



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**

**INSTITUTO DE CIENCIAS**

**POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES**



*"La tierra no es de nosotros, nosotros somos de la tierra"*

**DETECCIÓN DE RESIDUOS DE GLIFOSATO EN MAÍZ  
MEDIANTE ESPECTROSCOPIA RAMAN DE SUPERFICIE  
AUMENTADA**

TESIS

Que para obtener el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS AMBIENTALES**

Presenta

**IVONNE LUNA HERNÁNDEZ**

Director de tesis:

**Dra. Alia Méndez Albores**

Julio 2018



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**

**INSTITUTO DE CIENCIAS**

**POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES**



*“La tierra no es de nosotros, nosotros somos de la tierra”*

**DETECCIÓN DE RESIDUOS DE GLIFOSATO EN MAÍZ  
MEDIANTE ESPECTROSCOPIA RAMAN DE SUPERFICIE  
AUMENTADA**

TESIS

Que para obtener el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS AMBIENTALES**

Presenta

**IVONNE LUNA HERNÁNDEZ**

Comité tutorial:

Director	Dra. Alia Méndez Albores
Integrante Comité Tutorial	Dr. Enrique Quiroga González
Integrante Comité Tutorial	Dr. Eduardo Torres Ramírez
Integrante Comité Tutorial	Dra. Sonia Emilia Silva Gómez
Integrante Comité Tutorial	Dr. J Santos Hernández Zepeda

Julio 2018



**BUAP**

**C. IVONNE LUNA HERNANDEZ**

Por este conducto me permito comunicarle que los miembros del jurado integrado por:

<i>Dr. Enrique Quiroga González</i>	<i>Presidente</i>
<i>Dr. Eduardo Torres Ramírez</i>	<i>Secretario</i>
<i>Dra. Georgette Rebollar Pérez</i>	<i>1er. Vocal</i>
<i>Dra. María Guadalupe Tenorio Arvide</i>	<i>2do. Vocal</i>
<i>Dra. Fabiola Avelino Flores</i>	<i>Suplente</i>

Designado para la defensa de su tesis “Detección de residuos de glifosato en maíz mediante Espectroscopia Raman de Superficie Aumentada” han manifestado mediante su voto que esta cumple con los méritos suficientes para ser defendida como tesis de grado de Maestría en Ciencias Ambientales, por lo que este Posgrado le autoriza la impresión de la misma

Sin otro particular, quedo de usted.

ATENTAMENTE  
“PENSAR BIEN, PARA VIVIR MEJOR”  
H. PUEBLA DE Z., JUNIO 19 DE 2018

**DR. EDUARDO TORRES RAMÍREZ**  
COORDINADOR



ETR/app  
c.c.p. Archivo  
c.c.p. Minutario

Expreso mi agradecimiento al Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por su apoyo y patrocinio brindado para la realización de este proyecto de investigación titulado “Detección de residuos de glifosato en maíz mediante Espectroscopía Raman de Superficie Aumentada”

# **DEDICATORIA**

## **A MI FAMILIA**

Porque, sin duda mi familia me ha enseñado que hay momentos, procesos y situaciones a las que uno sólo debe hacer frente, ya que forman parte de tu experiencia. Sin embargo, hay otras (una gran parte), en que “utilizar todas tus fuerzas” significa que aproveches el apoyo de otros, que sepas pedir ayuda, que escuches diferentes opiniones y construyas una nueva alternativa.

A la personita que Dios me obsequio para hacerme soñar, anhelar y permitirme imaginar un mejor escenario. Dejando de lado las dudas, los temores y expandiendo mis límites. Haciendo que crea en la posibilidad de que los caminos se abren, los momentos se sincronizan y las oportunidades aparecen.

## **AGRADECIMIENTOS**

Hacer equipo te fortalece, los amigos son parte de tu riqueza, la familia son tus pilares. A veces creemos que tenemos que hacer todo por nuestra cuenta y sentimos un gran peso queriendo resolver todo. Saber recibir ayuda y echar mano de quienes están a tu rededor te hace más fuerte.

Agradezco a la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, por brindarme la oportunidad de formar parte de su comunidad.

Al Instituto de Ciencias y al Posgrado en Ciencias Ambientales por el apoyo brindado en la realización de este trabajo de investigación.

Extiendo mi más sincero agradecimiento a la Dra. Alia Méndez Albores asesora de este proyecto, por darme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo, motivarme y brindarme su apoyo para la culminación de este trabajo.

Al Dr. Enrique Quiroga González por su apoyo incondicional y aceptar ser parte de este proyecto brindando sus conocimientos e instalaciones para realizar este trabajo.

Al Dr. Eduardo Torres Ramírez por sus consejos, interés y asesoría en este proyecto, así mismo por su apoyo brindado en esta etapa.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de Energía del Instituto de Física de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla y del laboratorio de Bioinorgánica por su apoyo brindado y las aventuras vividas en este tiempo.

A mis amigos de años y a los que conocí y se sumaron en esta etapa: Paquito, Vicky, Viri, Omar, Noemí, Cande, Eduardo, Alejandro, David, Erick, Aline, Rodrigo, Gaby, Hedbel. Les agradezco su apoyo y los momentos vividos a su lado.

## RESUMEN

En esta tesis se planteó el objetivo de detectar residuos del herbicida glifosato en granos de maíz mediante el análisis de la respuesta plasmónica de substratos SERS activos de silicio dopados con nanopartículas de plata [Si-Ag NPs] y de la amplificación Raman por plasmones superficiales [SERS]. El glifosato es una molécula de gran interés debido a que es empleado en grandes cantidades por el sector agrícola provocando un impacto ambiental que debe ser estudiado. El principal desafío de este proyecto se centra en que el glifosato posee una pequeña sección eficaz en Raman haciendo prácticamente imposible la detección a través de esta, por ello desarrollamos una técnica para intensificar la señal SERS a través de substratos plasmónicos con una respuesta adecuada. Asimismo, otro desafío relevante a superar fue la de establecer las bases que permitan desarrollar la tecnología necesaria para generar una metodología analítica para la detección de glifosato en matrices como los alimentos.

Por consiguiente, se evaluó la respuesta SERS de la molécula a través de los substratos y como un comparativo se obtuvo el análisis de la respuesta Raman convencional del glifosato; ambos fueron evaluados en un sistema acuoso.

En el sistema, Raman convencional, se obtuvo una curva de calibración monitoreando la intensidad de la banda ubicada en  $1080\text{ cm}^{-1}$  durante el proceso de interacción de glifosato con el medio. Es importante destacar que solo fue posible obtener un rango de concentración, de 0.8 a 10 mM en estado acuoso (135 ppm). De la curva de calibración generada fue posible determinar; el límite de detección (LD) de 3 mM y un límite de cuantificación (LQ) de 13.5 mM. No obstante, los valores nos indican que para la detección de glifosato a través de esta técnica son elevados.

Por otra parte, los resultados obtenidos para la medición SERS de glifosato utilizando los substratos desarrollados muestran una interesante respuesta SERS de la molécula, esto es un resultado interesante dada la dificultad para detectar glifosato. El espectro obtenido experimentalmente sobre los substratos [Si-Ag NPs] muestra una interesante tendencia en la banda  $1565\text{ cm}^{-1}$  debido a la presencia de glifosato. Las concentraciones de glifosato

evaluado fueron de 0.00001 a 0.1 mM, obteniendo un límite de detección de 0.00001 mM (0.001 ppm).

Todo esto implica la posibilidad de poder detectar glifosato mostrando la capacidad de amplificación obtenida con los substratos SERS activos.

**Palabras clave:** SERS, Raman, glifosato, maíz, substratos SERS activos, Ag-NPs

## ABSTRACT

In this thesis the objective of detecting residues of the herbicide glyphosate in corn grains was studied by analyzing the plasmonic response of active silicon SERS substrates doped with silver nanoparticles [Si -Ag NPs] and Raman amplification by surface plasmons [SERS]. Glyphosate is a molecule of great interest because it is used in large quantities by the agricultural sector causing an environmental impact that must be studied. The main challenge of this project is focused on the fact that glyphosate has a small efficient section in Raman making it practically impossible to detect it, so we developed a technique to intensify the SERS signal through plasmonic substrates with an adequate response. Likewise, another relevant challenge to overcome was to establish the basis that allow developing the necessary technology to generate an analytical methodology for the detection of glyphosate in matrices such as food.

Therefore, two systems were evaluated; the first consisted in the analysis of the conventional Raman response of glyphosate; and the second in the evaluation of the SERS response of the molecule through the substrates, both were evaluated in an aqueous system.

In the first system, conventional Raman, a calibration curve was obtained by monitoring the intensity of the band located at  $1080\text{ cm}^{-1}$  during the process of interaction of glyphosate with the medium. It is important to note that it was only possible to obtain a concentration range, from 0.8 to 10 mM in aqueous state (135 ppm). From the calibration curve generated it was possible to determine; the limit of detection (LD) of 3 mM and a limit of quantification (LQ) of 13.5 mM. However, the values indicate that for the detection of glyphosate through this technique are high.

On the other hand, the results obtained for the SERS measurement of glyphosate using the developed substrates show an interesting SERS response of the molecule, this is an interesting result given the difficulty to detect glyphosate. The spectrum obtained experimentally on substrates [Si-Ag NPs] shows an interesting trend in the band  $1565\text{ cm}^{-1}$  due to the presence of glyphosate. The glyphosate concentrations evaluated were from 0.00001 to 0.1 mM, obtaining a limit of detection of 0.00001 mM (0.001 ppm).

All this implies the possibility of being able to detect glyphosate showing the amplification capacity obtained with the active SERS substrates.

**Keywords:** SERS, Raman, glyphosate, corn, active SERS substrates, Ag-NPs

# INDICE GENERAL

<b>RESUMEN .....</b>	<b>i</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>iii</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>2. MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>7</b>
<b>2.1 Generalidades del maíz .....</b>	<b>7</b>
2.1.1 Situación actual del cultivo de maíz en México.....	8
<b>2.2 Problemática ambiental ocasionada por el uso de glifosato .....</b>	<b>9</b>
2.2.1 Generalidades del glifosato .....	12
2.2.2 Formulación comercial.....	13
2.2.3 Persistencia en alimentos .....	15
2.2.4 Límites Máximos Residuales (Maíz) .....	16
2.2.5 Riesgos a la salud humana causados por el glifosato.....	17
2.2.6 Riesgos al ambiente por el uso de glifosato .....	17
2.2.6.1 Compartimento Suelo .....	17
2.2.6.2 Compartimento Agua .....	18
2.2.6.3 Compartimento Aire .....	19
<b>2.3 Detección de glifosato mediante técnicas analíticas.....</b>	<b>19</b>
<b>2.4 Detección de glifosato mediante la técnica SERS .....</b>	<b>21</b>
2.4.1 Fundamentos de la espectroscopía Raman.....	22
2.4.2 Fundamento SERS .....	24
2.4.3 Instrumentación.....	26
<b>3. DETALLES EXPERIMENTALES .....</b>	<b>27</b>
<b>3.1 Sustancias utilizadas .....</b>	<b>27</b>
<b>3.2 Equipo usado .....</b>	<b>27</b>
<b>3.3 Elaboración de sustratos SERS activos (Si-Ag NPs) mediante depósito químico .....</b>	<b>28</b>
<b>3.4 Preparación de las soluciones amortiguadoras pH 4 y pH 8 .....</b>	<b>29</b>
<b>3.5 Procedimientos para mediciones por Raman y SERS.....</b>	<b>29</b>
3.5.1 Obtención del espectro Raman de glifosato en estado sólido .....	29
3.5.2. Técnica de análisis (gota).....	30
3.5.3 Obtención del espectro Raman de glifosato en estado acuoso.....	31
3.5.4 Obtención del espectro SERS de glifosato en estado acuoso.....	32
3.5.5 Extracción de glifosato sobre granos de maíz.....	32
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>34</b>

<b>4.1 Caracterización morfológica de substratos SERS activos (Si-Ag NPs) mediante microscopía electrónica de barrido (SEM).....</b>	<b>35</b>
<b>4.2 Espectroscopía Raman convencional de glifosato en estado sólido.....</b>	<b>36</b>
<b>4.3 Espectroscopía Raman convencional de disoluciones acuosas amortiguadas de glifosato .....</b>	<b>38</b>
<b>4.4 SERS de disoluciones acuosas amortiguadas de glifosato sobre substratos de Si decorados con nanopartículas de Ag.....</b>	<b>45</b>
<b>4.5 Detección de glifosato en maíz por SERS usando substratos de Si decorados con nanopartículas de Ag .....</b>	<b>52</b>
<b>5. CONCLUSIONES .....</b>	<b>55</b>
<b>APÉNDICES .....</b>	<b>56</b>
<b>Apéndice I. Caracterización del sustrato Si-Ag NPs mediante Reflectancia UV-Vis .....</b>	<b>56</b>
<b>Apéndice II. Detección de glifosato acuoso pH 4 mediante Raman convencional ....</b>	<b>57</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>58</b>

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representación esquemática de la planta de maíz. ....	7
<b>Figura 2.</b> Interacciones del glifosato con el sistema. ....	11
<b>Figura 3.</b> Estructura de la molécula de glifosato. ....	13
<b>Figura 4.</b> Método analítico en la determinación de residuos de plaguicidas en alimentos. ....	20
<b>Figura 5.</b> Representación de la dispersión Raman. ....	23
<b>Figura 6.</b> Diagrama simple sobre el efecto Raman. ....	23
<b>Figura 7.</b> Descripción gráfica del efecto SERS. ....	25
<b>Figura 8.</b> Esquema simple de instrumentación Raman. ....	26
<b>Figura 9.</b> Diagrama del proceso de elaboración de los substratos SERS. ....	28
<b>Figura 10.</b> Técnica de la gota. ....	31
<b>Figura 11.</b> Proceso de extracción de glifosato sobre granos de maíz. ....	33
<b>Figura 12.</b> Imágenes SEM obtenidas de las nanopartículas de plata. ....	35
<b>Figura 13.</b> Espectro Raman de cristales de glifosato. ....	36
<b>Figura 14.</b> Estructura molecular del Glifosato. ....	38
<b>Figura 15.</b> Especies iónicas de glifosato de acuerdo al pH del medio. ....	39
<b>Figura 16.</b> Curva de especiación de la molécula de glifosato respecto al pH. ....	39
<b>Figura 17.</b> Espectro Raman de Amortiguador Fosfatos pH 8. ....	41
<b>Figura 18.</b> Espectro Raman de glifosato en estado acuoso pH 8. ....	42
<b>Figura 19.</b> Grupo PO <sub>2</sub> en el glifosato pH 8 y anión fosfato diácido (H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup> ). ....	43
<b>Figura 20.</b> Banda a 1080 cm <sup>-1</sup> de glifosato en estado acuoso. ....	43
<b>Figura 21.</b> Curva de calibración trazada para el glifosato. ....	44
<b>Figura 22.</b> Espectro Raman de silicio, (Si-Ag Nps) y Amortiguador pH 4. ....	45
<b>Figura 23.</b> Espectro Raman de glifosato en estado acuoso a pH 4. ....	48
<b>Figura 24.</b> Raman shift a 1565 cm <sup>-1</sup> . Glifosato en estado acuoso. ....	49
<b>Figura 25.</b> Curva de calibración trazada para la concentración de glifosato. ....	50
<b>Figura 26.</b> Espectro Raman de Glifosato en estado acuoso y muestra de maíz. ....	53
<b>Figura 27.</b> Espectro de Reflectancia UV-Vis de nanopartículas plata. ....	56
<b>Figura 28.</b> Espectro Raman de glifosato pH 4 en estado acuoso. ....	57

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Importación de maíz proveniente de los Estados Unidos.....	9
<b>Tabla 2.</b> Propiedades fisicoquímicas del glifosato .....	13
<b>Tabla 3.</b> Formulaciones comerciales de glifosato .....	14
<b>Tabla 4.</b> Límites Máximos Residuales de Glifosato en maíz .....	16
<b>Tabla 5.</b> Aplicaciones de la espectroscopía SERS para detección de contaminantes .....	21
<b>Tabla 6.</b> Parámetros de adquisición para espectro Raman del glifosato en estado sólido...	30
<b>Tabla 7.</b> Parámetros de adquisición para espectro Raman del glifosato en estado acuoso .	31
<b>Tabla 8.</b> Parámetros de adquisición para espectro SERS del glifosato en estado acuoso ...	32
<b>Tabla 9.</b> Asignación de bandas Raman para glifosato en estado sólido .....	37
<b>Tabla 10.</b> Asignación de bandas Raman para amortiguador de fosfatos pH 8 .....	41
<b>Tabla 11.</b> Asignación de bandas Raman para amortiguador amplio espectro en estado acuoso .....	47
<b>Tabla 12.</b> Resumen de trabajos realizados en la detección de glifosato mediante SERS....	52
<b>Tabla 13.</b> Comparación de los valores de obtenidos a partir de la curva de calibración (muestras sintéticas) y muestras de maíz.....	53



## 1. INTRODUCCIÓN

El maíz es una especie vegetal de las de mayor variedad a nivel mundial, y es destinado tanto para la alimentación humana como la del ganado (vacuno, porcino, equino, caprino). A nivel mundial se reportó en el año 2014 una producción de 1, 037, 791, 518 toneladas del grano [FAO, 2014]. En el caso particular de México la importancia del maíz como elemento esencial de la alimentación es indiscutible y está ampliamente documentada desde tiempos prehispánicos hasta la fecha [López, 2007]. De este grano se deriva la preparación de una gran variedad de alimentos tradicionales como las tortillas, los totopos, los tamales, el atole y las tostadas. Siendo la tortilla el más significativo por considerarse uno de los alimentos básicos en la dieta del mexicano. Así lo demuestra un estudio realizado por la Cámara Nacional de la Industria de Transformación (CANACINTRA), en donde se reportó que la población mexicana de 1 a 55 años consume en promedio 8 piezas de tortillas diarias [García, 2012], lo que posiciona al maíz como el principal grano básico para el sustento nacional.

El maíz es en consecuencia el cultivo más importante de México, con una producción nacional anual de aproximadamente 23 millones de toneladas cultivadas en aproximadamente 8 millones de hectáreas, con un promedio de cultivo de 3 toneladas por hectárea [SIAP, 2011]. No obstante, la cantidad producida del grano es insuficiente para cubrir la demanda interna bruta la cual supera los 30 millones anuales, haciendo necesaria su importación principalmente de los Estados Unidos [GATS, 2016].

El aumento de la producción del maíz se ha promovido con prácticas internacionales de uso de plaguicidas o bien del control químico. Por lo anterior, es común en su cultivo el uso de herbicidas para controlar las malezas, y de insecticidas y fungicidas para matar los insectos y hongos considerados plagas [Jaramillo *et al.*, 2009]. El glifosato es considerado el herbicida más utilizado en México y en todo el mundo [Woodburn, 2000]. Tanto en cultivos convencionales de maíz como en los genéticamente modificados [Szekacs & Darvas, 2012]. Es un herbicida no selectivo con acción sistémica, y puede ser aplicado en diferentes etapas del cultivo. Por ejemplo, en las primeras 3 a 4 semanas después de la siembra, después de la floración y pocos días antes, de la cosecha como desecante. De esta manera, y como consecuencia de su frecuencia de empleo, se incrementa la posibilidad de contaminación

residual, comprometiendo la inocuidad del grano [Ahmed *et al.*, 2009; Aldana *et al.*, 2008; Alsayeda *et al.*, 2008], e incrementando la probabilidad de utilizar maíz contaminado con residuos de este plaguicida en la elaboración de alimentos de él derivados.

Hasta hace unos años el glifosato era considerado inofensivo para la salud del ser humano. Confirmaciones científicas recientes han demostrado lo contrario, vinculando su consumo crónico con mutaciones genéticas (genotoxicidad) y estrés oxidativo; los cuales están estrechamente relacionados con diversas patologías entre las que destacan daño al hígado y los riñones, tumoración, cáncer, abortos espontáneos, nacimientos con malformaciones y fallos al sistema endócrino [Bellé *et al.*, 2002; Guyton *et al.*, 2015].

En nuestro país, el límite máximo residual (LMR) permitido es de 0.1 mg. de glifosato por cada kilogramo de grano de maíz [COFEPRIS, 2009]. El método rutinario de detección consiste en el uso de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), acoplada a fluorescencia. Esta técnica presenta un elevado nivel de exactitud y confiabilidad. No obstante, representa un tipo de análisis sofisticado, el cual emplea protocolos complejos que involucran un procedimiento de laboratorio en varios pasos (preparación, extracción, remoción de interferentes y detección del analito). Implicando que la expedición de resultados mediante las autoridades sanitarias correspondientes, se extienda incluso por varias semanas. Lo anterior, resulta un inconveniente en el caso del monitoreo de productos de importación y exportación en donde no se cuenta con el tiempo disponible para realizar análisis exhaustivos de laboratorio. En el caso de, productos perecederos o altamente demandados como en el caso del maíz.

Por tanto, se precisa de la aplicación y la generación de nuevas técnicas y metodologías analíticas que representen una alternativa viable a los métodos actuales, y que permitan la cuantificación residual de manera rápida y sensible de este tipo de contaminante en matrices complejas como los alimentos.

La técnica de Espectroscopía Raman de Superficie Aumentada (SERS por sus siglas en inglés) se ha convertido en una de las herramientas analíticas más favorables de los últimos años. Debido a las características que presenta tales como sensibilidad, especificidad y

rapidez, SERS es una técnica particularmente adecuada para el análisis ambiental. Esta se basa en el análisis de la luz dispersada al hacer incidir un haz de luz monocromático sobre la muestra. Lo que le proporciona un gran potencial para ser empleada como una técnica analítica en la inspección de los alimentos [Aroca, 2006].

SERS es una técnica que aprovecha las ventajas de Raman convencional (especificidad para identificar componentes químicos, rapidez de análisis en el orden de segundos, posibilidad de trabajar con muestras con algún contenido de humedad, registro de espectros en condiciones ambiente y mínima o nula preparación de la muestra) con las propiedades plasmónicas de nanoestructuras de metales de acuñación como el oro y la plata, incrementando por varios órdenes de magnitud ( $10^{14}$ ) la intensidad de dispersión Raman que presentan las moléculas enlazadas a su superficie, debido a la oscilación colectiva de los electrones de conducción aumentando el campo eléctrico. De esta manera, mediante el uso de substratos nanoestructurados, es posible incrementar la sensibilidad de la técnica Raman a tal punto que resulta en la detección de inclusive, una sola molécula de analito [Willets & Van Duyne, 2007].

En este proyecto se plantea la detección del plaguicida glifosato en granos de maíz utilizando la técnica de Espectroscopía Raman de Superficie Aumentada. Para ello, se exploró en el desarrollo de substratos SERS que presenten reproducibilidad en los resultados y afinidad por la adsorción del glifosato (requerimiento ideal para el uso de la técnica). Los substratos SERS fueron elaborados a base de nanopartículas de plata, las cuales han demostrado tener afinidad hacia los grupos funcionales que constituyen la molécula de glifosato (amino, carboxilato y fosfato). Dichas nanopartículas fueron depositadas sobre obleas de silicio (Si-Ag NPs) con el fin de controlar la geometría, el tamaño, el espacio y la periodicidad que presentan las nanopartículas sobre los substratos y con ello la reproducibilidad de los resultados.

De esta forma, se pretende sentar las bases para el desarrollo de una metodología analítica sensible, rápida y sencilla de emplear, para la detección de plaguicidas en granos de maíz; que logre impactar eventualmente en los programas de inspección en calidad e inocuidad de

los alimentos contra estos residuos, permitiendo el monitoreo continuo de muestras con grandes volúmenes.

## 1.1 JUSTIFICACIÓN

El grano de maíz es el producto agrícola más importante en México, debido a que forma parte fundamental de la alimentación de su población. Actualmente, para asegurar su producción en el mercado nacional agroalimentario, se ha fomentado la modernización del campo mexicano, basada en el uso de fertilizantes y plaguicidas. Siendo quizá, el uso de plaguicidas uno de los más importantes. Dentro de los plaguicidas más difundidos en nuestro país encontramos al glifosato, utilizado en diferentes etapas del cultivo de maíz para el control de plantas no deseadas. Por lo que, el uso frecuente e incontrolado de este ha provocado la presencia de residuos de glifosato en los granos de maíz cosechados. Hace algún tiempo el glifosato era considerado no tóxico. Sin embargo, numerosos estudios científicos han reportado que la ingesta residual crónica de este plaguicida está relacionada con diversos problemas a la salud humana. Por ejemplo, daños hepáticos, renales, cáncer y alteraciones en el sistema endocrino (Mesnage et al., 2015). Actualmente, existe una creciente demanda en el monitoreo continuo para determinar el riesgo al ambiente y a la salud humana. Asimismo, es importante destacar que las técnicas analíticas que se utilizan para la detección de este tipo de residuos son costosas, requieren de una dificultosa preparación de la muestra y necesitan de tiempos largos de análisis. Lo anterior, representa un obstáculo cuando se requiere de un monitoreo continuo. Sobre todo, de un producto tan comercializado como el grano de maíz. En ese sentido, resulta importante el desarrollo de una técnica para la detección rápida, sensible y específica de glifosato en granos de maíz, con el propósito de acelerar la emisión de resultados y con ello asegurar la calidad e inocuidad del maíz en nuestro país. Asimismo, el método a desarrollar puede ser eventualmente aplicado en programas de monitoreo de los principales puntos de importación y exportación aduanal del país. Por otra parte, podría emplearse en el monitoreo de glifosato en los diferentes compartimentos ambientales. De esta forma, se puede evaluar el problema ambiental provocado por el uso indiscriminado de glifosato.

Dado lo anteriormente expuesto, se formula la siguiente pregunta de investigación:

¿Cuál es la concentración mínima del plaguicida glifosato que se puede detectar en matrices de alimentos de manera robusta mediante SERS, utilizando sustratos de Si-Ag NPs?

## **1.2 HIPÓTESIS**

Debido a que las nanopartículas de plata presentan una gran afinidad por los grupos funcionales presentes en la molécula de glifosato (amina, carboxilato y fosfato), se espera su adsorción sobre su superficie facilitando su detección y cuantificación a concentraciones ultra-bajas por Espectroscopía Raman de Superficie Aumentada.

## **1.3 OBJETIVOS**

### Objetivo general

Identificar y cuantificar de manera rápida y sensible residuos de glifosato presentes en granos de maíz mediante la técnica de Espectroscopía Raman de Superficie Aumentada (SERS) utilizando substratos SERS de Silicio dopados con nanopartículas de plata [Si-Ag NPs].

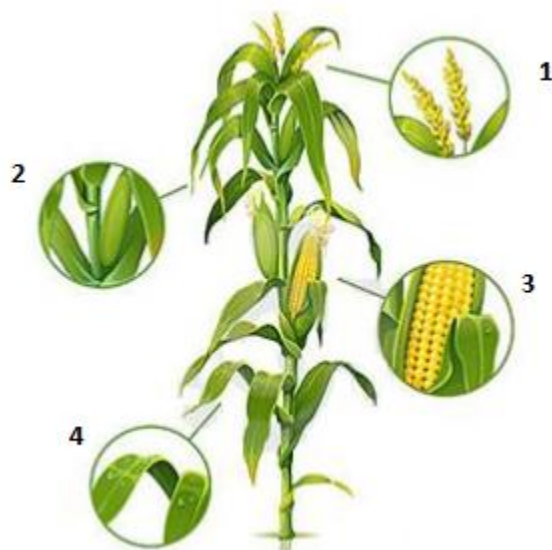
### Objetivos particulares

1. Obtener y optimizar substratos basados en plata activos en SERS que presenten elevada sensibilidad y especificidad al glifosato.
2. Identificar la banda de cuantificación SERS del glifosato (“finger print”) en muestras líquidas.
3. Obtener extractos de maíz contaminado con glifosato de manera simple, para su posterior detección en SERS.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Generalidades del maíz

El maíz (*Zea mays L.*) se clasifica dentro del género *Zea* perteneciente a la familia de las gramíneas o *Poaceae*, que incluye a otros cultivos como el trigo, arroz, avena, sorgo, cebada, y caña de azúcar [Doebley & Iltis, 1980]. El maíz es una de las gramíneas más ampliamente distribuidas a nivel mundial, se cultiva desde el nivel del mar hasta más de 3 mil metros de altitud, adaptándose a diversos climas y tipos de suelo. Es una planta de soporte robusto, hábito anual, tallo simple, erecto, elevada longitud (2-6 m) (**Figura 1**), presenta nudos y entrenudos, medula esponjosa y pocas ramificaciones [Jugenheimer, 1988]. Sus flores son unisexuales. Es decir, presenta flores masculinas y femeninas bien diferenciadas dentro de la misma planta, la masculina se conoce como panícula o espiga y la femenina como mazorca, la cual se localiza en las yemas axiales de las hojas.



**Figura 1.** Representación esquemática de la planta de maíz. <sup>1</sup>espiga, <sup>2</sup>yema axial, <sup>3</sup>mazorca y <sup>4</sup>hojas. Elaboración propia 2016.

Debido a su adaptabilidad, en la actualidad esta gramínea se cultiva en prácticamente todas las regiones del mundo, su producción representa el 65% de la producción total de granos a

nivel mundial [Gil *et al.*, 2004]. El maíz es uno de los cultivos con mayor importancia debido a sus múltiples usos, en los que se destaca: consumo humano y animal y como materia prima en diferentes procesos industriales [Paliwal *et al.*, 2001]. Por lo que se requieren grandes cantidades para satisfacer la demanda [ASERCA, 2013]. Debido a ello, en los últimos 20 años los países en desarrollo han implementado diferentes estrategias como el uso de agroquímicos para incrementar la eficiencia de los cultivos [Vázquez, 2004; Gleissman, 2008]. Así, el empleo de fertilizantes, plaguicidas y herbicidas en la agricultura ha logrado un incremento en la producción, reduciendo las pérdidas ocasionadas por plagas [Sánchez & Ortiz, 2011]. Dichos beneficios se ven reflejados en el aspecto social y económico de las sociedades tanto a nivel local, nacional y mundial [Olea & Fernández, 2001]. Sin embargo, el consumo en exceso de dichos plaguicidas ha causado graves efectos adversos a la salud humana y al ambiente [Mesnage *et al.*, 2015].

#### 2.1.1 Situación actual del cultivo de maíz en México

México es considerado el centro de origen y diversificación del maíz, en donde se tiene registrado alrededor de 59 razas [Sánchez *et al.*, 2000]. Lo que representa un importante porcentaje de las aproximadamente 300 razas que existen en el continente Americano [Kato *et al.*, 2009]. En el aspecto alimentario, económico, cultural y social esta herencia vegetal es de gran importancia para los mexicanos [SIAP, 2007]. Por ejemplo, se emplea en la medicina tradicional, como materia prima para la industria, expresiones artísticas y artesanales y en la gastronomía.

En la cultura gastronómica el maíz es utilizado como materia prima para la preparación del alimento más importante del mexicano (la tortilla). Como consecuencia de lo anterior nuestro país es el mayor consumidor de este cereal. No obstante, debido a una variedad amplia de razones políticas, sociales y tecnológicas la producción nacional no logra cubrir la demanda interna bruta; lo anterior ha llevado a su importación principalmente de Estados Unidos. Es importante enfatizar que el maíz importado puede ser una fuente importante de glifosato ya que en el país del que proviene, es tratado con grandes cantidades de este herbicida.

En 2016, México importó 7, 205, 042 toneladas de maíz; como se puede observar en la **Tabla 1** la cantidad importada en este periodo se incrementó un 26% comparada con el registro durante el mismo periodo de 2015 [GATS, 2016]. Esta cantidad representa aproximadamente el 23% del total de maíz consumido en el país. Por lo que, incrementa la posibilidad de encontrar maíz contaminado con residuos de glifosato.

**Tabla 1.** Importación de maíz proveniente de los Estados Unidos

Año	Volumen* (Ton)
2015	5,733,967
2016	7,205,042

**Fuente:** Global Agricultural Trade System Online, Departamento de Agricultura, USDA con datos del Departamento de Comercio, Buro de Censo (2016).

\*Los datos presentados comprenden el periodo de enero a junio

De la producción nacional de maíz en México, la cual asciende a 23 millones de toneladas, el 54% es cultivado de manera tradicional (preparación del terreno, deshierbe a mano, labranza, siembra, cosecha y almacenamiento) esto es, sin la utilización de agroquímicos. El 46% restante es producido a gran escala adoptando prácticas de la agricultura moderna arraigadas al control químico, que es donde se centra la problemática abordada en este trabajo. De esta manera los plaguicidas se aplican en las etapas de preparación del terreno, deshierbe, cosecha y almacenamiento. Dentro de los plaguicidas empleados, el herbicida glifosato es el más utilizado tanto en cultivos convencionales como en los genéticamente modificados en donde se utiliza prácticamente en la mayoría de las etapas (preparación del terreno, control de malezas y cosecha). En 2011 se utilizaron, alrededor de 650,000 toneladas de glifosato a nivel mundial [CCM International, 2011]. Con un valor en el mercado de aproximadamente \$ 6.5 mil millones de dólares [Sansom, 2012].

## 2.2 Problemática ambiental ocasionada por el uso de glifosato

En el marco regulatorio internacional la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de América (EPA) clasifica al glifosato de toxicidad clase II, toxicidad aguda dérmica y oral relativamente baja. Por otra parte, la Agencia Internacional para la Investigación del

Cáncer (IARC), que integra la OMS, afirmó que el glifosato “puede provocar cáncer en seres humanos” (IARC, 2015). A pesar de ello, en nuestro país no hubo ninguna modificación oficial respecto al registro o la clasificación del glifosato.

En el caso de México, diversas dependencias están involucradas con la reglamentación relacionada con la producción, distribución y utilización de plaguicidas. Por ejemplo, los aspectos sanitarios son regulados por la Secretaría de Salud (SSA); el impacto al ambiente por la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) y la eficacia biológica de los productos por la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA).

Por otra parte, en cuanto a leyes federales, la Ley Federal del Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente (LGEEPA), agrupa a los plaguicidas junto a los fertilizantes y las sustancias tóxicas, otorgándole a la federación la regulación en el uso y manejo de estas sustancias químicas. Asimismo, establece que las actividades particulares relacionadas con el manejo de plaguicidas se sujetarán a las Normas Oficiales Mexicanas.

Asimismo, la Ley Federal de Sanidad Vegetal (LFSV) como su nombre lo indica, está encargada de promover la sanidad vegetal, así como la aplicación, verificación y certificación de los sistemas para la reducción de riesgos de contaminación física, química y microbiológica en la producción de vegetales. También, señala que es competencia de la Federación a través de la SAGARPA regular los criterios para los estudios de campo para llevar a cabo el establecimiento de los límites máximos de residuos de plaguicidas a través de estudios de campo. Asimismo, la SAGARPA coadyuvará con la SSA para vigilar el cumplimiento de la normatividad aplicable a los plaguicidas. Por otra parte, ésta Secretaría está obligada a llevar a cabo un Programa Nacional de Monitoreo de Residuos de Plaguicidas y a difundir la información generada.

Finalmente, en este aspecto la Ley General de Salud (LGS) regula el derecho a la protección de la salud que tiene toda persona. De acuerdo a la LGS le corresponde a la SSA autorizar los nuevos productos que puedan resultar tóxicos, entre estos a los plaguicidas, así como,

coordinar con otras dependencias las condiciones de fabricación, formulación, envasado y etiquetado.

Por su parte, dentro de las Normas Oficiales se pueden destacar en el ámbito ecológico a la NOM-052-SEMARNAT-1993, relacionada con las características de los residuos peligrosos, su listado y los límites por su toxicidad al ambiente. Por otra parte, la NOM-232-SSA1-2009, establece los requisitos, indicaciones y características que deben cumplir el envase, embalaje y etiquetado de plaguicidas, a fin de minimizar los riesgos a la salud de la población en general, durante su almacenamiento, transporte, manejo y aplicación.

Finalmente, con la finalidad de proteger la salud de los consumidores, la SAGARPA y la SSA, destaca la NOM-082-SAG-FITO/SSA1-2017 que regula los Límites Máximos de Residuos (LMR) que pueden contener los alimentos producidos en México. Sin embargo, el marco regulatorio en nuestro país no cuenta con acciones específicas para el glifosato.

Por ello, el problema o impacto ambiental ocasionado por el uso del glifosato se puede considerar un problema complejo debido a que la dependencia existente entre sus partes se debe de analizar como un conjunto de interacciones para de esta manera poder alterar, comprender o resolver el problema o fenómeno asociado al sistema en estudio. Para comprender un poco mejor la situación ambiental provocada por el empleo del glifosato, se simplifica en el esquema siguiente la complejidad del problema.

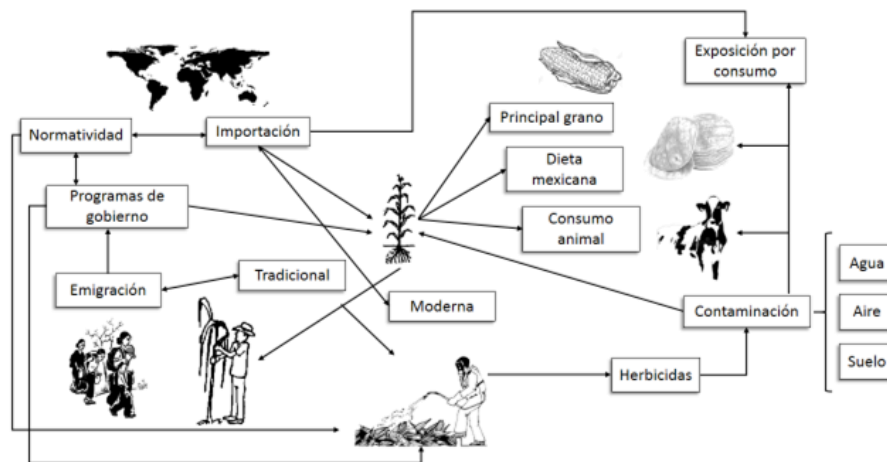
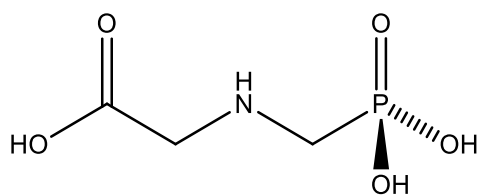


Figura 2. Interacciones del glifosato con el sistema. Elaboración propia 2017.

Los sistemas complejos están constituidos por elementos heterogéneos en interacción constante, por lo que estos componentes o procesos pertenecen a diversas disciplinas [García, 2011]. Debido a lo anterior, los sistemas complejos exigen ser tratados con una visión interdisciplinaria que permita tener una visión del todo para poder resolver los problemas que se presentan de manera integral y considerar todos los factores involucrados. Como puede observarse en la **Figura 2**, la identificación de las múltiples interacciones permite comprender mejor el problema, y por ende, eventualmente proponer medidas específicas para contribuir a disminuirlo. Dentro de esta complejidad, un punto de mayor relevancia es el monitoreo de su presencia (identificación y cuantificación), dado que es el paso inicial en la determinación del tamaño del problema. Es importante recordar que en un sistema complejo, además de identificar al compuesto contaminante, es indispensable identificar las interacciones aditivas o sinérgicas que éste pueda tener. Sin embargo, antes de llegar a ello, es necesario conocer la incidencia del compuesto en el espacio y tiempo. Lo anterior nos lleva a contar con técnicas analíticas confiables para cuantificar su distribución e impacto ambiental.

### 2.2.1 Generalidades del glifosato

El glifosato pertenece al grupo de los plaguicidas organofosforados, esto es, compuestos derivados del ácido fosfórico que poseen un átomo central de fósforo en la molécula [Vijay, 2010]. El glifosato representa el ingrediente activo de una gran variedad de plaguicidas, se emplea como un herbicida post-emergente, sistémico, no selectivo y de amplio espectro, con uso en el área agrícola y no agrícola para eliminar malezas, pastos anuales y perennes, entre otros [Goldsborough & Brown, 1988]. El glifosato está compuesto de una molécula de glicina y otra de fosfometilo lo que le confiere características de un compuesto organofosforado, en lo que se refiere a su estructura química esta se muestra en la **Figura 3**.



**Figura 3.** Estructura de la molécula de glifosato, los átomos de carbono se encuentran en los vértices de las líneas. Elaboración propia 2016.

Las propiedades fisicoquímicas más importantes del glifosato como compuesto químico puro se concentran en la **Tabla 2**.

**Tabla 2.** Propiedades fisicoquímicas del glifosato

Propiedad	Valor
Nombre químico	N-(fosfonometil) glicina
Formula empírica	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> NO <sub>5</sub> P
Estado físico	Sólido blanco
Peso molecular	169.08 g/mol
Olor	Inodoro
Densidad	1.70 g/cm <sup>3</sup>
Punto de fusión	184.5 °C
Presión de vapor	1.84 x 10 <sup>-7</sup> mm de Hg a 45°C
Punto de ebullición	Se descompone
Solubilidad en agua	12 .000 ppm a 25°C
pH en solución al 1%	2.5

**Fuente:** *Herbicide Handbook WSSA. Glyphosate. Illinois 1994. Farm Chemicals Handbook. Glyphosate. 1983. Global Herbicide Directory. Glyphosate. 1994. The Pesticide Manual. Glyphosate. 1994. Agrochemicals Desk Reference Environmental Data. J.H. Montgomery. Lewis Pub. 1993.*

### 2.2.2 Formulación comercial

En México el glifosato se comercializa bajo diferentes marcas comerciales, algunos de ellos se muestran en la **Tabla 3** registrados y aprobados por la COFEPRIS en el 2011. Las marcas

Roundup que están asociadas a la empresa Monsanto representan el 3.3% de las marcas comercializadas a nivel mundial.

**Tabla 3. Formulaciones comerciales de glifosato**

<b>Marca comercial</b>	<b>Empresa</b>	<b>Concentración</b>
Faena 320	Proficol SA	320 g/L
Fuete SL	Monsanto	480 g/L
Faena 320 SL	Monsanto	320 g/L
Ranger SL	Monsanto	240 g/L
Rocket SG	Monsanto	74-75%
Rocky SL	Monsanto	120 g/L
Roundup madurante SL	Monsanto	480 g/L
Roundup SG	Monsanto	74-75%
Roundup SL (Sal)	Monsanto	480 g/L
RONDO Súper	UPL Agro México.	30.34%
HELFOSAT	HELM	30.34%
GLYF 360	Petro de occidente	30.34%
GLIFOPAAK	Dragón	30.34%
LAFAM	Dragón	30.34%
YIERBASATO	Tridente	30.34%
ALTANIZAN	Polaquimia	30.34%
HERBIPOL Glifosato	Polaquimia	30.34%
TIRÓN	Valent	30.34%
YERBIMAT	Adama	30.34%
NEWCAP	Cuproza	30.34%
TACSAFATO	Tacsa	30.34%
Total 480 Glifosato	Ducoragro	30.34%

*Fuente: Elaboración propia 2017.*

El glifosato se comercializa en varias formulaciones para sus diversos usos:

- \* Sal isopropilamina (48 y 62%)

- \* Sal dimetilamina (60.8%)
- \* Sal potásica (43.8, 62 y 66.2)
- \* Sal amónica (40.5, 39.6, 74.7, 78 y 79%)

Los productos se pueden formular con 120, 240, 360, 480 y 680 g del ingrediente activo por litro. En la agricultura la formulación más común es de 360 g y se recomiendan 3L/ha para el control de malezas anuales en los cultivos.

El glifosato formulado como sal isopropilamina representa la formulación más vendida y comercializada en el mundo, utilizada para controlar hierbas de hoja ancha y malezas en muchos cultivos, como trigo, soja, frijol y maíz [Corbera *et al.*, 2007]. Debido a que presenta un extenso uso en la agricultura y jardinería [Albert, 1999].

### 2.2.3 Persistencia en alimentos

La persistencia de un plaguicida se refiere al tiempo que permanece en el medio ambiente sin sufrir una transformación o degradación por agentes naturales físicos. Respecto a la persistencia del glifosato en productos agrícolas, se ha reportado que puede permanecer activo de 28 a 56 días después de ser aplicado en frutas como: fresas, arándanos y frambuesas y de 30 a 56 días en vegetales como lechuga y zanahoria [Cessna & Cain, 1992; Eslava *et al.*, 2007]. Respecto a su persistencia en cereales existen estudios de la Soil Association del Reino Unido sobre la persistencia de glifosato en cereales como el trigo, en donde se ha reportado que sus residuos se conservan aun después de su procesamiento (harina y pan) [Lorenzatti *et al.* 2004]. Respecto a la persistencia de glifosato en maíz no se encuentran estudios disponibles que evidencien cual es exactamente su persistencia. Sin embargo, es importante connotar que el proceso de cultivo de este cereal posee cercanas similitudes al utilizado para el trigo y la soya, por lo que existe una probabilidad real de encontrar residuos de este plaguicida en esta matriz [Lorenzatti, 2006].

2.2.4 Límites Máximos Residuales (Maíz)

El límite máximo residual (LMR) fue establecido por primera vez por la máxima autoridad en seguridad alimentaria, la Comisión del Codex Alimentarius, haciendo referencia a la concentración específica de residuos de un plaguicida expresada en (mg/kg). La cuantificación considera la concentración del residuo tanto en su parte superficial como interna. Por su parte, los LMR son establecidos en niveles tan bajos como sea posible para proteger la salud del consumidor, además de ser compatibles con las prácticas agrícolas. Sin embargo se puede establecer un valor por defecto igual al límite de identificación que presentan las técnicas analíticas [Codex Alimentarius, 2011].

Además del Codex Alimentarius, los LMR pueden ser fijados por sus máximas delegaciones internacionales, la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA) y la Comunidad Europea (CE). En México, es el Centro Nacional de Referencia de Plaguicidas y Contaminantes CNRPYC, la institución encargada de certificar de manera voluntaria la inocuidad de los alimentos, siguiendo los LMR propuestos por la EPA.

Para el caso del glifosato, el Codex Alimentarius establece un LMR de 5 mg por cada kilogramo de maíz. Mientras que para la Agencia de Protección Ambiental (EPA) y la Comisión Europea (CE) establecen un LMR de 5 mg/kg y 1 mg/kg en granos de maíz respectivamente. En el caso particular de nuestro país, México a través de la COFEPRIS establece un LMR en maíz de 0.1 mg/kg. En la **Tabla 4** se muestra el valor de LMR de glifosato en maíz [FAO, 2010; COFEPRIS, 2009; EC, 2005; EPA, 2010].

**Tabla 4.** Límites Máximos Residuales de Glifosato en maíz

Matriz	Instancia regulatoria (LMR)			
	Codex Alimentarius	EPA	CE	COFEPRIS
Maíz	5 mg/kg	5 mg/kg	1 mg/kg	0.1 mg/kg

*Fuente: Elaboración propia 2017.*

### 2.2.5 Riesgos a la salud humana causados por el glifosato

Existen actualmente controversia acerca de los daños a la salud que causa el glifosato; en este contexto, un estudio pionero realizado por el científico Robert Bellé y colaboradores dio a conocer que el glifosato promueve las primeras etapas del cáncer [Bellé *et al.*, 2002]. Por otra parte, en otro estudio realizado en células embrionarias y células derivadas de la placenta humana se probó la toxicidad y su potencial de irrupción endócrina del plaguicida. Así mismo un estudio realizado por el Dr. Michael Antoniou del Kings College destacó que el consumo por niveles ultra-bajos de este herbicida a largo plazo provoca daño hepático y renal [Mesnage *et al.*, 2016]. Otro estudio muestra el aumento en la toxicidad y su potencial de irrupción endócrina [Benachour *et al.*, 2007]. Un estudio adicional muestra el aumento en la incidencia de signos anatómicos patológicos, cambios en la orina y parámetros bioquímicos de la sangre, asociados con insuficiencia en la funcionalidad hepática y renal, debido a la ingesta de residuos de glifosato. También se han mostrado los efectos cancerígenos de glifosato utilizando un modelo basado en ratones, mostrando como resultado la carcinogénesis de piel, revelando así que el glifosato tiene actividad promotora de tumores [George *et al.*, 2010]. Además, recientemente se han revelado nuevas evidencias contundentes a través de la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC) con la relación de la ingesta de dosis ultra bajas de glifosato, como una sustancia “probablemente cancerígenas para humanos” clasificado en el grupo 2A de la IARC [Guyton *et al.*, 2015].

### 2.2.6 Riesgos al ambiente por el uso de glifosato

#### 2.2.6.1 Compartimento Suelo

El glifosato puede ser relativamente persistente en el ambiente lo cual puede desembocar en una gran variedad de riesgos ambientales. Su uso indiscriminado para el control de malezas ha derivado en la contaminación de diferentes compartimentos ambientales. Investigaciones recientes han encontrado glifosato en el 40% de muestras de suelo, agua y sedimentos; analizadas en diferentes sitios de Estados Unidos [Battaglin et al. 2014].

Este herbicida era considerado no tóxico para los microorganismos que habitan en el suelo [Busse et al., 2001, Araújo et al., 2003]. Sin embargo, estudios recientes demuestran lo contrario. Por ejemplo, un bioindicador crucial en el suelo son las lombrices, encontrando una disminución de su biomasa después de la aplicación de glifosato [Sánchez-De León et al., 2006; García et al. 2014]. En 2014 se realizó un estudio comparando la biomasa de lombrices presentes en el suelo de dos plantaciones de café, en la primera se hizo uso del glifosato por 22 años y la segunda se encontraba libre de glifosato en los últimos 7 años; arrojando como resultado una disminución considerable de la población en aquella donde se usó glifosato [García et al. 2014].

Por otro lado, el glifosato se puede unir a los nutrientes presentes en el suelo, lo cual puede conllevar a una reducción significativa en la disponibilidad de los mismos [Duke et al. 2012]. Afectando considerablemente las concentraciones de compuestos como en potasio, hierro, fósforo, nitratos y sulfatos elementos indispensables para el desarrollo de las plantas [Obour, Stahlman, & Holman, 2016].

#### 2.2.6.2 Compartimento Agua

En lo que respecta al compartimento agua la detección de residuos de glifosato en este medio es cada vez más frecuente, siendo una fuente importante de contaminación la escorrentía [Annett et al. 2014]. Por ejemplo, las concentraciones mayores a 400  $\mu\text{g/L}$  de glifosato son potencialmente tóxicas para algunos organismos acuáticos dentro de los que podemos encontrar a los peces y anfibios [King and Wagner, 2010; Annette et al. 2014; Braz-Mota et al. 2015].

Así mismo también se ha reportado la presencia de glifosato en los ecosistemas marinos, por lo que las investigaciones en esta área han incrementado [Mercurio et al 2015]. Por otro lado, en el agua potable se considera aceptable una concentración de 0.1  $\mu\text{g/L}$  y un riesgo tolerable de 77  $\mu\text{g/L}$  [Horth y Blackmore 2009]. Sin embargo, autoridades europeas expresan que es necesario reducir las concentraciones de residuos de glifosato en agua de consumo humano.

Es importante señalar que el uso de glifosato no está aprobado en el agua, por lo que la presencia de este puede estar mediada por la escorrentía o derrames accidentales. Por ello su

aplicación correcta podría disminuir los riesgos en los organismos acuáticos [Saunders and Pezeshki, 2015].

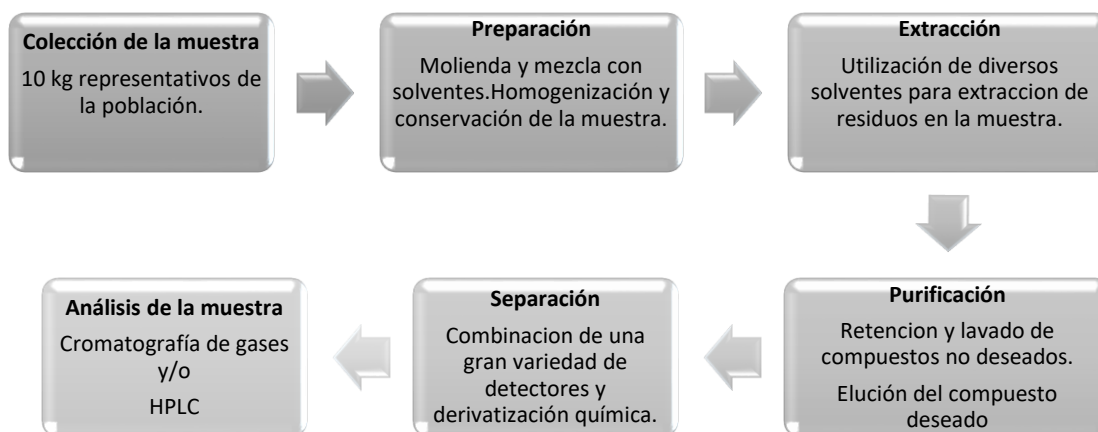
#### 2.2.6.3 Compartimento Aire

En lo que respecta a la atmosfera la distribución de los plaguicidas se puede presentar en forma de partículas o vapor; esto depende de la temperatura ambiental y la concentración del material suspendido [Gioia et al. 2005]. A pesar de, que el glifosato es uno de los plaguicidas más usados en el mundo existen muy pocos reportes sobre el transporte atmosférico del mismo. Por ejemplo, en un estudio, se informó que las concentraciones de glifosato en el aire se encontraban por debajo de 15.7 mg/m<sup>3</sup> durante los períodos de fumigación [Jauhiainen et al. 1991]. En otro estudio más reciente que se realizó de este tipo reportaron la detección de concentraciones de 2.5 µg/L de glifosato en el aire de áreas agrícolas en Mississippi y Iowa [Chang et al. 2011]. Sin embargo, el comportamiento del glifosato en la atmosfera aún se desconoce en gran medida.

### 2.3 Detección de glifosato mediante técnicas analíticas

Se han empleado diversas técnicas y metodologías en el análisis para la detección de residuos de glifosato en alimentos [Poulsen & Andersen, 2003; Araoud *et al.*, 2007; Mezcua *et al.*, 2009]. En todas ellas es necesario el empleo de técnicas y metodologías sistemáticas que permitan la extracción, separación, identificación y cuantificación del plaguicida.

A continuación, se resume en la **Figura 4** el método recomendado para la determinación de glifosato en alimentos según la FAO a través del Codex Alimentarius (LMR. CAC/IL GLC 33-1999):



**Figura 4.** Método analítico en la determinación de residuos de plaguicidas en alimentos. Elaboración propia 2017. Adaptada de Codex Alimentarius (LMR. CAC/IL GLC 33-1999).

Es importante destacar que el protocolo que sigue esta técnica analítica para la detección de glifosato en alimentos consume demasiado tiempo por lo que la emisión de los resultados se prolonga hasta por varias semanas, esto resulta un gran inconveniente. En el caso de, los alimentos con gran demanda y comercialización [Sherma, 1995; MacCarthy *et al.* 1995; Gairns & Baldwin, 1995].

Además de las técnicas analíticas en la detección, se encuentran las metodologías alternas, que aunque no han sido hasta el momento aceptadas y aprobadas por instancias certificadas, constituyen tecnologías novedosas o en desarrollo, las cuales representan alternativas funcionales para la cuantificación más simple de plaguicidas en diferentes matrices [Jokerst *et al.* 2012; Liu *et al.* 2011; Zheng *et al.* 2009; Shang, Qi & Wu, 2012; Liu *et al.* 2012].

Dentro de estas metodologías, se destaca la Espectroscopía Raman de Superficie Aumentada, que proporciona una señal Raman mucho mayor a partir de moléculas adsorbidas sobre superficies metálicas nanoestructuradas o coloides metálicas. En particular, de plata u oro [Halvorson & Vikesland, 2012].

## 2.4 Detección de glifosato mediante la técnica SERS

Como ya se mencionó anteriormente SERS, es una potente herramienta analítica fuertemente ligada a superficies nanoestructuradas. El potencial que presenta, en la actualidad se ha orientado hacia la realización en una serie de aplicaciones incluyendo la detección de plaguicidas [Aroca, 2006]. Los progresos recientes en la espectroscopía SERS para la detección de contaminantes en el ambiente se muestran en la **Tabla 5**.

*Tabla 5. Aplicaciones de la espectroscopía SERS para detección de contaminantes*

Analito	Substrato SERS	Referencia
Fonofos	Ag NPs	Vongsvivut <i>et al.</i> , 2010.
Omethoate	Agregado de Ag NPs	Guerrini <i>et al.</i> , 2011.
Methamidophos	Ag NPs	Xie <i>et al.</i> , 2012.
Thiram	Agrupamientos individuales autoensamblados de Ag NPs	Yuan <i>et al.</i> , 2011.
Thiram	Nanobastones de Au	Saute <i>et al.</i> , 2012.
Ferbam		
Ziram		
Plaguicida	Methyl parathion	CD-SH modificado con Au NPs
	Parathion	Capa aislada de silice Au NPs
	Paraquat	Ag NPs
Methyl parathion	Ag NPs	Yazdi & White, 2013.
Thiram		
Chlortoluron	Ag- nanocompuesto	Carrillo <i>et al.</i> , 2012.
Atrazine		
Diuron		
Terbuthylazine		
Glifosato	Nanocubos de Ag	Costa <i>et al.</i> , 2012.
Glifosato	Nanobastones de Au	Torul <i>et al.</i> , 2010.

*Fuente: Elaboración propia 2016.*

A pesar de, que el glifosato es uno de los compuestos organofosforados más utilizados en el mundo, las investigaciones SERS que se realizan sobre esta clase de compuestos son poco frecuentes. Así también, hay pocos estudios de residuos de glifosato en alimentos. Por

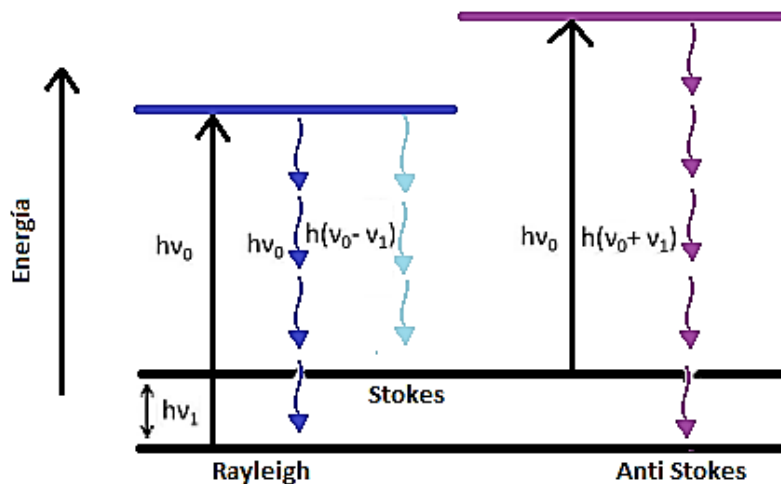
mencionar un ejemplo, en 2009 las autoridades de la Unión Europea realizaron 186,852 pruebas en muestras de cereales de residuos de plaguicidas. Pero, sólo cinco países realizaron las pruebas de glifosato [Meihui *et al.*, 2012]. De hecho, las autoridades de la UE sólo acordaron iniciar un seguimiento regular de glifosato en los cereales a partir de 2010, y no hay ninguna prueba en absoluto de los residuos de glifosato [Pardanaud *et al.*, 2012].

Por lo mencionado anteriormente en este proyecto se hará el empleo de la técnica SERS para la detección de glifosato en granos de maíz.

#### 2.4.1 Fundamentos de la espectroscopía Raman

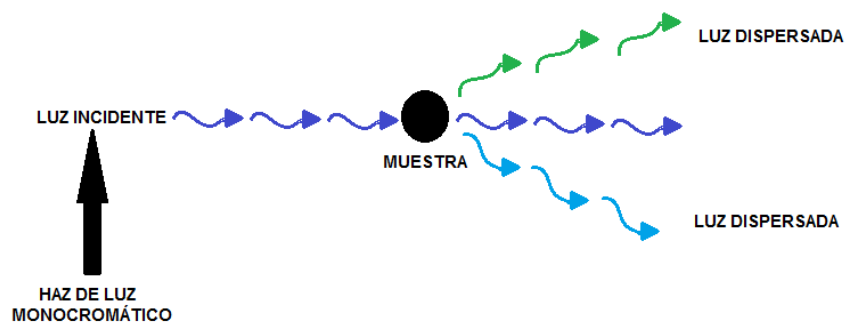
El efecto Raman fue descrito por primera vez en el año de 1928 por los físicos Chandrasekhara V. Raman y Kariamanickam S. Krishnan ambos de origen hindú [Raman & Krishnan, 1928]. Este fenómeno se origina por la polarización electrónica de la molécula provocada por la luz en un rango del espectro ultravioleta, visible e infrarrojo cercano [Smith & Dent, 2005].

Cuando el haz de luz monocromático irradia a la molécula, ocurren dos fenómenos, dispersión Rayleigh y dispersión Raman; el primer fenómeno se manifiesta cuando el fotón interacciona elásticamente con la molécula. Es decir, que la radiación incidente y la dispersada se encuentran en la misma frecuencia [Smith & Dent, 2005]. El segundo aparece cuando la radiación incidente es diferente a la dispersada. Es decir, una interacción inelástica [Smith & Dent, 2005]. Como se puede observar en la (**Figura 5**) cuando la molécula se encuentra en estado fundamental y pasa a un estado vibracional virtual excitado (línea azul y morada), y la energía del fotón dispersado es menor a la del incidente, a este fenómeno se le conoce como **Raman Stokes**; en el caso contrario, si la molécula se encuentra en un estado excitado, la energía del fotón dispersado es mayor a la del fotón incidente, se le denomina **Raman Anti Stokes**.



**Figura 5.** Representación de la dispersión Raman (Rayleigh, Raman Stokes y Raman Anti Stokes).  
Elaboración propia 2016.

Esta es una técnica espectroscópica de alta resolución que ayuda a obtener en un periodo corto información química y estructural de compuestos orgánicos e inorgánicos, lo cual nos ayuda para su identificación. El estudio que se realiza por medio de la espectroscopía Raman como ya se menciono está enfocado en hacer incidir un haz de luz monocromático (de una sola longitud de onda) sobre la muestra y el análisis de la luz dispersada con diferente longitud de onda cómo se representa en la **Figura 6**.



**Figura 6.** Diagrama simple sobre el efecto Raman. Elaboración propia 2016.

La luz dispersada es la luz que al pasar por la muestra es desviada en su dirección de propagación, de forma aparentemente desordenada. Gran parte de la luz dispersada presenta una energía similar a la luz de incidencia. Por otro lado, un pequeño porcentaje de la luz que incide a la muestra se dispersa con cambios en energía que son provocados por el material que se está analizando. A menudo estos estudios se efectúan sobre la muestra a analizar sin necesidad de alguna preparación específica o detallada y por ello no se presenta alguna alteración en el área de la muestra en análisis, esto quiere decir que es una técnica no destructiva. La luz dispersada que exhibe una energía diferente a la de la radiación o luz incidente, es la que nos va a proveer la información sobre la composición y estructura molecular de la muestra [Hendra, 1998].

#### 2.4.2 Fundamento SERS

Cuando se hace incidir el haz de luz monocromático sobre una nanopartícula de metal con dimensiones menores a la longitud de onda de la luz incidente es posible observar el fenómeno conocido como plasmón de superficie o plasmón superficial ocasionado por la variación del campo eléctrico de la luz [Moskovits, 1985; Wokaun, 1985; Aroca, 2006; Schlücker, 2011].

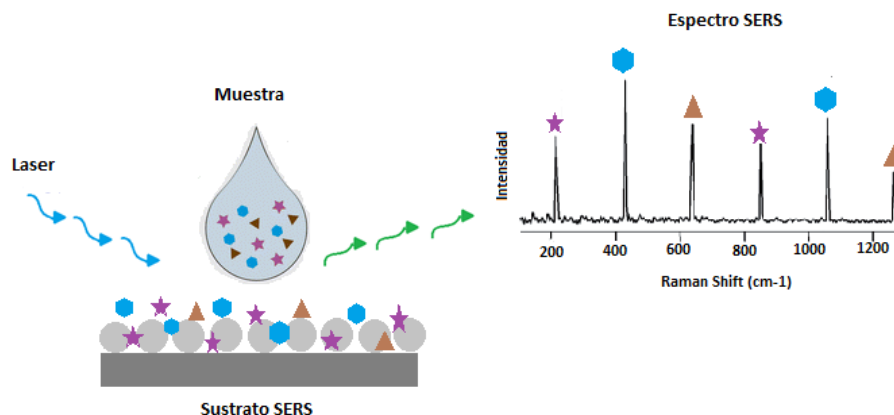
Este fenómeno electromagnético, en conjunto, con el químico son fundamentales para que se lleve a cabo el efecto SERS que fue descubierto por M. Fleischman en 1974 [Fleischman *et al.*, 1974], el cual tiene como objetivo la amplificación de las intensidades de las bandas vibracionales de Raman Convencional y la disminución de fluorescencia.

Por lo que en algunas ocasiones, cuando se tienen moléculas en las cercanías de un metal, se encuentra una amplificación de la señal Raman que puede llegar a un incremento de hasta 10 órdenes de magnitud [Zeng *et al.*, 2014; Ritchie, 1957; Polman & Atwater, 2005].

Esta amplificación, denominada Surface Enhanced Raman Scattering o SERS, tiene dos contribuciones: La primera es la amplificación por acoplamiento del proceso Raman con los modos plasmónicos del metal (componente Electromagnético o EM) [Kneipp, 2006]. Y la segunda es la amplificación por resonancia del proceso Raman con nuevas transiciones

electrónicas acopladas entre la molécula y el metal (componente químico o CH) [Otto *et al.*, 1992].

Las propiedades plasmónicas de nanoestructuras metálicas, incrementan por varios órdenes de magnitud la intensidad de dispersión Raman que presentan las muestras y en consecuencia su sensibilidad, como se muestra en la **Figura 7**.



*Figura 7. Descripción gráfica del efecto SERS. Elaboración propia 2017.*

Es importante mencionar, que la resonancia plasmónica para que el efecto SERS se produzca, depende de la función dieléctrica del metal, de la forma y tamaño de la nanopartícula; por lo que se recomienda que los sustratos SERS activos se encuentren en un rango de entre 5 y 100 nm [Pinto, 2006].

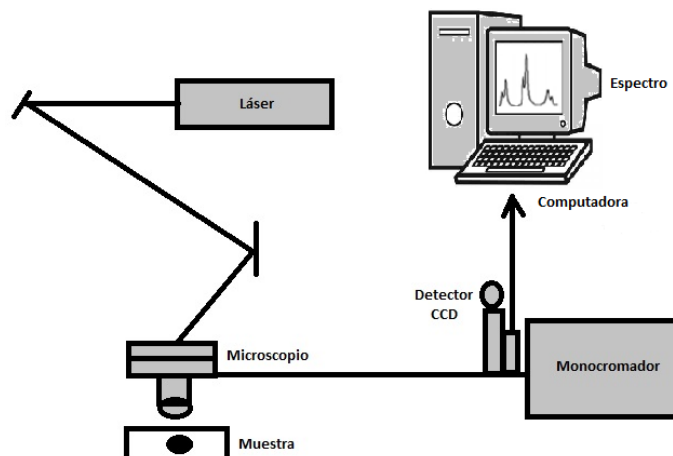
La radiación electromagnética que incide sobre la superficie del metal, un gran porcentaje se refleja y solo una pequeña fracción de la luz incidente se dispersa en todas direcciones. Sin embargo, cuando el metal se encuentra en forma de nanopartículas, la proporción de los átomos en la superficie respecto al volumen que ocupa es muy grande comparada con la que se presenta en el seno del metal. Este hecho hace que los electrones libres de la superficie sean capaces de interactuar con la radiación electromagnética provocando que parte de la radiación viaje sobre la superficie metálica y simultáneamente se produzcan oscilaciones colectivas de electrones restringidos en pequeños volúmenes metálicos. Este fenómeno desemboca en un aumento en los campos eléctricos locales que rodean a la nanopartícula

(efecto de resonancia localizada de plasmón superficial). De esta forma, las moléculas absorbidas o en cercanía a la superficie metálica experimentan un gran campo eléctrico, y por tanto, dado que la intensidad Raman es proporcional a la cuarta potencia de la amplitud del campo, la eficiencia se incrementa por factores tan grandes de hasta  $10^{14}$ .

Por lo que la implementación de esta metodología permite obtener resultados rápidos, reproducibles, confiables y se puede emplear en el análisis de rutina.

### 2.4.3 Instrumentación

El Espectrómetro Raman convencional como se puede observar en la **Figura 8**, está integrado por una fuentes de excitación láser que puede ser (UV, visible o infrarrojo cercano), un colector óptico, un analizador espectral (monocromador) y un detector



*Figura 8. Esquema simple de instrumentación Raman. Elaboración propia 2017.*

El colector óptico se encarga de recolectar la luz dispersada de la muestra y así mismo de enviarla al monocromador.

En la actualidad se han modificado los detectores y monocromadores para mejorar el rendimiento en la eliminación de la dispersión Rayleigh. La rejilla holográfica también es un filtro utilizado para la eliminación de la dispersión Rayleigh.

### 3. DETALLES EXPERIMENTALES

#### 3.1 Sustancias utilizadas

La solución de plata se preparó utilizando, nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) con una pureza del 99%, ácido fluorhídrico (HF) al 48% y peróxido ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) al 30%.

Las obleas de silicio (Si) utilizadas fueron de tipo P, dopadas con boro (B), orientación 1-0-0 y con una resistividad de 15-25  $\Omega$ .

Para, la primera solución amortiguadora se utilizó, ácido bórico ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ), ácido cítrico ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ ) y fosfato trisódico ( $\text{Na}_3\text{PO}_4$ ) con una pureza del 99, 100 y 98 % respectivamente,

En el caso de la segunda solución amortiguadora se empleó, fosfato monopotásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) y fosfato dipotásico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) ambos con una pureza de 99%.

Finalmente, el glifosato ( $\text{C}_3\text{H}_8\text{NO}_5\text{P}$ ) con una pureza del 99%. Este compuesto se disolvió en el amortiguador de amplio espectro pH 4, a concentraciones de  $1 \times 10^{-4}$  a  $1 \times 10^{-8}$  M. Posteriormente se realizó lo mismo con el amortiguador de fosfatos pH 8 a concentraciones de  $1 \times 10^{-2}$  a  $8 \times 10^{-4}$  M.

Cabe mencionar, que todos los productos químicos son de pureza analítica. Asimismo, todas las soluciones fueron preparadas con agua desionizada.

#### 3.2 Equipo usado

Los espectros Raman convencional y SERS se midieron usando un equipo (xplora modelo BX41TF, HORIBA Jobin-Yvon, Japon), equipado con una cámara CCD enfriada por aire, y un microscopio OLYMPUS (modelo BX41)

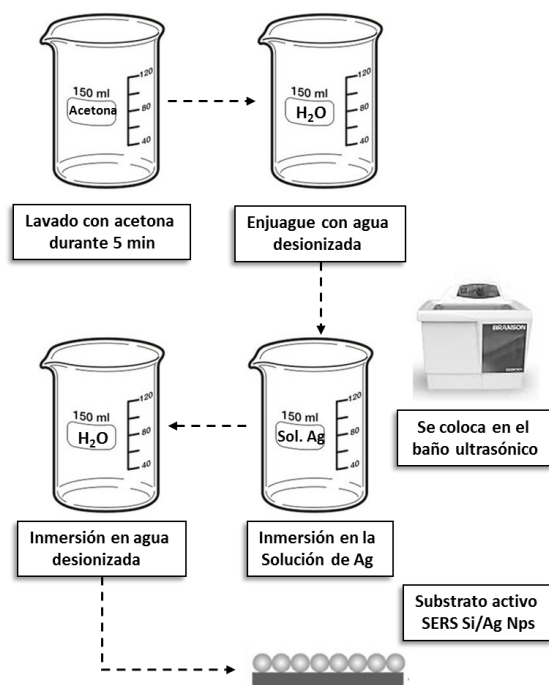
El equipo fue acoplado con varios tipos de láser que permiten el uso de diferentes líneas de excitación. La línea a 532 nm proporcionada por un láser Nd-YAG y la línea de 638 nm proporcionada por un láser de HeNe con una potencia máxima de 14 mW y 20 mW se usaron como fuentes de excitación. La dispersión Raman se filtró mediante una rejilla de difracción

de 1200 líneas/mm, para eliminar la dispersión elástica Rayleigh y los espectros se obtuvieron con el programa LabSpec6.

### 3.3 Elaboración de substratos SERS activos (Si-Ag NPs) mediante depósito químico

Se preparó la solución de plata a una concentración de 0.001mM disolviendo un total de 2 mg de  $\text{AgNO}_3$  en 100 ml de agua desionizada. Luego, se añadió un total de 2 ml de ácido fluorhídrico al 48% y 3.5 ml de peróxido al 30%. La mezcla se mantuvo en refrigeración.

Posteriormente la oblea de silicio adquirida, se lavó secuencialmente con acetona durante 5 minutos, posteriormente se enjuagó 3 veces con abundantemente agua desionizada para eliminar cualquier impureza orgánica y el óxido formado sobre la superficie. Luego, la oblea se sumergió en la solución de plata y se colocó en baño ultrasónico. Después de 1 minuto se retiró la oblea y se colocó en agua destilada para detener el proceso. El proceso se simplifica en la **Figura 9**. De esta manera se obtienen los substratos de Si-Ag para los estudios Raman.



**Figura 9.** Diagrama del proceso de elaboración de los substratos SERS activos Si / AgNPs. Elaboración propia 2017.

### 3.4 Preparación de las soluciones amortiguadoras pH 4 y pH 8

Se preparó una solución “A” de ácido bórico (0.2 M) y ácido cítrico (0.05 M) aforada a 200 ml con agua desionizada. Luego, se preparó una solución “B” de fosfato trisódico (0.1 M) aforada a 200 ml de agua desionizada. Posteriormente se mezcló un volumen de 155 ml de la solución “A” y 45 ml de la solución “B”. Obteniendo una solución amortiguadora de pH 4.

Para el amortiguador de fosfatos se preparó una solución de fosfato monopotásico (0.07 M) y fosfato dipotásico (0.4 M) aforada a 100 ml con agua desionizada. Obteniendo así la solución amortiguadora de pH 8. Para confirmar el valor de pH de ambas soluciones amortiguadoras se midió el mismo en el pH-metro marca OAKLON modelo pH 700.

Para las mediciones SERS del glifosato se preparó una solución stock de glifosato (0.1 M) y se añadió a la solución amortiguadora. Posteriormente se obtuvieron de las diferentes concentraciones llevándose a cabo una serie de diluciones.

### 3.5 Procedimientos para mediciones por Raman y SERS

#### 3.5.1 Obtención del espectro Raman de glifosato en estado sólido

Se procedió a la obtención del espectro del glifosato en su estado sólido como una referencia para los demás espectros que se obtendrán del glifosato en su estado acuoso. Esto con el fin de determinar las bandas asociadas al glifosato en forma de sal y en ausencia de interferentes como el agua u otras sales. Los espectros fueron calibrados usando la línea en el  $520.72 \text{ cm}^{-1}$  del silicio. Los parámetros evaluados en la obtención del espectro fueron: tiempo de adquisición, poder del láser, frecuencia del láser, rejilla, rango, slit y hole. Los parámetros utilizados para la obtención del espectro y sus respectivos valores se concentran en la **Tabla 6**.

**Tabla 6.** *Parámetros de adquisición para espectro Raman del glifosato en estado sólido*

Parámetro	Valor
Láser	532 nm
Tiempo de adquisición	5 s
Rejilla holográfica	1200 gr/mm
Poder del láser	24 mW
Objetivo	100x
Slit	100 $\mu\text{m}$
Hole	100 $\mu\text{m}$
Rango	400-1800 nm

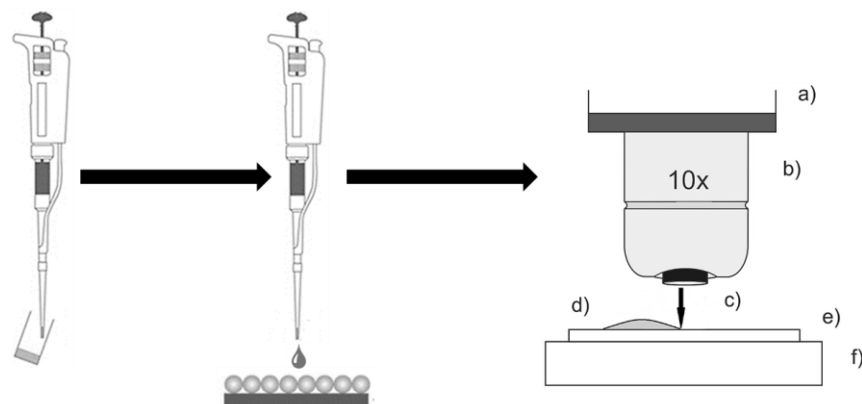
*Fuente:* Elaboración propia 2016.

### 3.5.2. Técnica de análisis (gota)

Uno de los retos de esta técnica consiste en la capacidad para analizar el contenido de pequeñas gotas de manera cualitativa y cuantitativamente. Por lo que esta juega un papel crítico en el desarrollo y aplicación en la detección de contaminantes como el glifosato.

La primera aplicación de la espectroscopía Raman en el sistema de la gota fue reportado por Cristóbal *et al.* [Cristóbal *et al.*, 2006]. La obtención de los espectros en estado acuoso se realizó mediante esta técnica, que consiste en el análisis de volúmenes pequeños del analito (picolitros a nanolitros) [Huebner *et al.*, 2008; Song *et al.* 2006; Solvas & DeMello, 2011; Kintses *et al.*, 2010].

Adaptando la técnica a nuestra necesidad, sobre el sustrato (Si-Ag NPs) se colocó una gota del analito ( $\sim 3\mu\text{l}$ ). Para el caso de Raman convencional la medición se realizó en el centro de la gota. Para las mediciones SERS se realizó sobre la periferia de la gota, posterior al enfoque se hizo incidir el láser y se registró la dispersión Raman obteniendo el espectro. Tal como, se puede observar en la **Figura 10**.



**Figura 10.** Técnica de la gota. (a) Sistema Raman, (b) objetivo (10x), (c) láser 532 nm, (d) muestra, (e) sustrato SERS activo (Si-Ag NPs) y (f) soporte. Elaboración propia 2016.

### 3.5.3 Obtención del espectro Raman de glifosato en estado acuoso

Como primer paso se llevó a cabo la obtención del espectro Raman del glifosato en estado acuoso a diferentes concentraciones [0.8, 2, 4, 6, 8 y 10 mM] en amortiguador de fosfatos pH 8. Todas las muestras fueron analizadas por cuadruplicado a través de la técnica de la gota descrita en el apartado anterior. Como blanco se utilizó el espectro Raman de amortiguador únicamente en ausencia de glifosato. Los parámetros utilizados para la obtención del espectro y sus respectivos valores se concentran en la **Tabla 7**.

**Tabla 7.** Parámetros de adquisición para espectro Raman del glifosato en estado acuoso

Parámetro	Valor
Láser	532 nm
Tiempo de adquisición	10 s
Gratting	1200 gr/mm
Poder del láser	24 mW
Objetivo	10x
Slit	100 $\mu\text{m}$
Hole	100 $\mu\text{m}$
Rango	400-1800 nm
Estado de la muestra	Líquido

**Fuente:** Elaboración propia 2016.

### 3.5.4 Obtención del espectro SERS de glifosato en estado acuoso

Posteriormente se llevó a cabo la obtención del espectro SERS del glifosato en estado acuoso a diferentes concentraciones [0.00001, 0.00005, 0.0001, 0.001, 0.01, 0.05 y 0.1 mM] en amortiguador de amplio espectro pH 4. Todas las muestras fueron analizadas por triplicado a través de la técnica de la gota descrita en el apartado anterior. Como blanco se utilizó el espectro Raman de amortiguador únicamente en ausencia de glifosato. Los parámetros utilizados para la obtención del espectro y sus respectivos valores se concentran en la **Tabla 8**.

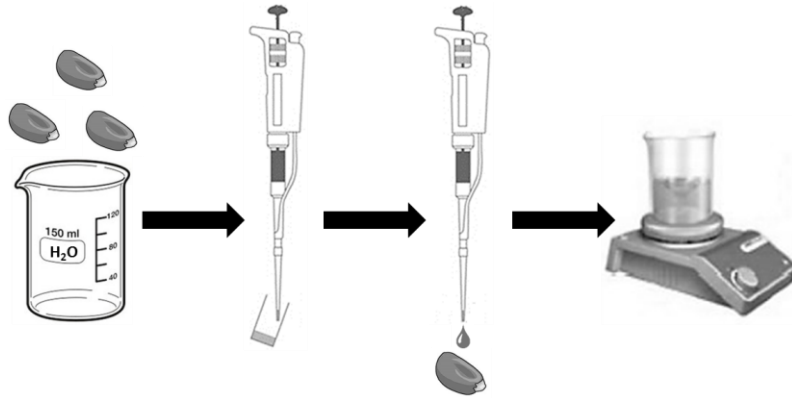
*Tabla 8. Parámetros de adquisición para espectro SERS del glifosato en estado acuoso*

Parámetro	Valor
Láser	532 nm
Tiempo de adquisición	10 s
Gratting	1200 gr/mm
Poder del láser	24 mW
Objetivo	10x
Slit	200 μm
Hole	300 μm
Rango	400-1800 nm
Estado de la muestra	Líquido

*Fuente: Elaboración propia 2016.*

### 3.5.5 Extracción de glifosato sobre granos de maíz

Finalmente, se procedió a la extracción de glifosato sobre granos de maíz como se muestra en la **Figura 11**. La extracción se realizó de la siguiente manera: Los granos de maíz se lavaron secuencialmente con abundante agua desionizada para eliminar partículas que se pudieran encontrar sobre los granos, se dejaron secar, posteriormente se adicionaron 10 μl de una concentración de glifosato conocida y se dejó secar durante 24 horas, por último los granos de maíz fueron colocados en 5 ml de buffer de amplio espectro y se dejaron en agitación durante 24 horas para su posterior análisis en SERS.



*Figura 11. Proceso de extracción de glifosato sobre granos de maíz. Elaboración propia 2017.*

## **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Contemplando que la Espectroscopía Raman de Superficie Aumentada (SERS) es una técnica útil en las mediciones de concentraciones ultra bajas de analitos, es de gran importancia la magnitud de la amplificación que se puede obtener. Debido a ello desarrollamos substratos SERS activos de silicio dopados con nanopartículas de plata (Ag) para optimizar los mecanismos de amplificación. En primer lugar, sobre el silicio se depositaron las nanopartículas de Ag. Considerando que, es uno de los metales más utilizados en plasmónica. Este metal presenta una mayor amplificación debido a que posee mayor eficiencia en la excitación de los plasmones.

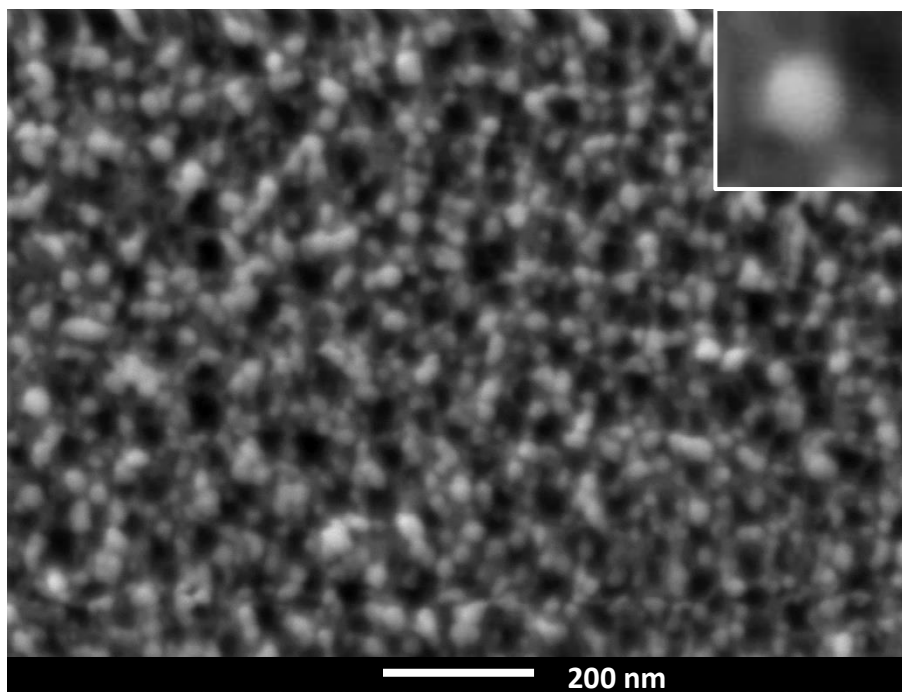
Para la obtención de los substratos SERS existen varios procesos de nano-fabricación entre ellos la reducción química, la deposición electroquímica y la deposición por vapor [Cao, 2004]. El depósito químico es una técnica que ha atraído la atención debido a que se trata de un proceso simple y económico [Huang et al., 2011]. Como su nombre lo indica, las partículas metálicas son un elemento importante del proceso. En pocas palabras, el silicio sólo se elimina en una región muy localizada, donde se depositan las partículas de metal [Hildreth & Schmidt, 2014]. Esta posibilidad de ataque altamente direccional, sobre el silicio es lo que la distingue de otras técnicas.

A continuación, se muestran los resultados obtenidos de la elaboración de substratos SERS activos de silicio con nanopartículas de plata (Si - Ag NPs) y su uso en la detección de glifosato en medio acuoso. Así mismo, la asignación de bandas de los espectros vibracionales del glifosato en estado sólido y en solución acuosa.

#### 4.1 Caracterización morfológica de sustratos SERS activos (Si-Ag NPs) mediante microscopía electrónica de barrido (SEM)

Los sustratos SERS que contienen nano-partículas de Ag, permiten la amplificación por resonancia plasmónica, misma que se encuentra a energías cercanas a la del láser usado para mediciones Raman. En este estudio se optó por el uso de nano-partículas de Ag y como soporte Silicio (Si) comercialmente disponible (sustrato Si-Ag NPs) ya que es el semiconductor más abundante y existe una gran variedad de técnicas para microestructurarlo. Los sustratos Si-Ag NPs fueron elaborados mediante la técnica de depósito químico descrita con anterioridad.

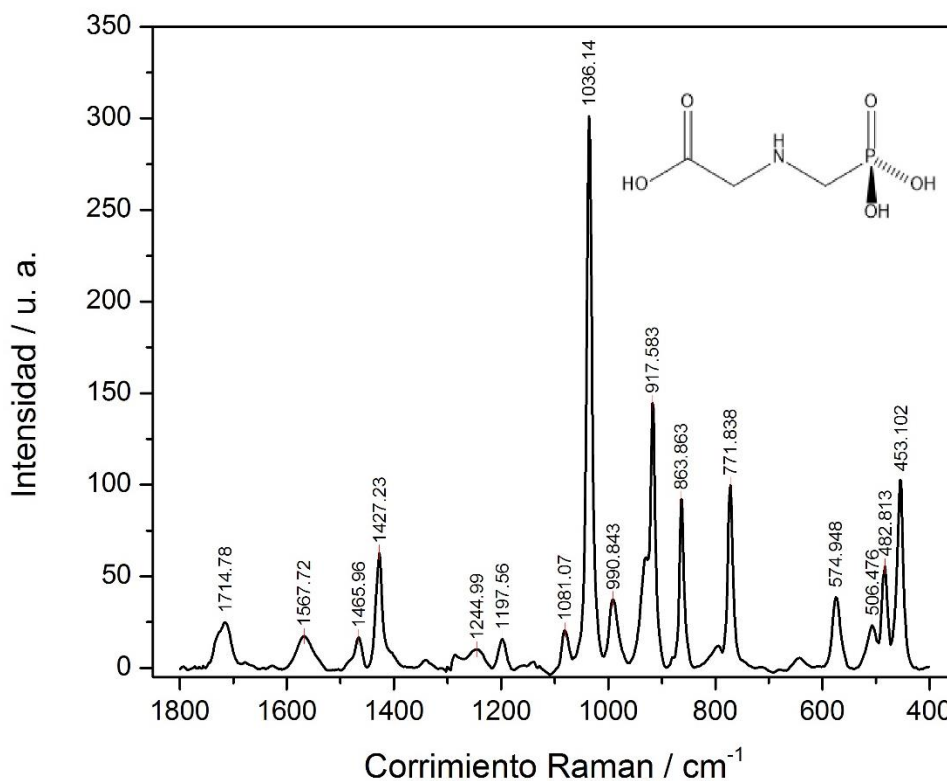
Los sustratos obtenidos fueron caracterizados mediante una técnica microscópica avanzada, microscopía electrónica de barrido (SEM) utilizando un equipo Jeol modelo (7500-F). La **(Figura 12)** muestra una imagen SEM de los sustratos, en donde se pueden apreciar las nanopartículas de plata sintetizadas, con una dimensión promedio de 22 nm +- 3.9 nm. Por otra parte, se observa una distribución homogénea de las nanopartículas de plata en su superficie, lo que resulta importante en el diseño de sustratos con respuestas SERS reproducibles.



*Figura 12. Imágenes SEM obtenidas de las nanopartículas de plata soportadas sobre la oblea de Silicio. Elaboración propia 2017.*

#### 4.2 Espectroscopía Raman convencional de glifosato en estado sólido

La obtención del espectro del glifosato en su estado sólido (**Figura 13**), se realizó para verificar la pureza del reactivo, así como para poder realizar la comparación del comportamiento de la molécula en su estado acuoso, y posteriormente como adsorbato sobre los sustratos **Si-Ag NPs** desarrollados. Los experimentos se realizaron utilizando un láser verde longitud de onda 532 nm debido a que de acuerdo a mediciones por UV-Vis (**ver apéndice I**) la longitud de onda correspondiente a la posición máxima del plasmón superficial de los sustratos **Si-Ag NPs** desarrollados en la presente tesis se encuentra aproximadamente en los 500 nm.



**Figura 13.** Espectro Raman de cristales de glifosato utilizando un láser de  $\lambda = 532$  nm. Elaboración propia 2016.

La asignación de bandas (**Tabla 9**), se realizó considerando la información disponible en literatura, la cual se encuentra reportada utilizando un láser en los 638 nm [Costa, 2012].

**Tabla 9.** Asignación de bandas Raman para glifosato en estado sólido

Raman Reportado (teórico)	Raman Obtenido (experimental)	Asignación Reportada
$\text{cm}^{-1}$		
455	455	$p(\text{CH}_2)+\delta(\text{OH})$
484	482	$\delta(\text{OH})+ p(\text{CH}_2)+(\text{PO}_2)$
506	508	$\delta(\text{OH})+p(\text{CH})$
573	574	$\delta(\text{OH})+ \delta(\text{OH}-\text{C}=\text{O})$
774	771	$\delta(\text{NH})+ p(\text{CH}_2)+\nu(\text{P}-\text{OH})$
863	863	$p(\text{CH}_2)+\delta(\text{NH})+ \nu(\text{C}-\text{C})$
----	917	$p(\text{CH}_2)^*$
992	990	$p(\text{CH}_2)+\delta(\text{OH})$
1037	1036	$\nu(\text{PO}_2)+ \delta(\text{OH})$
1081	1081	$\nu(\text{C}-\text{N})+ \nu(\text{C}-\text{OH})$
1197	1197	$\tau(\text{CH}_2)+ \delta(\text{OH})$
1238	1241	$\tau(\text{CH}_2)$
1245	----	$\omega(\text{CH}_2)$
1337	----	$\omega(\text{CH}_2) + \nu(\text{C}-\text{C})$
1425	1427	$\delta(\text{CH}_2)$
1433	----	$\delta(\text{CH}_2)$
----	1465	$\nu(\text{CC}) + \delta(\text{CNH})/ \tau(\text{NH}_2)$
1566	1567	$\delta(\text{NH}_2)$
1619	----	$\delta(\text{NH}_2^+)^a$
----	1714	$\nu(\text{CO})$
1732	----	$\nu(\text{C}=\text{O})$

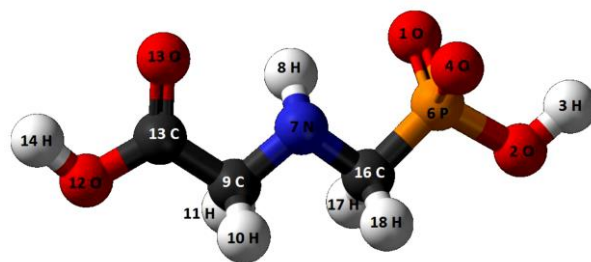
*Modos vibracionales:  $\nu$  = estiramiento,  $p$  = balanceo,  $\tau$  = torsión y  $\delta$  = flexión. Elaboración propia 2016.*

Espectros obtenidos a diferentes valores de longitud de onda pueden presentar cambios en la posición, forma e intensidad de algunas bandas Raman, o bien, la desaparición y aparición de algunas de ellas. Lo anterior debido a que cada longitud de onda presenta un valor de fotoluminiscencia asociada, que pueden excitar diferentes estados de resonancia de la muestra.

Como se observa en la **Tabla 9**, las bandas adjudicadas a la vibración: del metileno en los valores de frecuencia 1245, 1337 y 1433  $\text{cm}^{-1}$ , del grupo amino en 1619  $\text{cm}^{-1}$  y del grupo carbonilo en 1732  $\text{cm}^{-1}$ , desaparecen cuando la muestra es irradiada con el láser 532. Por otra parte, a esta longitud de onda de irradiación, se favorece la resonancia de tres modos normales adicionales en el 917, en el 1465  $\text{cm}^{-1}$  y en el 1714  $\text{cm}^{-1}$ . La banda localizada a 917  $\text{cm}^{-1}$  puede estar adjudicada al modo de vibración de aleteo del metileno  $p$  ( $\text{CH}_2$ ) y ha sido identificada por Costa et al. para el glifosato utilizando la técnica SERS. Por otra parte, la banda a 1465  $\text{cm}^{-1}$  puede ser atribuida a la vibración de flexión del mismo metileno  $\delta$  ( $\text{CH}_2$ ) [Costa, 2012] o bien la vibración de estiramiento del enlace C-N en 1465  $\text{cm}^{-1}$ . Así mismo, la banda en el 1714  $\text{cm}^{-1}$  es adjudicada a la vibración del grupo carbonilo del grupo carboxílico. El resto de las bandas presentes por la irradiación del láser verde presentan similitud entre las bandas reportadas y obtenidas de manera experimental y teóricas

### 4.3 Espectroscopía Raman convencional de disoluciones acuosas amortiguadas de glifosato

La molécula de glifosato está constituida por los grupos carboxilo, amina y fosfato. La correspondiente estructura de su conformación más estable se plantea en la siguiente **Figura 14**.



**Figura 14.** Estructura molecular del Glifosato, el color rojo representa átomos de oxígeno, el azul el átomo de nitrógeno, el negro átomos de carbono y el naranja el átomo de fósforo.

El glifosato presenta cuatro constantes de disociación  $pK_{a1} = 0.78$ ,  $pK_{a3} = 5.96$  (fosfonato),  $pK_{a2} = 2.29$  (carboxilato) y  $pK_{a4} = 10.98$  (amino) (Wauchope, 1976). Las especies iónicas resultantes para cada valor de  $pK_a$  se muestran a continuación:

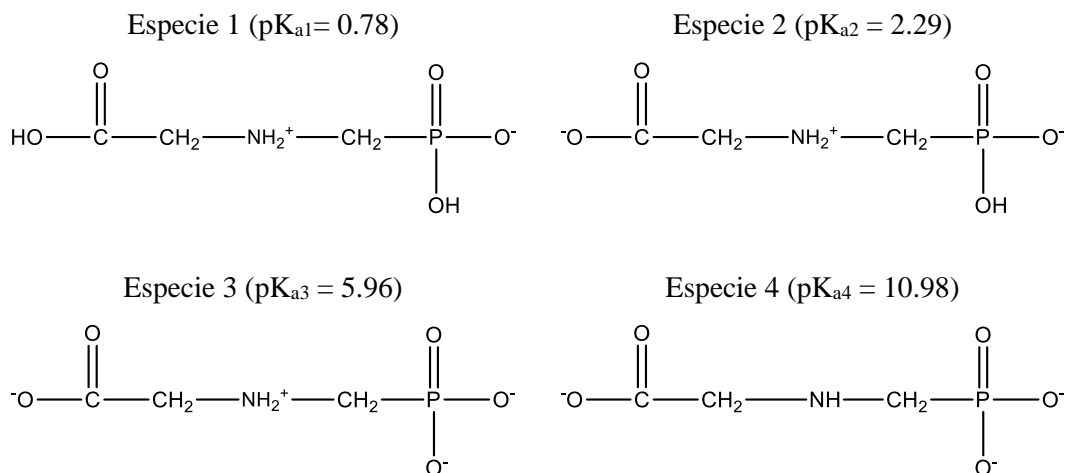


Figura 15. Especies iónicas de glifosato de acuerdo al pH del medio. Elaboración propia 2016.

La curva de fracción molar respecto al pH se muestra en la Figura 16.

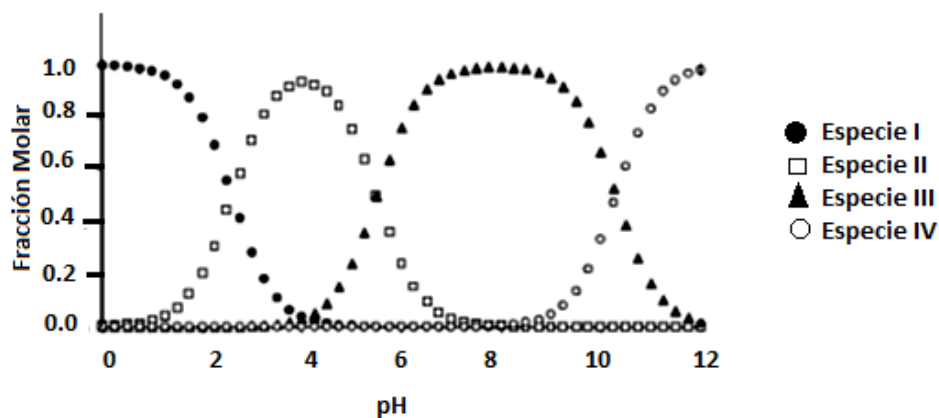


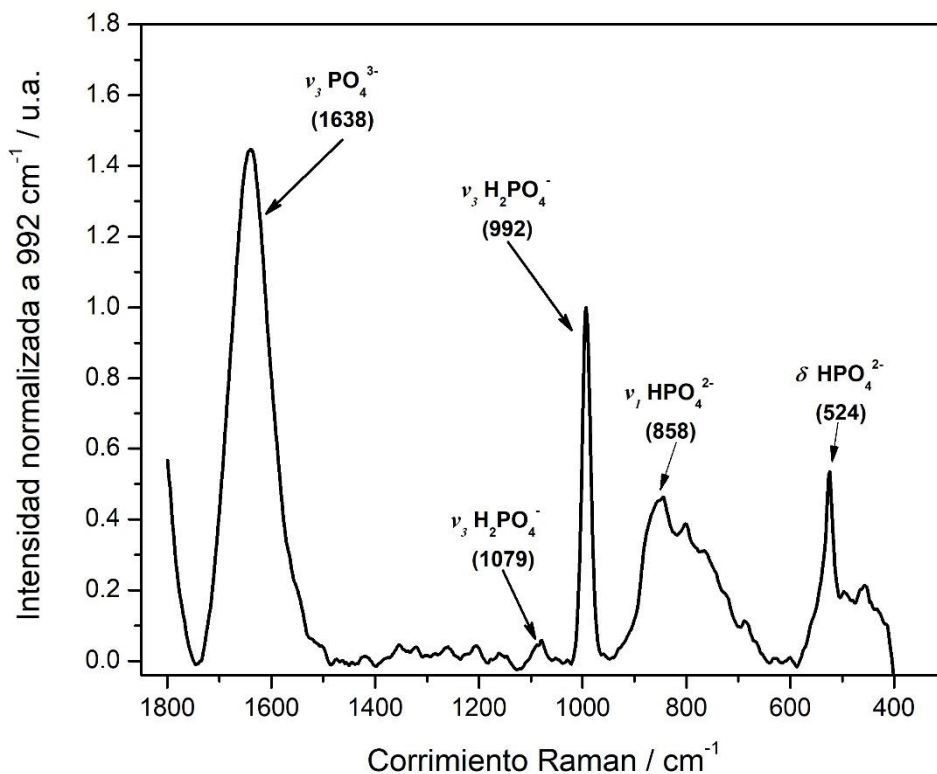
Figura 16. Curva de especiación de la molécula de glifosato respecto al pH. Elaboración propia 2016.

En la Figura 16 se puede observar que a los valores de pH 4 y pH 8, se tiene la presencia de prácticamente una sola especie de glifosato deprotonada (especie II y especie III). Por lo

anterior, en este trabajo se seleccionaron estos valores de pH para la determinación del glifosato en su estado acuoso.

Se obtuvieron los espectros Raman convencional de glifosato en estado acuoso a pH 4 y 8, con el fin de realizar un comparativo entre la respuesta Raman convencional y SERS del glifosato. No obstante, a pH 4 el espectro Raman del amortiguador de fosfatos utilizado, (**ver apéndice II**) no muestra ningún cambio regular en presencia de glifosato. A continuación, se muestran únicamente los resultados obtenidos utilizando el amortiguador a pH 8. En el espectro obtenido de la solución amortiguadora de fosfatos pH 8 (**Figura 17**) se puede observar la presencia de ciertas bandas características de las sales que constituyen al amortiguador en 858, 992, 1079, 1638 y 524  $\text{cm}^{-1}$ . La asignación tentativa de las bandas se realizó con la información disponible en la literatura y se presentan en la **Tabla 10**. Badreddine *et al.* reportan en su investigación la presencia de las bandas en 992 y 1079  $\text{cm}^{-1}$  las cuales son adjudicadas al modo vibracional ( $\nu_3$ ) de tensión de la especie  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ . Así mismo las bandas 524 y 858  $\text{cm}^{-1}$  se reportan adjudicadas a los modos vibracionales ( $\nu_4$  y  $\nu_1$ ) de flexión y tensión respectivamente de la especie  $\text{HPO}_4^{2-}$ . Por último, la banda (1638  $\text{cm}^{-1}$ ) se reporta adjudicada al modo vibracional ( $\nu_3$ ) de tensión de la especie  $\text{PO}_4^{3-}$  [Badreddine *et al.*, 1998; Badreddine *et al.*, 1999; Farmer, 1974].

El experimento anterior se realizó con el fin de sustraer sus contribuciones sobre el espectro que se obtuvo en presencia de glifosato.



**Figura 17.** Espectro Raman de Amortiguador Fosfatos pH 8, se observa la presencia de bandas en 524, 858, 992, 1079 y 1638  $\text{cm}^{-1}$ . Elaboración propia 2016.

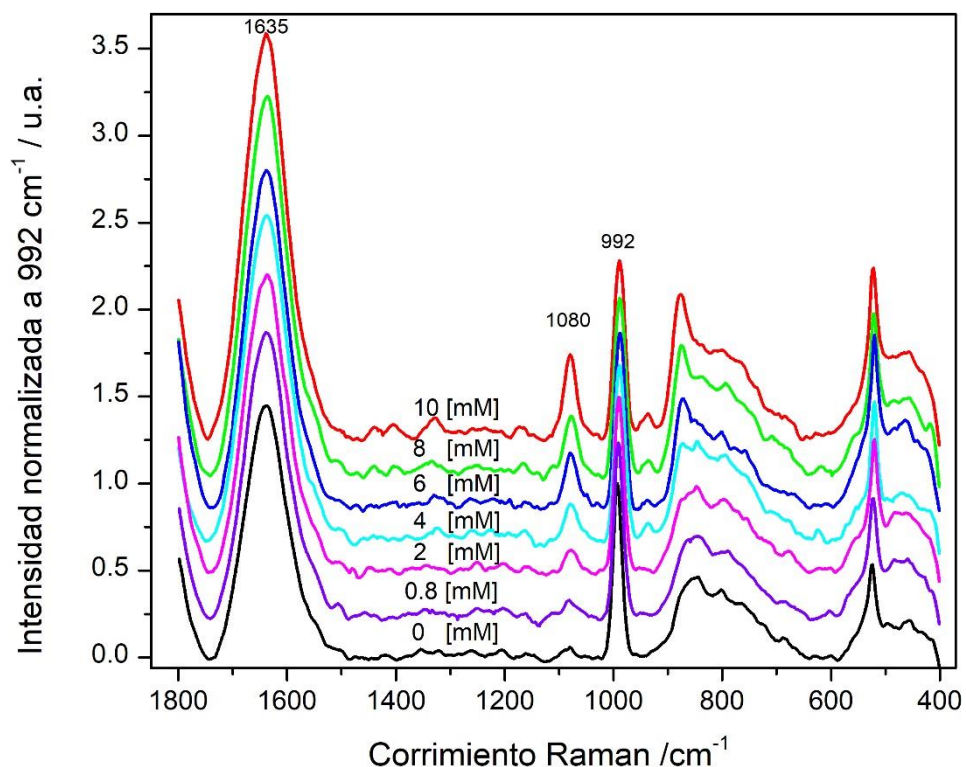
**Tabla 10.** Asignación de bandas Raman para amortiguador de fosfatos pH 8

Raman Reportado	Raman Obtenido	Asignación Reportada
$\text{cm}^{-1}$		
535	524	$\text{HPO}_4^{2-}$
860	858	$\text{HPO}_4^{2-}$
995	992	$\text{H}_2\text{PO}_4^-$
1077	1079	$\text{H}_2\text{PO}_4^-$
1650	1638	$\text{PO}_4^{3-}$

**Fuente:** Elaboración propia 2016.

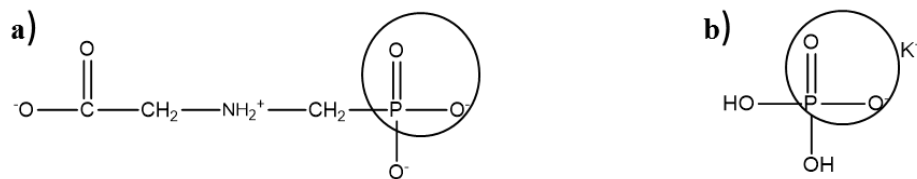
Una vez obtenido el espectro característico del amortiguador de fosfatos, se adicionaron concentraciones sucesivas de glifosato [0, 0.8, 2, 4, 6, 8 y 10 mM]. Para cada concentración

se obtuvo su espectro Raman a una longitud de onda de  $\lambda = 532$  nm. La **Figura 18** muestra la colección de espectros obtenidos en presencia y en ausencia de glifosato.



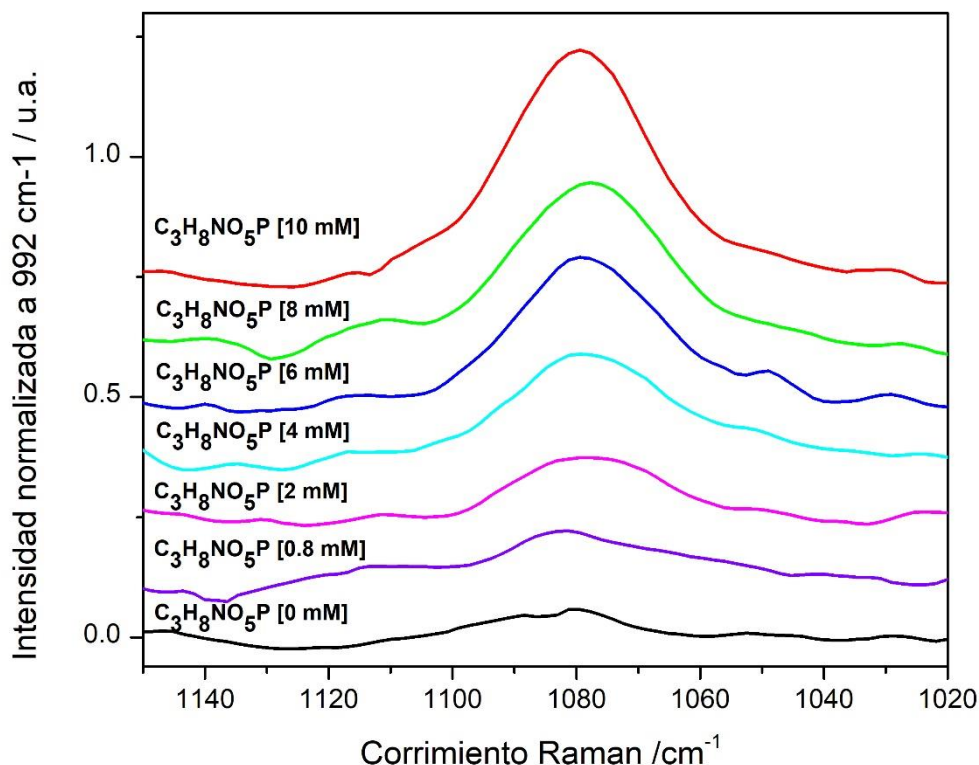
**Figura 18.** Espectro Raman de glifosato en estado acuoso a diferentes concentraciones [0 a 10 mM] mediante Raman convencional a una longitud de onda de  $\lambda$  532 nm. Elaboración propia 2016.

Como se puede observar en la **Figura 18**, la presencia del glifosato en solución, no permite la formación de nuevas bandas. Sin embargo, el espectro Raman del amortiguador presenta un importante aumento gradual en la banda ubicada alrededor de  $1080\text{ cm}^{-1}$  atribuida al modo de vibración de estiramiento simétrico del enlace  $\text{PO}_2$  del anión fosfato diácido ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ). Y en la banda alrededor de  $1635\text{ cm}^{-1}$  adjudicada a la vibración del ion fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) presenta el mismo comportamiento que la banda anterior. A pH 8, el grupo fosfonato del glifosato se encuentra totalmente deprotonado, por lo que la contribución de la vibración del grupo  $\text{PO}_2$  expuesto, contribuye al aumento observado en la banda a  $1080\text{ cm}^{-1}$  del amortiguador, la cual incrementa en función de la concentración del glifosato.



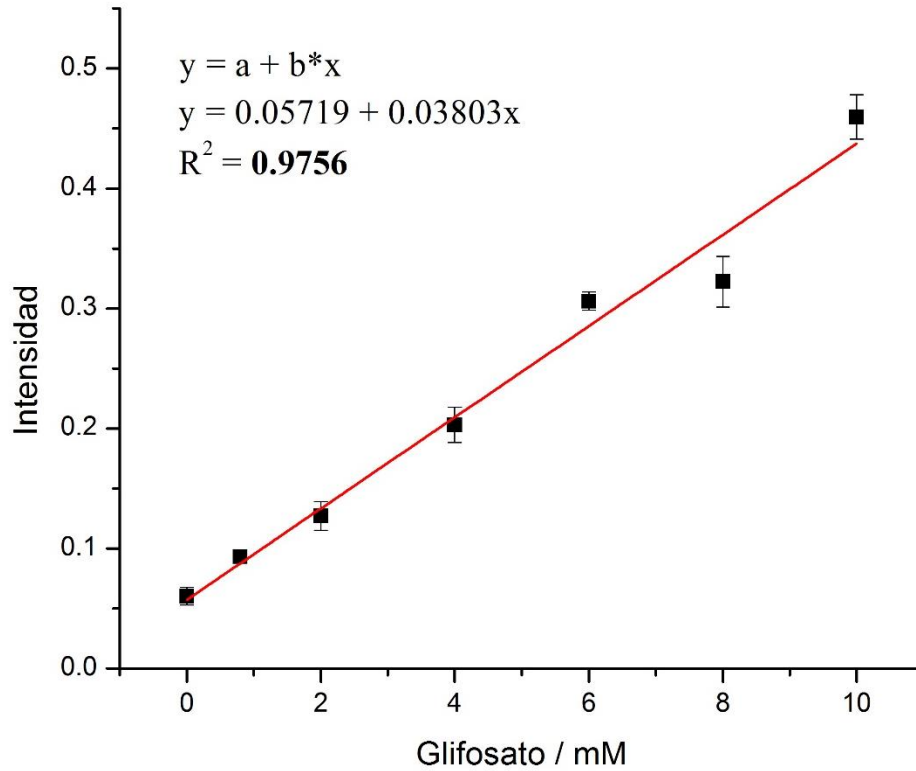
**Figura 19.** a) Grupo  $\text{PO}_2$  en el glifosato pH 8 y b) Grupo  $\text{PO}_2$  del anión fosfato diácido ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ). Elaboración propia 2017.

Es importante señalar que, hasta el momento de la escritura de la tesis, no se encuentra reportado en literatura el espectro Raman del glifosato en sistema acuoso a pH 8. A partir del análisis matemático y estadístico de las 2 bandas de interés, se seleccionó aquella que presentó mejor límite de detección (LD) y de cuantificación (LQ), que fue la banda ubicada en  $1080 \text{ cm}^{-1}$  (Figura 20).



**Figura 20.** Banda a  $1080 \text{ cm}^{-1}$  de glifosato en estado acuoso a diferentes concentraciones [0 a 10 mM] mediante Raman convencional a una longitud de onda de  $\lambda 532 \text{ nm}$ . Elaboración propia 2016.

Del análisis de esta banda se construyó el gráfico de concentración vs intensidad (**Figura 21**). La señal Raman convencional denota una dependencia lineal dentro del intervalo de concentración de glifosato de 0.8 mM a 10 mM.



**Figura 21.** Curva de calibración trazada para la concentración [0.8-10 mM] de glifosato. Elaboración propia, 2016.

Con dichos resultados se obtuvieron los límites de detección (LD) y de cuantificación (LQ) para esta región, siendo: LD= 3 mM y LQ= 13.5 mM. El LD y el LQ fueron calculados usando las siguientes ecuaciones:

$$LD = 3 \sigma / m \quad (\text{Ec.1})$$

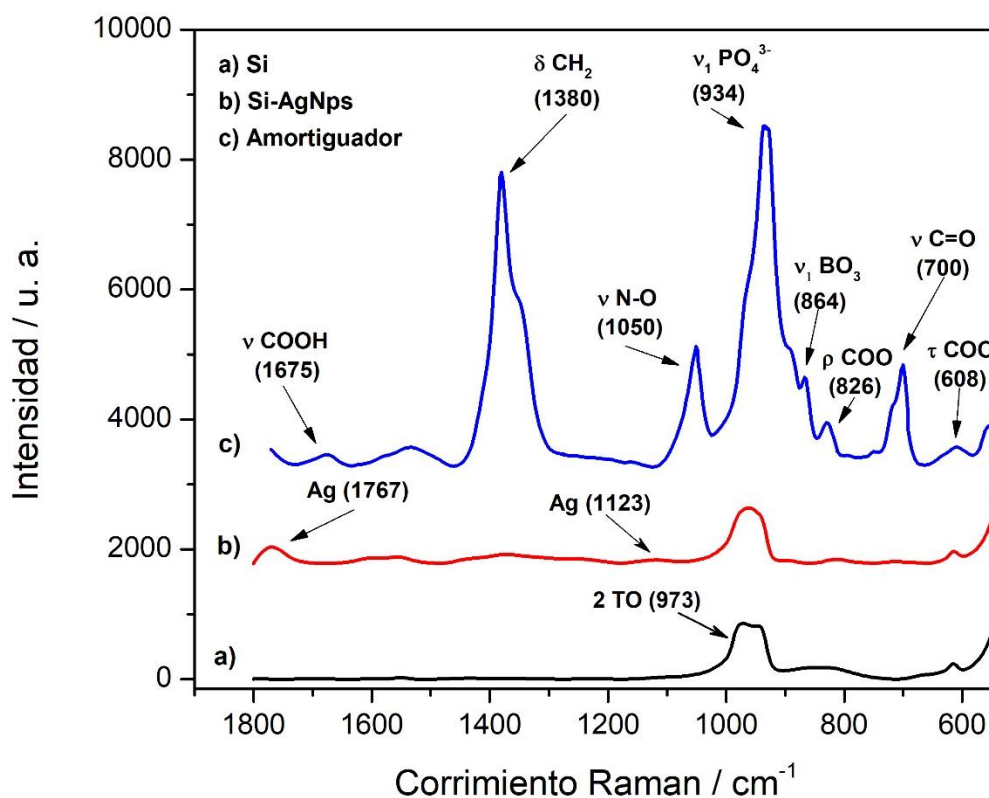
$$LQ = 10\sigma/m \quad (\text{Ec.2})$$

Donde  $\sigma$  es la desviación estándar de la respuesta, es decir, la intensidad de la banda del blanco y  $m$  es la pendiente de la curva de calibración.

Así mismo cabe mencionar que no se encuentra reportada la determinación de glifosato a partir de Raman convencional, por lo que los resultados obtenidos son novedosos.

#### 4.4 SERS de disoluciones acuosas amortiguadas de glifosato sobre sustratos de Si decorados con nanopartículas de Ag

La detección de glifosato acuoso utilizando los sustratos **Si-Ag NPs** se llevó a cabo a pH 4 y 8. No obstante, los resultados obtenidos a pH 8 no mostraron suficiente reproducibilidad por lo que se muestran únicamente los resultados obtenidos a pH 4. Para ello se eligió la solución amortiguadora de amplio espectro pH 4. El espectro Raman correspondiente a las obleas de silicio, al silicio modificado con nanopartículas de plata [**Si-Ag NPs**] y del amortiguador en estado acuoso sobre dichos sustratos se muestra en la **Figura 22**.



**Figura 22.** a) Espectro Raman de la oblea de silicio, b) Espectro Raman del sustrato (Si-Ag NPs) y c) Espectro Raman del Amortiguador amplio espectro pH 4, a una longitud de onda de  $\lambda = 532$  nm. Elaboración propia 2017.

Como se puede observar en la **Figura 22 a)** el espectro obtenido directamente de la oblea de silicio, presenta una banda alrededor de  $\sim 970\text{ cm}^{-1}$  adjudicada en literatura a la vibración de los fonones de silicio [Ma, Liao, Kong & Chu, 2000]. Por otro lado, en la **Figura 22 b)** correspondiente al espectro del sustrato **Si-Ag NPs** se observa la aparición de 2 bandas adicionales en  $1123$  y  $1767\text{ cm}^{-1}$  adjudicadas en literatura a diferentes modos vibracionales de la plata (Ag) [Débarre et al. 2004]. Para el caso de la **Figura 22 c)** correspondiente al espectro del amortiguador, se observa la presencia de bandas en  $608$ ,  $700$ ,  $826$ ,  $864$ ,  $934$ ,  $1050$ ,  $1380$ ,  $1534$  y  $1675\text{ cm}^{-1}$ .

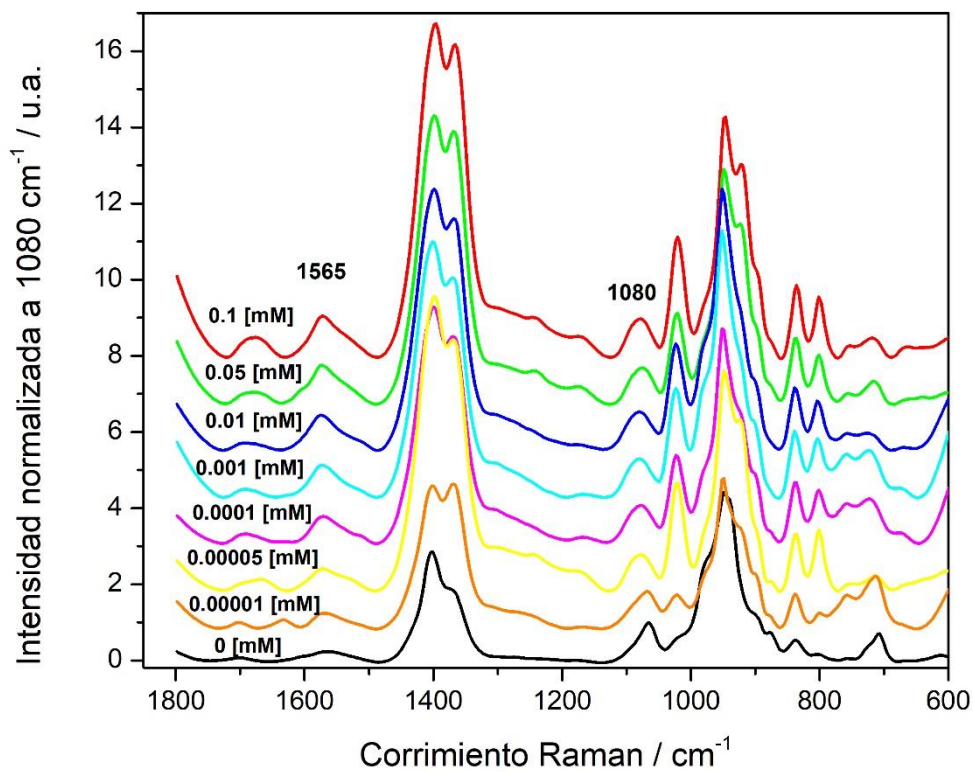
La asignación de bandas para el amortiguador en su estado acuoso **Tabla 11** se realizó considerando la información disponible en la literatura. Es importante mencionar, que dicha información se obtuvo de espectros de las sales en disolución que componen al amortiguador utilizado en la presente tesis; y que fueron tomados en diferentes longitudes de onda respecto a la empleada en nuestro sistema ( $532\text{ nm}$ ). No obstante, es válido realizar dicha asignación como una aproximación, considerando los posibles desplazamientos en las bandas y la aparición de nuevas. Las señales adjudicadas al ácido cítrico son:  $1675$ ,  $1380$ ,  $1050$ ,  $826$ ,  $700$ , y  $608\text{ cm}^{-1}$  las cuales están relacionadas con las siguientes vibraciones respectivamente  $\nu$  (COOH),  $\delta$  (CH<sub>2</sub>),  $\nu$  (N-O),  $p$  (COO),  $\nu$  (C=O) y  $\tau$  (COO) [Rao, 1970; Douheret, 1967; Douheret, 1968; Bevington, 1969; Marquardt, 1963; Maeder et al., 2006; Heitner et al., 1958; Bickley et al., 1991; Elbagerma et al., 2010]. La banda en  $864\text{ cm}^{-1}$  adjudicada al modo vibracional  $\nu_1$  (BO<sub>3</sub>) pertenece al ácido bórico [Servoss & Clark, 1957; Nakamoto, 1986; Nakamoto, 1978]. Por último la banda a  $938\text{ cm}^{-1}$  es adjudicada a la vibración del PO<sub>4</sub> del fosfato trisódico [Ghule, 2001; Ghule, 2003].

**Tabla 11.** Asignación de bandas Raman para amortiguador amplio espectro en estado acuoso

Raman Obtenido	Raman Reportado	Asignación Tentativa
$\text{cm}^{-1}$		
608	648	$\tau$ (COO)
	618	$\nu_4$ ( $\text{PO}_4^{3-}$ )
700	701	$\nu$ (C=O)
826	816	$p$ (COO)
864	875	$\nu_1$ ( $\text{BO}_3$ )
934	941	$\nu$ (C-C)
	938	$\nu_1$ ( $\text{PO}_4^{3-}$ )
1050	1065	$\delta$ (OH)
	1054	$\nu$ (N-O)
	1076	$\nu_3$ ( $\text{PO}_4^{3-}$ )
1380	1346	$\delta$ ( $\text{CH}_2$ )
	1414	$\delta$ ( $\text{CH}_2$ )
1534	-	-
1675	1721	$\nu$ (COOH)

*Modos vibracionales:  $\nu$  = estiramiento,  $p$  = balanceo,  $\tau$  = torsión y  $\delta$  = flexión. Elaboración propia 2017.*

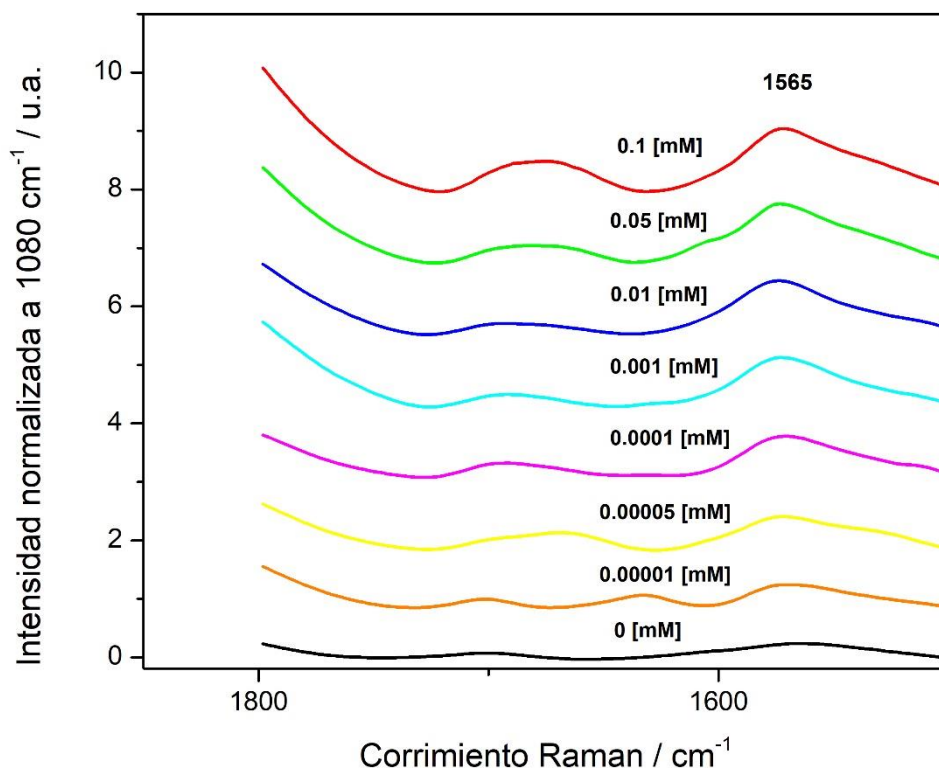
Una vez obtenido el espectro característico del amortiguador, se adicionaron concentraciones sucesivas de glifosato [0, 0.00001, 0.00005, 0.0001, 0.001, 0.01, 0.05 y 0.1 mM]. La **Figura 23** muestra los espectros obtenidos en presencia y en ausencia de glifosato.



**Figura 23.** Espectro Raman de glifosato en estado acuoso a diferentes concentraciones [0 a 0.1 mM] obtenido a una longitud de onda de  $\lambda$  532 nm. Elaboración propia 2017.

Como se puede observar en la **Figura 23**, la presencia del glifosato en solución no permite la formación de nuevas bandas. Sin embargo, la banda ubicada alrededor de  $1565 \text{ cm}^{-1}$  al adicionar glifosato en la solución amortiguadora podría estar relacionada con la vibración de flexión de la molécula del agua ( $\delta \text{ H}_2\text{O}$ ) o con la vibración de la amina  $\delta (\text{NH}_2^+)$ . La banda muestra una clara tendencia en relación a la concentración de glifosato en el medio [Costa, 2012]. Dicho incremento puede ser adjudicado a la interacción que presentan los grupos carboxilo y fosfato sobre las superficies metálicas (Au, Cu y Ag), de tal manera que conforme se incrementa la concentración de glifosato en solución se incrementa su adsorción sobre la superficie metálica y en consecuencia se incrementa el efecto SERS [Paik *et al.*, 2003; Yu-Tai, 1993].

Por consiguiente, se llevó a cabo el análisis de la banda de interés; como se puede observar en la **Figura 24** correspondiente a la banda ubicada en  $1565\text{ cm}^{-1}$  tentativamente relacionada con la vibración de la amina  $\delta$  ( $\text{NH}_2^+$ ) esta muestra una clara tendencia en relación a la concentración de glifosato en el medio [Costa, 2012].

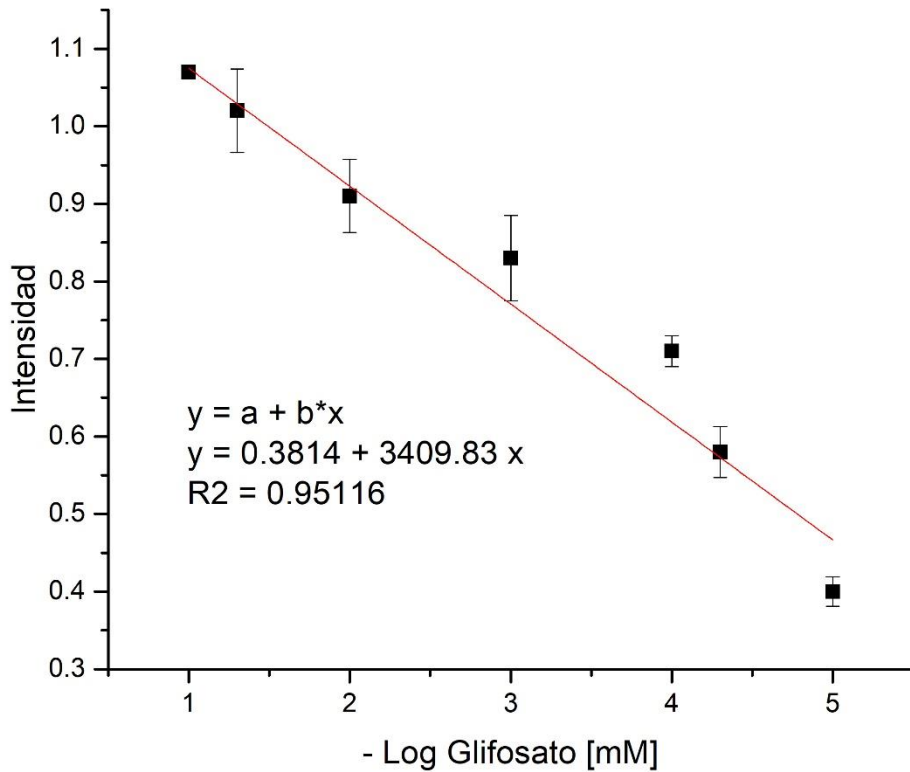


**Figura 24.** Banda Raman a  $1565\text{ cm}^{-1}$ . Glifosato en estado acuoso a diferentes concentraciones [0 a 0.1 mM] mediante SERS a una longitud de onda de  $\lambda$  532 nm. Elaboración propia 2017.

En un estudio realizado por Costa y cols. a través de esta técnica observaron la presencia de una banda a  $1590\text{ cm}^{-1}$ , que podría ser atribuida a la encontrada en este estudio destacando que sufre un fenómeno de desplazamiento debido al láser que se empleó, a la geometría de las partículas metálicas o a los parámetros de adquisición.

Posteriormente, en la **Figura 25** se muestra el gráfico trazado para el comportamiento del glifosato referente a la concentración vs intensidad normalizada. La señal SERS

denota una dependencia lineal dentro del intervalo de las primeras concentraciones de glifosato de 0.00001 a 0.1 mM. Se observó un coeficiente de correlación ( $R^2$ ) de, 0.95116.



**Figura 25.** Curva de calibración trazada para la concentración de glifosato. Elaboración propia, 2017.

Con dichos resultados se obtuvieron los límites de detección (LD) y de cuantificación (LQ) para esta región, siendo:  $LD = 1.67 \times 10^{-5}$  mM y  $LQ = 5.5 \times 10^{-5}$  mM. El LD y el LQ fueron calculados usando las siguientes ecuaciones:

$$LD = 3 \sigma / m \tag{Ec.3}$$

$$LQ = 10 \sigma / m \tag{Ec.4}$$

Donde  $\sigma$  es la desviación estándar de la respuesta, es decir, la intensidad de la banda del blanco y  $m$  es la pendiente de la curva de calibración.

El límite de detección obtenido mediante los substratos SERS activos (Si-Ag NPs) es similar a los obtenidos con los sistemas más sensibles que se han reportado para la detección de glifosato mediante SERS (**Tabla 12**).

Es importante mencionar, que la Espectroscopía Raman de Superficie Aumentada se utilizó por primera vez para la detección de glifosato por Costa et al., (2012) En sus resultados se muestra el análisis de glifosato en suspensión acuosa utilizando nanocubos de plata, aunque no se muestran los límites de cuantificación y detección, el sistema es reconocido como inestable debido a que las mediciones SERS que se realizan comúnmente en una solución coloidal de partículas metálicas que contiene al analito; son poco reproducibles por el constante movimiento de las nanopartículas en solución que ocasiona que estas entren y salgan del rayo láser enfocado. No obstante, se demostró que SERS es una herramienta útil que podría usarse en la detección de glifosato. En estudios más recientes, Sharma et al., (2016) desarrollaron un método para la fabricación de substrato SERS con nanoestructuras de plata dendríticas regulares sobre redes de Ag-Cu revestidas de carbono, que pueden usarse para la detección de glifosato obteniendo un límite de detección de 0.845 ppm. Sin embargo, durante la fabricación de los substratos se puede llegar a la formación de dendritas de cobre por la presencia del mismo lo que causa una reducción en la actividad plasmónica. Por su parte, Torul et al., (2010) usan una suspensión coloidal de nano-varillas de oro para la detección de glifosato, en sus resultados muestran un límite de detección de  $1 \times 10^{-14}$  ppm. Sin embargo, el oro muestra poca afinidad hacia la molécula del glifosato, aunado a esto, la inestabilidad que presenta el sistema debido a las mediciones en suspensión coloidal lo hace complicado. Así mismo Eleodoro et al., (2017) muestran en su investigación un límite de detección de 3.2 ppm. Sin embargo, el sistema se muestra inestable cuando se analizan concentraciones mayores a 400  $\mu\text{M}$  así mismo la desventaja en la repetibilidad de las mediciones debido a la utilización de plata coloidal.

*Tabla 12. Resumen de trabajos realizados en la detección de glifosato mediante SERS*

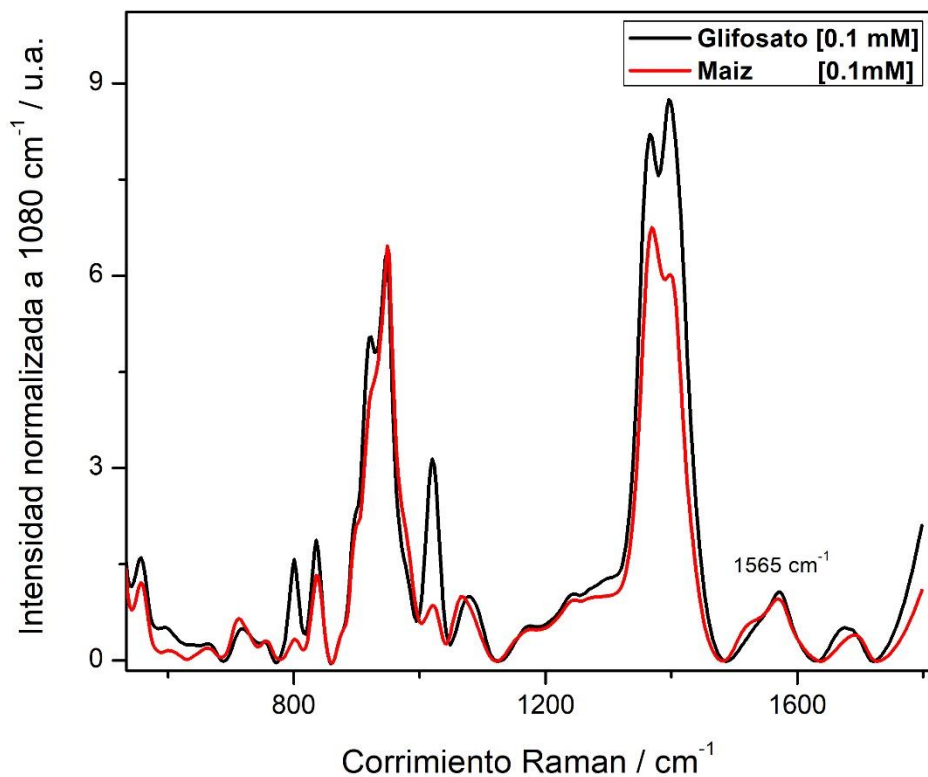
<b>Referencia</b>	<b>Substrato</b>	<b>Láser</b>	<b>Límite de detección</b>
Torul, Boyaci & Tamer, 2010.	Nano-varillas de oro (coloidal)	785 nm	$1 \times 10^{-14}$ ppm
Costa et al., 2012.	Nano-cubos de plata (coloidal)	632.8 nm	---
Sharma et al., 2016.	Nano estructuras dendríticas regulares de plata sobre redes de Ag-Cu revestidas de carbono	785 nm	0.845 ppm
Eleodoro, Muller & Fabris, 2017.	Nanopartículas de plata (coloidal)	632.8 nm	3.2 ppm

*Fuente: Elaboración propia 2017.*

#### **4.5 Detección de glifosato en maíz por SERS usando substratos de Si decorados con nanopartículas de Ag**

Una vez analizada la respuesta de los substratos SERS activos (Si-Ag NPs) para la determinación de glifosato en muestras sintéticas; para demostrar la aplicación del sensor (Si-Ag NPs) de glifosato en una muestra real, probamos la concentración de glifosato en muestras de maíz contaminadas intencionalmente. La **Figura 26** muestra las señales SERS de glifosato en granos de maíz obtenido con los substratos SERS activos (Si-Ag NPs). La recuperación fue del 90% para glifosato a 0.1 mM en granos de maíz.

Se procedió a evaluar la respuesta plasmónica del substrato activo SERS en muestras de maíz.



**Figura 26.** (—) Espectro Raman de Glifosato en estado acuoso a una concentración de [0.1 mM] y (—) espectro con muestra de maíz [0.1mM] a una longitud de onda de  $\lambda$  532 nm. Elaboración propia 2017.

En la **Tabla 13** se muestran los valores de la intensidad normalizada obtenida en la curva de calibración y la obtenida en las muestras de maíz.

**Tabla 13.** Comparación de los valores de obtenidos a partir de la curva de calibración (muestras sintéticas) y muestras de maíz

Concentración de Glifosato[mM]	Intensidad/normalizada (Curva de calibración)	Intensidad/normalizada (Muestra de maíz)
0.1mM	1.06	0.95

**Fuente:** Elaboración propia 2017.

Como se puede observar existe una gran similitud entre el valor obtenido de la intensidad normalizada en la concentración [0.1mM] a partir de la curva de calibración y la proveniente de la muestra de maíz. Asimismo, es posible afirmar que los substratos SERS poseen una alta sensibilidad para la detección de glifosato en muestras reales.

Finalmente, el haber logrado detectar de manera cuantitativa el glifosato sobre substratos SERS activos (Si-Ag NPs) es un resultado muy importante. Debido a que, se presenta un método para detectar este tipo de compuestos en diferentes compartimentos ambientales.

## 5. CONCLUSIONES

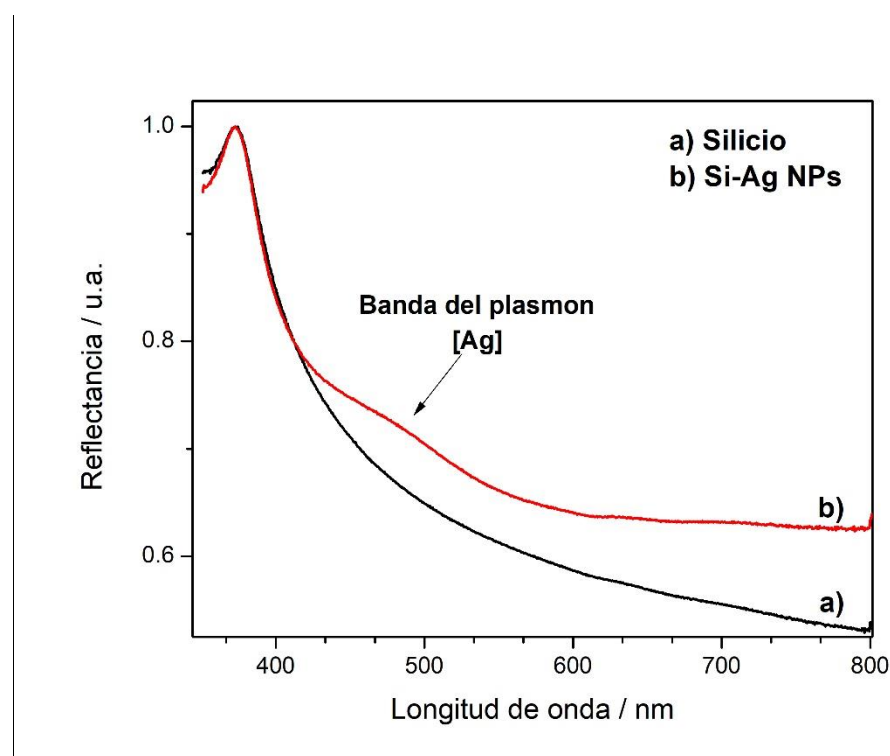
- La técnica de depósito químico es adecuada para la obtención de sustratos SERS de silicio con nanopartículas de plata [Si-Ag NPs]. Los depósitos son homogéneos sobre el sustrato, con un tamaño promedio de partícula de 22 nm +/- 3.9 nm.
- El glifosato presenta una banda SERS a  $1565\text{cm}^{-1}$  que permite la cuantificación del mismo. Se ha evidenciado una correlación lineal de la intensidad de esta banda con la concentración de glifosato, con un LD de  $1.67 \times 10^{-5}$  mM y un LC de  $5.5 \times 10^{-5}$  mM.
- Se ha desarrollado un procedimiento sencillo de extracción de extracto de maíz para su análisis por SERS. Éste, consiste en la remoción de glifosato sobre la superficie de los granos de maíz. Al analizar las muestras de esta forma, se logra identificar al glifosato a través de la banda de  $1565\text{ cm}^{-1}$ , cuya intensidad es comparable a la obtenida al estudiar soluciones de glifosato sin maíz.

## APÉNDICES

### Apéndice I. Caracterización del sustrato Si-Ag NPs mediante Reflectancia UV-Vis

Cuando la luz interactúa con las nanopartículas de un metal noble como la plata causa que los electrones de la banda de conducción oscilen a frecuencias específicas, todo esto como respuesta al campo magnético alternante, resultando colores brillantes y llamativos. Esta característica, es conocida como LSPR (Localized Surface Plasmon Resonance) y depende de la forma, tamaño, cantidad y espacio entre las nanopartículas.

Los sustratos utilizados en la presente tesis [Si-Ag NPs] se caracterizaron mediante la técnica de reflectancia por UV-Vis. La **Figura 27** muestra los espectros de reflectancia UV-Vis para el sustrato con nanopartículas de plata y para la oblea de silicio.

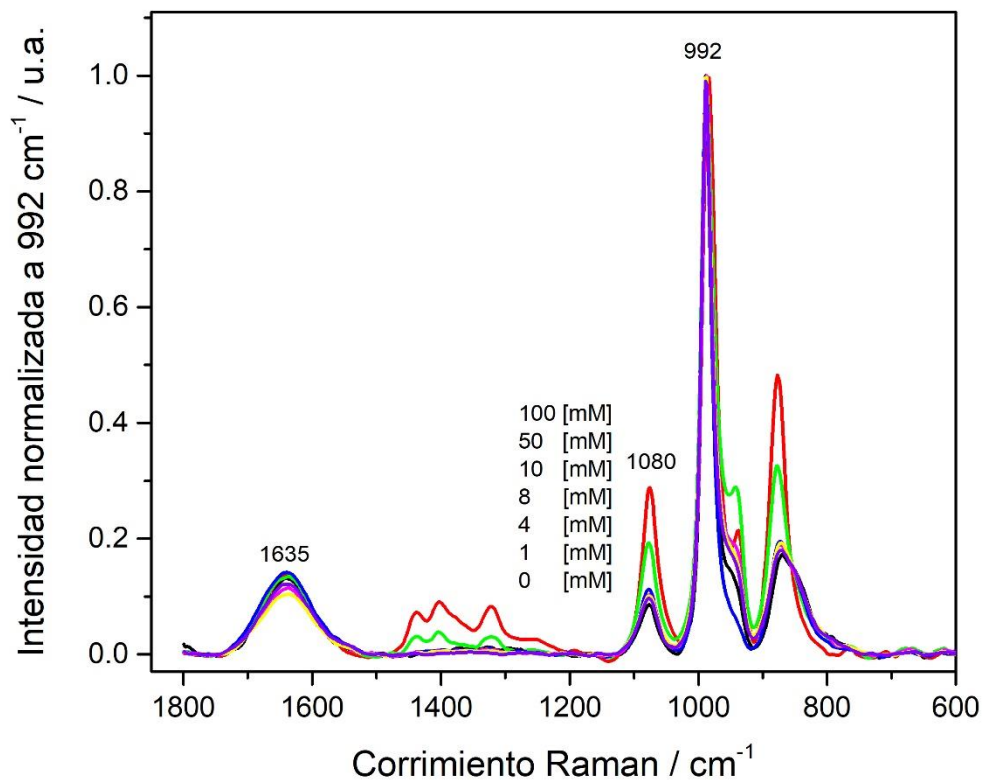


**Figura 27.** Espectro de Reflectancia UV-Vis de nanopartículas plata depositadas sobre silicio. Elaboración propia 2018.

Como se puede observar en la **Figura 27** el espectro correspondiente al sustrato denota la formación de la banda de plasmón de las nanopartículas de plata alrededor de 500 nm debido a ello en este estudio se decidió trabajar a esta longitud de onda.

**Apéndice II. Detección de glifosato acuoso pH 4 mediante Raman convencional**

A continuación, se muestran en la **Figura 28** los espectros que conciernen al comportamiento del glifosato acuoso a pH 4 mediante Raman convencional.



**Figura 28.** Espectro Raman de glifosato pH 4 en estado acuoso a diferentes concentraciones [0 a 100 mM] mediante Raman convencional a una longitud de onda de  $\lambda$  532 nm. Elaboración propia 2016.

Como se puede observar los espectros muestran la saturación del glifosato a partir de la concentración 10 mM por lo que no se logró detectar algún cambio en la intensidad para su cuantificación a este valor de pH mediante Raman convencional. Sin embargo, es importante mostrar dichos espectros.

## BIBLIOGRAFÍA

**Agrochemicals Desk Reference Environmental Data. (1993).** J.H. Montgomery. Lewis Pub.

**Ahmed, A.R., Tarek, M.M., Rady, A.R. y Mohamed, Y.H. (2009).** Dissipation of profenofos, imidacloprid and penconazole in tomato fruits and products. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 83, 812–817.

**Albert L. A. (1999).** La investigación sobre plaguicidas en México. Situación actual y perspectivas. III Congreso Mexicano de Toxicología. La toxicología en México, una visión hacia el nuevo milenio. Instituto Tecnológico de Sonora y Sociedad Mexicana de toxicología. Ciudad Obregón, Sonora. Pp- 13-14.

**Aldana, M.L., Valdez, S, Vargas, N.D., Salazar, N.J., Silveira, M.I., Loarca, F.G., Rodríguez, G., Wong, F.J., Borboa, J. y Burgos, A. (2008).** Insecticide residues in stored grains in Sonora, Mexico: quantification and toxicity testing. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 80, 93–96.

**Alsayeda, H., Pascal-Lorber, S., Nallanthigal, C., Debrauwer, L. y Laurent, F. (2008).** Transfer of the insecticide [14C] imidacloprid from soil to tomato plants. Environmental Chemistry Letters, 6, 229–234.

**Annetta, R., Habibib R. and Hontelaa A. (2014).** Impact of glyphosate and glyphosate-based herbicides on the freshwater environment. J. Appl. Toxicol. 34: 458–479. DOI 10.1002/jat.2997

**Araoud, M.; Douki, W.; Rhim, A.; Najjar, M.F.; Gazzah, N. (2007).** “Multiresidue analysis of pesticides in fruits and vegetables by gas chromatography-mass spectrometry”. Journal of Environmental Science and Health Part B. 42, 179-187.

**Araújo AS, Monteiro RT, Abarkeli RB. (2003).** Effect of glyphosate on the microbial activity of two Brazilian soils. Chemosphere 52:799–804

**Aroca, R. (2006).** Surface-enhanced Vibrational Spectroscopy. John Wiley & Sons, Chichester.

**ASERCA. (2013).** Granos y oleaginosas. Avance de siembra y cosechas. Cosechas Maíz-Primavera-Verano, 235, 15-21.

**Badreddine M., Legrouri A., Barroug A., De Roy A & Besse P. (1998).** Collection of Czechoslovak Chemical Communications. 63: 741.

**Badreddine M., Legrouri A., Barroug A., De Roy A & Besse P. (1998).** Materials Chemistry and Physics. 52: 235.

**Badreddine M., Legrouri A., Barroug A., De Roy A & Besse P. (1999).** Materials Letters. 38: 391.

**Battaglin W, Meyer M, Kuivila K, Dietze J. (2014).** Glyphosate and its degradation product AMPA occur frequently and widely in US soils, surface water, groundwater, and precipitation. J Am Water Resour Assoc 50:275–290

**Bellé R., Marc J., Mulner-Lorillon O., Boulben S., Hureau D. and Durand G. (2002).** Pesticide Roundup Provokes Cell Division Dysfunction at the Level of CDK1/Cyclin B Activation. Chem. Res. Toxicol., 15, 326–331.

**Benachour N., Sipahutar H., Moslemi S., Gasnier C., Travert C., Séralini E. (2007).** Time- and dose-dependent effects of roundup on human embryonic and placental cells. Arch Environ Contam Toxicology, 53, 126-33.

**Bevington R. (1969).** Data Reduction and Error Analysis for the Physical Sciences; McGraw-Hill: New York.

**Bickley I., Edwards M., Gustar R. & Rose J. (1991).** A vibrational spectroscopic study of nickel (II) citrate  $Ni_3(C_6H_5O_7)_2$  and its aqueous solutions. J. Mol. Struct. 246, 217-228.

**Braz-Mota S, Sadauskas-Henrique H, Duarte RM, Val AL, Almeida-Val M. (2015).** Roundup® exposure promotes gills and liver impairments, DNA damage and inhibition of brain cholinergic activity in the Amazon teleost fish *Colossoma macropomum*. Chemosphere 135:53–60

**Busse D., Ratcliff W., Shestak J. & Powers F. (2001).** Glyphosate toxicity and the effects of long-term vegetation control on soil microbial communities. *Soil Biol Biochem* 33:1777–1789

**Carrillo C., Simonet M., Valcárcel M. & Lendl B. (2012).** Determination of pesticides by capillary chromatography and SERS detection using a novel silver-quantum dots “sponge” nanocomposite. *J Chromatogr A* 1225:55–61

**Cao G. (2004).** *Nanostructures and Nanomaterials: Synthesis, Properties, and Applications*, (Imperial College Press, London,) pp. 51-109.

**CCM International (2011).** Outlook for China Glyphosate Industry 2012-2016

**Cessna, A. & Cain, N. (1992).** Residues of glyphosate and its metabolite AMPA in strawberry fruit following spot and wiper applications. *Canadian Journal of Plant Science*, 72, 1359-1365.

**Chang C., Simcik F. & Capel D. (2011).** Occurrence and fate of the herbicide glyphosate and its degradate aminomethylphosphonic acid in the atmosphere. *Environ Toxicol Chem* 30: 548-555.

**Codex Alimentarius. (2011).** Normas Alimentarias. Codex Alimentarius. FAO/OMS. [www.codexalimentarius.net/web/index\\_es.jsp](http://www.codexalimentarius.net/web/index_es.jsp)

**COFEPRIS. (2009).** Catálogo de plaguicidas. Recuperado de <http://www.cofepris.gob.mx/AZ/Paginas/Plaguicidas%20y%20Fertilizantes/CatalogoPlaguicidas.aspx>

**Corbera E., Kosoy N., Martinez Tuna M. (2007).** Equity implications of marketing ecosystem services in protected areas rural communities: Case studies from Meso-Amer.

**Costa, J., Ando R., Sant’Ana A., & Corio P. (2012).** Surface-enhanced Raman spectroscopy studies of organophosphorous model molecules and pesticides. *Rev. Phys. Chem. Chem. Phys.* 14, 1564515651.

**Cristobal G., Arbouet L., Sarrazin F., Talaga D., Bruneel L., Joanicot M. & Servant L. (2006).** Lab Chip 6. 1140–1146.

**Débarre, A., R. Jaffiol, C. Julien, P. Tchénio, and M. Mostafavi. (2004).** Raman scattering from single Ag aggregates in presence of EDTA. Chemical Physics Letters 386: 244–47.

doi:10.1016/j.cplett.2004.01.068

**Doebley, J. & Iltis, H. (1980).** Taxonomy of Zea (Gramineae) I. A subgeneric classification with key to taxa. Amer. J. Bot, 67, 982-993.

**Douheret G. (1968).** Liquid junction potentials and effects in mixed solvents (Water-Dipolar Aprotic Solvent). Application to the standardization of the glass-calomel electrodes system in these mixtures. dielectric properties of these mixtures. Bull. Soc. Chim. Fr. 8:3122–3131.

**Douheret G. (1967).** Study of the dissociation of organic compounds in hydro-organic media. Bull. Soc. Chim. Fr. 4:1412–1419.

**Duke O., Lydon J., Koskinen C., Moorman .B, Chaney L. & Hammerschmidt R. (2012).** Glyphosate effects on plant mineral nutrition, crop rhizosphere microbiota, and plant disease in glyphosateresistant crops. J Agr Food Chem 60:10375–10397

**EC. (2005).** EU legislation on MRLs. Recuperado de [https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/max\\_residue\\_levels/eu\\_rules\\_en](https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/max_residue_levels/eu_rules_en).

**Elbagerma A., Edwards M., Azimi H., Alajtal I. & Scowen J. (2010).** In situ monitoring of pH titration by Raman spectroscopy. Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc. 75(5):1403-1410.

**EPA. (2010).** Index to Pesticide Chemical Names, Part 180 Tolerance Information, and Food and Feed Commodities (by Commodity). Environmental Protection Agency.

**Eslava, P., Ramírez, W. y Rondón, I. (2007).** Sobre los efectos del glifosato y sus mezclas: impacto en peces nativos. Instituto de Acuicultura de los Llanos. Instituto de Investigaciones de la Orinoquia Colombiana, 34-43.

**FAO. (2010).** Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Límites máximos del Codex para residuos de plaguicidas. Disponible en <http://www.fao.org/waicent/faostat/Pest-Residue/pest-s.htm>.

**FAO. (2014).** Producción cultivos. 21/01/2016, de FAO Sitio web: <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/S>.

**Farm Chemicals Handbook. (1983).** Glyphosate.

**Farmer C. (1974).** Mineralogical Society Monograph 4: The Infrared Spectra of Minerals.

**Fleischman M. Hendra J. & McQuillan J. (1974).** Chemical Physics Letters, 26, 163-166

**Gairns T. & Baldwin R. (1995).** “Pesticide Analysis in Food by MS,” Analytical Chemistry, 67, 552R.

**Gao K., Choi N., Chang S., Kang H., Song M., Cho I., Lim W. & Choo J. (2010).** Highly sensitive trace analysis of paraquat using a surface-enhanced Raman scattering microdroplet sensor. Anal Chim Acta 681:87–91

**García R. (2011).** Interdisciplinarietà y sistemas complejos. Revista Latinoamericana de Metodología de las ciencias sociales. 1, 66-101.

**García, U. P. (2012).** La Alimentación de los Mexicanos. Cambios Sociales y Económicos, y su Impacto en los Hábitos Alimenticios. Cámara Nacional de la Industria de la Transformación (CANACINTRA) D.F., México. 162 p.

**García, A., Alarcón, E., Perroni Y, Barois I. (2014).** Earthworm communities and soil properties in shaded coffee plantations with and without application of glyphosate. Appl Soil Ecol 83:230–237

**GATS, Global Agricultural Trade System Online. (2016).** Departamento de Agricultura, USDA con datos del Departamento de Comercio, Buro de Censo.

**George J, Prasad S, Mahmood Z, Shukla Y., (2010).** Studies on glyphosate-induced carcinogenicity in mouse skin: a proteomic approach. J Proteomics, 73, 951-64.

**Ghule A., Murgan R. & Chang H. (2001).** Thermo-Raman studies on dehydration of  $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ . *Thermochim. Acta* 371: 127-135.

**Ghule A., Baskaran N., Murgan R. & Chang H. (2003).** Phase transformation studies of  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  by thermo-Raman and conductivity measurements. *Solid State Ionics* 161: 291 – 299.

**Gil M. A., C. Couoh, R. R. Mendoza, R. N. Gutiérrez, E. J. M. Figueroa & H. Arellano. A. (2004).** Maíz. En: Consejo Estatal de Ciencia y Tecnología y Fundación Produce Puebla. A.C. Cadenas Agroalimentarias. El papel estratégico de la tecnología y su prospectiva en el estado de Puebla. México. 87-100.

**Gioia R, Offenbergh JH, Gigliotti CL, Totten LA, Du SY, Eisenreich SJ. (2005).** Atmospheric concentrations and deposition of organochlorine pesticides in the US Mid-Atlantic region. *Atmos Environ* 39:2309–2322.

**Gleissman, S. (2008).** Importancia de los sistemas sostenibles para la producción de alimentos. Costa Rica. p.32.

**Global Herbicide Directory. (1994).** Glyphosate.

**Goldsborough G. & Brown D. (1988).** Effect of Glyphosate (Round-upR formulation) on periphytic algal photosynthesis. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 41: 253-260.

**Guerrini L, Sanchez-Cortes S, Cruz VL, Martinez S, Ristorib S, Feis A. (2011).** Surface-enhanced Raman spectra of dimethoate and omethoate. *J Raman Spectrosc* 42:980–985

**Guyton K., Loomis D., Grosse Y., Ghissassi F. & Benbrahim L. (2015).** Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate. *Lancet Oncol*, <http://www.thelancet.com/pdfs/journals/lanonc/PIIS1470-2045%2815%2970134-8.pdf>.

**Heitner C., Friedmann D., Goldschmidt H. & Shamin K. (1958).** *Bull. Soc. Chim. Fr.* 864. Available:<http://www.cem.msu.edu/~reusch/VirtualText/acidity2.htm> 2014

**Hendra P. (1998).** *International Journal Vibrational Spectroscopy*, 1, 6-16

**Herbicide Handbook WSSA. (1994).** Glyphosate. Illinois.

**Hildreth J. & Schmidt R. (2014).** Vapor phase metal-assisted chemical etching of silicon. *Adv. Funct. Mater.* 24. 3827-3833.

**Horth H. & Blackmore K. (2009).** Survey of glyphosate and AMPA in groundwaters and surface waters in Europe. Report by WRc plc, Swindon, Wiltshire, United Kingdom No: UC8073 2

**Huang Z., Geyer N., Werner P., de Boor J. & Gösele U. (2011).** *Adv. Mater.* 23. 285-308.

**Huebner A., Sharma S., Srisa-Art M., Hollfelder F., Edel B. & Demello J. (2008).** *Lab Chip* 8. 1244–1254.

**Jaramillo F., Meléndrez E. & Aldana, L. (2009).** *Toxicología de los Plaguicidas.* México; D.F.: Jaramillo, F., Rincón, A.R. y Rico, R.M.

**Jauhiainen A, Rasanen K, Sarantila R, Nuutinen J, Kangas J. (1991).** Occupational exposure of forest workers to glyphosate during brush saw spraying work. *Am Indust Hyg Assoc J* 52:61–64.

**Jokerst C., Emory M. & Henry S. (2012).** Advances in microfluidics for environmental analysis. *Analyst* 137:24–34

**Jugheimer W. (1988).** Maíz, variedades mejoradas, métodos de cultivo y producción de semilla. México: Limusa.

**Kato A., Mapes C., Mera L., Serratos J. & Bye R. (2009).** Origen y Diversificación del Maíz: Una Revisión Analítica. Universidad Nacional Autónoma de México, Comisión Nacional para el Uso y Conocimiento de la Biodiversidad. México; D.F: Apolo, S.A. de C.V.

**King, J. & Wagner, R. (2010).** Toxic Effects of the Herbicide Roundup Regular on Pacific Northwestern Amphibians. *Northwestern Naturalist.* 91. 318-324. 10.2307/40983228.

**Kintsés B., van Vliet D., Devenish S. & Hollfelder F. (2010).** *Curr. Opin. Chem. Biol.* 14:548–555.

**Kneipp K., Moskovits M. & Kneipp, H. (2006).** Surface-Enhanced Raman Scattering Physics and Applications, Springer

**Li F., Tian D., Li B., Anema R., Yang L., Ding Y., Wu F., Zeng M., Chen Z., Ren B., Wang L. & Tians Q. (2013).** Surface analysis using shell-isolated nanoparticle-enhanced Raman spectroscopy. *Nat Protoc* 8(1):52–64.

**Liu M., Zhao M., Chen S., Yu T. & Quan X. (2012).** Colloidal graphene as a transducer in homogeneous fluorescence-based immunosensor for rapid and sensitive analysis of microcystin-LR. *Environ Sci Technol* 46:12567–12574.

**Liu Y., Su X., Zhang B., Jiang B. & Yan B. (2011).** Nanoparticlebased strategies for detection and remediation of environmental pollutants. *Analyst* 136:872–877.

**López, M. (2007).** Antiguas Representaciones del Maíz. CONACULTA/Archivo General de la Nación. D.F., México. 89 p.

**Lorenzatti E.; M.I. Maitre. A. Lenardón, R. Lajmanovich; P. Peltzer & M. Anglada. (2004).** “Pesticides Residues in Immature Soybeans of Argentina Croplands”. *Fresenius Environmental Bulletin*, 13, 675-678.

**Lorenzatti E. (2006).** “Estudio de Residuos de Endosulfán y Glifosato en la Producción y Procesado de Soja Transgénica (*Glycine max*). Tesis Doctoral. Univers. Politécnica de Valencia. Departamento de Tecnología de Alimentos. España 216 pag.

**Ma Y., X. Liao, G. Kong and J. Chu. (2000).** *Sci. China, Ser. A: Math., Phys., Astron.*, 43, 414

**MacCarthy P. et al. (1995).** “Water Analysis,” *Analytical Chemistry*, 67, 525R.

**Maeder M. & Yorck N. (2006).** *Practical data analysis in chemistry.* Elsevier Science, Oxford.

**Marquardt W. (1963).** An algorithm for least-squares estimation of nonlinear parameters. *J. Sot. Ind. Appl. Math.* 11, 431-441.

**Meihui J., Wanying S., Yang L., Moran G., Yong T., Liwei L., Changli L., Xihe Z., Zhenfang M. & Hong-xing C.(2012).** Raman Spectrum Calculation and Analysis of glyphosate. *IEEE*, 978, 269-272.

**Mercurio P, Flores F, Mueller F, Carter S, Negri P. (2015).** Glyphosate persistence in seawater. *Mar Pollut Bull* 85:385–390

**Mesnager, R., Defarge, N., Spiroux de Vendômois, J., Séralini, E. (2015).** Potential toxic effects of glyphosate and its commercial formulations below regulatory limits. *Food and Chemical Toxicology*, 84, 133–153. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.08.012>

**Mesnager, R., Renney G., Séralini G., Ward M & Antoniou M. (2016).** Multiomics reveal non-alcoholic fatty liver disease in rats following chronic exposure to an ultra-low dose of Roundup herbicide. *Rev. Scientific Reports*. 7, 1-14.

**Mezcua, M.; Ferrer, C.; García-Reyes, J. F.; Martínez-Bueno, M. J.; Sigrist, M.; Fernández-Alba, A. R. (2009).** “Analyses of selected non-authorized insecticides in peppers by gas chromatography/mass spectrometry and gas chromatography/tandem mass spectrometry”. *Food Chemistry*. 112, 221-225.

**Moskovits, M. (1985).** *Reviews of Modern Physics*, 57, 783-826

**Nakamoto K. (1978).** *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Co-ordination Compounds*, 4th ed., Wiley, New York.

**Nakamoto K. (1986).** *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*, 4th Edition, Wiley, New York.

**Obour, K., Stahlman, W. and Holman, D. (2016).** Soil chemical properties as influenced by long-term glyphosate-resistant corn and soybean production in the central Great Plains, USA. *Geoderma* 277. 1-9.

**Olea N. & Fernández M. (2001).** Plaguicidas persistentes. *Laboratorio de Investigaciones Médicas, Hospital Clínico Universidad de Granada*. 1-18.

**Otto, A.; Mrozek, I.; Grabhorn, H. and Akemann, W. (1992).** Journal of Physics: Condensed Matter, 4, 1142-1212

**Paik, W., Han, S., Shin, W. and Kim Y. (2003).** Adsorption of carboxylic acids on gold by anodic reaction. Langmuir, 19, 4211-4216.

**Paliwal, R., Granados, G., Lafitte, R. & Violic, A. (2001).** El maíz en los trópicos: Mejoramiento y producción. Roma: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.

**Pardanaud C., Aréou E., Martin C., Ruffe R. & Angot T. (2012).** Raman microspectroscopy as a tool to measure the absorption coefficient and the erosion rate of hydrogenated amorphous carbon films heat-treated under hydrogen bombardment. Diamond and Related Materials. 22: 92–95.

**Pinto C., Neufeld R., Ribeiro, J. & Veiga,F. (2006).** Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine; 2; 8-21

**Polman A. & Atwater A. (2005).** Materials Today, 8, 56

**Poulsen, M. E. & Andersen, J. H. (2003).** “Results from the monitoring of pesticide residues in fruit and vegetables on the Danish market, 2000-01”. Food Additives and Contaminants. 20, 742-757.

**Raman V. & Krishnan K. (1928).** “A new of type of secondary radiation”. Nature, 121; 365.

**Rao M. & Narayanaswamy K. (1970).** Infrared spectrum of anhydrous citric acid in the solid state. Indian. J. Phy. 44:34-38.

**Ritchie H. (1957).** Physical Review, 106, 874-881.

**Sánchez-De León, Y., De Melo, E., Soto, G., Johnson-Maynard, J., & Lugo-Pérez, J. (2006).** Earthworm populations, microbial biomass and coffee production in different

experimental agroforestry management systems in Costa Rica. *Caribbean Journal of Science*, 42(3), 397-409.

**Sánchez E. & Ortiz L. (2011).** Riesgos y estrategias en el uso de plaguicidas. *Inventio*, 14, 21-27.

**Sánchez J., Goodman M. & Stuber C. (2000).** Isozymatic and morphological diversity in the races of maize of Mexico. *Econ.c Bot*, 54, 43-59.

**Sansom M. (2012).** Glyphosate use in the amenity sector. Presentation by Monsanto to the Amenity Forum. Available at [www.amenityforum.co.uk](http://www.amenityforum.co.uk)

**Saunders E. & Pezeshki R. (2015).** Glyphosate in runoff waters and in the root-zone: A review *toxics* 3:462–480

**Saute B., Premasiri R., Ziegler L. & Narayanan R. (2012).** Gold nanorods as surface enhanced Raman spectroscopy substrates for sensitive and selective detection of ultra-low levels of dithiocarbamate pesticides. *Analyst* 137:5082–5087.

**Schlücker S. (2011).** *Surface enhanced Raman spectroscopy*, Wiley-VCH.

**Servoss R. & Clark M. (1957).** Vibrational spectra of normal and isotopically labelled boric acid. *J Chem Phys* 26:1175–1178.

**Shang Y., Qi L. & Wu Y. (2012).** Functionalized manganese-doped zinc sulfide quantum dot-based fluorescent probe for zinc ion. *Microchim Acta* 177:333–339.

**Sherma, J. (1995).** “Pesticides,” *Analytical Chemistry*, 67, 1R.

**Shigeru Y. & Shuichi D. (2003).** Raman spectroscopic study on the behavior of boric acid in Wood. *J Wood Sci* (2003) 49:227–234.

**SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. (2007).** *Situación Actual y Perspectivas del Maíz en México 1996 - 2012*. México, D.F: Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA).

**SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (2011).** Cierre de la producción agrícola por cultivo. Disponible en: [http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com\\_wrapper&view=wrapper&Itemid=215](http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=215) (Diciembre 2015).

**Smith E. & Dent G. (2005).** Modern Raman Spectroscopy – A Practical Approach, John Wiley & Sons.

**Solvas X. & DeMello A. (2011).** Chem. Commun. 47. 1936–1942.

**Song H., Chen L. & Ismagilov F. (2006).** Angew. Chem. Int. Ed. 45. 7336–7356.

**Szekacs A. and Darvas B. (2012).** Forty Years with Glyphosate, Herbicides - Properties, Synthesis and Control of Weeds, Dr. Mohammed Nagib Hasaneen (Ed.), ISBN: 978-953-307-803-8, InTech, Available from:.

**The Pesticide Manual. (1994).** Glyphosate.

**Torul, H., Boyaci I & Tamer U. (2010).** Attomole Detection of Glyphosate by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Using Gold Nanorods. Rev. Pharm. Sci., 35, 179-184.

**Vázquez, L. (2004).** Experiencia de Cuba en la inserción del control biológico al manejo integrado de plagas. Manejo integrado de plagas en una agricultura sostenible, RAAA, Lima, Perú, 167-187.

**Vijay K. (2010).** Glyphosate resistance in crops and weeds. Ed. Jhon Wiley & Sons, INC., Publication. New Jersey. pp 6-9.

**Vongsvivut J, Robertsona EG, McNaughton D. (2010).** Surfaceenhanced Raman spectroscopic analysis of fonofos pesticide adsorbed on silver and gold nanoparticles. J Raman Spectrosc 41:1137–1148

**Wang J., Kong T., Guo Z., Xua Y. & Liu H. (2010).** Synthesis of novel decorated one-dimensional gold nanoparticle and its application in ultrasensitive detection of insecticide. J Mater Chem 20:5271–5279

**Willems A., & Van Duyne, P. (2007).** Localized Surface Plasmon Resonance spectroscopy and sensing, *Annu. Rev. Phys. Chem.* 58, 267–297.

**Wokaun, A. (1985).** *Molecular Physics*, 56, 1-33

**Woodburn A. T. (2000).** Glyphosate: production, pricing and use worldwide. *Pest Management Science*, 56, 309–312.

**Xie F., Mukamurezi G., Sun Y., Wang Y., Qian H. & Yao R. (2012).** Establishment of rapid detection method of methamidophos in vegetables by surface enhanced Raman spectroscopy. *Eur Food Res Technol* 234:1091–1098

**Yazdi H. & White M. (2013).** Multiplexed detection of aquaculture fungicides using a pump-free optofluidic SERS microsystem. *Analyst* 138:100–103

**Yuan C., Liu Y., Wang W., Han M., Han Y., Jiang L. & Zhang P. (2011).** Single clusters of self-assembled silver nanoparticles for surface-enhanced Raman scattering sensing of a dithiocarbamate fungicide. *J Mater Chem* 21:16264–16270.

**Yu-Tai, T. (1993).** Structural comparison of self-assembled monolayers of n-alkanoic acids on the surfaces of silver, copper, and aluminium. *J. Am. Chem. Soc.*, 115, 4350-4358.

**Zeng S., Baillargeat D., Ho P. & Yong T. (2014).** *Chemical Society Reviews*, 43, 3426-3452.

**Zheng Q., Yang Z., Pu H. & Zhang D. (2009).** Carbon nanotubebased DNA biosensor for monitoring phenolic pollutants. *Microchim Acta* 166:21–26.