClO_4$ en CH_3CN con 10 µl de EDOT para la que se sometió a una corriente de 19,6 µA durante 100 segundos. Inserto: ampliación de la cronopotenciometría de polimerización. 26
Figura 1-12: Electropolimerización de EDOT y proceso de carga y descarga del polímero (Ren, M 2021). 27
Figura 1-13: Voltamperogramas de la superficie de ECV|PEDOT tomadas a 50 mV s^{-1} en la disolución de 0,1 M de $NaClO_4$ en acetonitrilo seco. Se tomaron 5 ciclos. La gráfica corresponde a los últimos barridos de cada VC. La línea roja corresponde a la VC tomada con un ECV y la línea negra corresponde a la medida con ECV|PEDOT. 28
Figura 1-14: Voltamperogramas por VPD de medición de glifosato con ECV|PEDOT|Cu. Los electrodos fueron sometidos a potenciales finales de A. 0,8 V; B. 0

V y C. -0,8 V durante el paso previo de voltamperometría de confirmación del polímero antes de reducir cobre. 29
Figura 1-15: Aspecto de la superficie del electrodo cuando se ha recubierto con PEDOT y se ha aplicado un potencial final de -0,8 V durante la VC de confirmación. 30
Figura 1-16: Cronoamperograma de la reducción de cobre sobre el ECV|PEDOT. Potenciales aplicados: 0 V durante 10 s, -0.03 V durante 300 s. 31
Figura 1-17: Cronoamperogramas de la reducción de cobre sobre el ECV|PEDOT y sobre el ECV. 32
Figura 1-18: Aspecto de la superficie del electrodo cuando se ha reducido cobre sobre un ECV previamente modificado con una película de PEDOT 32
Figura 2-1: Voltamperogramas de la VC de la estabilización del ECV|PEDOT|Cu en disolución PBS 10X A. Se toman 15 ciclos a 250 mV s^{-1}, la gráfica corresponde a los barridos 1, 5, 10 y 15, en el orden indicado por la flecha. B. Se toma 5 ciclos a 50 mV s^{-1}. Los barridos se hicieron iniciando en -0,8 V hasta 0,8 V. 40
Figura 2-2: Voltamperogramas de comparación de la VC después de la estabilización de los electrodos ECV|PEDOT|Cu, ECV|PEDOT, ECV y ECV|Cu tomados a 50 mV s^{-1} en disolución PBS 10X. 41
Figura 2-3: Comparación de voltamperogramas de las VPD de medición de 17 mg kg^{-1} de glifosato con A) ECV, B) ECV|PEDOT, C) ECV|Cu y D) ECV|PEDOT|Cu, tomados en PBS 10X usando amplitud de pulso de 50 mV, con tiempo de pulso de 50 ms, durante un periodo de 0,66 segundos y un potencial de escalón de 5 mV. 42
Figura 2-4: Estructura propuesta para el complejo cobre(II)-glifosato. Las tres posiciones de moléculas de agua podrían estar ocupadas por otros ligantes. Adaptado de (Coutinho, C. F 2004) 43
Figura 2-5: Voltamperogramas de las VPD de medición de 17 mg kg^{-1} de glifosato con ECV|PEDOT|Cu tomados en PBB 10X usando amplitud de pulso de 50 mV, con tiempo de pulso de 50 ms, durante un periodo de 0,66 segundos y un potencial de escalón de 5 mV. Con corrientes forward y backward. 45
Figura 2-6: Gráficas de las cronopotenciometrías de la síntesis de PEDOT sobre la superficie del ECV de los 16 experimentos del diseño experimental en disolución de 0,1 M de $NaClO_4$ en CH_3CN con 10 µl de EDOT. 48
Figura 2-7: Voltamperogramas de las CV de confirmación del polímero sobre la superficie de ECV|PEDOT tomadas a 50 mV s^{-1} en 0,1 M de $NaClO_4$ en CH_3CN. Se graficó un experimento por cada grupo de 4 experimentos cuyas condiciones de polimerización coinciden. 49
Figura 2-8: Cronoamperogramas de la reducción de cobre sobre los ECV|PEDOT en la disolución de 0,033 M de $CuSO_4$ en 0,5 M de H_2SO_4 durante 300 s. Se graficó un experimento por tratamiento. 50
Figura 2-9: Voltamperogramas de las VPD de medición de 17 mg kg^{-1} de glifosato con ECV|PEDOT|Cu en PBS 10X de los 16 experimentos usando amplitud de pulso de 50 mV, con tiempo de pulso de 50 ms, durante un periodo de 0,66 segundos y un potencial de escalón de 5 mV, las repeticiones se graficaron juntas. 51

Figura 2-10: Voltamperogramas de estabilización de cobre en el electrodo, obtenidas mediante voltamperometría cíclica con 20 ciclos a una velocidad de barrido de 0,25 V/s. Se utilizó un electrodo de trabajo ECV|PEDOT|Cu. Cada una de las medidas se hizo empleando como electrolito soporte disolución de fosfatos reguladora de pH A) sin adición de cloruros, B) 0,02696 mol/kg, C) 0,5269 mol/kg y D) 1,3968 mol/kg de cloruros. La flecha indica la variación de corriente con el aumento del número de ciclos..... 54
Figura 2-11: Diagrama de Pourbaix para el sistema cobre-agua a 25°C. Tomado de Atlas of Electrochemical Equilibria in - Aqueous Solutions (Pourbaix, M 1966) 55
Figura 2-12: Diagrama de Pourbaix para el sistema cobre-agua-cloruros a 25°C para una actividad de cloruro de 1 mol/kg. Tomado de King and Kolar (King, F 2020)..... 56
Figura 2-13: Voltamperogramas de estabilización de cobre en el electrodo, obtenidas mediante voltamperometría cíclica con 5 ciclos a una velocidad de barrido de 0,05 Vs^{-1}. Se utilizó un electrodo de trabajo ECV|PEDOT|Cu que ha pasado por un primer paso de estabilización. Cada una de las medidas se hizo empleando como electrolito soporte disolución de fosfatos reguladora de pH A) sin adición de cloruros B) 0,02696 mol/kg, C) 0,5269 mol/kg y D) 1,3968 mol/kg de cloruros..... 57
Figura 2-14: Voltamperogramas obtenidos mediante VPD (amplitud de pulso: 50 mV, tiempo de pulso: 50 ms, periodo: 0,66 s, escalón de 5 mV). Se utilizó un electrodo de trabajo ECV|PEDOT|Cu. La línea negra en cada uno de los casos corresponde a electrolito soporte y la línea roja es la misma disolución con una concentración de glifosato de 17 mg kg^{-1}. Cada una de las medidas de hizo empleando como electrolito soporte disolución de fosfatos reguladora de pH a) sin adición de cloruros b) 0,02696 mol/kg, c) 0,5269 mol/kg y d) 1,3968 mol/kg de cloruros. 58
Figura 2-15: VPD del ECV|PEDOT|Cu en disolución reguladora de fosfatos a pH 7,4 a diferentes concentraciones de cloruros: línea roja sin adición de cloruros, línea verde con 0,02696 mol Cl^-/kg , línea azul con 0,5269 mol Cl^-/kg y línea morada con 1,3968 mol Cl^-/kg de cloruros, A) sin glifosato y B) con 17 mg kg^{-1} de glifosato. Inserto en A: Potencial de pico de la señal A1, Ep, en función de la concentración de cloruros. Inserto en B. Diferencia de la corriente de pico, ΔIp, en presencia y ausencia de glifosato, en función de la concentración de cloruros. Amplitud de pulso: 50 mV, tiempo de pulso: 50 ms, periodo: 0,66 s, escalón: 5 mV. 59
Figura 2-16: Voltamperogramas de las VPD de 3 medidas consecutivas de 17 mg kg^{-1} de glifosato con el mismo ECV|PEDOT|Cu 60
Figura 2-17: Posibles estructuras del complejo Cobre(I)-glifosato-Cl^- determinadas por cálculos computacionales hechos por el Grupo de Química Cuántica y Computacional de la Universidad Nacional..... 61
Figura 2-18: Imágenes SEM de la superficie del electrodo de carbono vítreo modificado con PEDOT y cobre sin el paso de estabilización, con detector SE a las magnificaciones de A) 600x y B) 3,00 kx. EDX en los puntos C), D) y E) señalados de la imagen A). 62
Figura 2-19: Imágenes SEM con detector SE de comparación entre el A) ECV (izquierda) y el B) ECV|PEDOT|Cu (Derecha) a las magnificaciones de 62x, 600x, 6,00 kx, 60kx. 64

Figura 2-20: Imágenes SEM con detector SE (izquierda) y BSE (derecha) a la magnificación de 6,00 kx. 65
Figura 2-21: Espectros EDX de electrodo sin modificar (columna A) y el electrodo modificado ECV/PEDOT/Cu después de la estabilización en PBS 10X (columna B). Se muestran además los porcentajes y mapa de distribuciones de los elementos para el electrodo completo y para la magnificación 6kx. 66
Figura 2-22: Voltamperogramas de las VPD de medición con ECV|PEDOT|Cu para la determinación de la repetibilidad en PBS 10X usando amplitud de pulso de 50 mV, con tiempo de pulso de 50 ms, durante un periodo de 0,66 segundos y un potencial de escalón de 5 mV de A. disolución blanco y B. disolución con de 17 mg kg^{-1} de glifosato. 69
Figura 3-1: Grafica de las condiciones iniciales del SIMPLEX. 80
Figura 3-2: Graficas de la diferencia de áreas entre el blanco y la disolución con glifosato con respecto al valor de los factores de cada experimento. 82
Figura 3-3: Voltamperogramas obtenidos durante los experimentos II, III, XI y XV del SIMPLEX. 83
Figura 3-4: Voltamperogramas de las VPD de medición de 17 mg kg^{-1} de glifosato con ECV|PEDOT|Cu empleando 4 combinaciones de parámetros. 85
Figura 3-5: Voltamperogramas de las VPD de medición de 17 mg kg^{-1} de glifosato con ECV|PEDOT|Cu variando la amplitud de pulso entre 50 y 300 mV. Tiempo de pulso 80 ms. Periodo 0,8 s. 87
Figura 3-6: Voltamperogramas de las VPD de medición de 17 mg kg^{-1} de glifosato con ECV|PEDOT|Cu variando el tiempo de pulso entre 30 y 80 ms. Amplitud de pulso 100 mV. Periodo 0,8 s. 87
Figura 3-7: Medición de 17 mg kg^{-1} de glifosato por VPD usando ECV|PEDOT|Cu antes y después de haber optimizado los parámetros analíticos. Para las líneas amarilla y anaranjada: amplitud de pulso de 50 mV, tiempo de pulso de 50 ms, periodo de 0,66 segundos, potencial de escalón de 5 mV. Para las líneas azul y verde: amplitud de pulso de 200 mV, tiempo de pulso de 50 ms, periodo de 0,8 segundos, potencial de escalón de 5 mV. 88
Figura 4-1: Graficas A) Voltamperogramas promedio (n=3) de las VPD de medición de las disoluciones patrón de la curva de calibración a altas concentraciones. El voltamperograma del blanco corresponde al promedio de 33 medidas. B) Curva de calibración de estándar externo entre 5,983 y 496,853 mg kg^{-1} en disolución PBS 10X pH 7.4 92
Figura 4-2: Gráfica de residuales en función de la concentración de glifosato. 94
Figura 4-3: Gráfica A. Ampliación de los máximos de las señales de Cu(0) -> Cu(I) de los voltamperogramas promedio (n = 3)de las VPD de medición de las disoluciones patrón de la curva de calibración a bajas concentraciones (Inserto en a: voltamperogramas promedio de las VPD de medición de las disoluciones patrón de la curva de calibración a bajas concentraciones). B. Curva de calibración de estándar externo entre 0,023 y 0,103 mg kg^{-1} en disolución PBS 10X pH 7.4..... 95

Figura 4-4: Gráfica de residuales en función de la concentración de glifosato para bajas concentraciones. 97
Figura 4-5: Voltamperogramas de las VPD de medición en disolución blanco y muestra de 44,90 mg l^{-1} de glifosato con ECV/PEDOT/Cu. 99
Figura 4-6: Voltamperogramas de las VPD de medición en disolución blanco y muestra de 0,05441 mg l^{-1} de glifosato con ECV|PEDOT|Cu. 100
Figura 4-7: Voltamperograma por VPD de dilución de agua de pozo en PBS 10X sobre ECV|PEDOT|Cu por triplicado. La línea gris indica el blanco. 102
Figura 4-8: Voltamperograma por VPD de dilución de agua de pozo en PBS 10X sobre ECV|PEDOT|Cu con adición (*Spk*) de 20 mg kg^{-1} de glifosato. Medida realizada por triplicado. La línea gris indica el blanco. 102

Lista de tablas

Pág.

Tabla 2-1: Estudios previos en que se hace la determinación de glifosato aprovechando la capacidad del cobre de acomplejarlo, en disolución con fosfatos. 38
Tabla 2-2: Factores a optimizar en el diseño de experimentos y los niveles a evaluar.... 46
Tabla 2-3: Descripción de los experimentos realizados para la optimización. 47
Tabla 2-4: Análisis de varianza de los resultados obtenidos de la optimización. 52
Tabla 2-5: Valores obtenidos en las 9 mediciones hechas para evaluar la repetibilidad de las medidas. 69
Tabla 3-1: Diferencia de área para los experimentos de la optimización por método simplex. 81
Tabla 3-2: Comparación entre las 4 combinaciones de parámetros. 85
Tabla 4-1: Estadísticas de la regresión lineal de la curva de calibración, obtenidos con la herramienta de análisis de excel. 92
Tabla 4-2: Estadísticas del análisis de varianza de los datos a altas concentraciones 94
Tabla 4-3: Estadísticas de la regresión lineal de la curva de calibración a bajas concentraciones. 96
Tabla 4-4: Estadísticas del análisis de varianza de los datos a bajas concentraciones... 96

Introducción

El glifosato conocido químicamente como N-fosfonometilglicina es uno de los herbicidas más ampliamente utilizados en todo el mundo (Mensink, H 1996; Benbrook, C. M 2016). Se clasifica como un herbicida no selectivo debido a su capacidad para inhibir la enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintetasa (EPSPS), lo que resulta en la interrupción de la síntesis de aminoácidos aromáticos en las plantas, por ende, reduce su capacidad para fijar carbono y afecta su metabolismo. El glifosato se transporta por el sistema vascular de las plantas desde el sitio de aplicación hacia el resto de la planta por lo que se considera sistémico y de acción post-emergente (Mensink, H 1996; Benbrook, C. M 2016; Duke, S. O 2003; Bai, S. H 2016; Duke, S. O 2018; Duke, S. O 2008).

El creciente uso del glifosato en el ámbito agrícola se debe a su eficacia para eliminar malezas y a su bajo costo. (Benbrook, C. M 2016). No obstante, el aumento en el uso de este herbicida ha generado preocupaciones tanto ambientales como en la salud. La contaminación de suelos y fuentes de agua se ha convertido en un problema crítico, dado que el glifosato se ha vuelto ubicuo en diversos entornos, desde el suelo y el agua hasta plantas, alimentos y animales, incluyendo a los seres humanos (Bai, S. H 2016; Gill, J. P. K 2017; Varona, M 2009).

Se ha observado que el glifosato puede ingresar al cuerpo humano a través de tres vías principales: la absorción dérmica, la ingestión oral y la inhalación pulmonar. Los efectos en la salud dependen de la dosis de exposición variando desde irritaciones de nariz, garganta, ojos, asma, y síntomas gastrointestinales como hemorragias, esofagitis, gastritis, hasta disfunción respiratoria, falla renal y cardiaca (Gill, J. P. K 2017; Varona, M 2009). Además, tiende a acumularse en órganos como los riñones, el hígado, el colon y el intestino delgado, resultando a largo plazo en daño renal o hepático (Bai, S. H 2016).

Los estudios enfocados en identificar los efectos sobre la salud han evidenciado que ratas expuestas por 90 días a glifosato han tenido daños hepáticos, aumento de los ácidos

biliares, inflamación renal crónica, disminución del peso corporal y aumento del potasio y el fósforo en la sangre (Bai, S. H 2016; Gill, J. P. K 2017; Varona, M 2009; Cox, J. A 1974). Çağlar y Kolankayase reportaron afectaciones hepáticas leves en ratas después de una exposición subcrónica al glifosato (entre 35 y 90 días) (Bai, S. H 2016; Gill, J. P. K 2017; Varona, M 2009; Cox, J. A 1974; Çağlar, S 2008). El artículo de revisión de Bai y colaboradores compila varios estudios que indican que incluso una exposición a concentraciones muy bajas de glifosato es capaz de modificar funciones celulares y provocar citotoxicidad. Por ejemplo, el estudio de Gasnier y colaboradores demuestra que dosis subagropecuarias (< 10 ppm) tanto de glifosato como de Roundup®400 generaron perturbaciones en el sistema endocrino humano, inhibición de las actividades transcripcionales de los receptores de estrógeno y citotoxicidad in vitro (Bai, S. H 2016; Gill, J. P. K 2017; Varona, M 2009; Cox, J. A 1974; Çağlar, S 2008; Gasnier, C 2009).

Debido a los diversos efectos adversos del glifosato diferentes entidades regulatorias en el mundo han adoptado Límites Máximos de Contaminación (LMC) para esta molécula. El LMC en caso del glifosato es de 700 µg L^{-1} en EE. UU (US EPA 2009) y de 1000 µg L^{-1} en Australia (NHMRC 2011). La regulación en la Unión Europea reporta un riesgo tolerable de 77 µg L^{-1} (Horth, H 2009) mientras que la concentración aceptable en el agua potable es inferior a 0,1 µg L^{-1} (Varona, M 2009; Cox, J. A 1974; Çağlar, S 2008; Gasnier, C 2009; US EPA 2009; NHMRC 2011; Horth, H 2009; IAEAC 1994). Este enfoque destaca la continua relevancia y preocupación sobre este tema en el contexto de la seguridad alimentaria. Colombia estableció límites máximos de residuos de plaguicidas (LMR) en alimentos de consumo humano en la Resolución número 2906 de 2007, la cual incluye 26 matrices entre alimentos y piensos en las que regula el LMR de glifosato (Ministerio de la Protección Social, 2007).

Las técnicas de análisis tradicionales como la cromatografía y la espectroscopía suelen ser costosas y lentas debido a la necesidad de realizar procesos de extracción y derivatización con el respectivo uso de reactivos y disolventes, lo que limita su aplicabilidad en el campo.

Por ejemplo, para la determinación de glifosato mediante cromatografía líquida existen técnicas de derivatización pre-columna o post-columna (Mensink, H 1994; Huhn, C 2018; Gill, J 2017; Valle, A. L 2019; Zhu, Y 1999; Zainudin, B. H 2015; Ding, J 2015; Bohórquez

Vivas, D. J 2020). Algunos de los reactivos empleados para derivatizaciones post-columna con fluorescencia son o-ftalaldehído (OPA) y Cloruro de 9 - fluorenilmetiloxicarbonilo (FMOC-Cl) que reacciona en medio acuoso y alcalino. Para derivatizar con OPA se debe hacer una hidrólisis previa del glifosato y para utilizar FMOC-Cl el medio de reacción debe ser acetonitrilo (Bohórquez Vivas, D. J 2020; Nedelkoska, T. V2004; Okada, E 2019; Winfield, T. W 1990; Tu, M 2001; Padilla Alonso, D. J 2014; Rojano Delgado, A. M 2012; Wang, S 2016; Abdullah, M. P 1995; Jámbor, A 2009).

Toss y colaboradores resaltan que el glifosato es uno de los pesticidas más difíciles de determinar debido a su alta polaridad. Cuando se detecta por cromatografía con columnas de fase inversa la retención es baja o inexistente lo que dificulta la evaluación del glifosato e implica la derivatización y concentración de las muestras para mejorar los resultados (Toss, V 2017).

Para abordar los desafíos en el análisis de glifosato este proyecto se centra en el desarrollo de un método de cuantificación alternativo mediante el uso de técnicas electroquímicas. Estas técnicas ofrecen ventajas significativas en términos de velocidad de análisis y reducción de costos.

El glifosato en sí no presenta un proceso redox detectable por lo que el análisis electroquímico debe realizarse de manera indirecta. Algunas técnicas electroquímicas se basan en la detección del contraión de isopropilamina (Oliveira, P. C 2018) o en la detección de N-nitrosoglifosato después de derivatizar el glifosato (Teófilo, R. F 2004; Zambrano-Intriago, L. A 2021). Se ha encontrado también procedimientos de detección basados en la inhibición de la actividad de un sensor generado por el electrodepósito de poli(2,5-dimetoxianilina) (PDMA) dopada con poli(ácido 4-estirenosulfónico) (PSS) sobre la superficie de un electrodo de oro. Sobre la película PDMA-PSS se une la enzima horseradish peroxidasa (HPR) de manera electrostática y se hace la determinación por voltamperometría cíclica (Barbosa, P. F. P 2019; Songa, E. A 2009 I). De manera similar se ha empleado la enzima horseradish peroxidasa inmovilizada electrostáticamente sobre la superficie de un electrodo rotatorio de oro modificado con nanopartículas de PDMA-PSS para hacer una detección amperométrica (Songa, E. A 2009 II) o atemoya peroxidasa inmovilizada en nanoarcilla para hacer detección por voltamperometría de onda cuadrada (Oliveira, G. C 2012).

Una estrategia más sencilla es el uso de electrodos con cobre debido a que el glifosato forma complejos con este metal que influyen en su proceso de oxidación. La capacidad del glifosato para acomplejarse con el cobre se debe a su estructura con grupos funcionales de amino, carboxilato y fosfonato (Daniele, P. G 1997; Coutinho, C. F 2005; Coutinho, C. F 2007; Coutinho, C. F 2009; Moraes, F. C 2010).

La corriente de oxidación del cobre se ve afectada por condiciones como la estabilidad del complejo analito-ion cúprico o cuproso, la velocidad de formación del complejo, la velocidad de formación y disolución de la capa de óxido/hidróxido, así como la velocidad de transporte tanto del analito como del Cu^{2+} en la disolución y en la capa pasivante (Sierra, E. V 2008; Daniele, P. G 1997).

Se han realizado estudios con electrodos de cobre y también con electrodos de base carbonosa modificados con cobre, encontrando que uno de los aspectos importantes en esta determinación es la naturaleza del electrolito. Coutinho y colaboradores usando voltamperometría de pulso diferencial (VPD) encontraron que la introducción de glifosato en disolución de fosfatos reguladora de pH generó un aumento en la corriente anódica del electrodo relacionada con la disolución electroquímica del cobre y este fenómeno se asoció con el acomplejamiento del Cu(II) por el glifosato (Daniele, P. G 1997; Coutinho, C. F 2005; Coutinho, C. F 2007). En ausencia de glifosato, los experimentos cronoamperométricos revelaron la formación de una película pasiva, posiblemente fosfato de cobre, en la superficie del electrodo. En contraste, en presencia de glifosato, se observó corrosión en la superficie del electrodo de cobre dando lugar a la formación de un complejo soluble Cu(II)-glifosato (Coutinho, C. F 2009; Moraes, F. C 2010).

En este sentido se observa que la aplicación de técnicas electroquímicas puede conducir a un método sensible y apropiado para la identificación de glifosato en diversas muestras. Además, este enfoque permite rapidez y miniaturización facilitando así la creación de dispositivos portátiles con aplicaciones prácticas tanto en el monitoreo ambiental como en la seguridad alimentaria.

Con el objetivo de aportar a la investigación en el país de métodos asequibles de análisis de glifosato, se desarrolló un método de análisis electroquímico que se basa en la

formación de un complejo entre el glifosato y el cobre, lo que permite su detección a través del incremento de la corriente de oxidación del cobre.

En esta investigación se optó como estrategia la modificación de un electrodo de carbono vítreo con una película de poli(3,4-etilendioxitiofeno) (PEDOT) sobre el cual se deposita el cobre usado en el proceso de detección (Ilieva, M 2004 Part I; Ilieva, M 2004 Part II; Cho, S. H 2006; Davis, J. R 2001). De esta forma, se busca tener una superficie estable y repetible. Adicionalmente, la técnica electroquímica usada fue la voltamperometría de pulso diferencial debido a su alta sensibilidad y capacidad para minimizar las corrientes capacitivas.

El documento que se presenta a continuación contiene cuatro capítulos principales en los cuales se describen en primer lugar, los métodos y técnicas electroquímicas utilizadas tanto para la modificación del electrodo como para el análisis. En el segundo capítulo, el proceso de optimización de la síntesis de la película de PEDOT/Cu que modifica el electrodo. En el tercer capítulo se explica el proceso de optimización de los parámetros de la voltamperometría de pulso diferencial usada para obtener la señal electroquímica durante la detección del glifosato. En el cuarto capítulo se muestra la determinación de los parámetros analíticos provenientes de la curva de calibración con glifosato y la aplicación del análisis a algunas muestras sintéticas de Roundup (producto comercial del glifosato). Finalmente, se desarrollan las conclusiones de la investigación realizada.

Bibliografía

Abdullah, M. P., Daud, J., Hong, K. S., & Yew, C. H. (1995). Improved method for the determination of glyphosate in water. Journal of Chromatography A, 697(1-2), 363-369.

Bai, S. H., & Ogbourne, S. M. (2016). Glyphosate: environmental contamination, toxicity and potential risks to human health via food contamination. Environmental Science and Pollution Research, 23, 18988-19001.

Bai, S. H., & Ogbourne, S. M. (2016). Glyphosate: environmental contamination, toxicity and potential risks to human health via food contamination. Environmental Science and Pollution Research, 23, 18988-19001.

Barbosa, P. F. P., Vieira, E. G., Cumba, L. R., Paim, L. L., Nakamura, A. P. R., Andrade, R. D. A., & do Carmo, D. R. (2019). Voltammetric techniques for pesticides and herbicides detection-an overview. International Journal of Electrochemical Science, 14(4), 3418-3433.

Benbrook, C. M. (2016). Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. Environmental Sciences Europe, 28(1), 1-15.

Bohórquez Vivas, D. J. (2020) Métodos analíticos para la determinación de Glifosato en matrices ambientales.

Çağlar, S., & Kolankaya, D. (2008). The effect of sub-acute and sub-chronic exposure of rats to the glyphosate-based herbicide Roundup. Environmental toxicology and pharmacology, 25(1), 57-62.

Cho, S. H., & Park, S. M. (2006). Electrochemistry of conductive polymers 39. Contacts between conducting polymers and noble metal nanoparticles studied by current-sensing atomic force microscopy. The Journal of Physical Chemistry B, 110(51), 25656-25664.

Coutinho, C. F. B., Silva, M. O., Machado, S. A. S., & Mazo, L. H. (2007). Influence of glyphosate on the copper dissolution in phosphate buffer. Applied surface science, 253(6), 3270-3275.

Coutinho, C. F., & Mazo, L. H. (2005). Complexos metálicos com o herbicida glifosato: revisão. Química Nova, 28, 1038-1045.

Coutinho, C. F., Coutinho, L. F., & Mazo, L. H. (2009). Estudo do comportamento eletroquímico de substâncias complexantes utilizando eletrodo de cobre. Química Nova, 32, 228-233.

Cox, J. A., & Cheng, K. H. (1974). Determination of phosphate by cathodic stripping voltammetry at a glassy carbon electrode. Analytical Letters, 7(10), 659-670.

Daniele, P. G., De Stefano, C., Prenesti, E., & Sammartano, S. (1997). Copper (II) complexes of N-(phosphonomethyl) glycine in aqueous solution: a thermodynamic and spectrophotometric study. Talanta, 45(2), 425-431.

Davis, J. R. (2001). Copper and copper alloys. ASM international.

Ding, J., Guo, H., Liu, W. W., Zhang, W. W., & Wang, J. W. (2015). Current progress on the detection of glyphosate in environmental samples. J. Sci. Appl. Biomed, 3(06), 88-95.

Duke, S. O. (2018). The history and current status of glyphosate. Pest management science, 74(5), 1027-1034.

Duke, S. O., & Powles, S. B. (2008). Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. Pest Management Science: formerly Pesticide Science, 64(4), 319-325.

Duke, S. O., Baerson, S. R., & Rimando, A. M. (2003). Glyphosate. Encyclopedia of Agrochemicals.

Gasnier, C., Dumont, C., Benachour, N., Clair, E., Chagnon, M. C., & Séralini, G. E. (2009). Glyphosate-based herbicides are toxic and endocrine disruptors in human cell lines. Toxicology, 262(3), 184-191.

Gill, J. P. K., Sethi, N., & Mohan, A. (2017). Analysis of the glyphosate herbicide in water, soil and food using derivatising agents. Environmental Chemistry Letters, 15, 85-100.

Gill, J. P. K., Sethi, N., & Mohan, A. (2017). Analysis of the glyphosate herbicide in water, soil and food using derivatising agents. Environmental Chemistry Letters, 15, 85-100.

Horth, H., & Blackmore, K. (2009). Survey of glyphosate and AMPA in groundwaters and surface waters in Europe. WRC report no. UC8073, 2.

Huhn, C. (2018). More and enhanced glyphosate analysis is needed. Analytical and bioanalytical chemistry, 410, 3041-3045.

Ilieva, M., & Tsakova, V. (2004). Copper modified poly (3, 4-ethylenedioxythiophene): Part I: Potentiostatic experiments. Synthetic metals, 141(3), 287-292.

Ilieva, M., & Tsakova, V. (2004). Copper modified poly (3, 4-ethylenedioxythiophene): Part II: Potentiostatic experiments. Synthetic metals, 141(3), 287-292.

Ilieva, M., & Tsakova, V. (2005). Copper electrocrystallization in PEDOT in presence and absence of copper–polymer-stabilized species. Electrochimica acta, 50(7-8), 1669-1674

International Association of Environmental Analytical Chemistry (IAEAC); (1994). Sample Handling of Pesticides in Water; Barcelona, España.

Jámbor, A., & Molnár-Perl, I. (2009). Amino acid analysis by high-performance liquid chromatography after derivatization with 9-fluorenylmethyloxycarbonyl chloride: Literature overview and further study. Journal of Chromatography A, 1216(15), 3064-3077.

Mensink, H., & Janssen, P. (1994). Glyphosate (No. 159). World Health Organization.

Ministerio de la Protección Social. (22 de agosto de 2007) Resolución Número 2906 de 2007. Por la cual se establecen los Límites Máximos de Residuos de Plaguicidas – LMR en alimentos para consumo humano y en piensos o forrajes. DO 46735. https://www.mincit.gov.co/temas-interes/reglamentos-tecnicos/rt-conjuntos/resolucion-2906-del-22-de-agosto-de-2007-1.aspx

Moraes, F. C., Mascaro, L. H., Machado, S. A., & Brett, C. M. (2010). Direct electrochemical determination of glyphosate at copper phthalocyanine/multiwalled carbon nanotube film electrodes. Electroanalysis, 22(14), 1586-1591.

National Health and Medical Research Council (NHMRC); (2011). Australian drinking water guidelines 6, Commonwealth of Australia; Canberra, Australia.

Nedelkoska, T. V., & Low, G. C. (2004). High-performance liquid chromatographic determination of glyphosate in water and plant material after pre-column derivatisation with 9-fluorenylmethyl chloroformate. Analytica Chimica Acta, 511(1), 145-153.

Okada, E., Coggan, T., Anumol, T., Clarke, B., & Allinson, G. (2019). A simple and rapid direct injection method for the determination of glyphosate and AMPA in environmental water samples. Analytical and bioanalytical chemistry, 411, 715-724.

Oliveira, G. C., Moccelini, S. K., Castilho, M., Terezo, A. J., Possavatz, J., Magalhães, M. R., & Dores, E. F. (2012). Biosensor based on atemoya peroxidase immobilised on modified nanoclay for glyphosate biomonitoring. Talanta, 98, 130-136.

Oliveira, P. C., Maximiano, E. M., Oliveira, P. A., Camargo, J. S., Fiorucci, A. R., & Arruda, G. J. (2018). Direct electrochemical detection of glyphosate at carbon paste electrode and its determination in samples of milk, orange juice, and agricultural formulation. Journal of Environmental Science and Health, Part B, 53(12), 817-823.

Padilla Alonso, D. J. (2014). Estudio de líquidos iónicos como solventes de extracción en el análisis de glifosato en agua.

Rojano Delgado, A. M. (2012). Plataformas analíticas en metabolómica y su aplicación para el estudio de la resistencia-sensibilidad a herbicidas.

Sierra, E. V., Méndez, M. A., Sarria, V. M., & Cortés, M. T. (2008). Electrooxidación de glifosato sobre electrodos de níquel y cobre. Química Nova, 31, 220-226.

Singh, S., Kumar, V., Gill, J. P., Datta, S., Singh, S., Dhaka, V., Kapoor, D., Wani, A. B., Dhanjal, D. S., Kumar, M., Harikumar, S. L., & Singh, J. (2020). Herbicide glyphosate: Toxicity and microbial degradation. International Journal of Environmental Research and Public Health, 17(20), 7519.

Songa, E. A., Arotiba, O. A., Owino, J. H., Jahed, N., Baker, P. G., & Iwuoha, E. I. (2009 - I). Electrochemical detection of glyphosate herbicide using horseradish peroxidase immobilized on sulfonated polymer matrix. Bioelectrochemistry, 75(2), 117-123.

Songa, E. A., Somerset, V. S., Waryo, T., Baker, P. G., & Iwuoha, E. I. (2009 - II). Amperometric nanobiosensor for quantitative determination of glyphosate and glufosinate residues in corn samples. Pure and Applied Chemistry, 81(1), 123-139.

Teófilo, R. F., Reis, E. L., Reis, C., Silva, G. A. D., & Kubota, L. T. (2004). Experimental design employed to square wave voltammetry response optimization for the glyphosate determination. Journal of the Brazilian Chemical Society, 15, 865-871.

Toss, V., Leito, I., Yurchenko, S., Freiberg, R., & Kruve, A. (2017). Determination of glyphosate in surface water with high organic matter content. Environmental Science and Pollution Research, 24, 7880-7888.

Tu, M., Hurd, C., & Randall, J. M. (2001). Weed control methods handbook: tools & techniques for use in natural areas.

United States Environmental Protection Agency (US EPA); (2009). EPA 816-F-09-004, National Primary Drinking Water Regulation; Washington D.C., United States of America.

Valle, A. L., Mello, F. C. C., Alves-Balvedi, R. P., Rodrigues, L. P., & Goulart, L. R. (2019). Glyphosate detection: methods, needs and challenges. Environmental chemistry letters, 17, 291-317.

Varona, M., Henao, G. L., Díaz, S., Lancheros, A., Murcia, Á., Rodríguez, N., & Álvarez, V. H. (2009). Evaluación de los efectos del glifosato y otros plaguicidas en la salud humana en zonas objeto del programa de erradicación de cultivos ilícitos. Biomédica, 29(3), 456-475.

Wang, S., Liu, B., Yuan, D., & Ma, J. (2016). A simple method for the determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in seawater matrix with high performance liquid chromatography and fluorescence detection. Talanta, 161, 700-706.

Winfield, T. W., Bashe, W. J., & Baker, T. V. (1990). Method 547 Determination of Glyphosate in Drinking Water by Direct-Aqueous-Injection Hplc, Post-Column Derivatization, and Fluorescence Detection. Technol. Appl, 1, 1-16.

Zainudin, B. H., Salleh, S., Mohamed, R., Yap, K. C., & Muhamad, H. (2015). Development, validation and determination of multiclass pesticide residues in cocoa beans using gas chromatography and liquid chromatography tandem mass spectrometry. Food chemistry, 172, 585-595.

Zambrano-Intriago, L. A., Amorim, C. G., Rodríguez-Díaz, J. M., Araújo, A. N., & Montenegro, M. C. (2021). Challenges in the design of electrochemical sensor for glyphosate-based on new materials and biological recognition. Science of the Total Environment, 793, 148496.

Zhu, Y., Zhang, F., Tong, C., & Liu, W. (1999). Determination of glyphosate by ion chromatography. Journal of chromatography A, 850(1-2), 297-301.

1. Capítulo 1: Métodos Experimentales

1.1 Técnicas electroquímicas

Las técnicas electroquímicas son métodos analíticos ampliamente utilizados en la química y la ciencia de los materiales para estudiar reacciones químicas y procesos electroquímicos en disoluciones. Estas técnicas involucran la medición de corrientes eléctricas generadas por la transferencia de electrones en una interfaz electrodo-disolución. Entre las técnicas electroquímicas más comunes se encuentran la voltamperometría y la cronopotenciometría, Cada una ofrece ventajas específicas en términos de su aplicabilidad y capacidades analíticas.

1.1.1 Voltamperometría cíclica

La voltamperometría cíclica (CV) es una técnica electroquímica ampliamente utilizada que permite realizar estudios detallados sobre el comportamiento de las especies químicas en disolución y el electrodo en el que ocurren las reacciones electroquímicas.

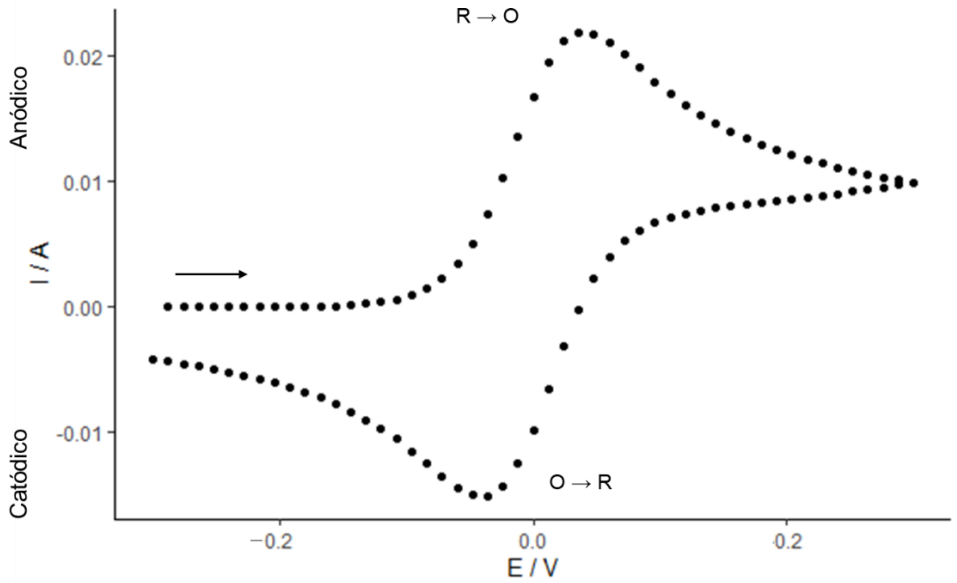
El procedimiento de voltamperometría cíclica implica un barrido de potencial controlado en una dirección, en un rango de potencial y con una velocidad preestablecidos sobre un electrodo de trabajo en relación con un electrodo de referencia. Una característica importante es que después de completar un primer barrido en la ventana de potencial seleccionada el barrido se invierte y genera ciclos de potencial. Durante este proceso se monitorea la corriente en función del potencial permitiendo así la generación de un voltamperograma completo (Simões, F 2017; Scholz, F 2015; Kissinger, P 1983).

Cuando el analito de interés está presente en la disolución se registra una corriente faradaica (I_f) en la ventana de potencial correspondiente a la reacción electroquímica específica de ese analito. Sin embargo, también se observan efectos relacionados con la corriente capacitiva (I_c) debido a la variación de la carga en la doble capa eléctrica (C_d) en

la interfaz electrodo-disolución. Este aspecto es importante ya que una corriente capacitiva elevada puede interferir en la observación de la corriente faradaica, que es la que proporciona información sobre la concentración del analito. Dado que el voltamperograma registra la corriente total (suma de I_f y I_c) en función del potencial, es esencial tener en cuenta estos efectos para evitar la pérdida de información relacionada con las corrientes faradaicas (Simões, F 2017).

La Figura 1-1 muestra un voltamperograma cíclico típico de una especie en disolución. El voltamperograma permite diferenciar dos regiones, la región anódica y la región catódica. La región anódica tiende a observarse durante el barrido hacia potenciales positivos y muestra la oxidación de una especie química en el electrodo, generando una corriente positiva. Por otro lado, la región catódica muestra la reducción de una especie química y produce una corriente negativa (Bard, A 2021; Wang, J. 2006; Rieger, P 1994).

Figura 1-1: Diagrama Voltamperograma Cíclico



Nombre de la fuente: Diagrama simulado con R con el uso de la biblioteca EleChemr

La posición de estos picos en el voltamperograma permite conocer los potenciales a los que ocurren las reacciones de oxidación y reducción. El potencial en el que se observa el pico de oxidación se conoce como *potencial de pico anódico*, y el correspondiente al pico de reducción se denomina *potencial de pico catódico* (Bard, A 2021; Wang, J. 2006).

La simetría entre el pico anódico y el pico catódico considerando la intensidad de corriente y la forma, así como la diferencia en potencial entre ambos, permite determinar la reversibilidad de la reacción. Si los picos son simétricos y la diferencia de potencial es cercana a 59 mV sugiere que la reacción es reversible y sigue la ecuación de Nernst. En contraste, si los picos carecen de simetría y la diferencia de potencial es mayor, la reacción es probablemente irreversible (Bard, A 2021; Inesi, A. 1986).

La forma de los picos también permite conocer la fase en la que ocurre la reacción, puesto que los picos agudos y que siguen la forma de una distribución normal indican que la reacción faradaica ocurre en la superficie del electrodo mientas que las señales que no siguen esta forma reflejan difusión del analito en la disolución (Bard, A 2021; Girault, H 2004).

En esta investigación se utilizó la voltamperometría cíclica para caracterizar el electrodo en los pasos de limpieza, la síntesis del polímero conductor y la evaluación de la estabilidad del cobre depositado. Los límites de la ventana de potencial, así como la velocidad de barrido dependen del medio utilizado y del experimento específico que se realiza.

1.1.2 Cronopotenciometría

La cronopotenciometría se basa en la aplicación de una corriente constante entre el electrodo de trabajo y un electrodo de referencia. Se utiliza para seguir la evolución del potencial del electrodo de trabajo en función del tiempo en un sistema electroquímico sometido a dicha corriente constante (Inesi, A. 1986).

Esta técnica es aplicable en una amplia gama de contextos, destacando su utilidad en el estudio de la cinética de reacciones redox específicas, la evaluación de la influencia de inhibidores o catalizadores en procesos electroquímicos y el desarrollo de sensores y biosensores electroquímicos (Bard, A 2021; Kissinger, P 1983; Wang, J. 2006; O'Mahony, A 2001). En este trabajo la técnica de cronopotenciometría fue utilizada para seguir la polimerización de EDOT sobre el electrodo de carbono vítreo, optimizando los valores de corriente y tiempo. La ventaja en este caso es poder controlar la carga utilizada durante el proceso de síntesis y asegurar de este modo la formación de una misma cantidad de polímero.

1.1.3 Cronoamperometría

La cronoamperometría es una técnica electroquímica que se utiliza para medir la corriente que fluye a través de un electrodo de trabajo en función del tiempo cuando se aplica un potencial constante al electrodo. Esta técnica proporciona información valiosa sobre la cinética de reacciones redox y la concentración de especies en disolución. La relación entre la corriente y el tiempo en cronoamperometría potenciostática se describe mediante la ecuación de Cottrell (ver Ecuación 1.1) para un proceso redox controlado por difusión. Típicamente se usa para determinar el área activa de un electrodo. (Bard, A 2021; Inesi, A. 1986; Rieger, P 1994).

$$i = \frac{nFA{D_0}^{1/2}C_0}{\sqrt{\pi t}} \qquad (1.1)$$

Donde:
I (amperios) es la corriente en función del tiempo
t (segundos).
n es el número de electrones transferidos en la reacción.
F es la constante de Faraday (96485,33212 C mol^{-1}).
A es el área del electrodo (cm^2).
C_0^* es la concentración de las especies oxidadas (mol cm^{-3}).
D_0 es el coeficiente de difusión de la especie oxidada (cm^2 s^{-1}).

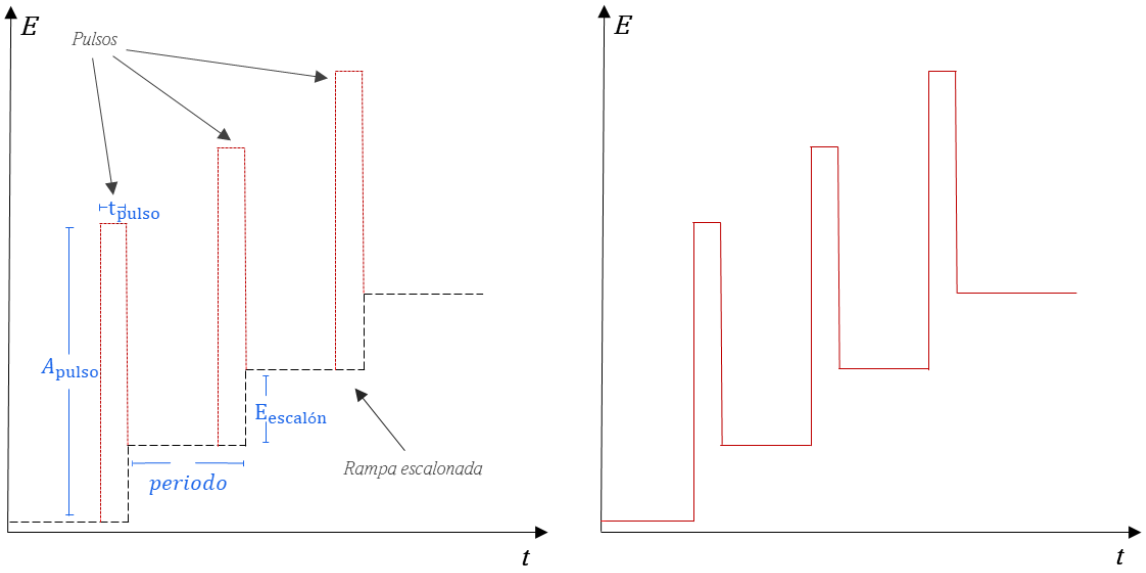
En este trabajo se usa la cronoamperometría para controlar el proceso de reducción del cobre variando el potencial y el tiempo de reducción en una disolución de 0,033 M de $CuSO_4$ en 0,5 M de H_2SO_4 y usando el electrodo de carbono vítreo previamente modificado con PEDOT.

1.1.4 Voltamperometría de pulso diferencial (VPD)

La voltamperometría de pulso diferencial (VPD) es una técnica en la que se mide la intensidad de corriente cuando se hace un barrido de potencial. Lo distintivo de esta técnica

radica en la aplicación de pulsos de potencial durante el barrido con una cierta amplitud ($E_{potencial}$), como se ilustra en la Figura 1-2. Se aplica un salto de potencial que se mantiene durante un tiempo específico (t_p) y después el potencial regresa a un potencial ligeramente mayor al inicial ($E_{escalón}$). La duración total del tiempo se llama periodo o tiempo del escalón ($t_{escalón}$). (Scholz, F. 2015; Simões, F 2017; Bard, A 2021; Wang, J 2006; Rieger, P 1994; Girault, H 2004).

Figura 1-2: Diagrama de la aplicación de pulso de potencial sobre una rampa de potencial lineal en función del tiempo. Diagrama adaptado de la referencia (Scholz, F. 2015).



Se lleva a cabo la medición de corriente justo antes de la aplicación de un pulso de potencial y nuevamente al finalizar dicho pulso. Estos valores de corriente se utilizan para calcular la diferencia entre ellos como se ilustra en la Figura 1-3. Esta diferencia entre las dos corrientes se representa mediante la ecuación:

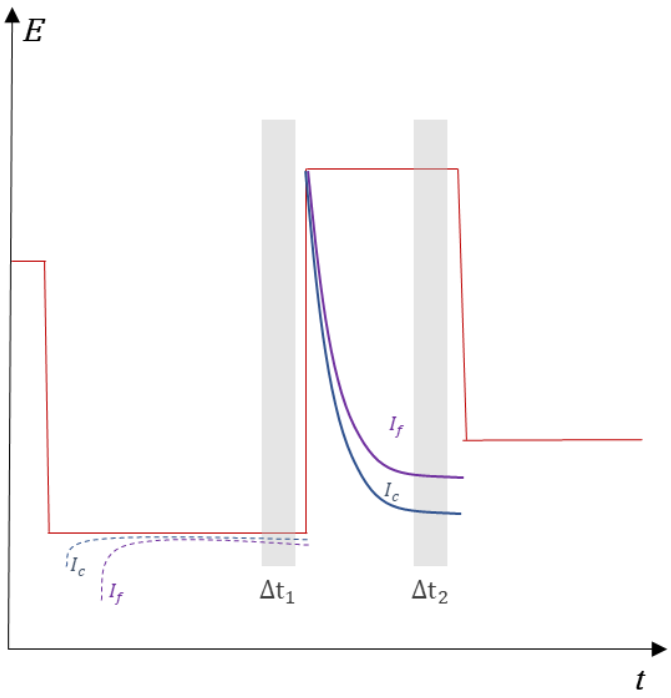
$$I_{n2} - I_{n1} = \Delta I_n, dp \qquad (1.2)$$

Donde n representa el número del pulso aplicado. La importancia de calcular esta diferencia radica en la reducción del efecto de las corrientes capacitivas, lo que permite

que la medición se enfoque en la corriente faradaica que es la corriente electroquímica de interés.

Los voltamperogramas se generan al graficar cada valor de $\Delta I_{n,dp}$ en función del potencial. Este enfoque permite visualizar claramente las respuestas electroquímicas en función del potencial aplicado (Simões, F 2017).

Figura 1-3: Diagrama de periodos de tiempo en que se mide la corriente total. Diagrama adaptado de la referencia (Scholz, F. 2015).



La intensidad de la señal depende de los parámetros de la aplicación del pulso ya que la corriente capacitiva y faradaica están involucradas en la respuesta del sistema. Por una parte, la señal de corriente faradaica máxima (Δi_{max}) para una especie en disolución cambia siguiendo la Ecuación (1.3). Tenga en cuenta que se consideran corrientes positivas a las corrientes anódicas.

$$\Delta i_{max} = nFA[C]\sqrt{\frac{D}{\pi t_p}}\frac{\sigma-1}{\sigma+1} \quad (1.3)$$

$$\sigma = e^{\frac{nFE_{pulso}}{2RT}} \quad (1.4)$$

En ese caso, n es el número de electrones involucrados en la reacción, F es la constante de Faraday, A es el área superficial del electrodo, [C] es la concentración del analito, D es el coeficiente de difusión, R es la constante de los gases ideales y T la temperatura.
El tiempo de pulso es t_p y σ es un parámetro descrito por la Ecuación (1.4). (Bard, A 2021; Wang, J 2006; Girault, H 2004; Pelzer, J 1989; Parry, E 1965). El parámetro σ alcanzará un valor infinito cuando se usen valores grandes de E_{pulso}.

El aumento de la amplitud del pulso también conlleva a que se incremente el ancho de las señales afectando la resolución entre picos cercanos.

Por otra parte, la caída en la corriente capacitiva para un circuito RC inicialmente descargado, está descrita por la Ecuación (1.5). (Pelzer, J 1989; Parry, E 1965)

$$i_c = \frac{E_{pulso}}{R} e^{\frac{-t_p}{RC_D}} \quad (1.5)$$

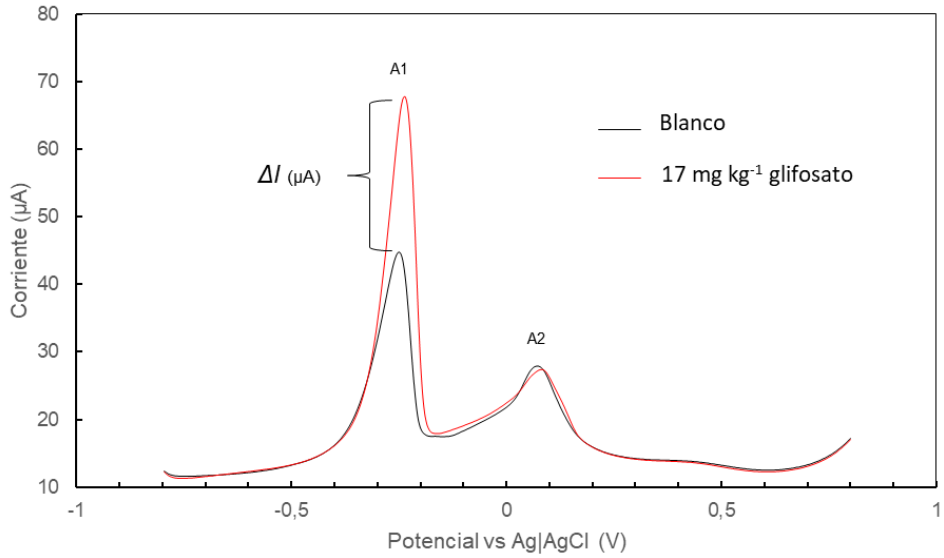
En este caso R es la resistencia, C_D es la capacitancia de la doble capa y t_p es el tiempo del pulso. La Ecuación (1.5) indica que la corriente para un capacitor ideal disminuye con el paso del tiempo de forma exponencial una vez se aplica el salto.

Las ecuaciones muestran que tanto la corriente faradaica como la capacitiva disminuyen con el tiempo. Sin embargo, la corriente capacitiva disminuye más rápido porque tiene un comportamiento exponencial. Por lo tanto, si la corriente capacitiva de fondo es la misma antes y al final del puso es posible eliminar o reducir esta contribución favoreciendo la señal faradaica.

La voltamperometría de pulso diferencial es una técnica ampliamente utilizada por sus ventajas como un límite de detección bajo, corriente capacitiva reducida y corrientes de fondo suprimidas. De esa forma, permite determinar compuestos electroactivos hasta 10^{-7} - 10^{-8} mol L^{-1} y también permite detectar simultáneamente diferentes analitos (Scholz, F 2015).

La VPD fue seleccionada para la determinación de glifosato haciendo una medida inicial con el electrodo en el electrolito soporte que consiste en una disolución reguladora de pH 7,4 y otra medida con el electrodo en la disolución con glifosato. Se hicieron barridos hacia potenciales positivos en una ventana entre -0,8 a 0,8 V vs Ag|AgCl. (Moraes, F 2010; Coutinho, C 2005 y 2007). La cuantificación de glifosato se hace por la diferencia entre la señal de la medición hecha en la disolución con glifosato y el blanco como se observa en la Figura 1-4. Los parámetros de amplitud, tiempo de pulso y periodo se analizaron y optimizaron para obtener la mayor diferencia entre el blanco y la señal con glifosato.

Figura 1-4: Ejemplo de los voltamperogramas de pulso diferencial obtenidos con el electrodo modificado en la disolución reguladora de pH con y sin glifosato. ΔI corresponde a la señal analítica de interés.



1.2 Reactivos y Equipos

Para la preparación de todas las disoluciones acuosas y el lavado del material se empleó agua ultrapura tratada a través del sistema Milli-Q de Merck. En el caso de las disoluciones con polímeros se utilizó Acetonitrilo. EMSURE® ACS, Reag. Ph Eur (CH_3CN) de Merck,

previamente secado durante 24 horas con tamiz molecular de 3 mm de diámetro. Este último se activa por calentamiento en un horno de microondas.

Otros reactivos necesarios como el ácido sulfúrico 95-97%. EMSURE® ISO (H_2SO_4), sulfato cúprico pentahidrato. EMSURE® ACS, ISO, Reag. Ph Eur ($CuSO_4.5H_2O$), fosfato monoácido de potasio trihidrato. EMSURE® ISO ($K_2HPO_4.3H_2O$), fosfato diácido de potasio. EMSURE® (KH_2PO_4), hidróxido de potasio en lentejas. EMSURE®, perclorato de sodio hidrato 99,99% ($NaClO_4$), 3,4-etilendioxitiofeno 99% y el estándar de N-(fosfonometil) glicina PESTANAL® fueron suministrados por la marca Merck.

Adicionalmente, se emplearon reactivos como cloruro de sodio (NaCl) y cloruro de potasio (KCl) suministrados por Rodaquímicos S.A.S.; dimetilsulfóxido (Reag. USP, Ph. Eur.) (DMSO CH_3SOCH_3) de PanReac AppliChem; permanganato de potasio, ACS ($KMnO_4$) de la marca Hach; peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 20% de Laboratorios Deuscorp y nitrógeno gaseoso suministrado por la marca Messer.

Se emplearon dos potenciostatos: CH Instruments Modelo 650E y el potenciostato/galvanostato µ-Autolab. En todos los casos se utilizó un sistema de 3 electrodos con electrodo de plata/cloruro de plata (Ag|AgCl, KCl 3,5 M) como electrodo de referencia (RE), platino (Pt) como contra electrodo (CE) y electrodo de carbono vítreo (ECV) con diámetro de 3 mm como electrodo de trabajo (*Working Electrode*, WE) que será modificado. Todos los potenciales experimentales están referidos al electrodo de referencia de Ag|AgCl.

En el desarrollo de esta investigación se emplearon dos variantes de celdas electroquímicas para los procesos de la modificación del electrodo y la determinación de glifosato. En primer lugar, se utilizaron celdas de cinco bocas que tienen un burbujeador y un capilar de Luggin. El capilar contiene la misma disolución presente en la celda y allí se ubica el electrodo de referencia. Este diseño (Figura 1-5) permite trabajar en una atmósfera libre de oxígeno burbujeando con nitrógeno. Para disminuir la alta resistencia producida por el uso del capilar de Luggin se utiliza un segundo contraelectrodo de platino que se conecta al electrodo de referencia empleando un capacitor (Figura 1-6).

Figura 1-5: Montaje celda de cinco bocas.

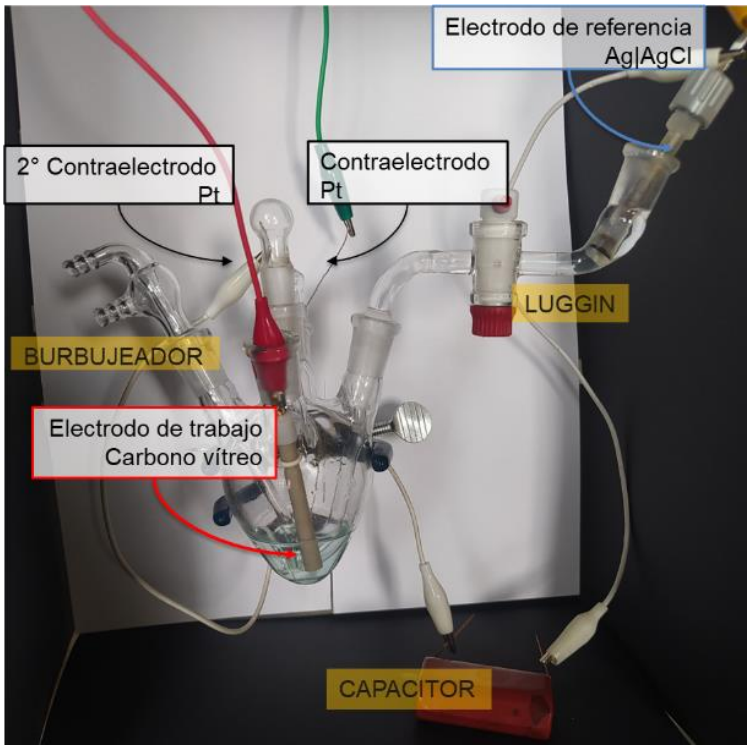
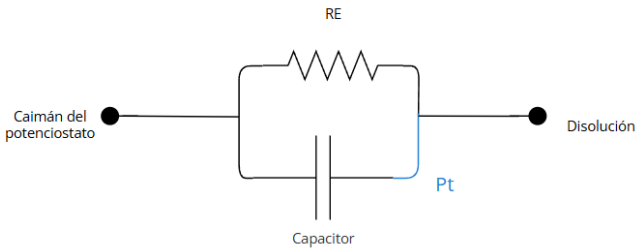


Imagen del montaje de la celda electroquímica.

Figura 1-6: Circuito eléctrico equivalente del electrodo de referencia en paralelo con el capacitor. Hecho con Visual Paradigm Online



El otro tipo de celdas fueron celdas cónicas de un solo compartimento que permiten el uso de volúmenes pequeños de 10 mL.

1.3 Procesos de limpieza

Los procesos de limpieza del material y del electrodo son fundamentales para asegurar la repetibilidad de los experimentos. Las señales obtenidas en la limpieza del electrodo

determinan si se continúa o no con el experimento puesto que si se encuentra alguna variación se procede a repetir la limpieza o a cambiar la disolución. A continuación, se describen detalladamente estos procesos.

1.3.1 Limpieza de material de vidrio

El proceso de limpieza del material de vidrio fue llevado a cabo siguiendo un procedimiento estándar. Primero, se sumergió el material en una disolución de permanganato de potasio ($KMnO_4$) acidificado con ácido sulfúrico durante un período de 24 horas. Este paso tenía como objetivo oxidar cualquier residuo presente en el material. Posteriormente, se retiró el material de la disolución de permanganato y se procedió a enjuagarlo con una disolución de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) que consistía en una disolución al 1% de H_2O_2 en agua desionizada, también, acidificada con ácido sulfúrico 0.1 M. Este enjuague permitió eliminar cualquier especie de dióxido de manganeso que pudiera quedar en la superficie del material.

Para asegurar una limpieza óptima se realizaron tres enjuagues adicionales con agua ultrapura (>18 MΩ). Finalmente, el material de vidrio se sometió a un proceso de ebullición en agua ultrapura al menos en tres ocasiones. Este riguroso proceso de limpieza garantizó que el material estuviera libre de cualquier contaminante o residuo antes de su uso en la celda electroquímica (Monge-Romero 2013).

1.3.2 Limpieza del electrodo de carbono vítreo (ECV)

El carbono vítreo es utilizado frecuentemente en electrodos ya que es un material conductor de la electricidad además de ser poco reactivo, gracias a sus poros muy pequeños y su baja permeabilidad a gases y líquidos. Es un electrodo inerte en una amplia ventana de potencial (Dekanski, A 2001; Van der Linden, W 1980; Zittel, H. 1965; Kamau, G 1988).

Kamau destaca en su investigación que la alta sensibilidad de las velocidades aparentes de las reacciones redox está relacionada con el estado de la superficie del electrodo. En su revisión identificó la dependencia de los resultados electroquímicos de la naturaleza y

reproducibilidad del método de preparación del electrodo, así como de la historia previa del electrodo (Kamau, G 1988).

Diversos métodos de limpieza han sido desarrollados para abordar esta cuestión, incluyendo el pretratamiento mediante pulido (Kamau, G 1988; Monge Romero, I 2013), pretratamiento térmico (Fagan, D 1985), pretratamiento electroquímico (Engstrom, R 1984; Kiema, G 2003), irradiación con láser (Rice, R 1990) y pretratamiento fotocatalítico (Dumanlı, O 2009). A lo largo de este trabajo la limpieza del ECV se hizo en dos pasos, el primero, es la limpieza mediante pulido, mecánicamente por abrasión con partículas de γ-alúmina y el segundo electroquímicamente en KOH 0.1 M.

Para llevar a cabo la limpieza mecánica se pulió el electrodo utilizando una suspensión de γ-alúmina con un diámetro de 0,3 µm sobre un paño suave. La superficie del electrodo se pulió aplicando una presión ligera y realizando movimientos en forma de ocho durante un minuto. Luego, se enjuagó el electrodo con agua desionizada y se sumergió en un vaso de precipitados con suficiente agua, sometiéndolo a ultrasonido durante un minuto. Este proceso se repitió utilizando una suspensión de γ-alúmina de 0,05 µm de diámetro en otro paño (Engstrom, R 1984; Kamau, G 1985; Hu, F 1985).

El paso de la limpieza electroquímica se llevó a cabo utilizando una disolución de 0,1 M de KOH en un vaso de precipitados que actuó como celda electroquímica. El ECV es tratado por voltamperometría cíclica (VC) usando límites de potencial entre -0,2 y 0,8 V vs Ag|AgCl durante 20 ciclos a 250 mV s^{-1}, después se hacen otros 3 ciclos a 50 mV s^{-1} para asegurar que no se observen señales adicionales de oxidación ni reducción (Suárez Herrera, M. 2011; Monge Romero, I 2013; Dekanski, A 2001).

El resultado de la limpieza se observa en la Figura 1-7 donde se puede evidenciar que las corrientes de oxidación disminuyen, lo que indica que hay menos especies que reaccionan sobre la superficie del electrodo. Hasta este punto de la limpieza y en esta la ventana de potencial de la VC, no se observa que se generen grupos funcionales hidroxilo ni carboxilo (Suárez Herrera, M. 2011; Monge Romero, I 2013).

Figura 1-7: Voltamperograma de la limpieza del electrodo de carbono vítreo (ECV) tomada a 250 mV s^{-1}. La gráfica corresponde a los barridos 1, 5, 10, 15 y 20, en el orden indicado por la flecha.

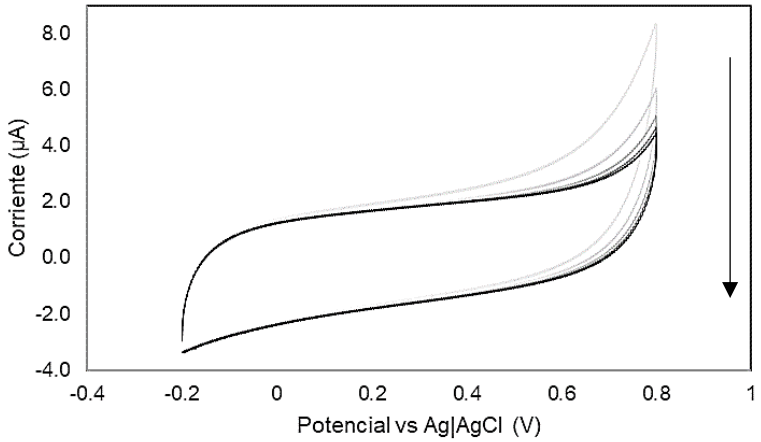
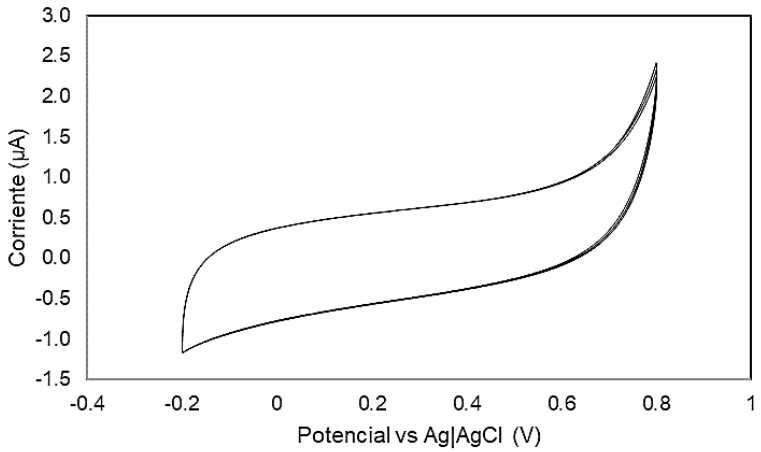


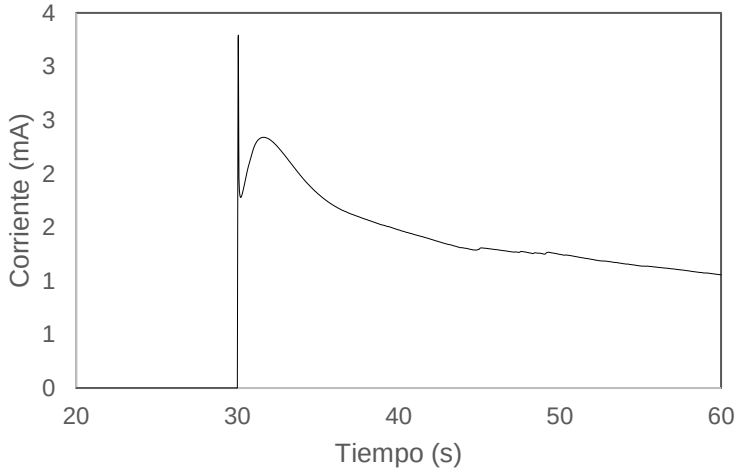
Figura 1-8: Voltamperograma de la VC de la limpieza del ECV tomada a 50 mV s^{-1} en 0,1 M de KOH. La gráfica corresponde a los barridos 1, 2 y 3.



El segundo VC de limpieza (Figura 1-8) se hace a una velocidad baja para garantizar que la señal obtenida sea estable y que no haya reacciones adicionales. Las corrientes observadas son causadas por el barrido de potencial al que se somete el electrodo, lo que provoca cambios de capacitancia en la doble capa eléctrica (Suárez Herrera, M. 2011).

Después del proceso de limpieza por VC se hace la activación del electrodo por cronoamperometría en la misma celda y disolución de KOH aplicando inicialmente un potencial de 0 V por 30 segundos y después un salto de potencial hasta 2 V durante 30 segundos, de modo que se formen las especies oxidadas sobre la superficie del electrodo. En la Figura 1-9 se muestra el resultado de la cronoamperometría de activación del electrodo y se puede observar que después del salto de potencial hay una señal de oxidación que disminuye con el tiempo.

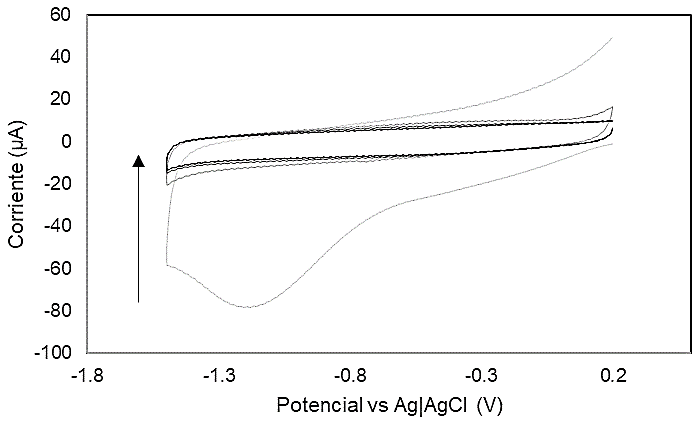
Figura 1-9: Cronoamperograma del ECV en 0,1 M de KOH entre 0 V durante 30 s hasta 2 V durante 30 s.



1.3.3 Activación del electrodo de carbono vítreo en medio orgánico

Antes de iniciar con la polimerización se hace una activación del ECV en el medio orgánico para eliminar el agua que queda presente en la superficie del electrodo. La activación se hace por CV usando una ventana de potencial entre -1,5 y 0,2 V vs Ag|AgCl durante 15 ciclos a 250 mV s^{-1} (Moreno-Piza, O 2022).

Figura 1-10: Voltamperograma de la VC de activación del ECV en una disolución de 0,1 $NaClO_4$ en acetonitrilo seco y con adición de 10 µL de EDOT tomada a 250 mV s^{-1}. La gráfica corresponde a los barridos 1, 5, 10 y 15, en el orden indicado por la flecha.



La Figura 1-10 muestra el voltamperograma de la activación del ECV hecha antes de la polimerización del EDOT. Se observa que a medida que avanzan los ciclos la señal de reducción se elimina. Esta señal se asocia a la producción de hidrógeno debido a los residuos de agua que había en la superficie del electrodo. (Suárez Herrera, M. 2011). Lo más importante en este paso es que, al final de los 15 ciclos, todas las corrientes observadas se deban al cambio en la capacitancia de la doble capa eléctrica y no se observe ningún tipo de señal anódica ni catódica adicional.

1.4 Síntesis de PEDOT sobre ECV

Una vez activado el electrodo en la disolución orgánica se lleva a cabo la electropolimerización de 3,4-etilendioxitiofeno (EDOT) para formar poli(3,4-etilendioxitiofeno) (PEDOT) en un medio orgánico aprótico siguiendo un procedimiento similar al conseguido por Sandoval y colaboradores. (Sandoval, A, 2014; Sivakumar, C, 2018; Cysewska, K, 2015; Poverenov, E 2010; Du, X 2003). Se emplearon diversas condiciones de polimerización a corriente constante las cuales se discutirán en el capítulo 2.

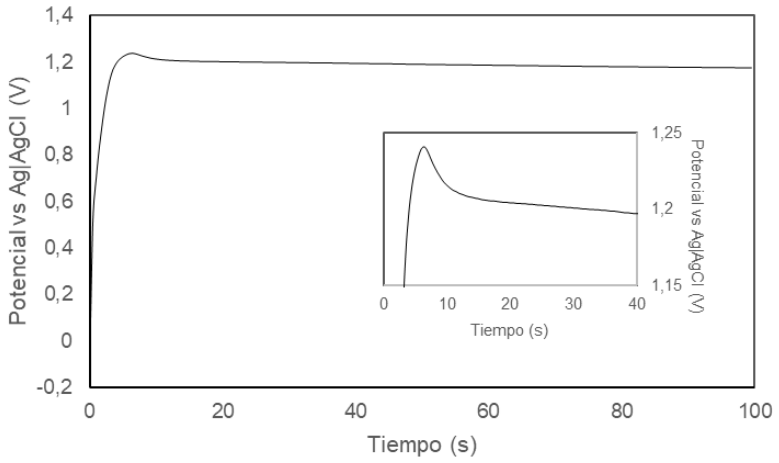
Para la síntesis se preparó una disolución de 0,1 M de $NaClO_4$ en CH_3CN, que fue previamente secada con un tamiz molecular de alumino-silicato de 3 mm de diámetro a

una proporción de 2 gramos por cada 10 ml durante 24 horas (Sandoval, A, 2014; Sivakumar, C 2018; Molina Osorio, A. 2014).

Se añadieron 10 ml de la disolución de $NaClO_4$ en una celda y se sometió a un intenso burbujeo de nitrógeno durante 15 minutos para desplazar el oxígeno presente en la disolución y en la celda. Después, se añadieron 10 µl de 3,4-etilendioxitiofeno (EDOT) y se mantuvo el burbujeo por otros 2 minutos.

Cuando la celda está lista se llena el capilar de Luggin, se lavan los electrodos con agua desionizada y luego con acetonitrilo seco, y se ubican los electrodos en la celda. Para disminuir la resistencia producida por el uso del capilar de Luggin, se utiliza un segundo contraelectrodo de platino que se conecta al electrodo de referencia empleando un capacitor.

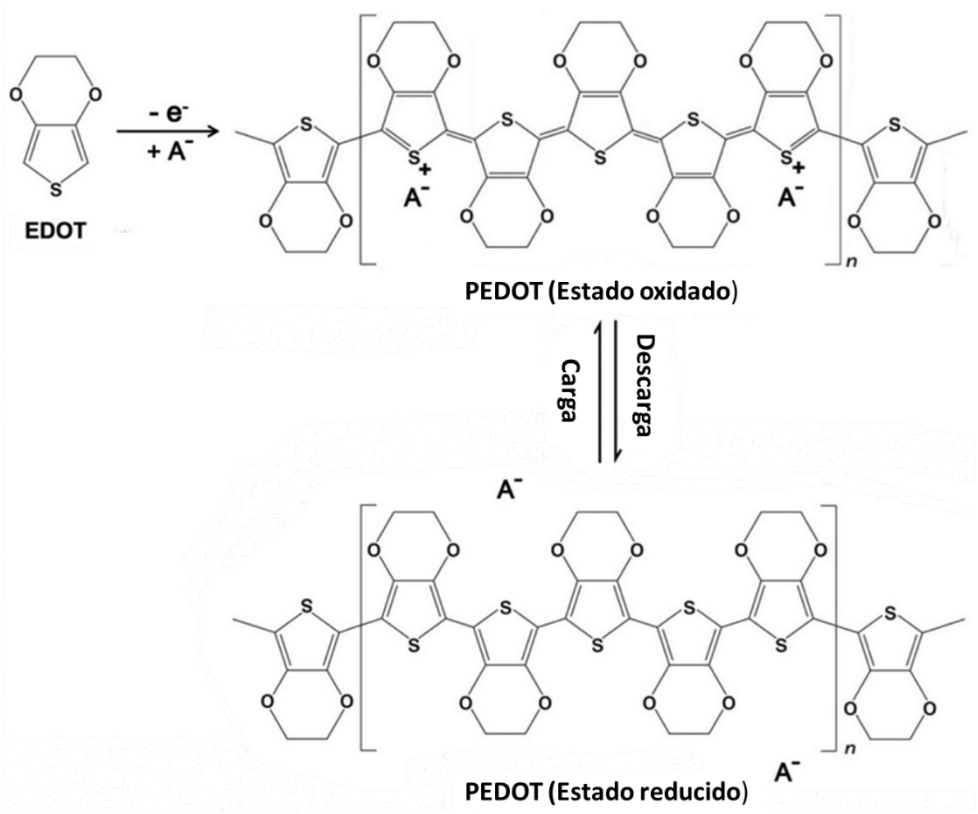
Figura 1-11: Gráfica de la cronopotenciometría de la síntesis de PEDOT sobre la superficie del ECV en disolución de 0,1 M de $NaClO_4$ en CH_3CN con 10 µl de EDOT para la que se sometió a una corriente de 19,6 µA durante 100 segundos. Inserto: ampliación de la cronopotenciometría de polimerización.



La síntesis del PEDOT en el caso de la Figura 1-11 se hizo a 0,248 mA/cm^2 durante 100 segundos (Sandoval, A. 2014). De la gráfica se puede observar que la polimerización es el único proceso que ocurre durante la cronopotenciometría. El inserto permite notar con

más claridad el potencial alcanzado (aprox 1,2 V) relacionado directamente con la oxidación del monómero y la formación de las primeras etapas de la formación de PEDOT (Sivakumar, C, 2018; Cysewska, K, 2015; Poverenov, E 2010; Du, X 2003).

Figura 1-12: Electropolimerización de EDOT y proceso de carga y descarga del polímero (Ren, M 2021).

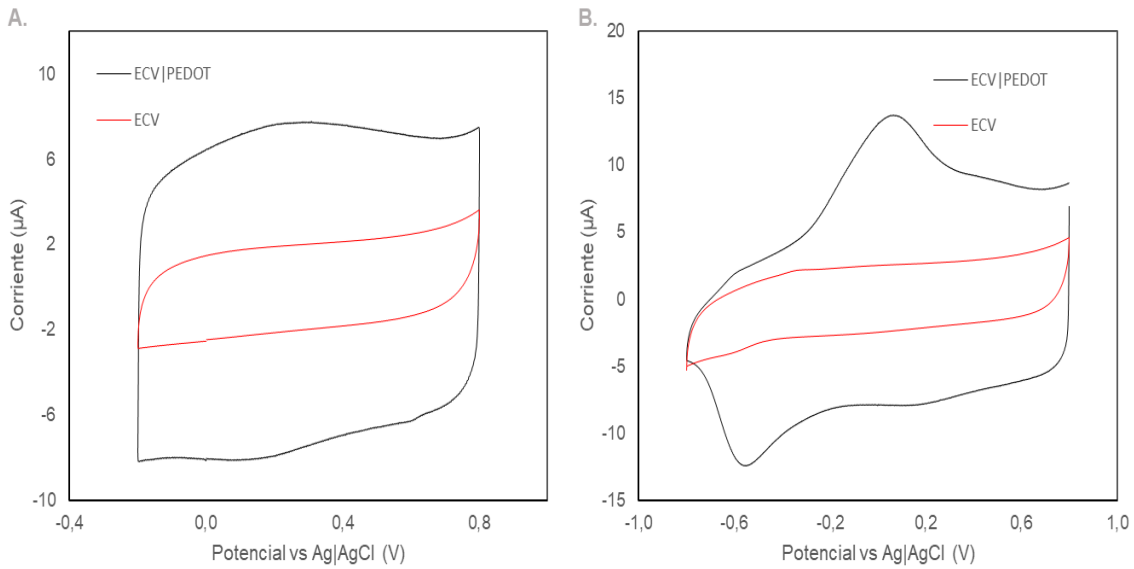


Después de la formación del polímero sobre la superficie del electrodo se hace una confirmación de la presencia del polímero por CV en una nueva disolución de 0,1 M de $NaClO_4$ en acetonitrilo seco nueva sin EDOT. La confirmación se hace en dos ventanas de potencial, una entre -0,2 y 0,8 V vs Ag|AgCl y la segunda entre -0,8 y 0,8 V vs Ag|AgCl, ambas durante 5 ciclos a 50 mV s^{-1}.

En la Figura 1-13 se observa que los voltamperogramas cíclicos tomados después de la polimerización difieren de los voltamperogramas tomados con el ECV sin modificar. En el voltamperograma A se observa un aumento de la corriente debida a la presencia del

polímero y su forma indica que tiene un comportamiento de tipo capacitivo (Suárez Herrera, M. 2011). En el voltamperograma B se observan señales de oxidación a 0 V y reducción alrededor de -0,6 V que son características del PEDOT (Sandoval, A, 2014; Poverenov, E 2010). Estas señales no se observan en el voltamperograma A lo que indica que el polímero se mantiene oxidado en la primera ventana de potencial y requiere reducirse (Figura 1-12) a su forma neutra a potenciales por debajo de -0,2 V para poder mostrar el comportamiento típico del voltamperograma B.

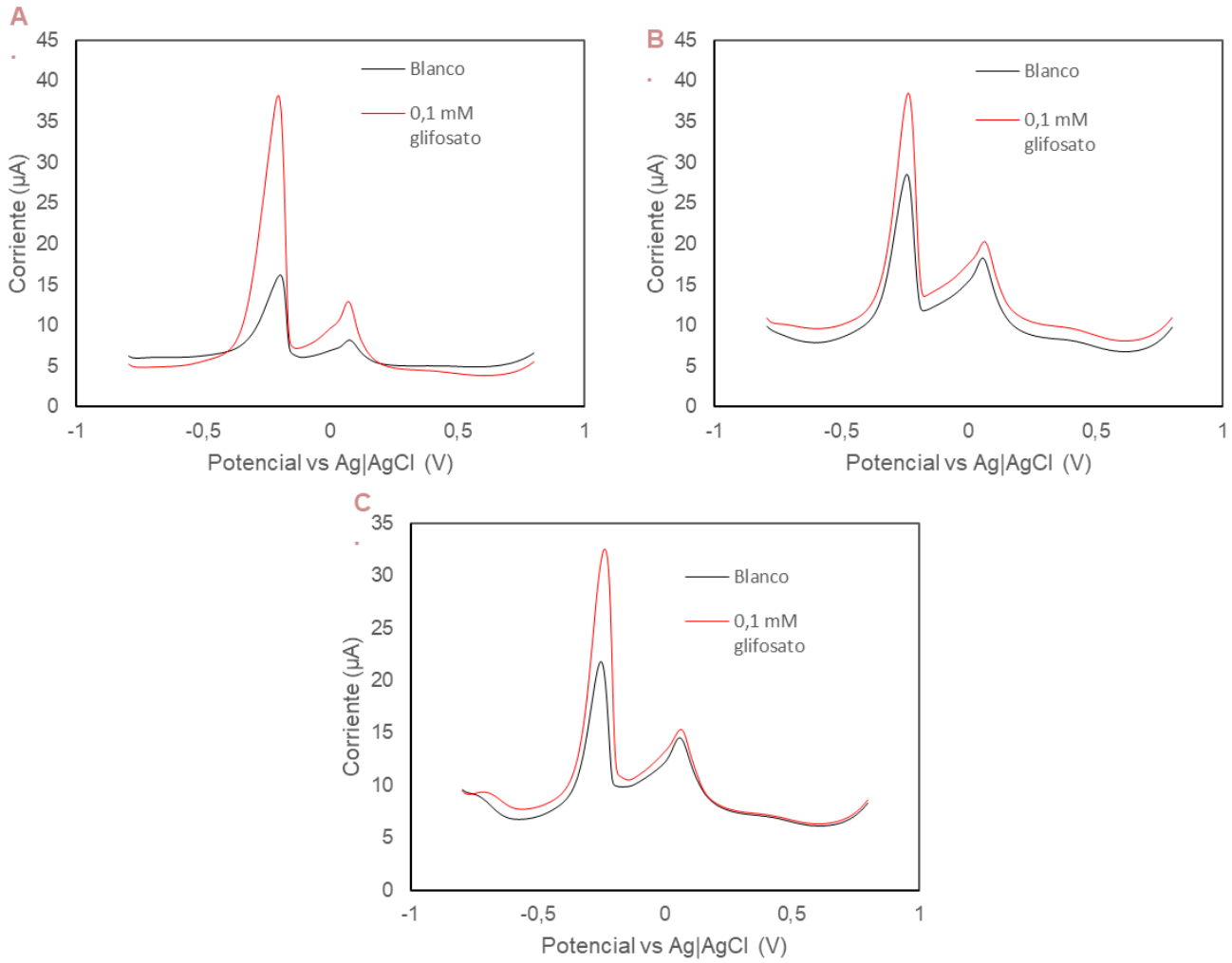
Figura 1-13: Voltamperogramas de la superficie de ECV|PEDOT tomadas a 50 mV s^{-1} en la disolución de 0,1 M de $NaClO_4$ en acetonitrilo seco. Se tomaron 5 ciclos. La gráfica corresponde a los últimos barridos de cada VC. La línea roja corresponde a la VC tomada con un ECV y la línea negra corresponde a la medida con ECV|PEDOT.



El polímero experimenta cambios en su oxidación dependiendo del potencial aplicado durante la VC, por lo tanto, fue importante considerar el efecto del potencial final al que se somete el electrodo recubierto con el polímero antes de proceder con el recubrimiento con cobre. Para evaluar este efecto, se realizaron tres mediciones de glifosato con electrodos modificados con PEDOT y cobre. La única diferencia entre ellas fue el valor del potencial

final durante la voltamperometría de confirmación del polímero utilizando los potenciales de 0,8 V, 0 V y -0,8 V.

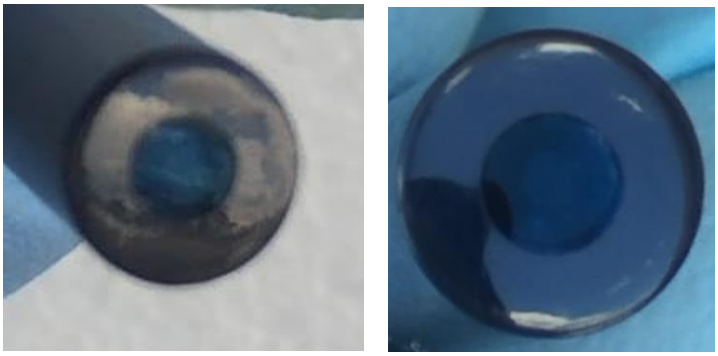
Figura 1-14: Voltamperogramas por VPD de medición de glifosato con ECV|PEDOT|Cu. Los electrodos fueron sometidos a potenciales finales de A. 0,8 V; B. 0 V y C. -0,8 V durante el paso previo de voltamperometría de confirmación del polímero antes de reducir cobre.



Las mediciones de glifosato se cuantifican por la diferencia de corriente entre la señal del blanco y la señal con glifosato aproximadamente en -0,25 V. Los valores de diferencia de corriente que se obtuvieron durante estas mediciones fueron: A. 21,9 µA, B. 9,92 µA y C. 10,7 µA. Por lo que se determinó que los mayores resultados de diferencia entre la señal con y sin glifosato se obtienen cuando se aplica un potencial final de 0,8 V sobre el electrodo recubierto con PEDOT antes de reducir cobre sobre el polímero.

Después de la VC de confirmación y aplicado un potencial final de 0,8 V, se observa que el polímero toma un color azul oscuro como se puede apreciar en la Figura 1-15.

Figura 1-15: Aspecto de la superficie del electrodo cuando se ha recubierto con PEDOT y se ha aplicado un potencial final de -0,8 V durante la VC de confirmación.



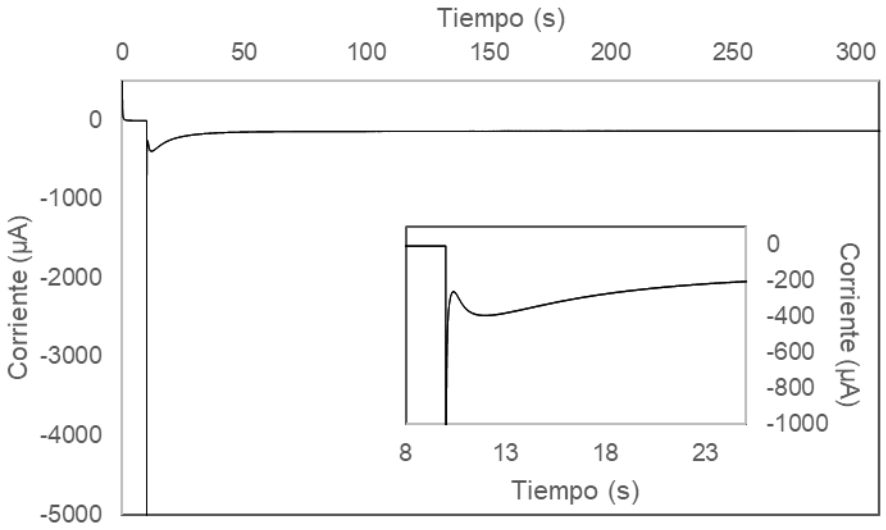
1.5 Reducción de cobre sobre electrodo modificado ECV|PEDOT

El cobre se redujo sobre la superficie del electrodo modificado ECV|PEDOT por cronoamperometría en medio acuoso acidificado, siguiendo un procedimiento similar al indicado por Ilieva y colaboradores (Ilieva, M 2004 parte I y II, Ilieva, M 2005). Para depositar el cobre sobre el electrodo se preparó una disolución de 0,033 M de $CuSO_4$ en 0,5 M de H_2SO_4. Esta disolución se agregó en una nueva celda que se desoxigenó por burbujeo con nitrógeno por 5 minutos.

Durante la cronoamperometría se aplica inicialmente un potencial de 0,8 V vs Ag|AgCl durante 10 segundos, esto asegura que no haya nada de cobre reducido sobre la superficie del electrodo. Posteriormente, se realiza un salto de potencial hasta -0,03 V durante 300 segundos, este potencial también será considerado en la sección sobre la optimización de la polimerización de EDOT y la reducción de cobre.

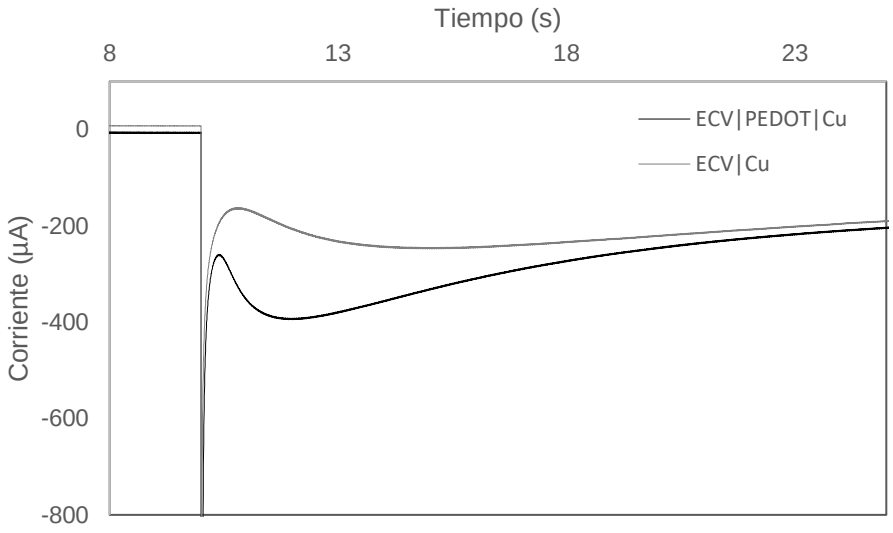
La Figura 1-16 muestra la gráfica de la cronoamperometría de reducción de cobre sobre el ECV modificado con PEDOT. Por la forma de la gráfica es posible decir que durante la reducción de cobre ocurre un proceso de nucleación progresiva de acuerdo con el modelo de Scharifker y Hills para la nucleación múltiple tridimensional (3D). (Scharifker, B. 1983; González Basto, M 2023; Sanz de Paz, D. 2015).

Figura 1-16: Cronoamperograma de la reducción de cobre sobre el ECV|PEDOT. Potenciales aplicados: 0 V durante 10 s, -0.03 V durante 300 s.



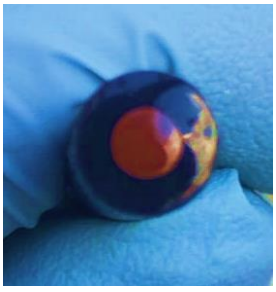
La Figura 1-17 resulta útil para comparar el proceso de reducción del cobre en el electrodo de ECV sin modificar y el ECV|PEDOT. En presencia de polímero el pico de corriente de reducción es más grande y sucede a tiempos menores que sobre el electrodo ECV lo que indica que la nucleación es más rápida en el polímero que en ausencia de este. Por lo tanto, se podría considerar que los sitios activos adicionales para el crecimiento de los núcleos de cobre se deben a la presencia de PEDOT. (Scharifker, B. 1983; Sanz de Paz, D. 2015).

Figura 1-17: Cronoamperogramas de la reducción de cobre sobre el ECV|PEDOT y sobre el ECV.



Después de que se reduce el cobre sobre la superficie del electrodo ésta toma un color anaranjado, lo que indica que hay una capa con una cantidad suficiente de cobre para que se pueda apreciar a simple vista como se puede ver en la Figura 1-18.

Figura 1-18: Aspecto de la superficie del electrodo cuando se ha reducido cobre sobre un ECV previamente modificado con una película de PEDOT



Después de modificar el electrodo con una capa de cobre se realizan varios ciclos de estabilización de la superficie mediante CV en una celda con una disolución reguladora de

pH conocida comercialmente como 10X *Phosphate-Buffered Saline* (PBS) for Western Blotting o PBS 10X. Esta solución se compone de 1,37 M NaCl, 27 mM KCl, 100 mM $K_2HPO_4.3H_2O$ y 18 mM KH_2PO_4 . La disolución se llevó a un pH de 7,40 con una disolución de KOH. (Merck KGaA). La estabilización se lleva a cabo utilizando una ventana de potencial de -0,8 a 0,8 V vs Ag|AgCl. En el primer paso, se realizan 20 ciclos a una velocidad de barrido de 250 mV s^{-1} seguido por el segundo paso con 5 ciclos a una velocidad de barrido de 50 mV s^{-1}.

Bibliografía

Aristov, N., & Habekost, A. (2015). Cyclic voltammetry-A versatile electrochemical method investigating electron transfer processes. World J. Chem. Educ, 3(5), 115-119.

Bard, A. L. (2001). Electrochemical Methods Fundamentals and Applications (2nd ed.). John Wiley & Sons.

Girault, H. H. (2004). Analytical and physical electrochemistry (1st ed.). Marcel Dekker.

Inesi, A. (1986). Instrumental Methods in Electrochemistry.: R. Greef, R. Peat, LM Peter, D. Pletcher and J. Robinson (Editors). Ellis Horwood, New York, Chichester, Brisbane, Toronto, 1985, 443 pp., 49-50

Kissinger, P. T., & Heineman, W. R. (1983). Cyclic voltammetry. Journal of Chemical Education, 60(9), 702.

Klingler, R. J., & Kochi, J. K. (1981). Electron-transfer kinetics from cyclic voltammetry. Quantitative description of electrochemical reversibility. The Journal of Physical Chemistry, 85(12), 1731-1741.

Monge Romero, I. C. (2013). Estudio electro catalítico de la reacción de reducción de oxígeno sobre películas ultra delgadas de polianilina (PANI). Sintetizadas vía electroquímica sobre electrodos de carbón vítreo, platino y oro modificados con películas de poli-(3, 4-etilendioxitiofeno)(PEDOT).

O'Mahony, A. M., Compton, R. G. (2011). "The use of single pulse chronopotentiometry to explore electrode kinetics: A review." Electrochimica Acta, 56(25), 9194-9207. M., Compton, R. G. (2011). "The use of single pulse chronopotentiometry to explore electrode kinetics: A review." Electrochimica Acta, 56(25), 9194-9207

Ren, M., Zhou, H., & Zhai, H. J. (2021). Obvious enhancement in electrochemical capacitive properties for poly (3, 4-ethylenedioxythiophene) electrodes prepared under optimized conditions. Journal of Materials Science: Materials in Electronics, 32, 10078-10088.

Rieger, P. H. (1994). Electrochemistry (2nd ed.). Chapman & Hall.

Scholz, F. (2015). Voltammetric techniques of analysis: the essentials. ChemTexts, 1(4), 17.

Simoes, F. R., Mattoso, L. H. C., & Vaz, C. M. P. (2006). Conducting polymers as sensor materials for the electrochemical detection of pesticides. Sensor Letters, 4(3), 319-324.

Wang, J. (2006). Analytical Electrochemistry (3rd ed.). John Wiley & Sons.

2. Capítulo 2: Optimización de los parámetros de modificación del electrodo de carbono vítreo y del electrolito soporte para la medida de glifosato.

El glifosato es una molécula difícil de analizar por los métodos cromatográficos convencionales debido a que es muy polar y es necesario el uso de columnas especializadas para este compuesto, lo cual incrementa un elevado costo en su análisis. Por otra parte, una alternativa más económica y rápida para el análisis del glifosato es el uso de las técnicas electroquímicas, no obstante, no es un procedimiento sencillo porque el glifosato no presenta señales de oxidación ni reducción en la ventana de potencial en medio acuoso. Por lo tanto, existen diferentes estrategias para obtener una señal electroquímica que responda a la presencia del compuesto y se ha encontrado que el uso del cobre es una de las más sencillas de implementar (Cao, Y 2019; Moraes, F 2010; Pereira Barbosa, P 2019; Brønstad, J 1976). Algunos de estos estudios se resumen en la Tabla **2-1.**

En esta investigación se propone el uso de un electrodo modificado con el polímero conductor poli(3,4-etilendioxitiofeno) PEDOT que se sintetiza electroquímicamente y sobre el cual se reduce cobre. A lo largo de este capítulo se mostrará la influencia de esta modificación en el análisis del glifosato y la optimización de los parámetros de síntesis para obtener la mejor superficie para el estudio.

Tabla 2-1: Estudios previos sobre determinación de glifosato por vía electroquímica.

Electrodo	Método	Electrolito	pH	Referencia
Electrodo de gota de mercurio (HMDE)	SWV	Disolución de 0,1 M $NaNO_2$	6,5	Dos Santos, S 2014
Electrodo de pasta de carbono (CPE)	CV y SWV	Disolución reguladora de pH Britton–Robinson (BR) (H_3BO_3, H_3PO_4 y CH_3COOH)	5,0	Oliveira, G 2018
Electrodo de platino modificado con $Ni_{1-x}Al_x(OH)_2NO_{3x}\cdot nH_2O$	CV	Disolución de KOH	13	Khenifi, A 2009
Electrodo de carbono vítreo y electrodo de microdisco de fibra de carbono	CV (electroquimio-luminiscencia)	Disolución reguladora de pH de fosfatos 0,1 M	8	Jin, J 2010
Electrodo de nanocompuesto de $Ti_3C_2T_x$/Cu-BTC (nanohojas de $Ti_3C_2T_x$ /benceno-1,3,5-tricarboxilato)	DPV	PBS	-	Wang, S 2022
Electrodo de gota de mercurio (HMDE)	SWV	Disolución de ácido clorhídrico	-	Teófilo, R 2004
Electrodo con Compuesto de Cu-(poli)pirrol depositado electroquímicamente sobre fibra de carbono activado	DPV	PBS	7	Shrivastava, S 2020
Electrodo de cobre y electrodo de niquel	CV y amperometría	Disolución reguladora de pH de fosfatos 0,1 M	7	Sierra, E 2007
Electrodo de carbono vítreo modificado con película de ftalocianina de cobre/nanotubos de carbono de paredes múltiples	DVP	Disolución reguladora de pH de fosfatos 0,1 M	7,4	Moraes, F 2010
Electrodo de oro recubierto con polidimetilsiloxano - poliestireno sulfonato sobre el cual se	CV Y amperometría	Disolución reguladora de pH de fosfatos 0,1 M	6,10	Songa, E 2009

inmoviliza peroxidasa HRP/PDMA-PSS/Au				
Electrodo de grafito-epoxi (GE) modificado con nanotubos de carbono multipared (MWCNT) y peroxidasa de rábano picante (GE/MWCNTs-HRP)	CV	Disolución reguladora de pH con ácido bórico, ácido cítrico y fosfato trisódico “wide range buffer”	4	Cahuantzi-Muñoz, S 2019
Electrodo de grafito en lápiz modificado por fibra hueca (HF) impregnado de nanotubos de carbono multipared (MWCNTS)-líquido iónico (IL) y nanopartículas de óxido de cobre (CuO)	DVP	Disolución reguladora de pH de fosfatos 0,1 M	7	Gholivand, M 2018
Electrodo de carbono vítreo modificado con nanocompuestos de grafeno y ftalocianina de cobre[1]	DVP	PBS	7,4	Xia, 2019

* Empleado para la determinación de Cloranfenicol y Florfenicol

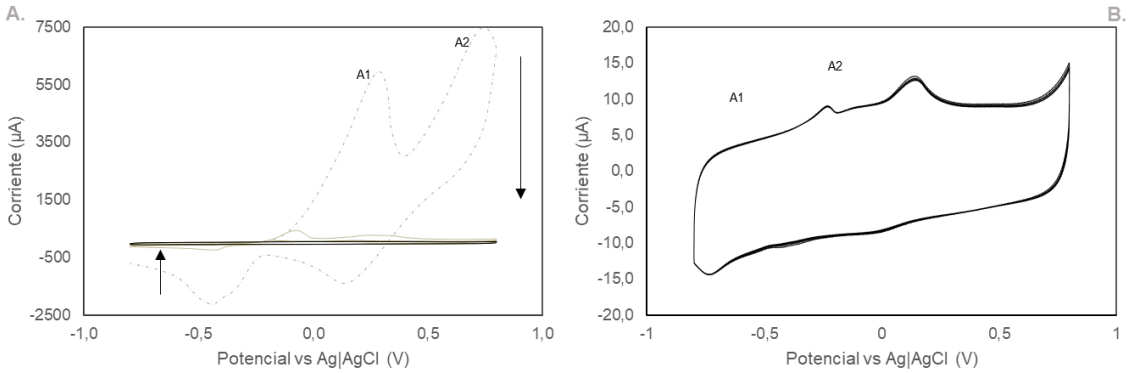
2.1 Efecto del polímero y la estabilización del cobre

La síntesis electroquímica de PEDOT se realiza de modo galvanostático en medio orgánico y luego se realiza la reducción de cobre en disolución ácida en medio acuoso como se describe en el capítulo 1. El medio en el cual se mide el glifosato es una disolución reguladora PBS 10X de pH 7,40. A este pH se asegura que el glifosato se encuentre en la especie con carga neta -2 por la disociación de los dos protones del grupo fosfonato y un protón del grupo carboxilato, manteniendo la carga positiva cobre la amina según sus valores de pKa (Muneer, M 2008; Vidal, E 2015).

Se realizan varios ciclos mediante VC con los electrodos modificados en una celda con la disolución reguladora de pH. Aquí se busca obtener una señal estable del cobre en el electrodo para asegurar que el electrodo utilizado en la determinación de glifosato siempre contenga una cantidad constante y estable de cobre en su superficie. La estabilización se lleva a cabo en dos etapas mediante VC, ambas, utilizan una ventana de potencial de -0,8

a 0,8 V vs Ag|AgCl. En el primer paso, se realizan 20 ciclos a una velocidad de barrido de 250 mV s^{-1} seguido por el segundo paso con 5 ciclos a una velocidad de barrido de 50 mV s^{-1}.

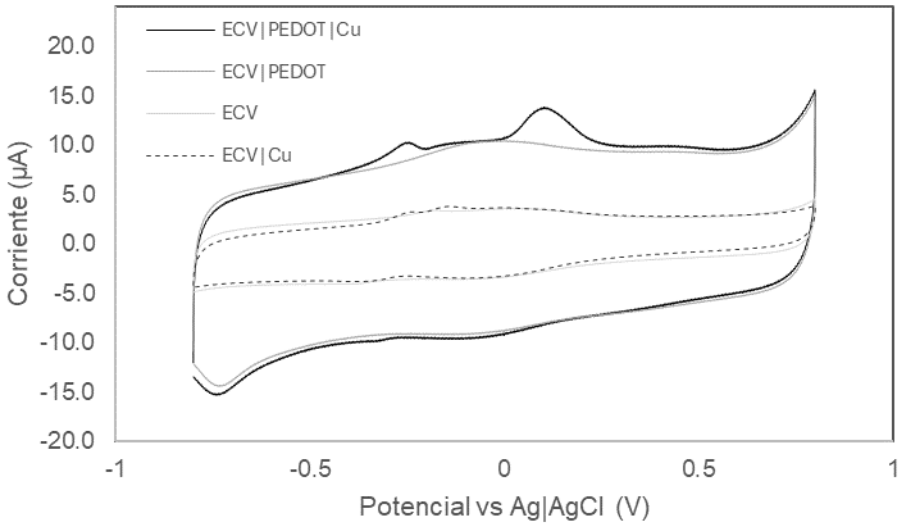
Figura 2-1: Voltamperogramas de la VC de la estabilización del ECV|PEDOT|Cu en disolución PBS 10X A. Se toman 15 ciclos a 250 mV s^{-1}, la gráfica corresponde a los barridos 1, 5, 10 y 15, en el orden indicado por la flecha. B. Se toma 5 ciclos a 50 mV s^{-1}. Los barridos se hicieron iniciando en -0,8 V hasta 0,8 V.



En la Figura 2-1 A, se observa que hay una disminución significativa en las corrientes a medida que avanzan los ciclos. Inicialmente, se aprecian dos corrientes anódicas (de oxidación) y dos corrientes catódicas (de reducción). Sin embargo, después del primer ciclo una de las señales de reducción desaparece por completo. A medida que avanzan los ciclos la intensidad de las corrientes restantes disminuye y se observa que la corriente de reducción experimenta una disminución mucho más pronunciada en comparación con las señales anódicas A1 y A2. En la Figura 2-1 B aún se pueden apreciar las señales A1 y A2 que corresponden a la oxidación de cobre. Sin embargo, estas señales se ocultan un poco debido a que la corriente capacitiva relacionada con la capa del polímero es alta.

Para evaluar el comportamiento del electrodo modificado con PEDOT y cobre se realizaron los mismos experimentos con las superficies de carbono vítreo (ECV), carbono vítreo y PEDOT (ECV|PEDOT), y carbono vítreo con cobre (ECV|Cu).

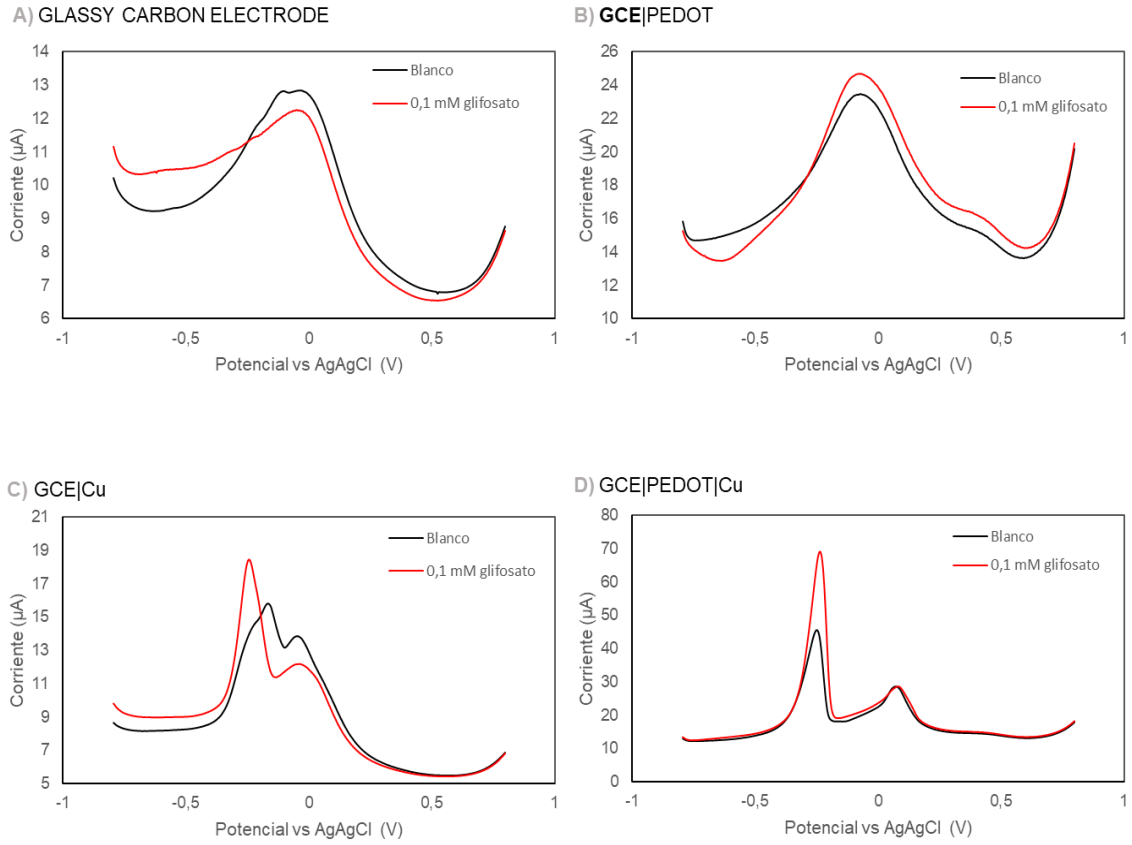
Figura 2-2: Voltamperogramas de comparación de la VC después de la estabilización de los electrodos ECV|PEDOT|Cu, ECV|PEDOT, ECV y ECV|Cu tomados a 50 mV s^{-1} en disolución PBS 10X.



La Figura 2-2 permite corroborar que la mayor parte de las corrientes observadas en la Figura 2-1 B corresponden a corrientes debidas a cambios de capacitancia ocasionados por el barrido de potencial de la VC. La comparación entre ECV|PEDOT|Cu y ECV|PEDOT permite confirmar que las señales anódicas observadas a -0,25 y 0,15 V se relacionan con el cobre.

Al observar los voltamperogramas del ECV y del ECV|Cu vemos que las corrientes son mucho menores ya que no hay polímero presente. Sin embargo, también se puede observar que después de la estabilización del cobre, en ausencia de polímero, muy poco cobre permanece en la superficie. La disminución de la cantidad de cobre en superficie se debe a que el cobre metálico se oxida al ión Cu^{2+} y se difunde a la disolución (Bianchi, G 1973; Štulík, K 1988; Sierra, E 2008; Reddy, K 1995).

Figura 2-3: Comparación de voltamperogramas de las VPD de medición de 17 mg kg^{-1} de glifosato con A) ECV, B) ECV|PEDOT, C) ECV|Cu y D) ECV|PEDOT|Cu, tomados en PBS 10X usando amplitud de pulso de 50 mV, con tiempo de pulso de 50 ms, durante un periodo de 0,66 segundos y un potencial de escalón de 5 mV.



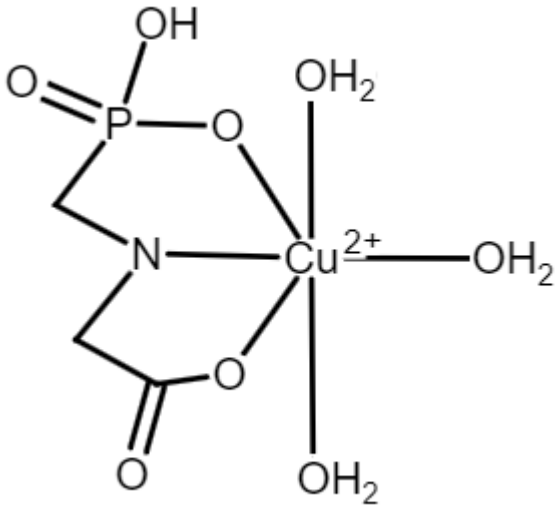
En la figura 2-3 se presentan los voltamperogramas de pulso diferencial (VPD) de las diferentes superficies en ausencia y presencia del glifosato. Se puede observar claramente que el uso de la técnica de VPD permite reducir las corrientes capacitivas debidas a la presencia del polímero.

En las figuras 2-3 A y 2-3 B se puede observar que los electrodos no modificados con cobre exhiben una única señal que no presenta una diferencia significativa al medirse en una disolución con glifosato. Asimismo, se observa que en los voltamperogramas A y B la señal es muy similar, aunque en presencia de PEDOT en el electrodo, la corriente es más

alta y las señales más definidas, mostrando un efecto del polímero en la corriente observada.

Cuando la superficie del electrodo de carbono vítreo se recubre con cobre (figura 2-3 C), siguiendo el mismo proceso de reducción y estabilización que se describe en el capítulo 1, se distinguen dos señales de oxidación que corresponden a la oxidación del cobre de Cu(0) a Cu(I) a -0.25 V y de Cu(I) a Cu(II) a -0.1 V. El proceso de oxidación es complejo ya que se conoce que a pH mayor a 6,5 el cobre forma una capa pasivante de Cu_2O, CuO y $Cu(OH)_2$ en la que el Cu_2O se oxida a $Cu(OH)_2$ y $Cu(OH)_4^{2-}$. (Sierra, E. V 2008; Coutinho, C. F 2007; Coutinho, C. F 2009). Además, dependiendo del electrolito soporte, también pueden formarse otras sales insolubles, por ejemplo, el fosfato de cobre (Coutinho, C. F 2009)). Se ha observado que al formar el complejo las moléculas del herbicida reemplazan la capa pasivante de óxidos e hidróxidos (Cao, Y 2019; Moraes, F 2010; Coutinho, C 2005, 2007 y 2009; Regiart, M 2020; Sierra, E 2007; del Carmen Aguirre, M 2019; Laguarda-Miro, N 2012, Stulík, K. 1988; Bianchi, G 1973). En la literatura se ha asociado específicamente al cobre (II) la formación de tal complejo en una estructura como la que se presenta en la figura 2-4.

Figura 2-4: Estructura propuesta para el complejo cobre(II)-glifosato. Las tres posiciones de moléculas de agua podrían estar ocupadas por otros ligantes. Adaptado de (Coutinho, C. F 2004).



Se puede observar en la figura 2-3 D que las dos señales de oxidación de cobre se separan, quedando la señal asociada a la oxidación de Cu(I) a Cu(II) a potenciales más positivos alrededor de 0,1 V. También, es evidente que hay un incremento significativo en la intensidad de corriente de la primera señal (Cu(0) a Cu(I)) por efecto del glifosato. Esta diferencia de corriente en presencia y ausencia del glifosato se puede usar como señal analítica para realizar la cuantificación del mismo. En estudios anteriores se ha observado que el PEDOT contribuye a estabilizar núcleos metálicos debido a la interacción con el anillo de tiofeno en su estructura (Ilieva, M 2005, Gourier, D 1986) y de igual manera, se ha identificado que la superficie del polímero favorece la nucleación del cobre. Esta combinación en el electrodo puede favorecer la estabilidad del cobre en la superficie (es decir que se mantenga adherido a la superficie) y que esté igualmente disponible para interacción con el glifosato.

Es interesante resaltar además que la modificación de la señal se realiza sobre la señal a potenciales más bajos asociada a la oxidación de Cu(0) a Cu(I), y no se observan cambios significativos en la señal de oxidación de Cu(I) a Cu(II). Este comportamiento puede significar que la modificación realizada con PEDOT influencia la formación del complejo con el cobre y es más importante la interacción con Cu(I) que con Cu(II) a pesar de que en la literatura se afirma que la formación del complejo es con Cu(II) y que los estudios computacionales indican que el complejo con Cu(II) es más estable. (Estudios en curso por el Grupo de Química Cuántica y Computacional de la Universidad Nacional de Colombia).

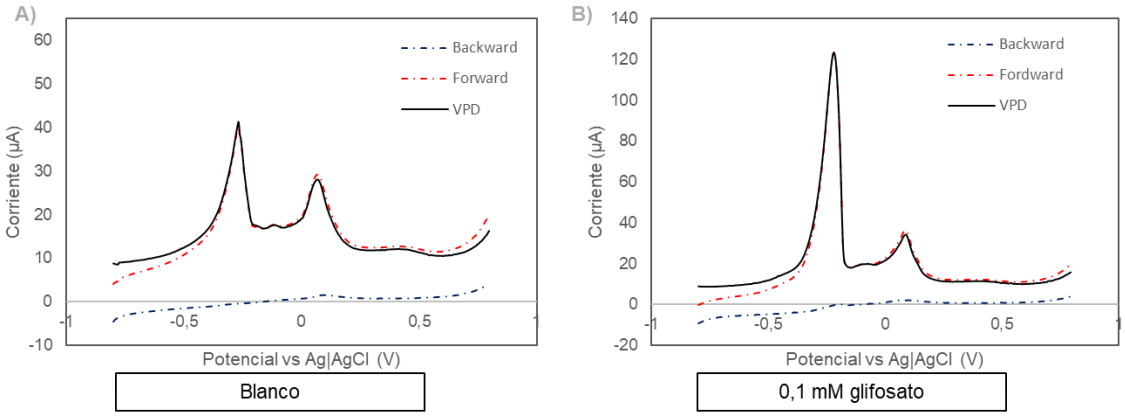
El paso de estabilización de la capa de cobre utilizando ciclos de VC en la disolución reguladora de pH es necesario para asegurar una cantidad de cobre reproducible en la superficie del electrodo.

En el potenciostato μ-autolab es posible obtener las corrientes *forward* después del pulso y la corriente *backward* que se toma antes de aplicar el pulso en la VPD. En algunos casos, estas dos corrientes permiten identificar si las señales provienen de procesos redox reversibles. (Guziejewski, D 2002; Aoki, K 1984; Bard, A 2001; Wang, J 2006).

La Figura 2-5 muestra las corrientes al final del pulso (*forward*) y las corrientes antes del pulso (*backward*) en las VPD del blanco y de la disolución con glifosato. Se observa que la corriente neta mostrada por la VPD se compone en prácticamente en su totalidad por las corrientes *forward*, ya que las corrientes *backward* son cercanas a cero.

Igualmente, en las corrientes *backward* no se observan altas corrientes negativas que pudiesen relacionarse con la reducción del cobre. En principio este resultado podría indicarnos que el proceso de oxido-reducción del cobre en este sistema no es reversible, pero deben realizarse otros estudios porque en esta VPD el tiempo que transcurre antes del pulso es largo (610 ms) y al medir la corriente al final de este tiempo las corrientes faradaicas ya han disminuido significativamente. Se podría intentar evaluar esta reversibilidad con una voltamperometría de onda cuadrada cuyos tiempos de pulso son menores y por tanto las corrientes *forward* y *backward* se miden en una escala de tiempo menores.

Figura 2-5: Voltamperogramas de las VPD de medición de 17 mg kg^{-1} de glifosato con ECV|PEDOT|Cu tomados en PBB 10X usando amplitud de pulso de 50 mV, con tiempo de pulso de 50 ms, durante un periodo de 0,66 segundos y un potencial de escalón de 5 mV. Con corrientes forward y backward.



2.2 Optimización de los parámetros de modificación del electrodo

Con objeto de aumentar la diferencia entre la corriente medida en las soluciones con y sin glifosato se llevó a cabo la optimización de tres parámetros en la modificación del electrodo: el potencial de reducción del cobre, el tiempo de polimerización y la densidad de corriente de la polimerización. Para la variación de este último parámetro se usaron diferentes valores de corriente puesto que se utilizó siempre el mismo electrodo y por tanto la misma área.

Para la optimización se utilizó un diseño experimental correspondiente a un diseño factorial 2^k. Como se dijo anteriormente, se van a optimizar 3 factores por lo que es un diseño 2^3. Este tipo de diseños evalúan dos niveles por cada factor, así que en este caso hay 8 tratamientos, es decir, 8 condiciones experimentales diferentes. Cada factor representa una variable independiente que se manipula en el experimento, y los niveles de cada factor indican las diferentes condiciones o configuraciones en las que se estudia la variable. (Melo Martínez, O 2020; Montgomery, D 2017)

Los niveles de los factores se eligieron buscando que una mayor cantidad de cobre se mantenga sobre la superficie del electrodo antes de hacer la determinación ya que se considera que esto mejorará la señal de oxidación de cobre (0) a cobre (I). Así que se considera la hipótesis de que más polímero puede retener más cobre. Los niveles que se evaluaron de cada factor se pueden observar en la Tabla 2-2.

Tabla 2-2: Factores a optimizar en el diseño de experimentos y los niveles a evaluar.

Factor	Nivel bajo (-1)	Nivel alto (1)
Corriente de polimerización	9,8 µA	19,6 µA
Tiempo de polimerización	50 s	100 s
Potencial de reducción de Cu	-0,1 V	-0,03 V

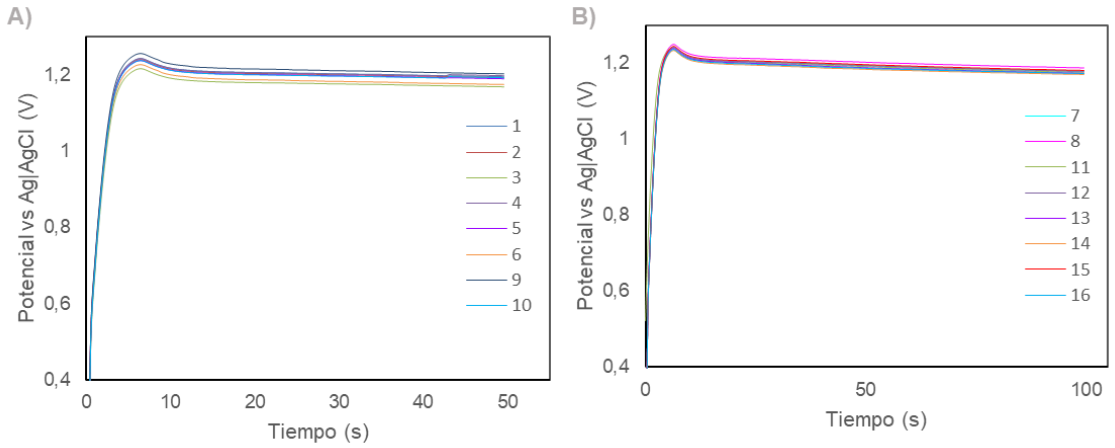
Se hacen dos réplicas por cada tratamiento y a cada experimento se le asigna un número, después, se generan números aleatorios para cada número y se desarrollan los experimentos de acuerdo con el número aleatorio que se les asignó. La Tabla 2-3 muestra cada experimento, detallando los valores que tomó cada factor e indicando el orden en que se realizaron los experimentos.

Tabla 2-3: Descripción de los experimentos realizados para la optimización.

# Exp	Potencial de reducción de Cu (V)	Corriente de polimerización (µA)	Tiempo de polimerización (s)	# Exp
1	-0,1	9,8	50	4
2	-0,1	9,8	50	9
3	-0,03	9,8	50	1
4	-0,03	9,8	50	12
5	-0,1	19,6	50	3
6	-0,1	19,6	50	14
7	-0,1	9,8	100	10
8	-0,1	9,8	100	7
9	-0,03	19,6	50	2
10	-0,03	19,6	50	5
11	-0,03	9,8	100	15
12	-0,03	9,8	100	8
13	-0,1	19,6	100	13
14	-0,1	19,6	100	6
15	-0,03	19,6	100	16
16	-0,03	19,6	100	11

El proceso de modificación del electrodo sigue en todos los casos los pasos descritos en las secciones anteriores.

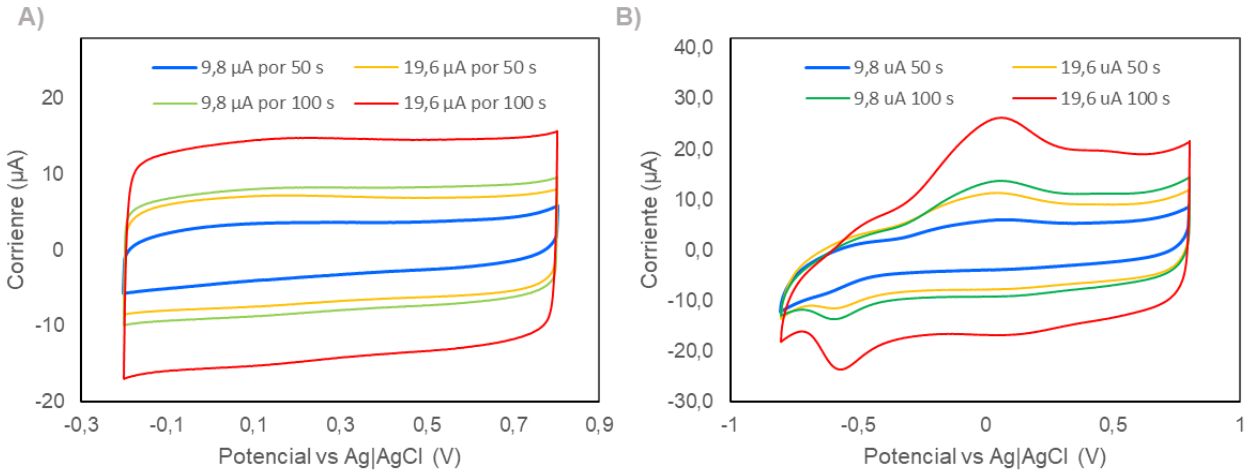
Figura 2-6: Gráficas de las cronopotenciometrías de la síntesis de PEDOT sobre la superficie del ECV de los 16 experimentos del diseño experimental en disolución de 0,1 M de $NaClO_4$ en CH_3CN con 10 µl de EDOT.



La Figura 2-6, muestra las cronopotenciometrías de todos los experimentos de polimerización e indica que la corriente de polimerización no influye significativamente en las señales de electropolimerización debido a que la polimerización ocurre siguiendo siempre el mismo mecanismo sin importar el tiempo ni la corriente utilizada.

Posterior a la polimerización se llevaron a cabo las voltamperometrías cíclicas de confirmación de la misma manera que se detalló en la parte experimental. Dado que las polimerizaciones exhibieron un comportamiento similar y que en experimentos con tiempos y corrientes de polimerización iguales los voltamperogramas cíclicos muestran corrientes idénticas. Se presenta en la Figura 2-7 un único voltamperograma para cada conjunto de experimentos que comparten las mismas condiciones de polimerización.

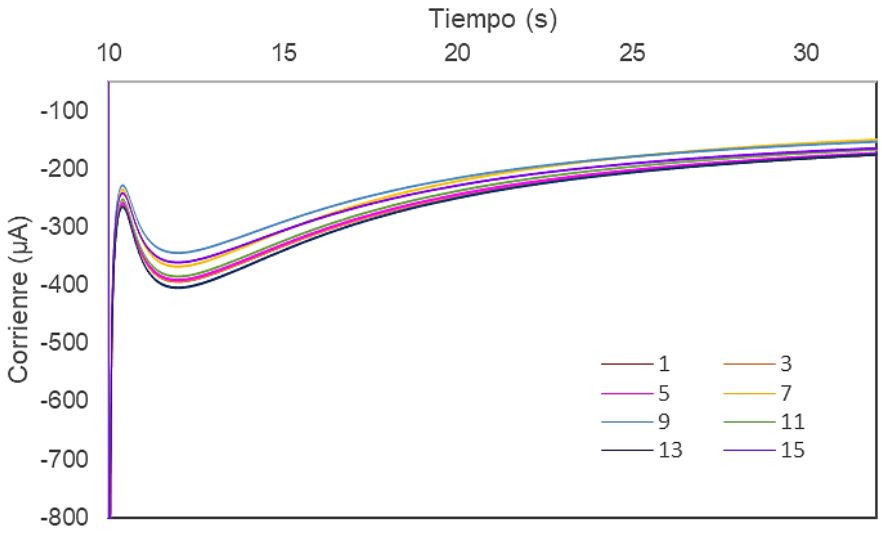
Figura 2-7: Voltamperogramas de las CV de confirmación del polímero sobre la superficie de ECV|PEDOT tomadas a 50 mV s^{-1} en 0,1 M de $NaClO_4$ en CH_3CN. Se graficó un experimento por cada grupo de 4 experimentos cuyas condiciones de polimerización coinciden.



La comparación de las corrientes en los voltamperogramas indica que la cantidad de polímero aumenta tanto con el incremento de la corriente como con el aumento del tiempo de polimerización, como era de esperarse. Cuando ambos factores aumentan simultáneamente, la cantidad de polímero experimenta un incremento aún mayor. Duplicar tanto la corriente como el tiempo resulta en el doble de polímero, lo que implica que duplicar ambos factores produce cuatro veces la cantidad de polímero. De esta comparación, se puede concluir que la cantidad de polímero producido depende de la carga (corriente multiplicada por el tiempo).

La Figura 2-8 muestra las corrientes de reducción del cobre. Se observa que no existe una tendencia en estas señales de reducción debida al potencial de reducción del cobre ni a las características del polímero. Por lo tanto, las ligeras variaciones se asocian a variaciones experimentales aleatorias.

Figura 2-8: Cronoamperogramas de la reducción de cobre sobre los ECV|PEDOT en la disolución de 0,033 M de $CuSO_4$ en 0,5 M de H_2SO_4 durante 300 s. Se graficó un experimento por tratamiento.



El efecto de los factores fue directamente evaluado sobre las diferencias en las corrientes con y sin glifosato obtenidas con VPD. En los voltamperogramas de la Figura 2-9 se puede observar que las réplicas hechas por cada tratamiento tienen corrientes muy parecidas entre ellas.

Para determinar si los factores tienen un efecto significativo en la detección del glifosato se toman los resultados de las diferencias entre las corrientes de las mediciones en disoluciones con y sin glifosato y se hace un análisis de varianza de los resultados obtenidos (Tabla 2-4).

El análisis de varianza permite a través del p-valor y el estadístico F, indicar si los parámetros tienen un efecto importante o no en los resultados. Si el p-valor es menor a 0,05 indica que sí hay un efecto estadísticamente significativo al igual que si el valor calculado F supera el valor crítico.

Figura 2-9: Voltamperogramas de las VPD de medición de 17 mg kg^{-1} de glifosato con ECV|PEDOT|Cu en PBS 10X de los 16 experimentos usando amplitud de pulso de 50 mV, con tiempo de pulso de 50 ms, durante un periodo de 0,66 segundos y un potencial de escalón de 5 mV, las repeticiones se graficaron juntas.

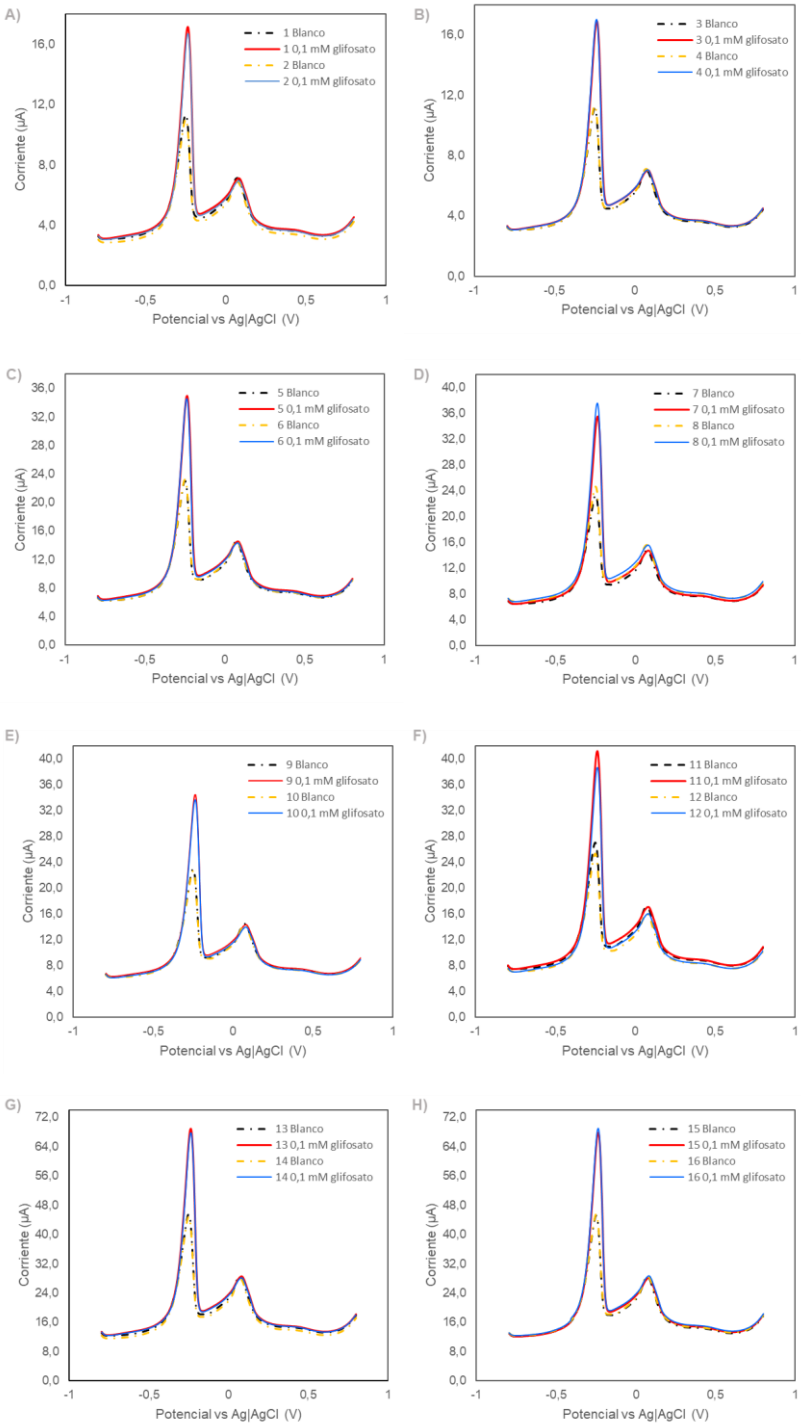


Tabla 2-4: Análisis de varianza de los resultados obtenidos de la optimización. Fdv: Fuente de variación, GL: Grados de libertad, SC: Suma de cuadrados, CM: Cuadrados medios, F: estadístico.

Fdv	GL	SC	CM	F	F CRITICO	p VALOR
Tiempo	1	365.1385	365.1385	6.1085	5.3077	0.0386
Potencial	1	0.2473	0.2473	0.0041	5.3077	0.9503
Corriente	1	243.9576	243.9576	4.0812	5.3077	0.0780
T P	1	0.7539	0.7539	0.0126	5.3077	0.9133
T C	1	18.1903	18.1903	0.3043	5.3077	0.5963
P C	1	1885.1204	1885.1204	31.5368	5.3177	0.0005
T P C	1	-1884.4723	-1884.4723			
ERROR	8	478.2019	59.7752			
TOTAL	15	1107.1376	73.8092			

En la tabla 2-4 se puede observar que el tiempo de la polimerización tiene efecto significativo en la diferencia en la intensidad de la señal. En los voltamperogramas de la figura 2-9 también es notable que, a mayor tiempo de polimerización, la diferencia en la señal por efecto del glifosato aumenta. Mientras que la corriente de polimerización y el potencial de reducción no producen un efecto significativo en la diferencia de señal. De esta manera se puede confirmar la hipótesis de que una mayor cantidad de polímero permite tener más cobre en superficie, (siempre y cuando el potencial aplicado sea el adecuado), sobre todo, permite una corriente más alta en presencia de glifosato respecto al voltamperograma del blanco.

Considerando los resultados obtenidos, los parámetros óptimos encontrados fueron: 19,6 µA como corriente de polimerización durante 100 s y -0,03 V como potencial de reducción del cobre sobre el polímero.

2.3 Efecto de la presencia de iones cloruros en la detección de glifosato

Uno de los aspectos a tener en cuenta a la hora de realizar el análisis del glifosato es la composición del electrolito soporte ya que existen diversidad de opciones utilizadas en las determinaciones electroquímicas como se mencionó en la Tabla 2-1.

Algunos autores reportaron que la disolución reguladora de pH muestra mejores resultados para la detección electroquímica de glifosato cuando se emplean fosfatos (Coutinho, C 2007; Sierra, E 2007), mientras que otros incorporan, además de fosfatos, cloruros de sodio y potasio, también conocidos como PBS (*Phosphate-Buffered Saline* o solución salina regulada con fosfato) (Zhang, C 2017; Shrivastava, S 2020).

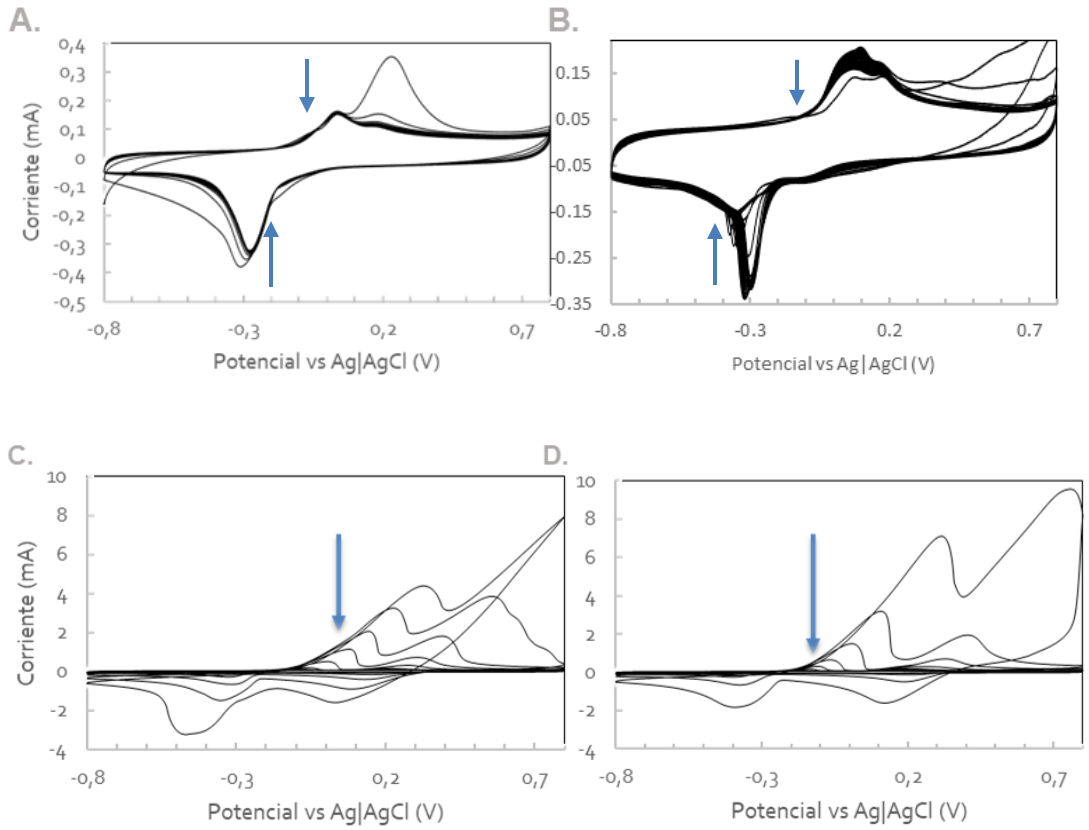
Ninguno de los artículos consultados menciona que haya un efecto al incorporar iones cloruro en la determinación de glifosato, aunque es bien conocido que los iones cloruro tienen un efecto sobre la oxidación de cobre (Mayanna, S. M 1974; Shao, W 2007).

En esta sección se evalúa el efecto de la adición de cloruros a la disolución de fosfatos reguladora de pH en la que se estabiliza el cobre del electrodo y en la que se hace la determinación de glifosato.

Para analizar el efecto de la presencia de cloruros se prepararon 4 disoluciones reguladoras de fosfatos a pH 7.4 con diferentes concentraciones de cloruros: a) sin adición de cloruros, b) 0,02696 mol/kg, c) 0,5269 mol/kg y d) 1,3968 mol/kg de cloruros (disolución reguladora de pH PBS 10X).

El primer efecto observable resulta de la estabilización de cobre sobre el electrodo. Los primeros 25 voltamperogramas obtenidos por voltamperometría cíclica a 0,25 V/s en cada uno de los 4 electrolitos soportes, obtenidos de experimentos individuales son los que se observan en la Figura 2-10.

Figura 2-10: Voltamperogramas de estabilización de cobre en el electrodo, obtenidas mediante voltamperometría cíclica con 20 ciclos a una velocidad de barrido de 0,25 V/s. Se utilizó un electrodo de trabajo ECV|PEDOT|Cu. Cada una de las medidas se hizo empleando como electrolito soporte disolución de fosfatos reguladora de pH A) sin adición de cloruros, B) 0,02696 mol/kg, C) 0,5269 mol/kg y D) 1,3968 mol/kg de cloruros. La flecha indica la variación de corriente con el aumento del número de ciclos.



La Figura 2-10 muestra que en la primera fase de estabilización en las diferentes soluciones de fosfatos reguladoras de pH, cuando no hay cloruros o cuando la cantidad de cloruros es baja, el voltamperograma cíclico llega a ser estable en pocos ciclos; es decir, las corrientes se repiten entre un ciclo y otro. Por el contrario, en aquellas disoluciones con una concentración más elevada de cloruros, se evidencian señales iniciales de mayor intensidad de corriente, y que disminuyen a medida que progresa el número de ciclos indicando una solubilización del cobre. Esta solubilización también se evidencia por el

cambio de color de la superficie antes y después de la voltamperometría cíclica, pasando de un color naranja a un color azulado.

Este comportamiento se puede entender a partir de las especies que se pueden formar sobre la superficie a pH 7,4 en el rango de potencial de trabajo. En el diagrama de Pourbaix para el sistema cobre-agua (Figura 2-11) se observa que a pH 7,4 las especies favorecidas con compuestos de cobre son óxidos e hidróxidos, por lo que el cobre, al oxidarse, forma una capa pasivante y por tanto las corrientes de oxidación son inicialmente bajas y permanecen constantes con el número de ciclos. Por el contrario, en el sistema cobre-agua-cloruros (Figura 2-12) se muestra que las especies favorecidas son compuestos solubles de cobre con cloruros (Zambrano-Intriago, L 2021; Coutinho, C 2007) lo que da lugar a unas corrientes iniciales altas de oxidación donde mucho cobre se disuelve debido la formación de iones complejo con los iones cloruro.

Figura 2-11: Diagrama de Pourbaix para el sistema cobre-agua a 25°C. Tomado de Atlas of Electrochemical Equilibria in - Aqueous Solutions (Pourbaix, M 1966)

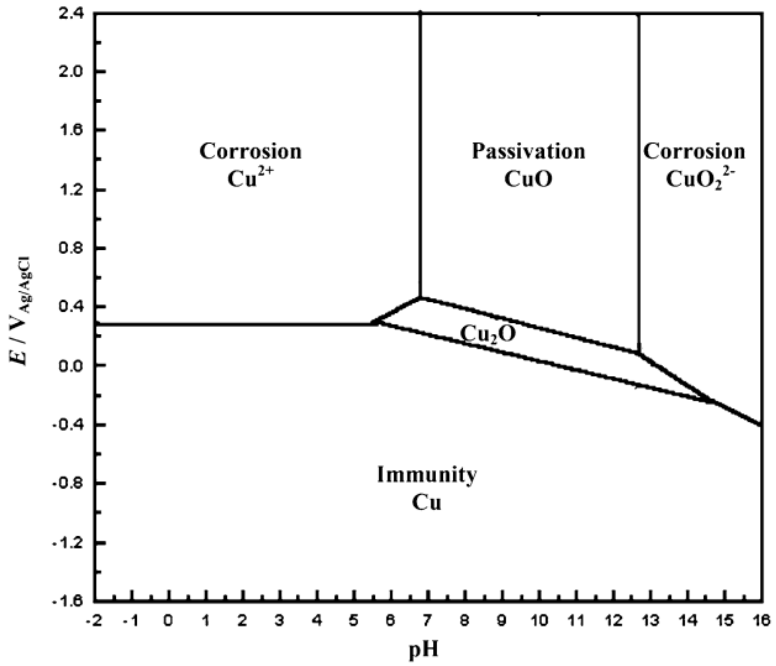
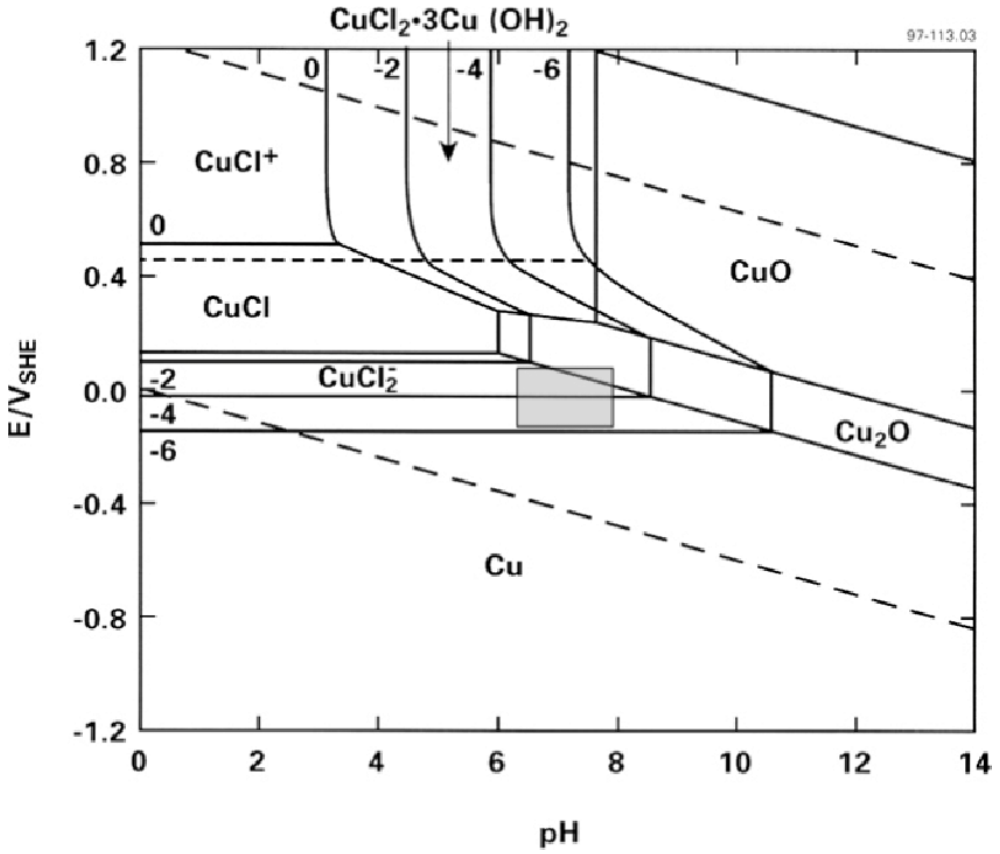


Figura 2-12: Diagrama de Pourbaix para el sistema cobre-agua-cloruros a 25°C para una actividad de cloruro de 1 mol/kg. Tomado de King and Kolar (King, F 2020)



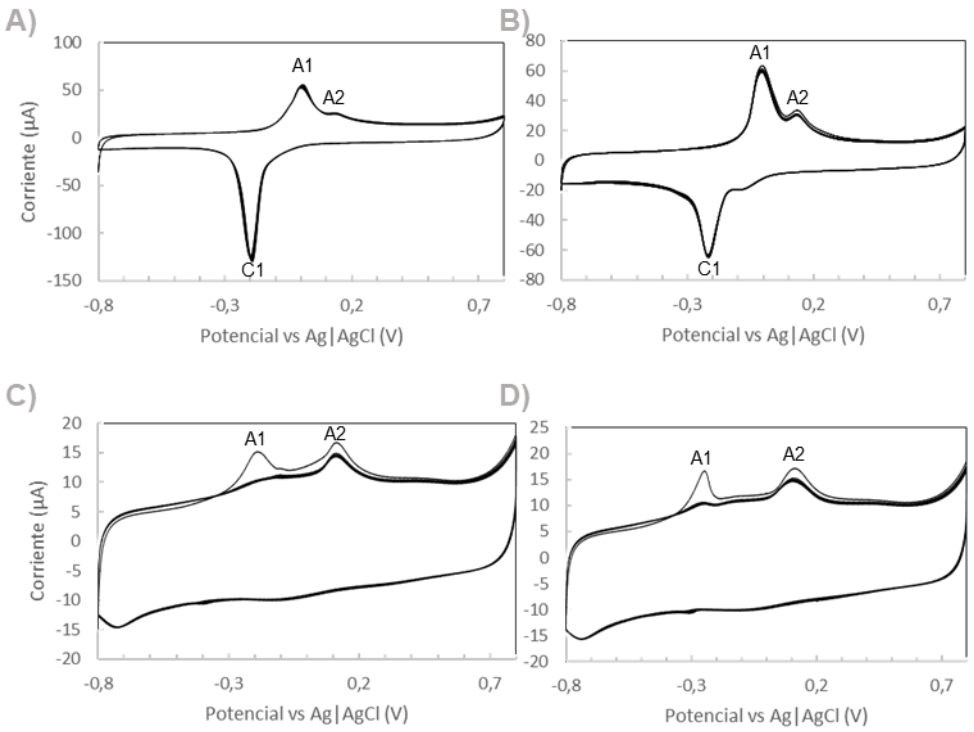
La segunda fase de la estabilización continúa con la aplicación de voltamperometría cíclica a una velocidad de 0,05 Vs^{-1} durante 5 ciclos y resulta en los voltamperogramas que se presentan en la Figura 2-13. En esta fase se puede observar que las señales permanecen prácticamente sin modificación con el número de ciclos.

Aquí se observan corrientes de oxidación y reducción más altas para las disoluciones sin o con baja concentración de cloruros que las observadas en las disoluciones con una alta concentración de cloruros. Lo anterior indica que en los casos A y B, la cantidad de cobre que permanece en superficie es mayor que en C y en D, donde, como habíamos dicho, el cobre se desprende por solubilización.

Aun así, en los voltamperogramas de las disoluciones con mayor concentración de cloruros se observan dos señales de oxidación de baja intensidad que parecen ocultas por la

corriente capacitiva debida a la película de PEDOT. De esta etapa de la estabilización también se puede notar que, aunque los cloruros causan una disminución notable en la cantidad de cobre, las señales se estabilizan y se puede contar con una capa estable de cobre para continuar con el paso de determinación de glifosato.

Figura 2-13: Voltamperogramas de estabilización de cobre en el electrodo, obtenidas mediante voltamperometría cíclica con 5 ciclos a una velocidad de barrido de 0,05 Vs^{-1}. Se utilizó un electrodo de trabajo ECV|PEDOT|Cu que ha pasado por un primer paso de estabilización. Cada una de las medidas se hizo empleando como electrolito soporte disolución de fosfatos reguladora de pH A) sin adición de cloruros B) 0,02696 mol/kg, C) 0,5269 mol/kg y D) 1,3968 mol/kg de cloruros

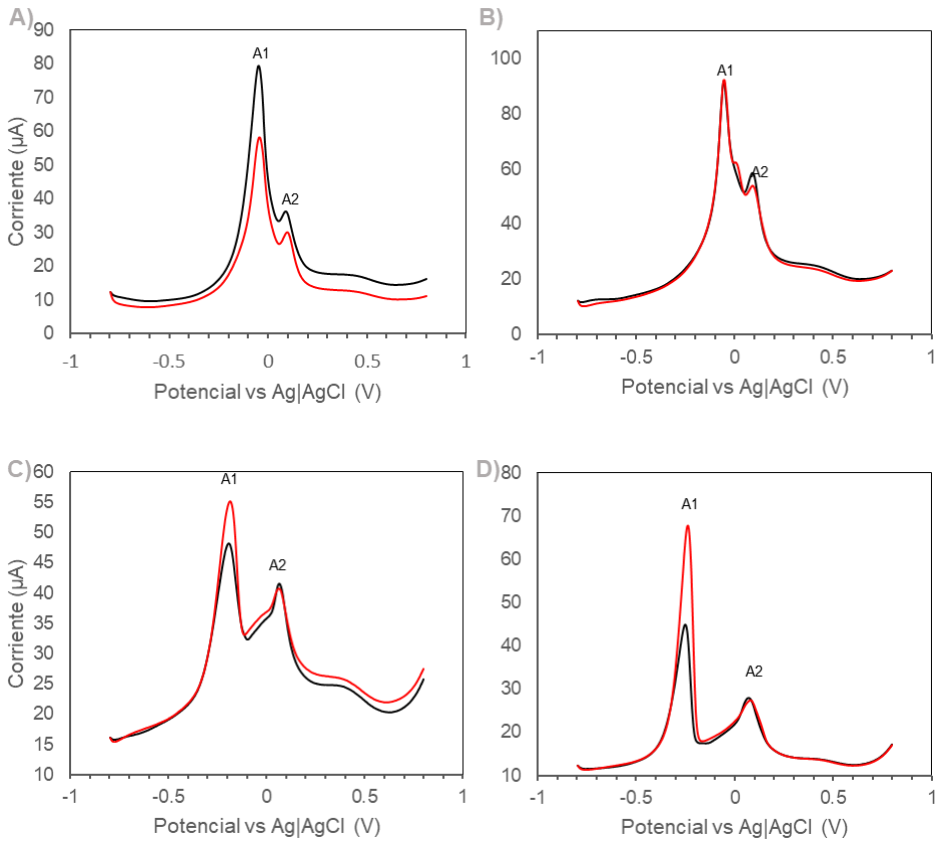


La determinación de glifosato para evaluar el efecto de los cloruros en la disolución de fosfatos reguladora de pH se hace siguiendo los mismos dos pasos descritos anteriormente usando VPD.

Se realizó inicialmente una VPD en el electrolito soporte para obtener el blanco, seguida de una segunda VPD en el electrolito soporte con concentración de 17 mg kg^{-1} de glifosato.

En la Figura 2-14 se presentan las parejas de voltamperogramas correspondientes a cada uno de los cuatro experimentos, mostrando la comparación entre los resultados obtenidos en presencia y ausencia de glifosato.

Figura 2-14: Voltamperogramas obtenidos mediante VPD (amplitud de pulso: 50 mV, tiempo de pulso: 50 ms, periodo: 0,66 s, escalón de 5 mV). Se utilizó un electrodo de trabajo ECV|PEDOT|Cu. La línea negra en cada uno de los casos corresponde a electrolito soporte y la línea roja es la misma disolución con una concentración de glifosato de 17 mg kg^{-1}. Cada una de las medidas de hizo empleando como electrolito soporte disolución de fosfatos reguladora de pH a) sin adición de cloruros b) 0,02696 mol/kg, c) 0,5269 mol/kg y d) 1,3968 mol/kg de cloruros.

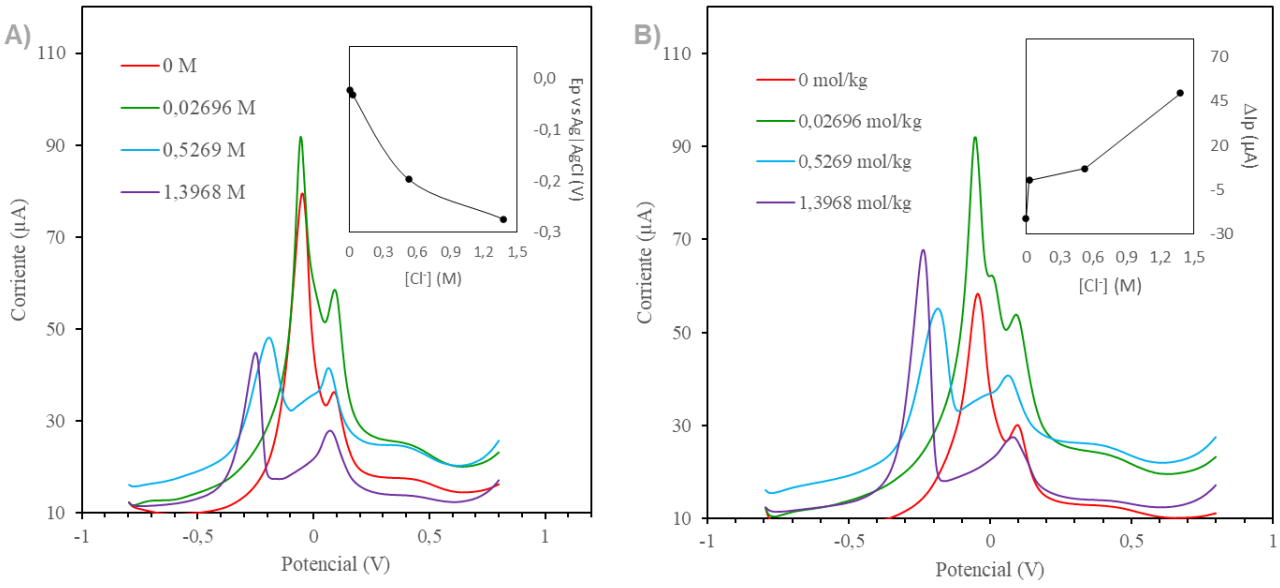


Cuando no hay adición de cloruros, la señal A1 disminuye en presencia de glifosato con respecto al blanco, debido a que la formación del complejo cobre-glifosato tiene un efecto corrosivo sobre el cobre. El complejo solubiliza cobre y por lo tanto la cantidad de cobre

en superficie disminuye (Bensalah, N. 2012; Bianchi, G 1973). Por el contrario, en las disoluciones con mayor concentración de cloruros se puede observar que la señal A1 aumenta con la adición de glifosato y también se observa que a mayor concentración de cloruros la diferencia de corriente entre el blanco y la disolución con glifosato aumenta.

Otro fenómeno que se pudo notar en estos experimentos es que a medida que aumenta la concentración de cloruros el potencial en que se observa la señal A1 se desplaza a potenciales más bajos, mientras que la señal A2 permanece constante. Este resultado es notable cuando se comparan los blancos y las soluciones con glifosato entre sí, como se observa en la Figura 2-15.

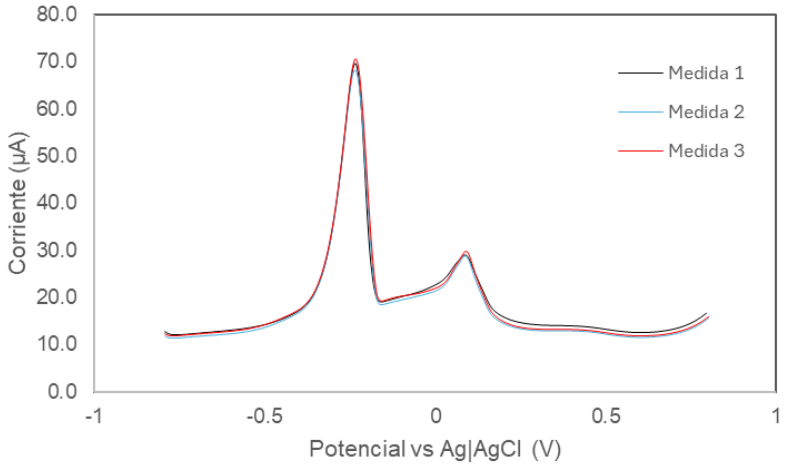
Figura 2-15: VPD del ECV|PEDOT|Cu en disolución reguladora de fosfatos a pH 7,4 a diferentes concentraciones de cloruros: línea roja sin adición de cloruros, línea verde con 0,02696 mol Cl^-/kg , línea azul con 0,5269 mol Cl^-/kg y línea morada con 1,3968 mol Cl^-/kg de cloruros, A) sin glifosato y B) con 17 mg kg^{-1} de glifosato. Inserto en A: Potencial de pico de la señal A1, Ep, en función de la concentración de cloruros. Inserto en B. Diferencia de la corriente de pico, ΔIp, en presencia y ausencia de glifosato, en función de la concentración de cloruros. Amplitud de pulso: 50 mV, tiempo de pulso: 50 ms, periodo: 0,66 s, escalón: 5 mV.



La disminución en el potencial de la señal A1 indica la formación de complejos estables entre el Cu(I), el glifosato y el ion cloruro, haciendo que se requiera menos energía para la oxidación del Cu (0). Sin embargo, la oxidación a Cu (II) no se ve influenciada significativamente por el cloruro ni por el glifosato.

En la revisión hecha por Coutinho se resaltó que la constante de estabilidad del complejo entre cobre (II) y glifosato es $8{,}3x10^{11}$ y la constante producto de solubilidad del complejo Cu(Glifosato)(H_2O)-0.4CuO en agua es $2{,}7x10^{-13}$, indicando que estos compuestos pueden estar precipitados en disolución acuosa. No se encuentra en esta revisión complejos formados con Cu(I) (Subramaniam and Hoggard, 1988; Tsui, T 2002, Coutinho, C 2005). Sin embargo, podemos decir que en este trabajo, los compuestos formados entre cobre, glifosato y cloruros se mantienen en la superficie, ya sea porque son insolubles o por efecto del acomplejamiento simultáneo con el polímero, ya que, al hacer una segunda medida con el mismo electrodo en la misma disolución, la señal obtenida por VPD se mantiene constante como se observa en la figura 2-16.

Figura 2-16: Voltamperogramas de las VPD de 3 medidas consecutivas de 17 mg kg^{-1} de glifosato con el mismo ECV|PEDOT|Cu

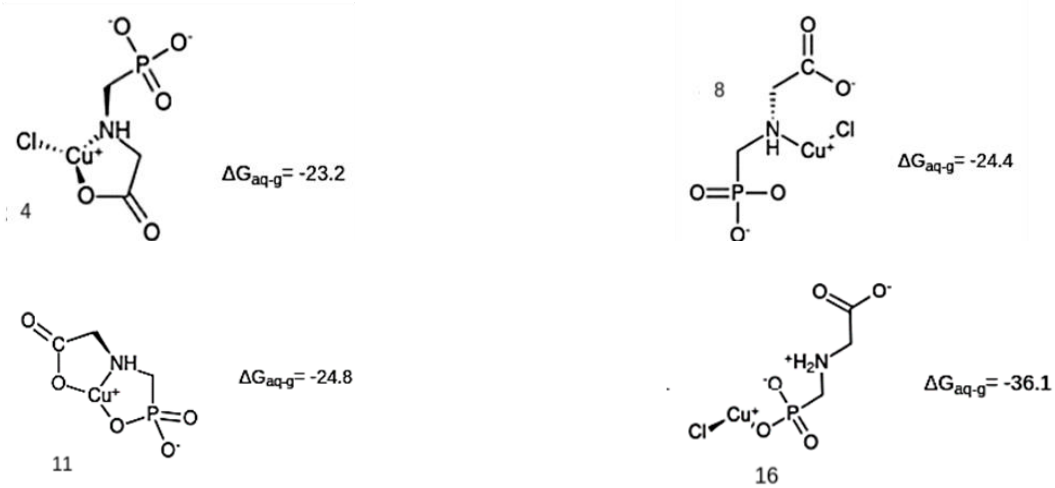


Durante esta investigación se contó con la colaboración del Grupo de Química Cuántica y Computacional de la Universidad Nacional quienes realizaron una primera exploración de la estabilidad de los complejos de Cu-glifosato-Cl con Cu(I) y Cu(II). Las posibles

estructuras con Cu(I) que se muestran en la Figura 2-19. Las estructuras tanto con Cu(I) como con Cu(II) se encontraron favorables, aunque la energía libre de Gibbs es un poco más negativa con Cu(II). Estos resultados no explican por qué la señal observada a potenciales más negativos es la que se afecta con el glifosato y por lo tanto se debe seguir investigando para incluir en los cálculos computacionales la presencia del PEDOT.

Se concluye de estos resultados que es necesaria la presencia de cloruros en una alta concentración para obtener la mejor separación entre los picos de oxidación de cobre y la mayor diferencia entre la señal del blanco y la señal del glifosato. Esta composición del electrolito puede ser favorable en el caso de medir muestras ambientales en las cuales es muy probable que se encuentren cloruros. Por esta razón, los experimentos de aquí en adelante se desarrollan todos en el electrolito que llamamos PBS 10X.

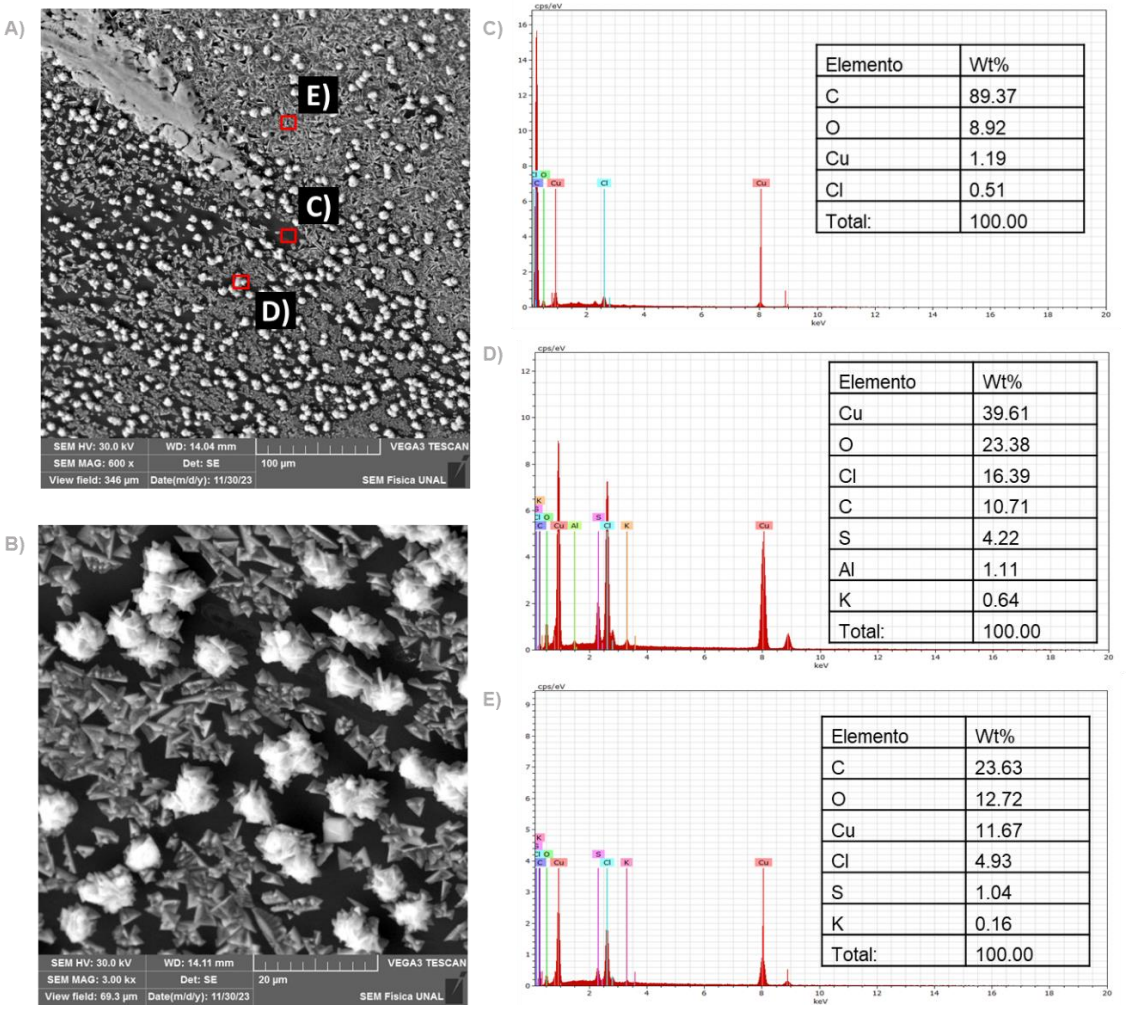
Figura 2-17: Posibles estructuras del complejo Cobre(I)-glifosato-Cl^- determinadas por cálculos computacionales hechos por el Grupo de Química Cuántica y Computacional de la Universidad Nacional



2.4 Morfología del electrodo

Una vez se establecieron las condiciones óptimas para la modificación del electrodo, se tomaron imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) con detectores de electrones secundarios (SE), electrones retrodispersados (BSE), y espectroscopía de rayos X de energía dispersiva (EDX) justo después de la formación del depósito de cobre y de la estabilización de la superficie del electrodo en PBS 10X con los barridos de voltamperometría cíclica.

Figura 2-18: Imágenes SEM de la superficie del electrodo de carbono vítreo modificado con PEDOT y cobre sin el paso de estabilización, con detector SE a las magnificaciones de A) 600x y B) 3,00 kx. EDX en los puntos C), D) y E) señalados de la imagen A).



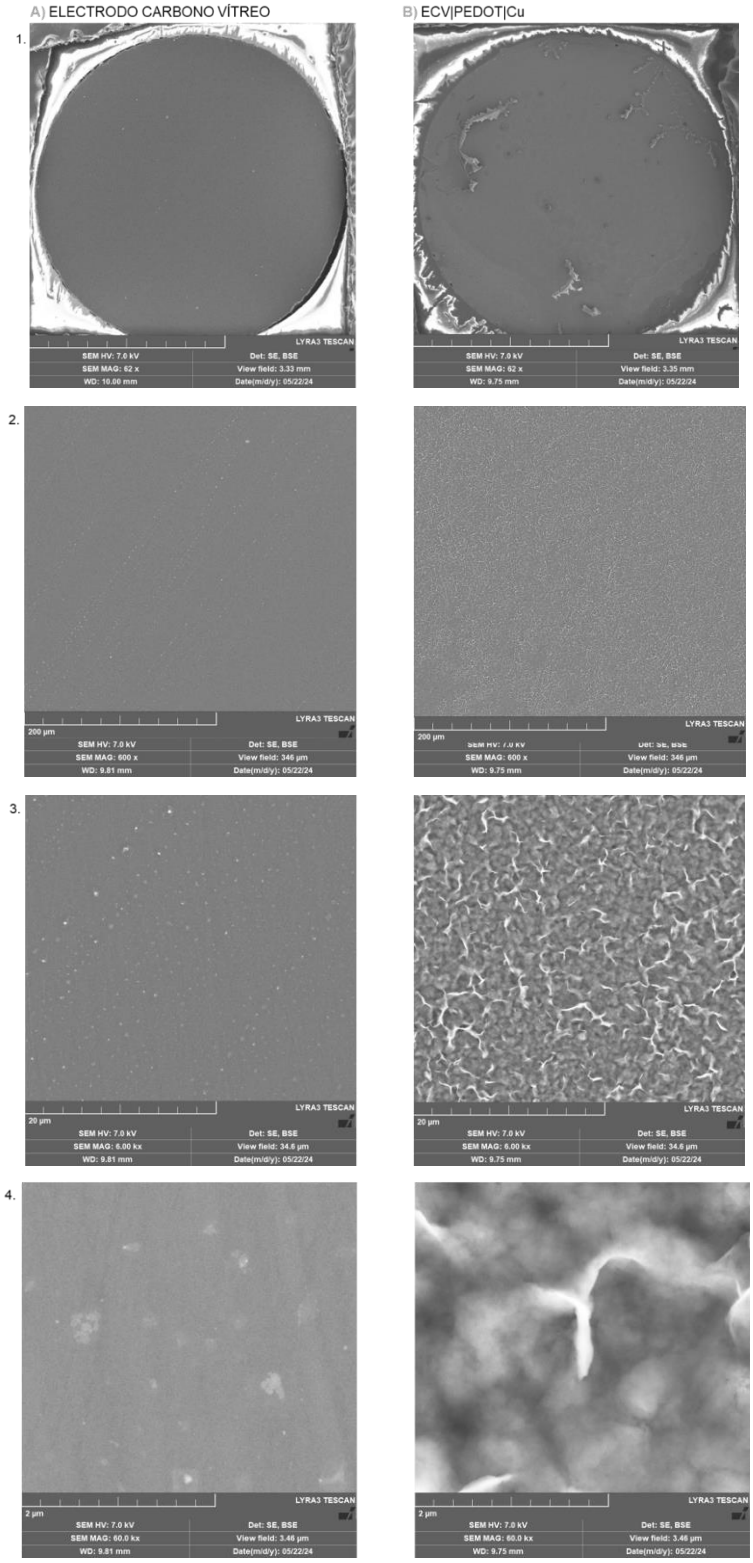
En la Figura 2-18 se muestra la exploración de la morfología del cobre depositado sobre el PEDOT mediante cronoamperometría en medio ácido. En la figura 2-18 A) y B) se pueden observar agrupaciones de cristales de cobre que tienen formas puntiagudas irregulares. La composición se confirma por el espectro EDX donde incrementa la señal de cobre. Igualmente, se puede observar la presencia del polímero debido a las señales de azufre en las ubicaciones D y E, mientras que en la zona C donde no hay cristal, tampoco se observa señal de azufre. Este resultado nos puede indicar que el cobre crece preferencialmente asociado al azufre del polímero como lo sugieren otros autores. (Ilieva, M 2005, Gourier, D 1986)

Por otro lado, Ilieva y colaboradores también concluyen que cuando se utiliza un sobrepotencial alto para la reducción cronoamperométrica de cobre sobre el PEDOT se observa formación de cristales. Considerando que el potencial que se utilizó para depositar el cobre fue de -0,03 V, es decir, un sobrepotencial de 0,176 V respecto al potencial de reducción de Cu(II), la formación de los cristales sigue el comportamiento observado por Ilieva y colaboradores. (Ilieva, M 2004 parte I y II, Ilieva, M 2005).

Después del paso de la estabilización del cobre en la superficie del electrodo mediante voltamperometría cíclica en PBS 10X, se tomaron imágenes SEM del electrodo y se compararon con el electrodo sin ninguna modificación de forma que se puedan apreciar los cambios de la superficie y en la distribución de cobre después de que termina la estabilización.

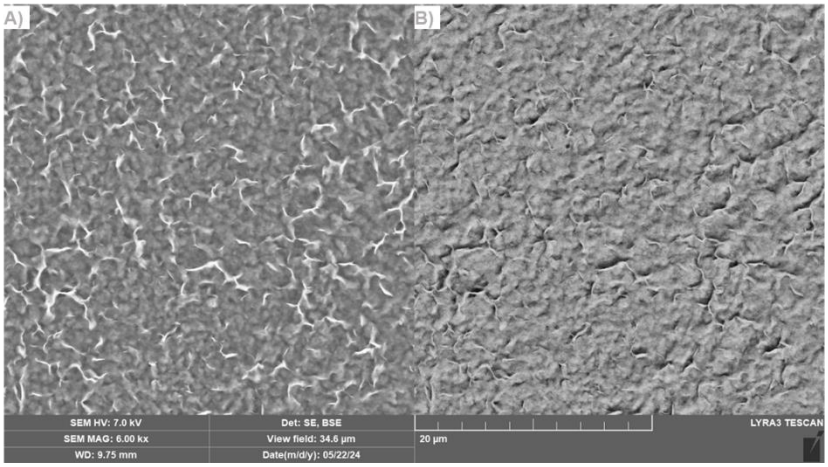
En la figura 2-19 se pueden ver las imágenes SEM obtenidas de un electrodo de carbono vítreo y un electrodo modificado y estabilizado con PEDOT/Cu, aumentando la magnitud paso a paso. Es evidente que la superficie del electrodo deja de tener cristales después de la estabilización. En las superficies de la magnificación 1 y 2, se puede ver que el electrodo modificado tiene una superficie uniforme comparable a la del ECV. La magnificación de 6 kx permite ver de forma más clara que la superficie está recubierta de esferas con algunos hilos sobre ellas. Por último, la magnificación 4 muestra un acercamiento sobre uno de los hilos que sobresale.

Figura 2-19: Imágenes SEM con detector SE de comparación entre el A) ECV (izquierda) y el B) ECV|PEDOT|Cu (Derecha) a las magnificaciones de 62x, 600x, 6,00 kx, 60kx.



Riveros y colaboradores también electrodepositan cobre en presencia de iones cloruro. En su caso, se hace en una disolución de DMSO y las imágenes SEM de la superficie que obtienen también muestran una superficie con una distribución uniforme de esferas. Además, también hicieron el análisis por difracción de rayos X (DRX) para determinar la estructura cristalina. Los análisis que hicieron llevaron a concluir que obtienen óxido de cobre (I), lo que inicialmente podría indicar que el compuesto obtenido sobre la superficie modificada con PEDOT/Cu y después estabilizada puede ser similar (Riveros, G 2016).

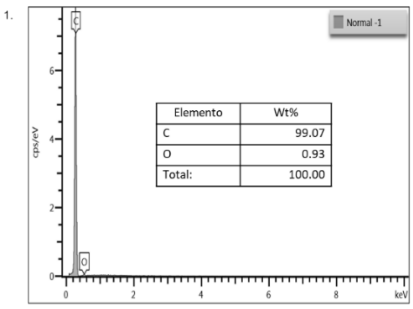
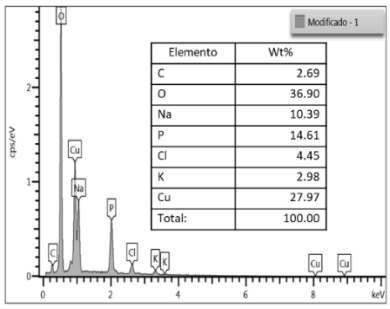
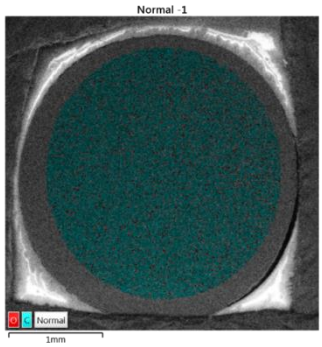
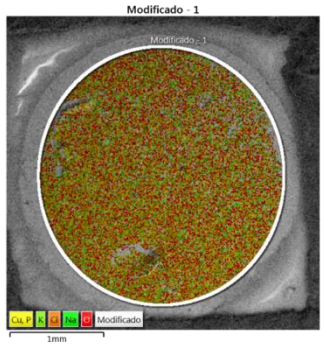
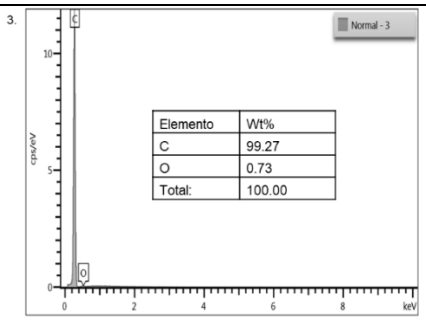
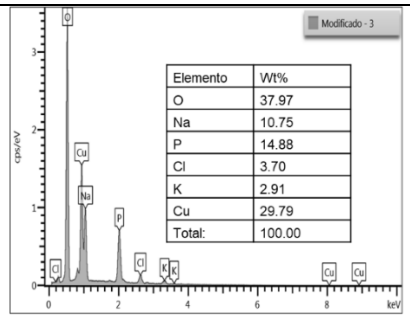
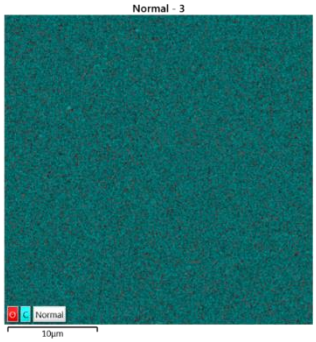
Figura 2-20: Imágenes SEM con detector SE (izquierda) y BSE (derecha) a la magnificación de 6,00 kx.



La figura 2-20 muestra las imágenes SE y BSE de la magnificación de 6,00 kx del electrodo modificado. La imagen obtenida con el detector BSE evidencia que los hilos observados se componen del mismo tipo de átomos que el resto de la superficie porque no hay un cambio de brillo, y por su parte el cambio en el tono observado en la imagen obtenida con el detector SE se debe a que los hilos sobresalen de la superficie.

Para poder determinar qué elementos hay en las superficies también se tomaron EDX al electrodo completo y a la magnificación de 6kx, Figura 2-21. La comparación de los EDX permite observar la presencia uniforme de cobre sobre el electrodo a pesar de la disminución significativa en las señales electroquímicas de cobre por VC después del paso de estabilización en el PBS 10X. Además, se observa presencia de sodio, potasio, cloruros y fósforo que son los elementos que conforman el electrolito soporte.

Figura 2-21: Espectros EDX de electrodo sin modificar (columna A) y el electrodo modificado ECV/PEDOT/Cu después de la estabilización en PBS 10X (columna B). Se muestran además los porcentajes y mapa de distribuciones de los elementos para el electrodo completo y para la magnificación 6kx.

	A) ECV	B) ECV/PEDOT/Cu
Espectro Electrodo completo		
Mapa de distribución Electrodo completo		
Espectro Magnificación 6kx		
Mapa de distribución Magnificación 6kx		

Particularmente, llama la atención que para el electrodo modificado no está presente la señal de azufre, que es un elemento presente en el PEDOT sobre el que se depositó el cobre, esto indica que durante la estabilización se forma una capa uniforme que cubre el polímero.

La relación de elementos junto con la forma esférica observada en las imágenes SEM llevan a considerar que, sobre la superficie, la capa observada se compone de óxidos e hidróxidos de cobre (Chen, K. 2014) en combinación probablemente de complejos de cobre con cloruros y fosfatos que se forman sobre la superficie del electrodo durante los ciclos de oxidación reducción. Ilieva y colaboradores observaron también la disolución de los cristales por ciclos de estabilización en medio ácido (Ilieva, M. 2004). Sin embargo, en el presente trabajo, aunque se observa pérdida de la cantidad de cobre electroquímicamente el pH y la composición del electrolito favorecen que parte del cobre se quede estabilizado en la superficie.

Algunas de estas reacciones del cobre han sido revisadas en diferentes condiciones por diferentes autores (Chen, K. 2014) en donde se evidencia que a pH neutros y básicos se forma en superficie una capa pasivante de óxido de cobre (I), y en presencia de aniones como los iones cloruro se forman otras especies oxidadas como el hidroxicloruro de cobre. De hecho, algunas de estas capas tienen un efecto anticorrosivo (Teague, M 2018). A continuación, se muestran las reacciones mencionadas.

$Cu^{2+} + 2OH^- \rightarrow Cu(OH)_2$	$kps= 4.8\times10^{-20}$	(Chen, K. 2014)
$4Cu + O_2 \rightarrow 2Cu_2O$	$kps= 2\times10^{-15}$	(Chen, K. 2014)
$2Cu_2O + O_2 \rightarrow 4CuO$		(Chen, K. 2014)
$2CuCl_{2,ads}^- + H_2O \leftrightarrow Cu_2O_{ads} + 2H^+ + 4Cl^-$		(Chen, K. 2014)
$Cu + Cl^- \leftrightarrow CuCl_{ads} + e^-$	$kps= 1.72\times10^{-7}$	(Teague, M 2018)
$CuCl_{ads} + Cl^- \leftrightarrow CuCl_{2,ads}^- + e^-$		(Chen, K. 2014, Teague, M 2018)
$CuCl_{2,ads}^- + Cl^- \leftrightarrow CuCl_{3,ads}^{2-} + e^-$		(Teague, M 2018)
$2Cu_2O + O_2 + 4H_2O + 8OH^- \rightarrow 4Cu(OH)_4^{2-}$		(Teague, M 2018)
$4Cu(OH)_4^{2-} + 2e^- \rightarrow Cu_2O + 6OH^- + H_2O$		(Teague, M 2018)
$4CuCl_2^- + O_2 + 4H_2O \leftrightarrow 2Cu_2(OH)_3Cl + 6Cl^- + 2H^+$		(Teague, M 2018)

Este resultado nos permite explicar las señales obtenidas en la VDP donde se observan dos picos. El primero, observado a un potencial de -0,3 V estaría relacionado con la oxidación del cobre de la capa más superficial de Cu(0) a Cu(I) que interactúa con el glifosato y otros aniones del electrolito soporte permaneciendo en superficie; mientras que el segundo pico observado a un potencial de 0,1 V estaría relacionado con la oxidación de Cu(I) del Cu_2O a Cu(II), que podría estar en una capa intermedia, menos expuesta a la disolución, como lo observan Cheng y colaboradores. Estos autores obtienen una estructura tricapa $Cu/Cu_2O/CuO$ durante la oxidación de cobre a altas temperaturas (Chen, K. 2014). Al estar en una capa intermedia, el pico no se ve afectado por la presencia ni de los iones cloruro ni del glifosato.

La combinación de óxidos, hidróxidos y complejos con cobre permiten que la superficie modificada del electrodo sea estable y sensible de forma que pueda interactuar con el glifosato y generar un aumento en la corriente como se espera que sea la respuesta en las condiciones planteadas en este trabajo.

2.5 Estudio de repetibilidad de la modificación del electrodo.

Después de haber determinado las mejores condiciones para la modificación del electrodo y del electrolito soporte, se hizo un estudio de la repetibilidad haciendo 9 veces la modificación y midiendo una disolución del electrolito sin y con glifosato. Las 9 gráficas se pueden ver en la Figura 2-22 donde es notable que las corrientes obtenidas son muy similares. En la Tabla 2-4 se compilaron los resultados de las 9 mediciones para poder calcular la desviación estándar relativa entre experimentos.

Los valores obtenidos de la desviación estándar relativa indican que la variabilidad entre los experimentos es menor al 0,5% (Ott, R 2015; Montgomery, D 2017) y por lo tanto se considera que hay una buena repetibilidad. Este es un resultado muy importante para el método electroquímico puesto que normalmente no es fácil conseguir estos niveles de repetibilidad debido a las múltiples condiciones que se deben tener en cuenta a la hora de realizar los experimentos.

Figura 2-22: Voltamperogramas de las VPD de medición con ECV|PEDOT|Cu para la determinación de la repetibilidad en PBS 10X usando amplitud de pulso de 50 mV, con tiempo de pulso de 50 ms, durante un periodo de 0,66 segundos y un potencial de escalón de 5 mV de A. disolución blanco y B. disolución con de 17 mg kg^{-1} de glifosato.

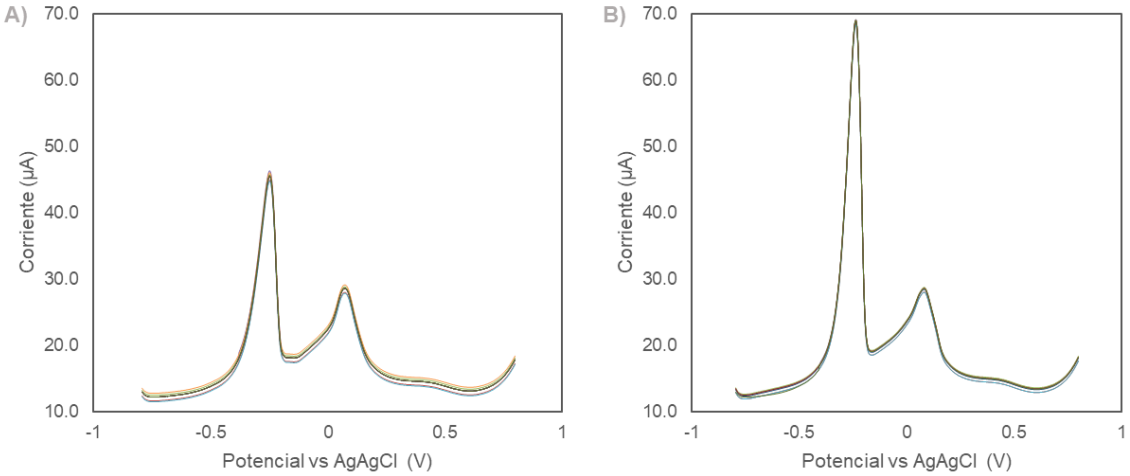


Tabla 2-5: Valores obtenidos en las 9 mediciones hechas para evaluar la repetibilidad de las medidas.

N°	i (µA) Blanco	i (µA) 0,01 mM glifosato	i (µA) Diferencia
1	28.62	50.83	22.21
2	28.66	50.78	22.12
3	28.67	50.87	22.20
4	28.72	50.72	22.00
5	28.64	50.85	22.21
6	28.57	50.87	22.30
7	28.59	50.81	22.22
8	28.65	50.88	22.23
9	28.60	50.89	22.29
promedio	28,60	50,80	22.20
dvs	4.61278×10^{-3}	5.5453×10^{-3}	9.0799×10^{-3}
% CV	0.161	0.109	0.409

Para garantizar la repetibilidad durante este proceso fue muy importante tener en cuenta la limpieza del electrodo, la desoxigenación de las celdas, en especial la de polimerización y el pH de la disolución de PBS. La limpieza del electrodo después de que ha sido modificado requirió del uso de una disolución de DMSO en la que se sumerge el electrodo durante 30 minutos después de pulirlo una vez y se sonicó durante tres minutos con el fin de eliminar cualquier residuo de polímero, para después, volver a hacer la limpieza mecánica previamente descrita en el capítulo 1.

Bibliografía

Aoki, K., Tokuda, K., & Matsuda, H. (1984). Theory of differential pulse voltammetry at stationary planar electrodes. Journal of electroanalytical chemistry and interfacial electrochemistry, 175(1-2), 1-13.

Barbosa, P. F. P., Vieira, E. G., Cumba, L. R., Paim, L. L., Nakamura, A. P. R., Andrade, R. D. A., & do Carmo, D. R. (2019). Voltammetric techniques for pesticides and herbicides detection-an overview. International Journal of Electrochemical Science, 14(4), 3418-3433

Bard, A. L. (2001). Electrochemical Methods Fundamentals and Applications (2nd ed.). John Wiley & Sons.

Bensalah, N. (2012). Pitting corrosion. InTech.

Bianchi, G., & Longhi, P. (1973). Copper in sea-water, potential-pH diagrams. Corrosion Science, 13(11), 853-864.

Brønstad, J. O., & Friestad, H. O. (1976). Method for determination of glyphosate residues in natural waters based on polarography of the N-nitroso derivative. Analyst, 101(1207), 820-824.

Cahuantzi-Muñoz, S. L., González-Fuentes, M. A., Ortiz-Frade, L. A., Torres, E., Ţălu, Ş., Trejo, G., & Méndez-Albores, A. (2019). Electrochemical biosensor for sensitive quantification of glyphosate in maize kernels. Electroanalysis, 31(5), 927-935.

Cao, Y., Wang, L., Shen, C., Wang, C., Hu, X., & Wang, G. (2019). An electrochemical sensor on the hierarchically porous Cu-BTC MOF platform for glyphosate determination. Sensors and Actuators B: Chemical, 283, 487-494.

Chen, K., & Xue, D. (2014). Reaction route to the crystallization of copper oxides. Applied Science and Convergence Technology, 23(1), 14-26.

Coutinho, C. F. B., Silva, M. O., Machado, S. A. S., & Mazo, L. H. (2007). Influence of glyphosate on the copper dissolution in phosphate buffer. Applied surface science, 253(6), 3270-3275.

Coutinho, C. F., & Mazo, L. H. (2005). Complexos metálicos com o herbicida glifosato: revisão. Química Nova, 28, 1038-1045.

Coutinho, C. F., Coutinho, L. F., & Mazo, L. H. (2009). Estudo do comportamento eletroquímico de substâncias complexantes utilizando eletrodo de cobre. Química Nova, 32, 228-233.

Cysewska, K., Karczewski, J., & Jasiński, P. (2015). Influence of electropolymerization conditions on the morphological and electrical properties of PEDOT film. Electrochimica Acta, 176, 156-161.

Dekanski, A., Stevanović, J., Stevanović, R., Nikolić, B. Ž., & Jovanović, V. M. (2001). Glassy carbon electrodes. Carbon, 39(8), 1195–1205. doi:10.1016/s0008-6223(00)00228-1

del Carmen Aguirre, M., Urreta, S. E., & Gomez, C. G. (2019). A Cu2+-Cu/glassy carbon system for glyphosate determination. Sensors and Actuators B: Chemical, 284, 675-683.

dos Santos, S. C., Galli, A., Felsner, M. L., & Justi, K. C. (2014). Desenvolvimento de Metodologia Eletroanalítica para a Determinação do Pesticida Glifosato em Amostras Ambientais. Revista Virtual de Química, 6(4), 866-883.

Du, X., & Wang, Z. (2003). Effects of polymerization potential on the properties of electrosynthesized PEDOT films. Electrochimica Acta, 48(12), 1713-1717.

Dumanlı, O., & Onar, A. N. (2009). Activation of glassy carbon electrodes by photocatalytic pretreatment. Electrochimica acta, 54(26), 6438-6444.

Engstrom, R. C., & Strasser, V. A. (1984). Characterization of electrochemically pretreated glassy carbon electrodes. Analytical Chemistry, 56(2), 136-141.

Fagan, D. T., Hu, I. F., & Kuwana, T. (1985). Vacuum heat-treatment for activation of glassy carbon electrodes. Analytical chemistry, 57(14), 2759-2763.

Gholivand, M. B., Akbari, A., & Norouzi, L. (2018). Development of a novel hollow fiber-pencil graphite modified electrochemical sensor for the ultra-trace analysis of glyphosate. Sensors and Actuators B: Chemical, 272, 415-424.

Girault, H. H. (2004). Analytical and physical electrochemistry (1st ed.). Marcel Dekker.

González Basto, M. C. Validation of the square wave anodic stripping voltammetry methodology for cadmium quantification in Theobroma cacao L. beans (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de Colombia).

Gourier, D., & Tourillon, G. (1986). Production of highly ordered organic conducting polymers (poly-(3-methylthiophene)) under electrochemical inclusion of copper (2+) ions: an ESR study. The Journal of Physical Chemistry, 90(22), 5561-5565.

Guziejewski, D., Stojanov, L., Gulaboski, R., & Mirceski, V. (2022). Reversible and quasireversible electron transfer under conditions of differential square-wave voltammetry. The Journal of Physical Chemistry C, 126(12), 5584-5591.

Hu, F., Karweik, D. H., & Kuwana, T. (1985). Activation and deactivation of glassy carbon electrodes. Journal of electroanalytical chemistry and interfacial electrochemistry, 188(1-2), 59-72.

Ilieva, M., & Tsakova, V. (2004). Copper modified poly (3, 4-ethylenedioxythiophene): Part I: Potentiostatic experiments. Synthetic metals, 141(3), 287-292.

Ilieva, M., & Tsakova, V. (2004). Copper modified poly (3, 4-ethylenedioxythiophene): Part II: Potentiostatic experiments. Synthetic metals, 141(3), 287-292.

Ilieva, M., & Tsakova, V. (2005). Copper electrocrystallization in PEDOT in presence and absence of copper–polymer-stabilized species. Electrochimica acta, 50(7-8), 1669-1674.

Jin, J., Takahashi, F., Kaneko, T., & Nakamura, T. (2010). Characterization of electrochemiluminescence of tris (2, 2′-bipyridine) ruthenium (II) with glyphosate as coreactant in aqueous solution. Electrochimica acta, 55(20), 5532-5537.

Kamau, G. N. (1988). Surface preparation of glassy carbon electrodes. Analytica Chimica Acta, 207, 1–16. doi:10.1016/s0003-2670(00)80777-1

Kamau, G. N., Willis, W. S., & Rusling, J. F. (1985). Electrochemical and Electron Spectroscopic Studies of Highly Polished Glassy Carbon Electrodes. Analytical Chemistry, 57(2), 545–551. doi:10.1021/ac50001a049

Khenifi, A., Derriche, Z., Forano, C., Prevot, V., Mousty, C., Scavetta, E., ... & Tonelli, D. (2009). Glyphosate and glufosinate detection at electrogenerated NiAl-LDH thin films. Analytica Chimica Acta, 654(2), 97-102.

Kiema, G. K., Aktay, M., & McDermott, M. T. (2003). Preparation of reproducible glassy carbon electrodes by removal of polishing impurities. Journal of Electroanalytical Chemistry, 540, 7-15.

King, F., & Kolar, M. (2000). The copper container corrosion model used in AECL's second case study. Ontario Power Generation report.

Laguarda-Miro, N., Ferreira, F. W., García-Breijo, E., Ibáñez-Civera, J., Gil-Sánchez, L., & Garrigues-Baixauli, J. (2012). Glyphosate detection by voltammetric techniques.

A comparison between statistical methods and an artificial neural network. Sensors and Actuators B: Chemical, 171, 528-536.

Melo Martínez, O, López Pérez, L y Melo Martínez, S. (2020). Diseño de experimentos: métodos y aplicaciones. Universidad Nacional de Colombia.

Merck KGaA, Darmstadt, Alemania y/o sus filiales. (n.d.). 10X Phosphate-Buffered Saline (PBS) for Western Blotting. 10x phosphate-buffered saline (PBS) for western blotting. https://www.sigmaaldrich.com/CO/es/support/calculators-and-apps/10x-phosphate-buffered-saline

Molina Osorio, A. F. (2014). Estudio de la reacción de reducción electroquímica de CO2 sobre electrodos sólidos modificados con Poli-(3, 4-etilendioxitiofeno)(PEDOT) Poli-(3, 4-etilendioxitiofeno)(PEDOT) (Doctoral dissertation).

Monge Romero, I. C. (2013). Estudio electro catalítico de la reacción de reducción de oxígeno sobre películas ultra delgadas de polianilina (PANI). Sintetizadas vía electroquímica sobre electrodos de carbón vítreo, platino y oro modificados con películas de poli-(3, 4-etilendioxitiofeno)(PEDOT).

Montgomery, D. C. (2017). Design and analysis of experiments. John wiley & sons.

Moraes, F. C., Mascaro, L. H., Machado, S. A., & Brett, C. M. (2010). Direct electrochemical determination of glyphosate at copper phthalocyanine/multiwalled carbon nanotube film electrodes. Electroanalysis, 22(14), 1586-1591

Moreno-Piza, O. J., & Suarez-Herrera, M. F. (2022). Electrochemical study of the redox processes of elemental sulfur in organic solvents using poly (3, 4-ethylene-dioxy-thiophene) modified glassy carbon electrodes as working electrodes and ionic liquids as electrolytes. Electrochimica Acta, 436, 141442.

Muneer, M., & Boxall, C. (2008). Photocatalyzed degradation of a pesticide derivative glyphosate in aqueous suspensions of titanium dioxide. International Journal of Photoenergy, 2008.

Oliveira, G. C., Moccelini, S. K., Castilho, M., Terezo, A. J., Possavatz, J., Magalhães, M. R., & Dores, E. F. (2012). Biosensor based on atemoya peroxidase immobilised on modified nanoclay for glyphosate biomonitoring. Talanta, 98, 130-136.

Ott, R. L., & Longnecker, M. T. (2015). An introduction to statistical methods and data analysis. Cengage Learning.

Pourbaix, M. (1966). Atlas of electrochemical equilibria in aqueous solutions. NACE.

Poverenov, E., Li, M., Bitler, A., & Bendikov, M. (2010). Major effect of electropolymerization solvent on morphology and electrochromic properties of PEDOT films. Chemistry of Materials, 22(13), 4019-4025.

Reddy, K. J., Wang, L., & Gloss, S. P. (1995). Solubility and mobility of copper, zinc and lead in acidic environments. Plant and Soil, 171, 53-58.

Regiart, M., Kumar, A., Gonçalves, J. M., Silva Junior, G. J., Masini, J. C., Angnes, L., & Bertotti, M. (2020). An electrochemically synthesized nanoporous copper microsensor for highly sensitive and selective determination of glyphosate. ChemElectroChem, 7(7), 1558-1566.

Rice, R. J., Pontikos, N. M., & McCreery, R. L. (1990). AME" CHEMICAL SOCIETY. J. Am. Chem. SOC, 112(12). 0002-7863/90/1512-4617$02.50/0

Rieger, P. H. (1994). Electrochemistry (2nd ed.). Chapman & Hall.

Riveros, G., León, M., & Ramírez, D. (2016). Effect of chloride ions on the structural, optical, morphological, and electrochemical properties of Cu2O films electrodeposited on Fluorine-doped tin Oxide substrate from a DMSO solution. Journal of the Chilean Chemical Society, 61(4), 3219-3223.

Sandoval, A. P., Feliu, J. M., Torresi, R. M., & Suárez-Herrera, M. F. (2014). Electrochemical properties of poly (3, 4-ethylenedioxythiophene) grown on Pt (111) in imidazolium ionic liquids. Rsc Advances, 4(7), 3383-3391.

Sanz de Paz, D. (2015). Comportamiento electroquímico del ion Ag (I) sobre electrodo de Pt en Cloruro de 1-Butil-3 Metil-Imidazolio (BMIMCl) entre 343-363 K.

Scharifker, B., & Hills, G. (1983). Theoretical and experimental studies of multiple nucleation. Electrochimica acta, 28(7), 879-889.

Scholz, F. (2015). Voltammetric techniques of analysis: the essentials. ChemTexts, 1(4), 17.

Shrivastava, S., Kumar, A., Verma, N., Chen, B. Y., & Chang, C. T. (2021). Voltammetric detection of aqueous glyphosate on a copper and poly (pyrrole)-electromodified activated carbon fiber. Electroanalysis, 33(4), 916-924.

Sierra, E. V., Méndez, M. A., Sarria, V. M., & Cortés, M. T. (2008). Electrooxidación de glifosato sobre electrodos de níquel y cobre. Química Nova, 31, 220-226.

Simoes, F. R., Mattoso, L. H. C., & Vaz, C. M. P. (2006). Conducting polymers as sensor materials for the electrochemical detection of pesticides. Sensor Letters, 4(3), 319-324.

Sivakumar, C., & Berchmans, S. (2018). Methanol electro-oxidation by nanostructured Pt/Cu bimetallic on poly 3, 4 ethylenedioxythiophene (PEDOT). Electrochimica Acta, 282, 163-170.

Songa, E. A., Somerset, V. S., Waryo, T., Baker, P. G., & Iwuoha, E. I. (2009). Amperometric nanobiosensor for quantitative determination of glyphosate and glufosinate residues in corn samples. Pure and Applied Chemistry, 81(1), 123-139.

Štulík, K., Pacáková, V., Le, K., & Hennisen, B. (1988). Amperometric flow detection with a copper working electrode—response mechanism and application to various compounds. Talanta, 35(6), 455-460.

Suárez Herrera, M. F. (2011). Electroquímica física e interfacial: una aproximación teórica. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias.

Subramaniam, V., & Hoggard, P. E. (1988). Metal complexes of glyphosate. Journal of agricultural and food chemistry, 36(6), 1326-1329.

Teague, M., Li, S., & Cong, H. (2018). Interfacial Corrosion of Copper and the Formation of Copper Hydroxychloride.

Teófilo, R. F., Reis, E. L., Reis, C., Silva, G. A. D., & Kubota, L. T. (2004). Experimental design employed to square wave voltammetry response optimization for the glyphosate determination. Journal of the Brazilian Chemical Society, 15, 865-871.

Tsui, T. K. (2002). Aquatic toxicity and environmental fate of glyphosate-based herbicides (Doctoral dissertation, Chinese University of Hong Kong).

Van der Linden, W. E., & Dieker, J. W. (1980). Glassy carbon as electrode material in electro- analytical chemistry. Analytica Chimica Acta, 119(1), 1–24. doi:10.1016/s0003-2670(00)00025-8

Vidal, E., Negro, A., Cassano, A., & Zalazar, C. (2015). Simplified reaction kinetics, models and experiments for glyphosate degradation in water by the UV/H2O2 process. Photochemical & Photobiological Sciences, 14(2), 366-377. Wang, J. (2006). Analytical Electrochemistry (3rd ed.). John Wiley & Sons.

Wang, S., Yao, Y., Zhao, J., Han, X., Chai, C., & Dai, P. (2022). A novel electrochemical sensor for glyphosate detection based on Ti 3 C 2 T x/Cu-BTC nanocomposite. RSC advances, 12(9), 5164-5172.

Xia, Y. M., Zhang, W., Li, M. Y., Xia, M., Zou, L. J., & Gao, W. W. (2019). Effective electrochemical determination of chloramphenicol and florfenicol based on graphene/copper phthalocyanine nanocomposites modified glassy carbon electrode. Journal of The Electrochemical Society, 166(8), B654.

Zambrano-Intriago, L. A., Amorim, C. G., Rodríguez-Díaz, J. M., Araújo, A. N., & Montenegro, M. C. (2021). Challenges in the design of electrochemical sensor for glyphosate-based on new materials and biological recognition. Science of the Total Environment, 793, 148496.

Zhang, C., She, Y., Li, T., Zhao, F., Jin, M., Guo, Y., ... & Wang, J. (2017). A highly selective electrochemical sensor based on molecularly imprinted polypyrrole-modified

gold electrode for the determination of glyphosate in cucumber and tap water. Analytical and bioanalytical chemistry, 409, 7133-7144.

Zittel, H. E., & Miller, F. J. (1965). A Glassy-Carbon Electrode for Voltammetry. Analytical Chemistry, 37(2), 200–203. doi:10.1021/ac60221a006

3. Capítulo 3: Optimización de los parámetros de la voltamperometría de pulso diferencial

La voltamperometría de pulso diferencial (VPD) se describió en el capítulo 1. La técnica utiliza los parámetros de amplitud de pulso ($E_{potencial}$), tiempo de pulso (t_p), escalón de potencial ($E_{escalón}$) y periodo ($t_{escalón}$), como se puede ver en las gráficas de potencial vs tiempo de la Figura 1-2. (Scholz, F. 2015; Simões, F 2017; Bard, A 2021; Wang, J 2006; Rieger, P 1994; Girault, H 2004).

En este sentido, se realizaron modificaciones en los valores de la amplitud del pulso de potencial, la duración del pulso y tiempo del escalón. La velocidad de barrido se define como la relación entre el potencial del escalón y el tiempo del pulso, y, para hacer cambios sobre la velocidad de manera más controlada, se realizó el ajuste sobre el tiempo del escalón. Los parámetros se evaluaron para obtener líneas base más estables y especialmente mayores diferencias en la intensidad de señal entre el blanco y la disolución con glifosato.

3.1 Análisis del efecto de los parámetros por método SIMPLEX

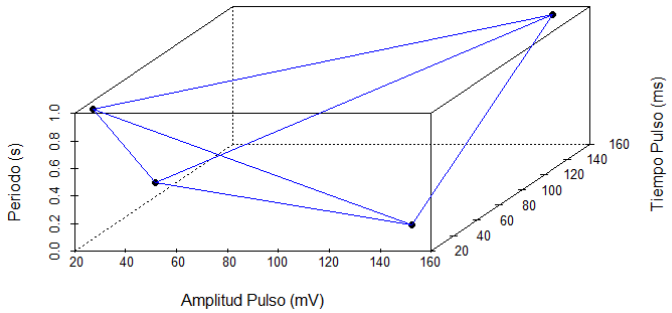
Se empleó el método de optimización SIMPLEX buscando obtener la relación entre parámetros que generara una mayor diferencia de corriente entre el blanco y la disolución con glifosato. Los parámetros seleccionados fueron periodo, tiempo de pulso y amplitud del pulso.

El método SIMPLEX utiliza una figura geométrica que consta de n+1 vértices, de modo que cuando son 3 vértices, la figura utilizada será un triángulo, una de 4 será un tetraedro triangular, una de 5 será un pentaedro triangular, y así sucesivamente (Walters, F 1991).

El simplex se representa en un espacio donde los ejes corresponden a los factores que se están optimizando y los vértices de la figura representan los valores de cada variable. El método consiste en realizar modificaciones en los vértices, las cuales pueden ser reflexiones, expansiones y contracciones. Estas decisiones se toman después de evaluar el resultado de aplicar las condiciones descritas en cada vértice, de manera que el vértice sugerido tenga una respuesta mayor o menor que las anteriores, en caso de que se desee maximizar o minimizar. (Walters, F 1991; Dantzig, G 1990; Ficken, F 2015)

Para este caso se exploró la relación entre periodo, tiempo y amplitud del pulso, así que, n es igual a 3 y la figura que designará la explicación de los parámetros es un tetraedro triangular. Inicialmente se desarrollaron 4 experimentos de forma que al graficarse los valores de los parámetros se forme un tetraedro en el que no haya una pareja de condiciones sobre el mismo eje.

Figura 3-1: Grafica de las condiciones iniciales del SIMPLEX.



Después de llevar a cabo los experimentos asociados con los 4 vértices de la Figura 3-1 los resultados expresados como la diferencia en áreas entre el blanco y la disolución con glifosato para cada experimento (Tabla **3-1**) permiten la generación de una sugerencia para un nuevo vértice por parte del algoritmo cuando se ejecuta en el entorno de software libre para computación y gráficos estadísticos R con los paquetes plotly para generar gráficos interactivos, readxl para importar archivos de Excel, reshape2 para convertir entre

formatos ancho y largo y htmlwidgets Guardar gráficos interactivos en HTML . Tras realizar cada experimento propuesto por el algoritmo se obtiene un punto nuevo para llevar a cabo el siguiente experimento. En este caso, el algoritmo sugirió tiempos de pulso negativos después de realizar los experimentos 4 y 8, los cuales se descartaron. En total se realizaron 15 experimentos.

Tabla 3-1: Diferencia de área para los experimentos de la optimización por método simplex.

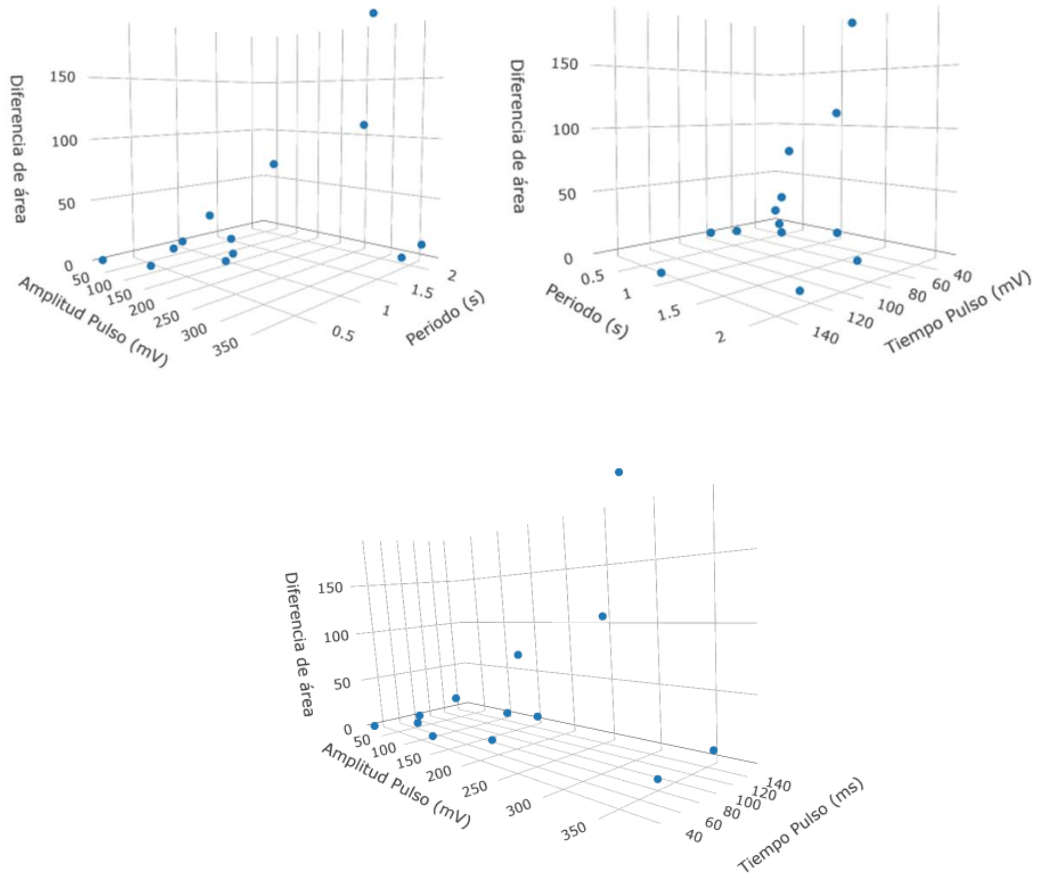
Exp	Amplitud de pulso (mV)	Tiempo de pulso (ms)	Periodo (s)	Diferencia de área (µA/V)
I	150	150	1	2.27
II	25	80	0.16	0.20
III	25	25	1	0.03
IV	150	25	0.16	10.32
VI	66.667	55	0.72	3.28
VII	219.44	73.33	1.093	80.93
VIII	316.889	70	1.56	112.41
X	163.889	100	0.906	18.15
XI	353.704	75	1.831	4.62
XII	138.426	60	0.797	37.20
XIII	358.33	135	2.12	10.22
XIV	202.083	52.5	0.65	9.47
XV	369.907	28.33	1.202	191.53

La tabla 3-1 muestra los valores de diferencias de áreas obtenidas para los distintos experimentos realizados. Los resultados obtenidos de estos experimentos se analizaron como diferencias de área y no de corriente como en el capítulo anterior porque la forma de las señales y la línea base de los voltamperogramas cambiaron significativamente como se explicará más adelante.

Se puede observar que los valores sugeridos por el SIMPLEX desde el punto 7 son todos mayores a los 100 mV de amplitud, valores poco usuales en las voltamperometrías diferenciales de pulso. Esta tendencia al aumento de la amplitud continuó hasta llegar al experimento 15 con un valor sugerido de 369 mV. En este punto se decidió no continuar

con el SIMPLEX y revisar las tendencias observadas con los otros dos factores como se observa en la figura 3-2.

Figura 3-2: Graficas de la diferencia de áreas entre el blanco y la disolución con glifosato con respecto al valor de los factores de cada experimento.

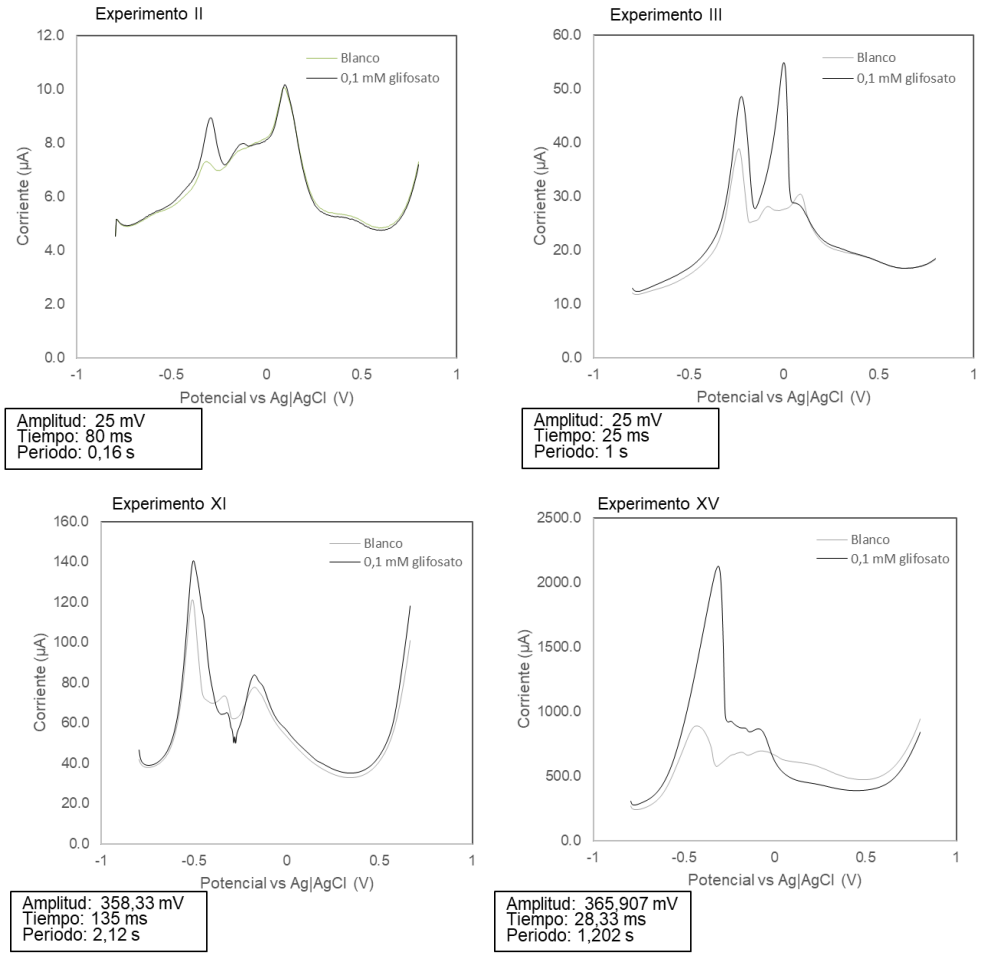


Después de analizar la Figura 3-2 se puede concluir que efectivamente la diferencia de área aumenta cuando se aplica una mayor amplitud de pulso. Al mismo tiempo se puede observar que, aunque la amplitud de pulso sea alta, cuando el periodo es extenso, disminuye la diferencia del área, debido a que como se puede ver en la Figura 1-3 la corriente faradaica también disminuye mientras el potencial se mantiene constante, así que si el periodo es largo la corriente faradaica disminuirá bastante y al restar las corrientes *forward* y *backward* de obtendrá un valor de corriente bajo.

También se observa que las mayores diferencias de área se encuentran a tiempos de pulso menores a 100 ms. Por lo tanto, no es posible decir que hay alguna relación o rango que esté indicando que el SIMPLEX está llegando a una convergencia.

Debido a este comportamiento en el que después de 15 experimentos la tendencia seguía hacia al aumento en amplitud, se hizo necesario analizar la forma de las señales obtenidas durante cada uno de los experimentos. Algunos de los voltamperogramas más significativos se muestran en la Figura 3-3.

Figura 3-3: Voltamperogramas obtenidos durante los experimentos II, III, XI y XV del SIMPLEX.



Las gráficas de la Figura 3-3 ilustran el cambio en la forma de las señales causado por los parámetros empleados en la VPD. Se puede observar que, a mayores amplitudes de pulso,

las señales son más anchas y se desplazan a menores potenciales además de causar inclinación en la línea base. La inclinación es más pronunciada cuando los periodos son muy cortos. En experimentos donde la relación entre el tiempo y el periodo es pequeña, como en el experimento II, y la amplitud no es muy alta, el desplazamiento de la línea base es notable, además, la resolución de las señales es pobre.

Sin embargo, con una relación muy grande como en el experimento III, las corrientes base se incrementan y se inclina el voltamperograma. Otro problema observado es que con amplitudes de pulso muy grandes como en el experimento XV, la resolución de los picos se ve comprometida.

También se observa que periodos muy largos causan que las diferencias en área se hagan mucho más pequeñas, como en el experimento XI, aunque las amplitudes de pulso son altas, así que el periodo debe mantenerse en valores intermedios, lo que también se pudo notar en la Figura 3-2, de modo que dure un tiempo suficiente para disminuir la corriente capacitiva pero no en exceso menguando también la corriente faradaica.

Se observó que la variación simultánea de los parámetros modificó la forma y el ancho de las señales y desplazó e inclinó la línea base. De forma general, se puede decir que se deformaron los voltamperogramas. Para poder determinar los valores de los parámetros en los que no hay deformación y se incrementa la diferencia entre la señal de glifosato y el blanco es necesario evaluar el efecto de cada parámetro de manera individual.

La optimización por el método SIMPLEX buscaba determinar la relación entre parámetros que generara una mayor diferencia de corriente entre el blanco y la disolución con glifosato. Sin embargo, no se alcanzó una relación óptima ya que los valores se seguían incrementando sin tener en cuenta la deformación de los picos. Aun así, los experimentos realizados sí sirvieron para usarse como base para poder identificar tendencias, el efecto que tienen los cambios de amplitud, tiempo de pulso, y periodo, además, sugerir los valores iniciales para realizar una optimización parámetro a parámetro.

3.2 Optimización de la señal por VPD para la detección de glifosato

Aunque por el método simplex no se obtuvieron los parámetros óptimos, si se encontró un intervalo de condiciones en los cuales deberían estar tales valores teniendo en cuenta que no se deformen los picos y que no se incline significativamente la línea base. Por esa razón, y considerando que la señal después de hacer la medida en la disolución con glifosato es reproducible, se modificó un electrodo con el que se hicieron cuatro medidas en la misma disolución con glifosato variando la amplitud del pulso y el tiempo del pulso.

Figura 3-4: Voltamperogramas de las VPD de medición de 17 mg kg^{-1} de glifosato con ECV|PEDOT|Cu empleando 4 combinaciones de parámetros.

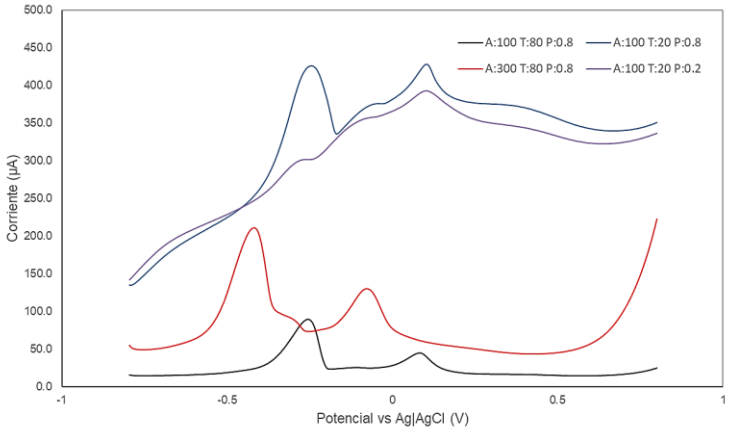


Tabla 3-2: Comparación entre las 4 combinaciones de parámetros.

Color	Negro	Azul	Rojo	Morado
Amplitud de pulso (mV)	100	100	300	100
Tiempo de pulso (ms)	80	20	80	20
Periodo (s)	0,8	0,8	0,8	0,2
Línea base	10 µA. No se inclina	Inicia en 120 µA. Se inclina	50 µA. Solo se inclina a E> 0,5 V	Inicia en 120 µA. Se inclina
Potencial al que se observa la señal de Cu(0) -> Cu(I)	-0,25 V	-0,25 V	-0.47 V	-0,25 V
Ancho de la señal de Cu(0) -> Cu(I)	0,065 V	0,090 V	0,105 V	----

La Figura 3-4 permite observar las corrientes medidas con cuatro combinaciones de parámetros que se muestran en la Tabla 3-2 junto con la comparación de sus efectos en la forma de los voltamperogramas. Se puede concluir que el factor que más influyó en la inclinación de la línea base es el tiempo de pulso que para los casos de la medida azul y amarilla fue muy corto, lo que podría indicar que la inclinación en la línea base se debe al efecto de las corrientes capacitivas que no alcanzan a disminuir a tiempos de pulso tan cortos.

El incremento de la amplitud del pulso también genera que la línea base se incline. Además, se corroboró que aplicar una mayor amplitud de pulso genera que la señal se desplace a potenciales más bajos.

Finalmente se observa que disminuir el periodo de 0,8 a 0,2 s hace que se pierdan también las corrientes faradaicas. Por lo tanto, se decidió mantener para todos experimentos posteriores un periodo de 0,8 s.

Para determinar los parámetros que permiten lograr el mayor aumento en la intensidad de corriente manteniendo una adecuada línea base, se hicieron experimentos variando la amplitud de pulso y luego cambiando el tiempo de pulso como se observa en la Figura 3-5 y 3-6.

La Figura 3-5 permite seleccionar una amplitud adecuada. Esta selección se hizo teniendo en cuenta el valor con el que se obtiene una mayor intensidad de corriente manteniendo al mínimo la inclinación de la línea base y un ancho de la señal que no deforme el pico, así que en lugar de escoger la amplitud que genera el máximo de corriente, se seleccionó una amplitud de 200 mV.

El tiempo de pulso que resulta en una corriente más intensa manteniendo una línea base estable fue 50 ms, representado por la línea magenta como se muestra en la Figura 3-6. En este caso no se observa que este resultado se relacione con una tendencia, sino que este es el tiempo apropiado en que las corrientes capacitivas disminuyen lo suficiente y el no es tan largo como para que las corrientes faradaicas también disminuyan.

Figura 3-5: Voltamperogramas de las VPD de medición de 17 mg kg^{-1} de glifosato con ECV|PEDOT|Cu variando la amplitud de pulso entre 50 y 300 mV. Tiempo de pulso 80 ms. Periodo 0,8 s.

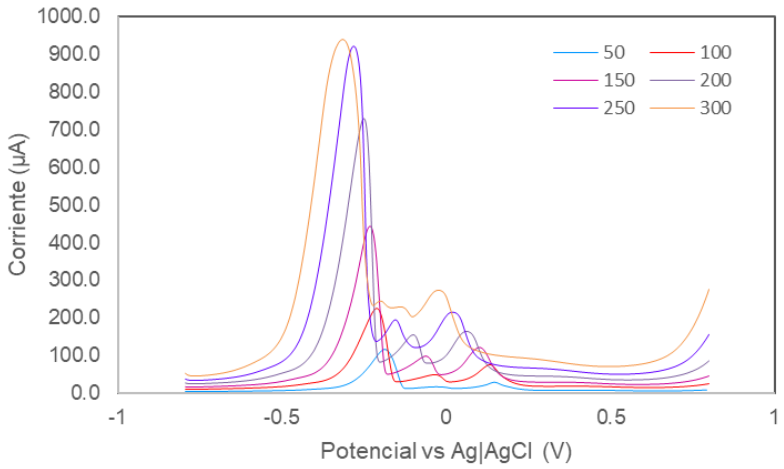
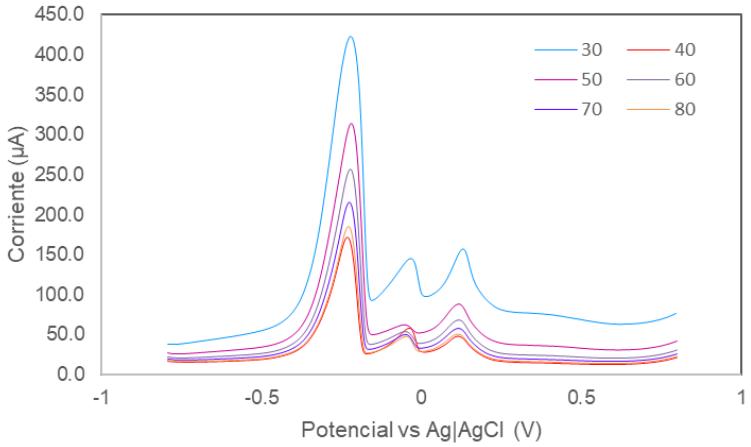
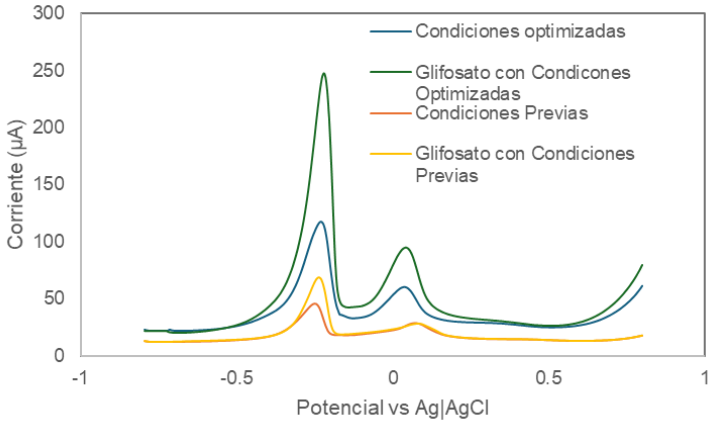


Figura 3-6: Voltamperogramas de las VPD de medición de 17 mg kg^{-1} de glifosato con ECV|PEDOT|Cu variando el tiempo de pulso entre 30 y 80 ms. Amplitud de pulso 100 mV. Periodo 0,8 s.



Después de la exploración de los parámetros se concluyó que los valores más apropiados para la determinación de glifosato con el ECV|PEDOT|Cu son: amplitud de pulso de 200 mV, tiempo de pulso de 50 ms y periodo de 0,8 s. En la Figura 3-7 se muestra la comparación entre los voltamperogramas del blanco y de la disolución con glifosato, antes y después de haber optimizado los parámetros.

Figura 3-7: Medición de 17 mg kg^{-1} de glifosato por VPD usando ECV|PEDOT|Cu antes y después de haber optimizado los parámetros analíticos. Para las líneas amarilla y anaranjada: amplitud de pulso de 50 mV, tiempo de pulso de 50 ms, periodo de 0,66 segundos, potencial de escalón de 5 mV. Para las líneas azul y verde: amplitud de pulso de 200 mV, tiempo de pulso de 50 ms, periodo de 0,8 segundos, potencial de escalón de 5 mV.



La Figura 3 – 7 muestra claramente que antes de la optimización de los parámetros analíticos la diferencia de corriente entre el blanco y la señal con glifosato fue de 22,27 µA, mientras que esta misma diferencia después de la optimización de los parámetros analíticos es de 130.01 µA, indicando que la diferencia de corriente después de la optimización se incrementó 5,83 veces.

Bibliografía

Bard, A. L. (2001). Electrochemical Methods Fundamentals and Applications (2nd ed.). John Wiley & Sons.

Dantzig, G. B. (1990). Origins of the simplex method. In A history of scientific computing (pp. 141-151).

Ficken, F. A. (2015). The simplex method of linear programming. Courier Dover Publications.

Girault, H. H. (2004). Analytical and physical electrochemistry (1st ed.). Marcel Dekker

Parry, E. P., & Osteryoung, R. A. (1965). Evaluation of analytical pulse polarography. Analytical Chemistry, 37(13), 1634-1637.

Pelzer, J., Scholz, F., Henrion, G., & Nitschke, L. (1989). Optimization of parameters for differential pulse voltammetry at the hanging mercury drop electrode. Electroanalysis, 1(5), 437-440.

Rieger, P. H. (1994). Electrochemistry (2nd ed.). Chapman & Hall.

Scholz, F. (2015). Voltammetric techniques of analysis: the essentials. ChemTexts, 1(4), 17.

Simoes, F. R., Mattoso, L. H. C., & Vaz, C. M. P. (2006). Conducting polymers as sensor materials for the electrochemical detection of pesticides. Sensor Letters, 4(3), 319-324.

Walters, F. H. (1991). Sequential simplex optimization: a technique for improving quality and productivity in research, development, and manufacturing. (No Title).

Wang, J. (2006). Analytical Electrochemistry (3rd ed.). John Wiley & Sons

4. Capítulo 4: Parámetros analíticos en la determinación de glifosato

La determinación de glifosato por VPD utilizando un ECV|PEDOT|Cu modificado por la metodología previamente descrita se hizo por medio del método de calibración de estándar externo. Este método de calibración consiste en generar una curva de calibración que represente la respuesta del método a disoluciones de concentración conocida del analito (Harris, D 2003; Miller, J. N., & Miller, J 2002).

Para determinar el rango de concentraciones que se pueden medir por el método que hemos planteado el estudio estadístico de la curva de calibración para determinar el intervalo lineal, el límite de detección (LOD), de cuantificación (LOQ) y la sensibilidad como la pendiente de la curva de calibración.

4.1 Curvas de calibración

Para identificar la respuesta del electrodo a la concentración de glifosato se planteó hacer una curva de calibraciones a altas concentraciones y una segunda a bajas. Para las dos curvas de calibración se utilizó el estándar de N-(fosfonometil) glicina PESTANAL® y la disolución de PBS 10X pH 7,4.

4.1.1 Curva de calibración a altas concentraciones

Inicialmente, se preparó una disolución patrón de 2000 mg kg^{-1} en PBS 10X y a partir de esta se prepararon las 8 disoluciones patrón de puntos de la curva de calibración por triplicado.

La Figura 4 -1 A) muestra los voltamperogramas promedio obtenidos de los 7 puntos de la curva y del blanco, en el caso de los 6 puntos entre 5,983 y 496,853 mg kg^{-1} el

voltamperograma mostrado corresponde al promedio de las 3 medidas que se tomaron por cada punto de la curva, en voltamperograma del blanco en la figura corresponde al promedio de los 33 blancos tomados para la construcción de la curva. La parte B. de la Figura 4 - 1 muestra la curva de calibración generada a partir de la diferencia entre cada medida y el blanco. En la Tabla 4-1 se encuentran las estadísticas de la regresión lineal de la curva.

Figura 4-1: Graficas A) Voltamperogramas promedio (n=3) de las VPD de medición de las disoluciones patrón de la curva de calibración a altas concentraciones. El voltamperograma del blanco corresponde al promedio de 33 medidas. B) Curva de calibración de estándar externo entre 5,983 y 496,853 mg kg^{-1} en disolución PBS 10X pH 7.4

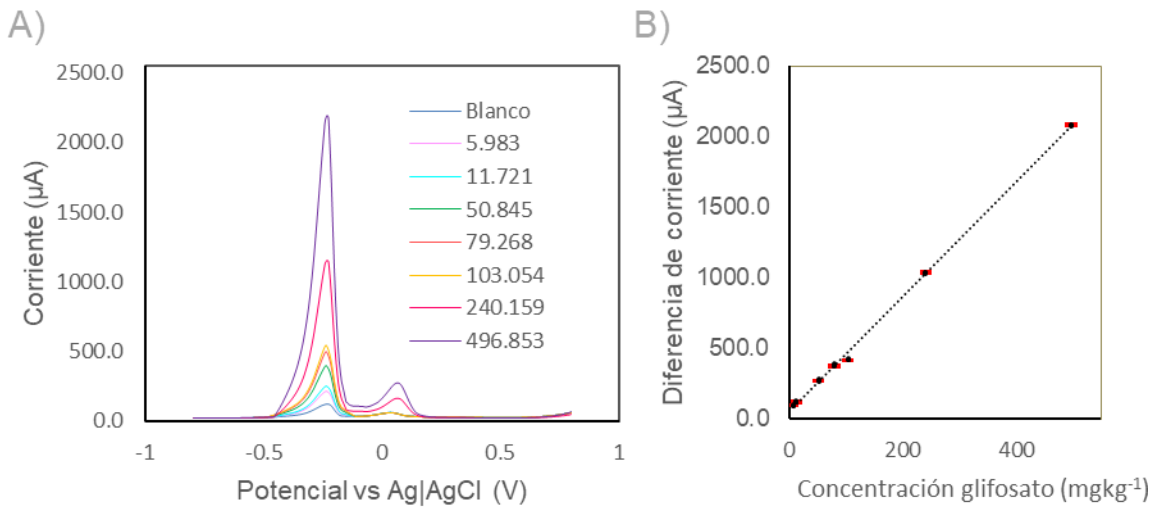


Tabla 4-1: Estadísticas de la regresión lineal de la curva de calibración, obtenidos con la herramienta de análisis de excel.

a.

	Coeficientes	**Error típico**	**Estadístico t**	**Probabilidad**
Intercepción	58,8	6,7	8,749	$4,3 \times 10^{-8}$
Variable X 1	4,056	0,031	129,807	$1,8 \times 10^{-29}$

b.

Estadísticas de la regresión	
Coeficiente de correlación múltiple	0.9994
Coeficiente de determinación R^2	0.9989
R^2 ajustado	0.9988
Error típico	23.26
Observaciones	21

Las estadísticas de la regresión en la Tabla 4-1 a. proporcionan los valores de la pendiente y el intercepto con sus respectivas incertidumbres. Teniendo en cuenta el valor del estadístico t y de la probabilidad, se puede decir que el intercepto y la pendiente son estadísticamente diferentes de 0 (Melo Martínez, O 2020; Montgomery, D 2017).

La Tabla 4-1 b. contiene los valores calculados para los coeficientes de correlación y determinación. El coeficiente de correlación múltiple es una medida de la bondad de la predicción de una variable, es decir, la diferencia de corrientes con y sin glifosato (ΔI), cuando se emplea una función lineal de otra u otras variables, en este caso, la concentración de glifosato (Moore, D 2009; Rodríguez Jaume, M 2001; Allison, P 1999). Mientras el valor obtenido sea más cercano a 1 se concluye que la respuesta puede ser predicha por la función lineal, así que se puede decir que la intensidad de la corriente medida para altas concentraciones de glifosato puede ser predicha por la Ecuación 4.1 :

$$y = 4{,}06 \pm 0{,}03\ \mu A\ kg\ mg^{-1}[C] + 59 \pm 7\ \mu A \quad (4.1)$$

El coeficiente de determinación se puede describir como el porcentaje de la variación en la respuesta que se relaciona con la variable independiente (Moore, D 2009; Rodríguez Jaume, M 2001; Allison, P 1999). Así que por el valor obtenido se puede decir que un 99,89% de la variación de ΔI se relaciona con la concentración de glifosato.

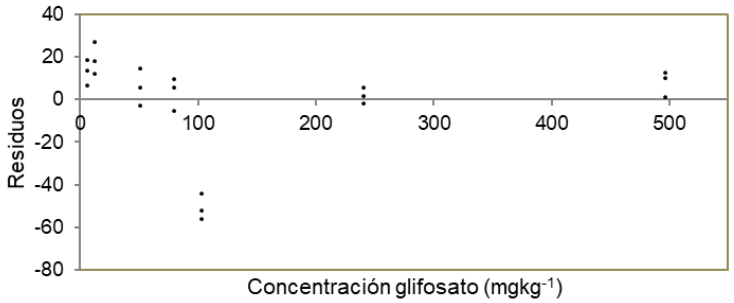
Tabla 4-2: Estadísticas del análisis de varianza de los datos a altas concentraciones

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	9120917.43	9120917.43	16849.8858	1.8×10^{-29}
Residuos	19	10284.7837	541.304407		
Total	20	9131202.22			

El análisis de varianza de la regresión que se observa en la Tabla 4-2 lleva a concluir que el modelo de regresión permite explicar el comportamiento de los datos debido a que el valor de F de la regresión es mayor al valor crítico de F, de modo que el modelo lineal planteado es adecuado para representar la relación entre la respuesta de corriente que varía linealmente con la concentración de glifosato (Melo Martínez, O 2020; Montgomery, D 2017).

También se hizo una gráfica de los residuales en función de la concentración de glifosato para identificar si se encuentran tendencias o patrones que puedan indicar falta de linealidad del modelo.

Figura 4-2: Gráfica de residuales en función de la concentración de glifosato.



La Figura 4-2 nos permite observar que no hay ningún patrón en los residuales y están dispersos de manera aleatoria, así que no hay una relación no lineal, interacciones entre variables, o la necesidad de transformar alguna variable. (Melo Martínez, O 2020; Montgomery, D 2017). Así que, al tener en cuenta que el modelo resultó ser significativo, que el R^2 tiene un valor cercano a 1 y que los residuales indican homocedasticidad es

correcto afirmar que el modelo de regresión lineal por mínimos cuadrados ordinarios es adecuado para describir los datos de las medidas a altas concentraciones.

Por último, se graficó la curva de regresión ajustada junto con la curva original de modo que se puede notar gráficamente la bondad del ajuste del modelo lineal obtenido a los datos originales.

4.1.2 Curva de calibración a bajas concentraciones

Las disoluciones preparadas para la curva a bajas concentraciones fueron: 0,023, 0,042, 0,063, 0,080 y 0,103mg kg^{-1} de glifosato.

La Figura 4 - 3 A. muestra una ampliación de los voltamperogramas promedio de cada uno de los 5 puntos de la curva y del blanco. En el inserto se puede ver la forma de los voltamperogramas completos. De igual manera, la parte B muestra la curva de calibración generada a partir de la diferencia de corriente entre las disoluciones con glifosato y el blanco. La Tabla 4-3 resume las estadísticas de la regresión lineal de la curva a bajas concentraciones.

Figura 4-3: Gráfica A. Ampliación de los máximos de las señales de Cu(0) -> Cu(I) de los voltamperogramas promedio (n = 3)de las VPD de medición de las disoluciones patrón de la curva de calibración a bajas concentraciones (Inserto en a: voltamperogramas promedio de las VPD de medición de las disoluciones patrón de la curva de calibración a bajas concentraciones). B. Curva de calibración de estándar externo entre 0,023 y 0,103 mg kg^{-1} en disolución PBS 10X pH 7.4

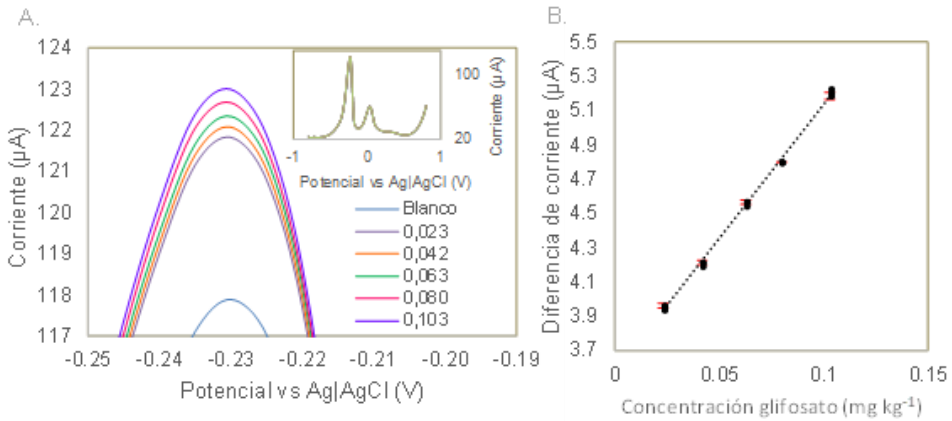


Tabla 4-3: Estadísticas de la regresión lineal de la curva de calibración a bajas concentraciones.

a.

	Coeficientes	**Error típico**	**Estadístico t**	**Probabilidad**
Intercepción	3.570	0.015	235.658	5.5×10^{-24}
Variable X 1	15.67	0.22	70.451	3.5×10^{-18}

b.

Estadísticas de la regresión	
Coeficiente de correlación múltiple	0.9987
Coeficiente de determinación R^2	0.9974
R^2 ajustado	0.9972
Error típico	0.024
Observaciones	15

Siguiendo con los mismos análisis hechos para la curva a altas concentraciones los datos en la Tabla 4-4 a. indican el valor de la pendiente y el intercepto con sus respectivos errores. En este caso, los valores del estadístico t y de la probabilidad, también indican que el intercepto y la pendiente son estadísticamente diferentes de 0 (Melo Martínez, O 2020; Montgomery, D 2017).

Los valores de los coeficientes de correlación y determinación en la Tabla 4 -1 permiten concluir que la *ΔI* medida para bajas concentraciones de glifosato puede ser predicha por la Ecuación (4.2):

$$y = 15{,}67 \pm 0{,}02\ \mu A\ kg\ mg^{-1}[C\,] + 3{,}57 \pm 0{,}22\ \mu A \qquad (4.2)$$

Tabla 4-4: Estadísticas del análisis de varianza de los datos a bajas concentraciones

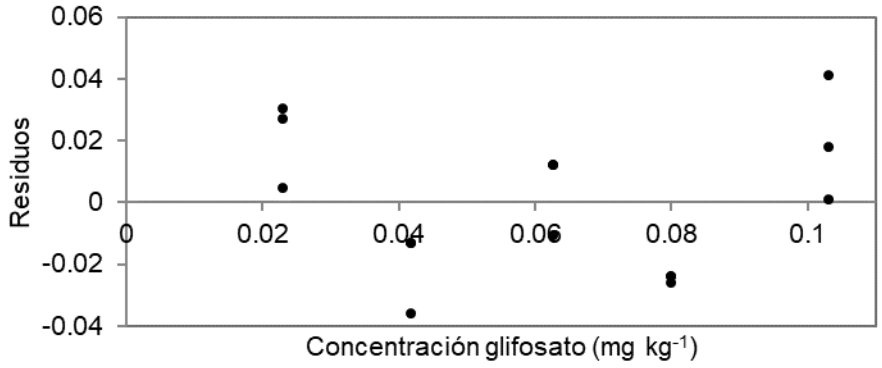
	Grados de libertad	**Suma de cuadrados**	**Promedio de los cuadrados**	**F**	**Valor crítico de F**
Regresión	1	2.891919312	2.891919312	4963.298978	3.5×10^{-18}
Residuos	13	0.007574589	0.000582661		
Total	14	2.899493901			

Los datos F y valor crítico de F de la Tabla 4 – 4 indican que el modelo de regresión es adecuado para explicar el comportamiento de los datos, así que, el modelo lineal planteado es capaz de representar la relación entre la respuesta de corriente con la concentración de glifosato (Melo Martínez, O 2020; Montgomery, D 2017).

Para demostrar la homocedasticidad de los datos en ese caso también se grafican los residuales para verificar que no se observen patrones y que los residuos tengan una distribución aleatoria.

La Figura 4-4 es útil para confirmar la homocedasticidad esperada. Nuevamente, el modelo es significativo, el R^2 tiene un valor cercano a 1 y tiene homocedasticidad, así que es correcto afirmar que el modelo de regresión lineal por mínimos cuadrados ordinarios es adecuado para describir los datos de las medidas a bajas concentraciones.

Figura 4-4: Gráfica de residuales en función de la concentración de glifosato para bajas concentraciones.



La sensibilidad está determinada por la pendiente de la curva de calibración, es decir, que con la curva a bajas concentraciones se obtuvo una sensibilidad de 15,67 µA mg^{-1} kg, mientras que con la curva a altas concentraciones la sensibilidad fue de 4,06 µA mg^{-1} kg. Se identifica que la sensibilidad analítica es mayor con la curva a bajas concentraciones.

4.1.3 LOD y LOQ

Es importante conocer el intervalo de concentraciones que se pueden detectar con este método por lo que se deben determinar los límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ). Un LOD se ha definido como “la menor cantidad de analito que puede detectarse en una muestra, aunque no necesariamente cuantificarse, bajo las condiciones del experimento indicadas. Así, las pruebas de límite confirman simplemente que la cantidad de analito se encuentra por encima o por debajo de un cierto nivel” (Currie, L 1995; Bernal, E 2014; UNODC 2009; Armbruster, D 2008; Vashist, S 2018).

Debido a que el valor del intercepto es diferente de 0 se determinaron los valores del límite de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ) se hizo siguiendo la aproximación de límite superior (*upper limit approach ULA)* (Mocak, J 1997). La determinación de los límites por este método requiere inicialmente requiere calcular la incertidumbre del modelo de regresión, es decir, el cual se expresa mediante su varianza del error de la regresión, para esto se desarrolla la Ecuación (4.3).:

$$s_y^2 = \frac{\sum(y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2} \tag{4.3}$$

Donde, y_i corresponde a los valores medidos en cada punto de la curva a bajas concentraciones y $\hat{y}_i$ a los valores predichos con la Ecuación 4.2 y n son la cantidad total de medidas.

El cálculo de la varianza para los datos de la curva a bajas concentraciones es 0,001 μA^2 y con este valor se calcula el LOD siguiendo la Ecuación (4.4) y LOQ con la Ecuación (4.5):

$$LOD = \frac{t(v,\alpha)}{m}\sqrt{\left(1 + \frac{1}{n} + \frac{\bar{C}^2}{\sum_{i=0}^{n_s}(C_0 - \bar{C})^2}\right)} \tag{4.4}$$

$$LOQ = 3\,\frac{t(v,\alpha)}{m}\sqrt{\left(1 + \frac{1}{n} + \frac{\bar{C}^2}{\sum(C_i - \bar{C})^2}\right)} \tag{4.5}$$

En las ecuaciones 4.4 y 4.5 la expresión t(v, α) corresponde al valor crítico de la distribución t de Student para un nivel de confianza dado $\alpha = 0.05$ y $n - 2$ grados de libertad, en este

caso el valor de t(v, α) es 2.16036. $\bar{C}$ es la media de las concentraciones que se representan con C_i.

Los límites calculados son 0,010 mg kg^{-1} como límite de detección y 0,029 mg kg^{-1} como límite de cuantificación. El límite de detección obtenido es igual al que obtuvieron Dhamu y colaboradores con el sistema sensor electroquímico de alta sensibilidad para detectar y distinguir entre glifosato y glufosinato (Dhamu, V. N 2021). Otro trabajo que obtuvo el mismo límite de detección fue el de Shrivastava, llamado detección voltamperométrica de glifosato acuoso en una fibra de carbón activado de cobre y poli(pirrol)-electromodificado (Shrivastava, S 2021).

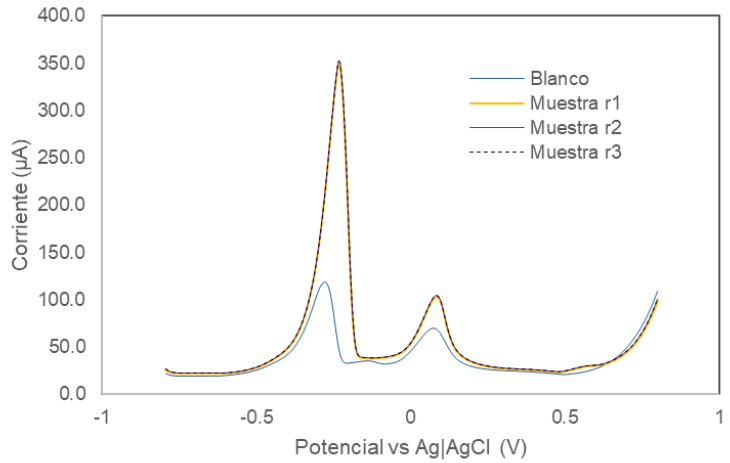
Otros métodos como el dos Santos y colaboradores y como el de Teófilo y colaboradores tienen límites de detección más altos 22,04 ± 0,42 µg L^{-1} y 25 µg L^{-1} respectivamente, la detección se hizo mediante voltamperometría de onda cuadrada (SWV) y electrodo de gota de mercurio colgante (HMDE) (dos Santos, S. C 2014; Teófilo, R. F 2004), El método de Alza-Camacho y colaboradores tiene un LOD de 40 µg L^{-1} y también se hizo por SWV con un ECV (Alza-Camacho 2016).

4.1.4 Análisis de muestras de glifosato con los electrodos modificados

El método desarrollado se empleó para hacer mediciones de muestras sintéticas preparadas en el laboratorio utilizando Roundup® Activo que es un concentrado soluble comercial de glifosato comercializado por Bayer con una concentración de 363 g l^{-1}.

Para hacer la determinación de la disolución de Roundup® Activo se prepararon dos disoluciones. La primera disolución con una concentración de esta de 44,90 mg l^{-1} cuyo voltamperograma se puede observar en la Figura 4-5.

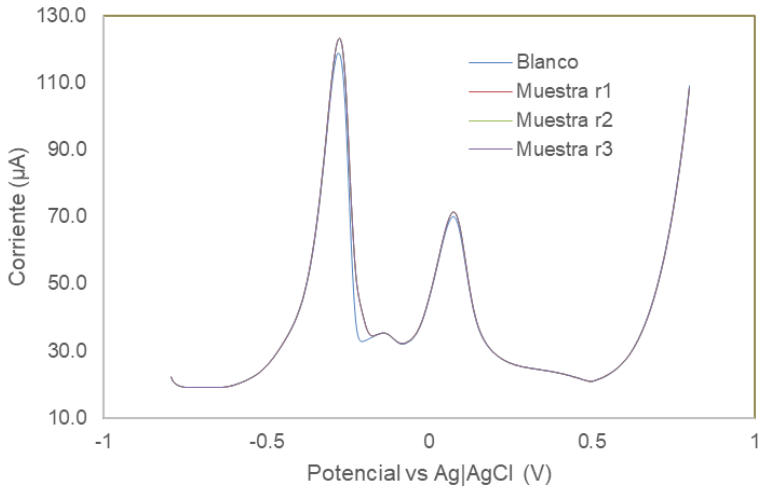
Figura 4-5: Voltamperogramas de las VPD de medición en disolución blanco y muestra de 44,90 mg l^{-1} de glifosato con ECV/PEDOT/Cu.



La Figura 4-5 muestra 3 mediciones de la muestra. La concentración resultante de la extrapolación de estas medidas es de 43 mg kg^{-1} ± 5 mg kg^{-1}, es decir que, el valor de la disolución Roundup® Activo es: 35 × 10^4 mg l^1 ± 4 × 10^4 mg l^{-1}, este resultado tiene una diferencia de 3,6% con respecto al valor indicado en la etiqueta del producto.

También se preparó una disolución de muestra con una concentración esperada de glifosato de 0,05441 mg l^{-1}.

Figura 4-6: Voltamperogramas de las VPD de medición en disolución blanco y muestra de 0,05441 mg l^{-1} de glifosato con ECV|PEDOT|Cu.



La cuantificación de los valores obtenidos para la Figura 4-6 resulta en una concentración de 0,052 mg kg^{-1} ± 0,001 mg kg^{-1}, es decir que, el valor de la disolución Roundup® Activo es: 345 × 10^3 mg l^{-1} ± 5 × 10^3 mg l^{-1}, este resultado tiene una diferencia de 4,9% con respecto al valor indicado en la etiqueta del producto.

Tener diferencias menores al 5% con respecto al valor esperado, indica que electrodo modificado con PEDOT y cobre permite detectar la concentración de glifosato que tiene la disolución, así que el electrodo modificado en conjunto con la VDP resulta en valores confiables de la concentración de glifosato.

Como una actividad adicional a los objetivos planteados en el proyecto se midieron algunas muestras de agua pertenecientes a un pozo ubicado en una finca de la Vereda el Alizal, municipio de Tuta, Boyacá, en la que se emplea glifosato para el control de la maleza. La muestra de agua de pozo fue tomada 3 meses antes de la medición en el laboratorio, mantenida en nevera, y se analizó por dilución de 100 µL de agua de pozo a 10,0 mL con PBS 10X, por triplicado. La muestra también fue sometida a un análisis certificado de glifosato por HPLC en donde no se encontró presencia de glifosato.

En la figura 4-7 se observa el resultado del análisis por VPD del agua de pozo diluida, en donde se encuentra que hay una modificación importante de la línea base, además de un desplazamiento en las dos señales de oxidación de cobre.

Teniendo en cuenta la ausencia de glifosato por la prueba certificada, se procedió a filtrar la muestra y a realizar una adición de glifosato de 20 mg kg^{-1} para observar el comportamiento de las señales, Figura 4-8. En esta adición se obtuvo un 59% de recuperación según las curvas de calibración realizadas, lo que indica un fuerte efecto matriz. Por lo tanto, serán necesarios estudios posteriores para el análisis con curvas de calibración por adición estándar y estudios para buscar el mejor tratamiento de la muestra que permita eliminar los interferentes.

Figura 4-7: Voltamperograma por VPD de dilución de agua de pozo en PBS 10X sobre ECV|PEDOT|Cu por triplicado. La línea gris indica el blanco.

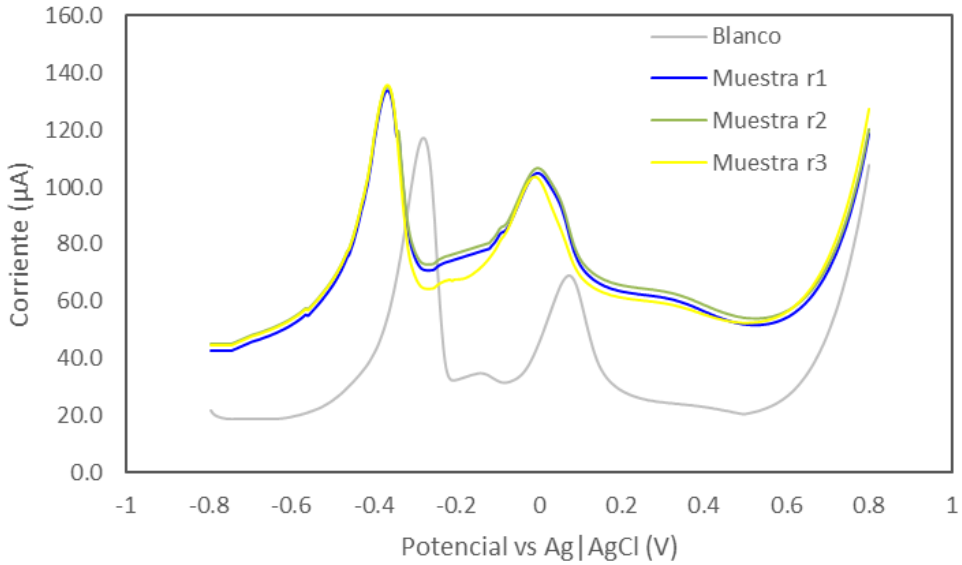
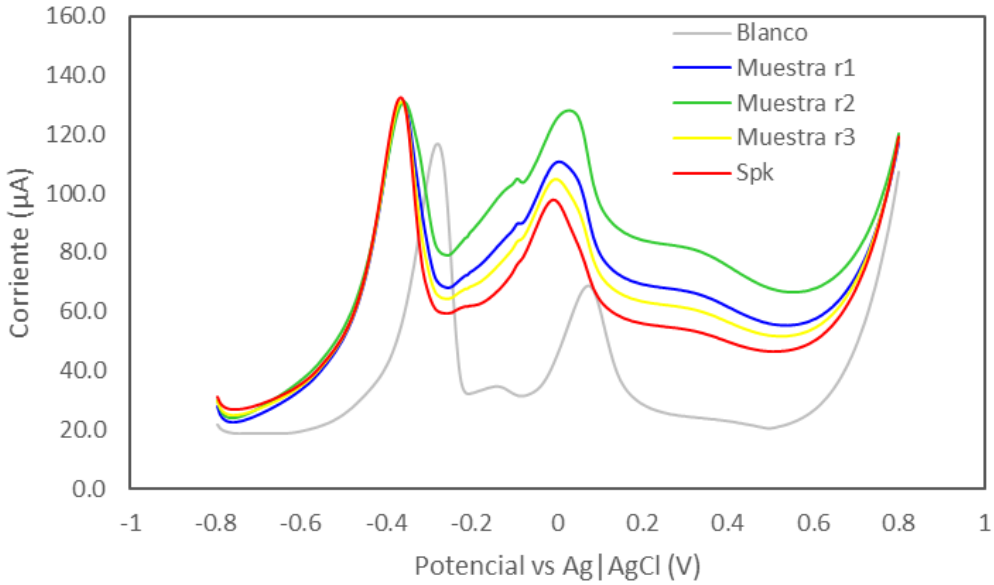


Figura 4-8: Voltamperograma por VPD de dilución de agua de pozo en PBS 10X sobre ECV|PEDOT|Cu con adición (*Spk*) de 20 mg kg^{-1} de glifosato. Medida realizada por triplicado. La línea gris indica el blanco.



Bibliografía

Allison, P. D. (1999). Multiple regression: A primer. Pine Forge Press.

Alza-Camacho, W. R., García-Colmenares, J. M., & Chaparro-Acuña, S. P. (2016). Determinación voltamétrica de paraquat y glifosato en aguas superficiales. Ciencia y Tecnología Agropecuaria, 17(3), 331-345.

Armbruster, D. A., & Pry, T. (2008). Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation. The clinical biochemist reviews, 29(Suppl 1), S49.

Bernal, E., & Guo, X. (2014). Limit of detection and limit of quantification determination in gas chromatography. Advances in gas chromatography, 3(1), 57-63.

Currie, L. A. (1995). Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities (IUPAC Recommendations 1995). Pure and applied chemistry, 67(10), 1699-1723.

Dhamu, V. N., Poudyal, D. C., Muthukumar, S., & Prasad, S. (2021). A highly sensitive electrochemical sensor system to detect and distinguish between glyphosate and glufosinate. Journal of The Electrochemical Society, 168(5), 057531.

dos Santos, S. C., Galli, A., Felsner, M. L., & Justi, K. C. (2014). Desenvolvimento de Metodologia Eletroanalítica para a Determinação do Pesticida Glifosato em Amostras Ambientais. Revista Virtual de Química, 6(4), 866-883.

Harris, D. C. (2003). Análisis químico cuantitativo. Argentina: Reverté.

Melo Martínez, O, López Pérez, L y Melo Martínez, S. (2020). Diseño de experimentos: métodos y aplicaciones. Universidad Nacional de Colombia.

Miller, J. N., & Miller, J. C. (2002). Estadística y quimiometría para química analítica (No. 543.062: 519.23 MIL).

Mocak, J., Bond, A. M., Mitchell, S., & Scollary, G. (1997). A statistical overview of standard (IUPAC and ACS) and new procedures for determining the limits of detection and quantification: application to voltammetric and stripping techniques (technical report). Pure and Applied Chemistry, 69(2), 297-32

Montgomery, D. C. (2017). Design and analysis of experiments. John wiley & sons

Moore, D. S. (2009). Introduction to the Practice of Statistics. WH Freeman and company.

Rodríguez Jaume, M. J., & Mora Catalá, R. (2001). Estadística informática: casos y ejemplos con el SPSS. Publicaciones de la Universidad de Alicante.

Shrivastava, S., Kumar, A., Verma, N., Chen, B. Y., & Chang, C. T. (2021). Voltammetric detection of aqueous glyphosate on a copper and poly (pyrrole)-electromodified activated carbon fiber. Electroanalysis, 33(4), 916-924.

Teófilo, R. F., Reis, E. L., Reis, C., Silva, G. A. D., & Kubota, L. T. (2004). Experimental design employed to square wave voltammetry response optimization for the glyphosate determination. Journal of the Brazilian Chemical Society, 15, 865-871.

United Nations Office on Drugs, Crime. Laboratory, & Scientific Section. (2009). Guidance for the Validation of Analytical Methodology and Calibration of Equipment Used for Testing of Illicit Drugs in Seized Materials and Biological Specimens: A Commitment to Quality and Continuous Improvement. United Nations Publications.

Vashist, S. K., & Luong, J. H. (2018). Bioanalytical requirements and regulatory guidelines for immunoassays. In Handbook of immunoassay technologies (pp. 81-95). Academic Press.

5. Conclusiones

La modificación del electrodo de carbono vítreo (ECV) con poli(3,4-etilendioxitiofeno) (PEDOT) y cobre permitió obtener un método viable para determinar el herbicida glifosato por voltamperometría diferencial de pulso (VPD). El método electroquímico de análisis desarrollado tuvo en cuenta la evaluación de diferentes parámetros de la modificación del electrodo, de las técnicas electroquímicas, así como el cuidado experimental durante la modificación de la superficie para obtener experimentos con una alta repetibilidad con desviación estándar relativa menor al 0,5%.

Durante esta investigación se encontraron dos aspectos claves que facilitan la detección del glifosato con la superficie propuesta. El primero fue la presencia de polímero conductor PEDOT, y el segundo fue la presencia de cloruros en el paso de estabilización del cobre en PBS 10X.

Cuando se optimizaron las condiciones de la modificación del electrodo se observó que la mayor diferencia en la señal entre el blanco y la disolución con glifosato ocurre cuando se hace la polimerización aplicando 19,6 µA durante 100 segundos, lo que resulta en la mayor cantidad de polímero sobre la superficie del electrodo, según se evidencia en la confirmación por VC. El potencial de reducción de cobre resultó ser un parámetro no significativo para mejorar la diferencia en la señal. Igualmente se observó que con el polímero se obtienen dos señales separadas y bien definidas de la oxidación de cobre, a diferencia de lo que sucede sólo en presencia de cobre depositado directamente sobre electrodo de carbono vítreo, lo que indica que hay una interacción química entre el polímero y el cobre que permite, además, una mejora en la señal con el glifosato. Cabe destacar que el uso de la voltamperometría diferencial de pulso fue una técnica electroquímica apropiada en este caso porque permitió obtener señales definidas y evitar

la influencia de las altas corrientes capacitivas producto de la presencia del polímero, en contraste con la voltamperometría cíclica.

Se encontró que la presencia de una alta concentración de iones cloruro durante el paso de estabilización en la disolución de PBS 10X fue fundamental para obtener una superficie que permite un incremento significativo en la señal de oxidación del cobre en presencia de glifosato respecto a la señal del blanco. Además, se observó que la adición de cloruros generó un desplazamiento de la señal asignada a la oxidación Cu(0) a Cu(I) a potenciales más negativos mientras que la segunda señal de Cu(I) a Cu(II) no se vió afectada significativamente. Por lo tanto, se utilizó para el análisis la primera señal.

Los espectros EDX del electrodo estabilizado mostraron la presencia de cobre y una cantidad importante de otros elementos como fósforo, cloruros y oxígeno, lo que sugiere que la superficie estabilizada consiste en óxidos, hidróxidos y complejos de cobre con los aniones del electrolito. De tal manera que el glifosato junto con otros aniones como el ion cloruro, puede formar complejos estables con Cu(I) que se mantienen en la superficie del electrodo gracias al pH en el que se realiza la medida.

Al optimizar los parámetros amplitud de pulso, tiempo de pulso y periodo de la voltamperometría diferencial de pulso se observó que a mayor amplitud de pulso aplicado la corriente de la primera señal de cobre fue en constante aumento, de modo que no se alcanzó un máximo. Por este motivo, se estableció como una amplitud razonable un valor de 200 mV de tal manera que no se deformara el voltamperograma. Los valores obtenidos de la optimización fueron: tiempo de pulso de 50 ms y periodo de 0,8 s. Con estos valores se obtuvo una diferencia de corriente máxima sin inclinación significativa de la línea base.

En la evaluación de los parámetros analíticos del método se encontraron dos intervalos lineales, el primero entre 6 y 500 mg kg^{-1}, y el segundo entre 0,02 y 0,10 mg kg^{-1}. Con los valores de la curva de calibración a bajas concentraciones se obtuvo un valor de límite de detección de 0,010 mg kg^{-1} y de cuantificación, de 0,029 mg kg^{-1}.

Finalmente, se realizó el análisis de dos muestras sintéticas a partir del producto comercial de glifosato Roundup® Activo de 363 g l^{-1} (302,5 g kg^{-1}), utilizando dos diluciones de

diferentes concentraciones para utilizar las curvas de altas y bajas concentraciones. Los valores obtenidos calculados fueron de 350^{-1} ± 40 g l^{-1} y de 345 ± 5 g l^{-1} que difieren en menos del 5% respecto al valor indicado en la etiqueta del producto. Estos resultados indican que el método desarrollado es promisorio para el análisis del glifosato y se debe seguir trabajando para validarlo en muestras reales.

Bibliografía

Abdullah, M. P., Daud, J., Hong, K. S., & Yew, C. H. (1995). Improved method for the determination of glyphosate in water. Journal of Chromatography A, 697(1-2), 363-369.

Allison, P. D. (1999). Multiple regression: A primer. Pine Forge Press.

Alza-Camacho, W. R., García-Colmenares, J. M., & Chaparro-Acuña, S. P. (2016). Determinación voltamétrica de paraquat y glifosato en aguas superficiales. Ciencia y Tecnología Agropecuaria, 17(3), 331-345.

Aoki, K., Tokuda, K., & Matsuda, H. (1984). Theory of differential pulse voltammetry at stationary planar electrodes. Journal of electroanalytical chemistry and interfacial electrochemistry, 175(1-2), 1-13.

Aristov, N., & Habekost, A. (2015). Cyclic voltammetry-A versatile electrochemical method investigating electron transfer processes. World J. Chem. Educ, 3(5), 115-119.

Armbruster, D. A., & Pry, T. (2008). Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation. The clinical biochemist reviews, 29(Suppl 1), S49.

Bai, S. H., & Ogbourne, S. M. (2016). Glyphosate: environmental contamination, toxicity and potential risks to human health via food contamination. Environmental Science and Pollution Research, 23, 18988-19001.

Barbosa, P. F. P., Vieira, E. G., Cumba, L. R., Paim, L. L., Nakamura, A. P. R., Andrade, R. D. A., & do Carmo, D. R. (2019). Voltammetric techniques for pesticides and herbicides detection-an overview. International Journal of Electrochemical Science, 14(4), 3418-3433.

Bard, A. L. (2001). Electrochemical Methods Fundamentals and Applications (2nd ed.). John Wiley & Sons.

Benbrook, C. M. (2016). Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. Environmental Sciences Europe, 28(1), 1-15.

Bensalah, N. (2012). Pitting corrosion. InTech.

Bernal, E., & Guo, X. (2014). Limit of detection and limit of quantification determination in gas chromatography. Advances in gas chromatography, 3(1), 57-63.

Bianchi, G., & Longhi, P. (1973). Copper in sea-water, potential-pH diagrams. Corrosion Science, 13(11), 853-864.

Bohórquez Vivas, D. J. (2020) Métodos analíticos para la determinación de Glifosato en matrices ambientales.

Brønstad, J. O., & Friestad, H. O. (1976). Method for determination of glyphosate residues in natural waters based on polarography of the N-nitroso derivative. Analyst, 101(1207), 820-824.

Çağlar, S., & Kolankaya, D. (2008). The effect of sub-acute and sub-chronic exposure of rats to the glyphosate-based herbicide Roundup. Environmental toxicology and pharmacology, 25(1), 57-62.

Cahuantzi-Muñoz, S. L., González-Fuentes, M. A., Ortiz-Frade, L. A., Torres, E., Ţălu, Ş., Trejo, G., & Méndez-Albores, A. (2019). Electrochemical biosensor for sensitive quantification of glyphosate in maize kernels. Electroanalysis, 31(5), 927-935.

Cao, Y., Wang, L., Shen, C., Wang, C., Hu, X., & Wang, G. (2019). An electrochemical sensor on the hierarchically porous Cu-BTC MOF platform for glyphosate determination. Sensors and Actuators B: Chemical, 283, 487-494.

Chen, K., & Xue, D. (2014). Reaction route to the crystallization of copper oxides. Applied Science and Convergence Technology, 23(1), 14-26.

Cho, S. H., & Park, S. M. (2006). Electrochemistry of conductive polymers 39. Contacts between conducting polymers and noble metal nanoparticles studied by current-sensing atomic force microscopy. The Journal of Physical Chemistry B, 110(51), 25656-25664.

Coutinho, C. F. B., Silva, M. O., Machado, S. A. S., & Mazo, L. H. (2007). Influence of glyphosate on the copper dissolution in phosphate buffer. Applied surface science, 253(6), 3270-3275.

Coutinho, C. F., & Mazo, L. H. (2005). Complexos metálicos com o herbicida glifosato: revisão. Química Nova, 28, 1038-1045.

Coutinho, C. F., Coutinho, L. F., & Mazo, L. H. (2009). Estudo do comportamento eletroquímico de substâncias complexantes utilizando eletrodo de cobre. Química Nova, 32, 228-233.

Cox, J. A., & Cheng, K. H. (1974). Determination of phosphate by cathodic stripping voltammetry at a glassy carbon electrode. Analytical Letters, 7(10), 659-670.

Currie, L. A. (1995). Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities (IUPAC Recommendations 1995). Pure and applied chemistry, 67(10), 1699-1723.

Cysewska, K., Karczewski, J., & Jasiński, P. (2015). Influence of electropolymerization conditions on the morphological and electrical properties of PEDOT film. Electrochimica Acta, 176, 156-161.

Daniele, P. G., De Stefano, C., Prenesti, E., & Sammartano, S. (1997). Copper (II) complexes of N-(phosphonomethyl) glycine in aqueous solution: a thermodynamic and spectrophotometric study. Talanta, 45(2), 425-431.

Dantzig, G. B. (1990). Origins of the simplex method. In A history of scientific computing (pp. 141-151).

Davis, J. R. (2001). Copper and copper alloys. ASM international.

Dekanski, A., Stevanović, J., Stevanović, R., Nikolić, B. Ž., & Jovanović, V. M. (2001). Glassy carbon electrodes. Carbon, 39(8), 1195–1205. doi:10.1016/s0008-6223(00)00228-1

del Carmen Aguirre, M., Urreta, S. E., & Gomez, C. G. (2019). A Cu2+-Cu/glassy carbon system for glyphosate determination. Sensors and Actuators B: Chemical, 284, 675-683.

Dhamu, V. N., Poudyal, D. C., Muthukumar, S., & Prasad, S. (2021). A highly sensitive electrochemical sensor system to detect and distinguish between glyphosate and glufosinate. Journal of The Electrochemical Society, 168(5), 057531.

Ding, J., Guo, H., Liu, W. W., Zhang, W. W., & Wang, J. W. (2015). Current progress on the detection of glyphosate in environmental samples. J. Sci. Appl. Biomed, 3(06), 88-95.

dos Santos, S. C., Galli, A., Felsner, M. L., & Justi, K. C. (2014). Desenvolvimento de Metodologia Eletroanalítica para a Determinação do Pesticida Glifosato em Amostras Ambientais. Revista Virtual de Química, 6(4), 866-883.

Du, X., & Wang, Z. (2003). Effects of polymerization potential on the properties of electrosynthesized PEDOT films. Electrochimica Acta, 48(12), 1713-1717.

Duke, S. O. (2018). The history and current status of glyphosate. Pest management science, 74(5), 1027-1034.

Duke, S. O., & Powles, S. B. (2008). Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. Pest Management Science: formerly Pesticide Science, 64(4), 319-325.

Duke, S. O., Baerson, S. R., & Rimando, A. M. (2003). Glyphosate. Encyclopedia of Agrochemicals.

Dumanlı, O., & Onar, A. N. (2009). Activation of glassy carbon electrodes by photocatalytic pretreatment. Electrochimica acta, 54(26), 6438-6444.

Engstrom, R. C., & Strasser, V. A. (1984). Characterization of electrochemically pretreated glassy carbon electrodes. Analytical Chemistry, 56(2), 136-141.

Fagan, D. T., Hu, I. F., & Kuwana, T. (1985). Vacuum heat-treatment for activation of glassy carbon electrodes. Analytical chemistry, 57(14), 2759-2763.

Ficken, F. A. (2015). The simplex method of linear programming. Courier Dover Publications.

Gasnier, C., Dumont, C., Benachour, N., Clair, E., Chagnon, M. C., & Séralini, G. E. (2009). Glyphosate-based herbicides are toxic and endocrine disruptors in human cell lines. Toxicology, 262(3), 184-191.

Gholivand, M. B., Akbari, A., & Norouzi, L. (2018). Development of a novel hollow fiber-pencil graphite modified electrochemical sensor for the ultra-trace analysis of glyphosate. Sensors and Actuators B: Chemical, 272, 415-424.

Gill, J. P. K., Sethi, N., & Mohan, A. (2017). Analysis of the glyphosate herbicide in water, soil and food using derivatising agents. Environmental Chemistry Letters, 15, 85-100.

Girault, H. H. (2004). Analytical and physical electrochemistry (1st ed.). Marcel Dekker.

González Basto, M. C. Validation of the square wave anodic stripping voltammetry methodology for cadmium quantification in Theobroma cacao L. beans (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de Colombia).

Gourier, D., & Tourillon, G. (1986). Production of highly ordered organic conducting polymers (poly-(3-methylthiophene)) under electrochemical inclusion of copper (2+) ions: an ESR study. The Journal of Physical Chemistry, 90(22), 5561-5565.

Guziejewski, D., Stojanov, L., Gulaboski, R., & Mirceski, V. (2022). Reversible and quasireversible electron transfer under conditions of differential square-wave voltammetry. The Journal of Physical Chemistry C, 126(12), 5584-5591.

Harris, D. C. (2003). Análisis químico cuantitativo. Argentina: Reverté.

Horth, H., & Blackmore, K. (2009). Survey of glyphosate and AMPA in groundwaters and surface waters in Europe. WRC report no. UC8073, 2.

Hu, F., Karweik, D. H., & Kuwana, T. (1985). Activation and deactivation of glassy carbon electrodes. Journal of electroanalytical chemistry and interfacial electrochemistry, 188(1-2), 59-72.

Huhn, C. (2018). More and enhanced glyphosate analysis is needed. Analytical and bioanalytical chemistry, 410, 3041-3045.

Ilieva, M., & Tsakova, V. (2004). Copper modified poly (3, 4-ethylenedioxythiophene): Part I: Potentiostatic experiments. Synthetic metals, 141(3), 287-292.

Ilieva, M., & Tsakova, V. (2004). Copper modified poly (3, 4-ethylenedioxythiophene): Part II: Potentiostatic experiments. Synthetic metals, 141(3), 287-292.

Ilieva, M., & Tsakova, V. (2005). Copper electrocrystallization in PEDOT in presence and absence of copper–polymer-stabilized species. Electrochimica acta, 50(7-8), 1669-1674

Inesi, A. (1986). Instrumental Methods in Electrochemistry.: R. Greef, R. Peat, LM Peter, D. Pletcher and J. Robinson (Editors). Ellis Horwood, New York, Chichester, Brisbane, Toronto, 1985, 443 pp., 49-50

International Association of Environmental Analytical Chemistry (IAEAC); (1994). Sample Handling of Pesticides in Water; Barcelona, España.

Jámbor, A., & Molnár-Perl, I. (2009). Amino acid analysis by high-performance liquid chromatography after derivatization with 9-fluorenylmethyloxycarbonyl chloride: Literature overview and further study. Journal of Chromatography A, 1216(15), 3064-3077.

Jin, J., Takahashi, F., Kaneko, T., & Nakamura, T. (2010). Characterization of electrochemiluminescence of tris (2, 2′-bipyridine) ruthenium (II) with glyphosate as coreactant in aqueous solution. Electrochimica acta, 55(20), 5532-5537.

Kamau, G. N. (1988). Surface preparation of glassy carbon electrodes. Analytica Chimica Acta, 207, 1–16. doi:10.1016/s0003-2670(00)80777-1

Kamau, G. N., Willis, W. S., & Rusling, J. F. (1985). Electrochemical and Electron Spectroscopic Studies of Highly Polished Glassy Carbon Electrodes. Analytical Chemistry, 57(2), 545–551. doi:10.1021/ac50001a049

Khenifi, A., Derriche, Z., Forano, C., Prevot, V., Mousty, C., Scavetta, E., ... & Tonelli, D. (2009). Glyphosate and glufosinate detection at electrogenerated NiAl-LDH thin films. Analytica Chimica Acta, 654(2), 97-102.

Kiema, G. K., Aktay, M., & McDermott, M. T. (2003). Preparation of reproducible glassy carbon electrodes by removal of polishing impurities. Journal of Electroanalytical Chemistry, 540, 7-15.

King, F., & Kolar, M. (2000). The copper container corrosion model used in AECL's second case study. Ontario Power Generation report.

Kissinger, P. T., & Heineman, W. R. (1983). Cyclic voltammetry. Journal of Chemical Education, 60(9), 702.

Klingler, R. J., & Kochi, J. K. (1981). Electron-transfer kinetics from cyclic voltammetry. Quantitative description of electrochemical reversibility. The Journal of Physical Chemistry, 85(12), 1731-1741.

Laguarda-Miro, N., Ferreira, F. W., García-Breijo, E., Ibáñez-Civera, J., Gil-Sánchez, L., & Garrigues-Baixauli, J. (2012). Glyphosate detection by voltammetric techniques. A comparison between statistical methods and an artificial neural network. Sensors and Actuators B: Chemical, 171, 528-536.

Melo Martínez, O, López Pérez, L y Melo Martínez, S. (2020). Diseño de experimentos: métodos y aplicaciones. Universidad Nacional de Colombia.

Mensink, H., & Janssen, P. (1994). Glyphosate (No. 159). World Health Organization.

Merck KGaA, Darmstadt, Alemania y/o sus filiales. (n.d.). 10X Phosphate-Buffered Saline (PBS) for Western Blotting. 10x phosphate-buffered saline (PBS) for western blotting. https://www.sigmaaldrich.com/CO/es/support/calculators-and-apps/10x-phosphate-buffered-saline

Miller, J. N., & Miller, J. C. (2002). Estadística y quimiometría para química analítica (No. 543.062: 519.23 MIL).

Ministerio de la Protección Social. (22 de agosto de 2007) Resolución Número 2906 de 2007. Por la cual se establecen los Límites Máximos de Residuos de Plaguicidas – LMR en alimentos para consumo humano y en piensos o forrajes. DO 46735. https://www.mincit.gov.co/temas-interes/reglamentos-tecnicos/rt-conjuntos/resolucion-2906-del-22-de-agosto-de-2007-1.aspx

Mocak, J., Bond, A. M., Mitchell, S., & Scollary, G. (1997). A statistical overview of standard (IUPAC and ACS) and new procedures for determining the limits of detection and quantification: application to voltammetric and stripping techniques (technical report). Pure and Applied Chemistry, 69(2), 297-32

Molina Osorio, A. F. (2014). Estudio de la reacción de reducción electroquímica de CO2 sobre electrodos sólidos modificados con Poli-(3, 4-etilendioxitiofeno)(PEDOT) Poli-(3, 4-etilendioxitiofeno)(PEDOT) (Doctoral dissertation).

Monge Romero, I. C. (2013). Estudio electro catalítico de la reacción de reducción de oxígeno sobre películas ultra delgadas de polianilina (PANI). Sintetizadas vía electroquímica sobre electrodos de carbón vítreo, platino y oro modificados con películas de poli-(3, 4-etilendioxitiofeno)(PEDOT).

Montgomery, D. C. (2017). Design and analysis of experiments. John wiley & sons.

Moore, D. S. (2009). Introduction to the Practice of Statistics. WH Freeman and company.

Moraes, F. C., Mascaro, L. H., Machado, S. A., & Brett, C. M. (2010). Direct electrochemical determination of glyphosate at copper phthalocyanine/multiwalled carbon nanotube film electrodes. Electroanalysis, 22(14), 1586-1591.

Moreno-Piza, O. J., & Suarez-Herrera, M. F. (2022). Electrochemical study of the redox processes of elemental sulfur in organic solvents using poly (3, 4-ethylene-dioxy-thiophene) modified glassy carbon electrodes as working electrodes and ionic liquids as electrolytes. Electrochimica Acta, 436, 141442.

Muneer, M., & Boxall, C. (2008). Photocatalyzed degradation of a pesticide derivative glyphosate in aqueous suspensions of titanium dioxide. International Journal of Photoenergy, 2008.

National Health and Medical Research Council (NHMRC); (2011). Australian drinking water guidelines 6, Commonwealth of Australia; Canberra, Australia.

Nedelkoska, T. V., & Low, G. C. (2004). High-performance liquid chromatographic determination of glyphosate in water and plant material after pre-column derivatisation with 9-fluorenylmethyl chloroformate. Analytica Chimica Acta, 511(1), 145-153.

Okada, E., Coggan, T., Anumol, T., Clarke, B., & Allinson, G. (2019). A simple and rapid direct injection method for the determination of glyphosate and AMPA in environmental water samples. Analytical and bioanalytical chemistry, 411, 715-724.

Oliveira, G. C., Moccelini, S. K., Castilho, M., Terezo, A. J., Possavatz, J., Magalhães, M. R., & Dores, E. F. (2012). Biosensor based on atemoya peroxidase immobilised on modified nanoclay for glyphosate biomonitoring. Talanta, 98, 130-136.

Oliveira, P. C., Maximiano, E. M., Oliveira, P. A., Camargo, J. S., Fiorucci, A. R., & Arruda, G. J. (2018). Direct electrochemical detection of glyphosate at carbon paste electrode and its determination in samples of milk, orange juice, and agricultural formulation. Journal of Environmental Science and Health, Part B, 53(12), 817-823.

O'Mahony, A. M., Compton, R. G. (2011). "The use of single pulse chronopotentiometry to explore electrode kinetics: A review." Electrochimica Acta, 56(25), 9194-9207. M., Compton, R. G. (2011). "The use of single pulse chronopotentiometry to explore electrode kinetics: A review." Electrochimica Acta, 56(25), 9194-9207

Ott, R. L., & Longnecker, M. T. (2015). An introduction to statistical methods and data analysis. Cengage Learning.

Padilla Alonso, D. J. (2014). Estudio de líquidos iónicos como solventes de extracción en el análisis de glifosato en agua.

Parry, E. P., & Osteryoung, R. A. (1965). Evaluation of analytical pulse polarography. Analytical Chemistry, 37(13), 1634-1637.

Pelzer, J., Scholz, F., Henrion, G., & Nitschke, L. (1989). Optimization of parameters for differential pulse voltammetry at the hanging mercury drop electrode. Electroanalysis, 1(5), 437-440.

Pourbaix, M. (1966). Atlas of electrochemical equilibria in aqueous solutions. NACE.

Poverenov, E., Li, M., Bitler, A., & Bendikov, M. (2010). Major effect of electropolymerization solvent on morphology and electrochromic properties of PEDOT films. Chemistry of Materials, 22(13), 4019-4025.

Reddy, K. J., Wang, L., & Gloss, S. P. (1995). Solubility and mobility of copper, zinc and lead in acidic environments. Plant and Soil, 171, 53-58.

Regiart, M., Kumar, A., Gonçalves, J. M., Silva Junior, G. J., Masini, J. C., Angnes, L., & Bertotti, M. (2020). An electrochemically synthesized nanoporous copper microsensor for highly sensitive and selective determination of glyphosate. ChemElectroChem, 7(7), 1558-1566.

Ren, M., Zhou, H., & Zhai, H. J. (2021). Obvious enhancement in electrochemical capacitive properties for poly (3, 4-ethylenedioxythiophene) electrodes prepared under optimized conditions. Journal of Materials Science: Materials in Electronics, 32, 10078-10088.

Rice, R. J., Pontikos, N. M., & McCreery, R. L. (1990). AME" CHEMICAL SOCIETY. J. Am. Chem. SOC, 112(12). 0002-7863/90/1512-4617$02.50/0

Rieger, P. H. (1994). Electrochemistry (2nd ed.). Chapman & Hall.

Riveros, G., León, M., & Ramírez, D. (2016). Effect of chloride ions on the structural, optical, morphological, and electrochemical properties of Cu2O films electrodeposited on Fluorine-doped tin Oxide substrate from a DMSO solution. Journal of the Chilean Chemical Society, 61(4), 3219-3223.

Rodríguez Jaume, M. J., & Mora Catalá, R. (2001). Estadística informática: casos y ejemplos con el SPSS. Publicaciones de la Universidad de Alicante.

Rojano Delgado, A. M. (2012). Plataformas analíticas en metabolómica y su aplicación para el estudio de la resistencia-sensibilidad a herbicidas.

Sandoval, A. P., Feliu, J. M., Torresi, R. M., & Suárez-Herrera, M. F. (2014). Electrochemical properties of poly (3, 4-ethylenedioxythiophene) grown on Pt (111) in imidazolium ionic liquids. Rsc Advances, 4(7), 3383-3391.

Sanz de Paz, D. (2015). Comportamiento electroquímico del ion Ag (I) sobre electrodo de Pt en Cloruro de 1-Butil-3 Metil-Imidazolio (BMIMCl) entre 343-363 K.

Scharifker, B., & Hills, G. (1983). Theoretical and experimental studies of multiple nucleation. Electrochimica acta, 28(7), 879-889.

Scholz, F. (2015). Voltammetric techniques of analysis: the essentials. ChemTexts, 1(4), 17.

Shrivastava, S., Kumar, A., Verma, N., Chen, B. Y., & Chang, C. T. (2021). Voltammetric detection of aqueous glyphosate on a copper and poly (pyrrole)-electromodified activated carbon fiber. Electroanalysis, 33(4), 916-924.

Sierra, E. V., Méndez, M. A., Sarria, V. M., & Cortés, M. T. (2008). Electrooxidación de glifosato sobre electrodos de níquel y cobre. Química Nova, 31, 220-226.

Simoes, F. R., Mattoso, L. H. C., & Vaz, C. M. P. (2006). Conducting polymers as sensor materials for the electrochemical detection of pesticides. Sensor Letters, 4(3), 319-324.

Singh, S., Kumar, V., Gill, J. P., Datta, S., Singh, S., Dhaka, V., Kapoor, D., Wani, A. B., Dhanjal, D. S., Kumar, M., Harikumar, S. L., & Singh, J. (2020). Herbicide glyphosate: Toxicity and microbial degradation. International Journal of Environmental Research and Public Health, 17(20), 7519.

Sivakumar, C., & Berchmans, S. (2018). Methanol electro-oxidation by nanostructured Pt/Cu bimetallic on poly 3, 4 ethylenedioxythiophene (PEDOT). Electrochimica Acta, 282, 163-170.

Songa, E. A., Arotiba, O. A., Owino, J. H., Jahed, N., Baker, P. G., & Iwuoha, E. I. (2009 - I). Electrochemical detection of glyphosate herbicide using horseradish peroxidase immobilized on sulfonated polymer matrix. Bioelectrochemistry, 75(2), 117-123.

Songa, E. A., Somerset, V. S., Waryo, T., Baker, P. G., & Iwuoha, E. I. (2009 - II). Amperometric nanobiosensor for quantitative determination of glyphosate and glufosinate residues in corn samples. Pure and Applied Chemistry, 81(1), 123-139.

Štulík, K., Pacáková, V., Le, K., & Hennisen, B. (1988). Amperometric flow detection with a copper working electrode—response mechanism and application to various compounds. Talanta, 35(6), 455-460.

Suárez Herrera, M. F. (2011). Electroquímica física e interfacial: una aproximación teórica. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias.

Subramaniam, V., & Hoggard, P. E. (1988). Metal complexes of glyphosate. Journal of agricultural and food chemistry, 36(6), 1326-1329.

Teague, M., Li, S., & Cong, H. (2018). Interfacial Corrosion of Copper and the Formation of Copper Hydroxychloride.

Teófilo, R. F., Reis, E. L., Reis, C., Silva, G. A. D., & Kubota, L. T. (2004). Experimental design employed to square wave voltammetry response optimization for the glyphosate determination. Journal of the Brazilian Chemical Society, 15, 865-871.

Toss, V., Leito, I., Yurchenko, S., Freiberg, R., & Kruve, A. (2017). Determination of glyphosate in surface water with high organic matter content. Environmental Science and Pollution Research, 24, 7880-7888.

Tsui, T. K. (2002). Aquatic toxicity and environmental fate of glyphosate-based herbicides (Doctoral dissertation, Chinese University of Hong Kong).

Tu, M., Hurd, C., & Randall, J. M. (2001). Weed control methods handbook: tools & techniques for use in natural areas.

United Nations Office on Drugs, Crime. Laboratory, & Scientific Section. (2009). Guidance for the Validation of Analytical Methodology and Calibration of Equipment Used for Testing of Illicit Drugs in Seized Materials and Biological Specimens: A Commitment to Quality and Continuous Improvement. United Nations Publications.

United States Environmental Protection Agency (US EPA); (2009). EPA 816-F-09-004, National Primary Drinking Water Regulation; Washington D.C., United States of America.

Valle, A. L., Mello, F. C. C., Alves-Balvedi, R. P., Rodrigues, L. P., & Goulart, L. R. (2019). Glyphosate detection: methods, needs and challenges. Environmental chemistry letters, 17, 291-317.

Van der Linden, W. E., & Dieker, J. W. (1980). Glassy carbon as electrode material in electro- analytical chemistry. Analytica Chimica Acta, 119(1), 1–24. doi:10.1016/s0003-2670(00)00025-8

Varona, M., Henao, G. L., Díaz, S., Lancheros, A., Murcia, Á., Rodríguez, N., & Álvarez, V. H. (2009). Evaluación de los efectos del glifosato y otros plaguicidas en la salud humana en zonas objeto del programa de erradicación de cultivos ilícitos. Biomédica, 29(3), 456-475.

Vashist, S. K., & Luong, J. H. (2018). Bioanalytical requirements and regulatory guidelines for immunoassays. In Handbook of immunoassay technologies (pp. 81-95). Academic Press

Vidal, E., Negro, A., Cassano, A., & Zalazar, C. (2015). Simplified reaction kinetics, models and experiments for glyphosate degradation in water by the UV/H2O2 process. Photochemical & Photobiological Sciences, 14(2), 366-377. Wang, J. (2006). Analytical Electrochemistry (3rd ed.). John Wiley & Sons.

Walters, F. H. (1991). Sequential simplex optimization: a technique for improving quality and productivity in research, development, and manufacturing. (No Title).

Wang, J. (2006). Analytical Electrochemistry (3rd ed.). John Wiley & Sons.

Wang, S., Liu, B., Yuan, D., & Ma, J. (2016). A simple method for the determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in seawater matrix with high performance liquid chromatography and fluorescence detection. Talanta, 161, 700-706.

Wang, S., Yao, Y., Zhao, J., Han, X., Chai, C., & Dai, P. (2022). A novel electrochemical sensor for glyphosate detection based on Ti 3 C 2 T x/Cu-BTC nanocomposite. RSC advances, 12(9), 5164-5172.

Winfield, T. W., Bashe, W. J., & Baker, T. V. (1990). Method 547 Determination of Glyphosate in Drinking Water by Direct-Aqueous-Injection Hplc, Post-Column Derivatization, and Fluorescence Detection. Technol. Appl, 1, 1-16.

Xia, Y. M., Zhang, W., Li, M. Y., Xia, M., Zou, L. J., & Gao, W. W. (2019). Effective electrochemical determination of chloramphenicol and florfenicol based on graphene/copper phthalocyanine nanocomposites modified glassy carbon electrode. Journal of The Electrochemical Society, 166(8), B654.

Zainudin, B. H., Salleh, S., Mohamed, R., Yap, K. C., & Muhamad, H. (2015). Development, validation and determination of multiclass pesticide residues in cocoa beans using gas chromatography and liquid chromatography tandem mass spectrometry. Food chemistry, 172, 585-595.

Zambrano-Intriago, L. A., Amorim, C. G., Rodríguez-Díaz, J. M., Araújo, A. N., & Montenegro, M. C. (2021). Challenges in the design of electrochemical sensor for glyphosate-based on new materials and biological recognition. Science of the Total Environment, 793, 148496.

Zhang, C., She, Y., Li, T., Zhao, F., Jin, M., Guo, Y., ... & Wang, J. (2017). A highly selective electrochemical sensor based on molecularly imprinted polypyrrole-modified gold electrode for the determination of glyphosate in cucumber and tap water. Analytical and bioanalytical chemistry, 409, 7133-7144.

Zhu, Y., Zhang, F., Tong, C., & Liu, W. (1999). Determination of glyphosate by ion chromatography. Journal of chromatography A, 850(1-2), 297-301.

Zittel, H. E., & Miller, F. J. (1965). A Glassy-Carbon Electrode for Voltammetry. Analytical Chemistry, 37(2), 200–203. doi:10.1021/ac60221a006

A. Anexo: Participación en eventos científicos

Daniela Malaver-Amaya, Andrea del Pilar Sandoval-Rojas. *Modificación de Electrodos de Carbono Vítreo con PEDOT/Cu para la Determinación Electroquímica de Glifosato*, V Congreso Colombiano de Electroquímica, Florencia, Caquetá Colombia del 3 al 7 de octubre del 2022. Modalidad Póster

Daniela Malaver-Amaya, Jorge Puello-Silva , Jorge Alí-Torres, Andrea del Pilar Sandoval-Rojas. *Estudio de Complejos Cobre-Glifosato-Cloruro Formados Durante la Detección Electroquímica de Glifosato*, XIX Congreso Colombiano de Química, Bogotá, Colombia del 2 a 6 de octubre de 2023. Modalidad oral.