



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
INSTITUTO DE CIENCIAS
POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES



"La Tierra no es de nosotros, nosotros somos de la Tierra"

Desarrollo de un método para la detección y cuantificación del plaguicida glifosato y su aplicación en muestras de agua de San Simón Atzitzintla, Puebla.

TESIS

Que para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS AMBIENTALES

Presenta

ALINE ROMERO NATALE

Director de tesis:
Dr. Eduardo Torres Ramírez

Diciembre 2019



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
INSTITUTO DE CIENCIAS
POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES



"La Tierra no es de nosotros, nosotros somos de la Tierra"

Desarrollo de un método para la detección y cuantificación del plaguicida glifosato y su aplicación en muestras de agua de San Simón Atzitzintla, Puebla.

TESIS

Que para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS AMBIENTALES

Presenta

ALINE ROMERO NATALE

Comité tutorial:

Director y Tutor	Dr. Eduardo Torres Ramírez
Integrante Comité Tutorial	Dra. Adela Irmene Ortiz López
Integrante Comité Tutorial	Dr. Ricardo Munguía Pérez
Integrante Comité Tutorial	Dra. María Guadalupe Tenorio Arvide
Integrante Comité Tutorial	Dr. Manuel Huerta Lara
Integrante Comité Tutorial	Dra. Alía Méndez Albores

Diciembre 2019

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto de investigación fue financiado por Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con el No. de beca 494272.

Gracias a la Dra. Ilaria Palchetti por permitirme realizar la estancia en el departamento de química “Ugo Schiff” de la Universidad de Florencia, también agradezco a la Dra. Marcela Ayala por permitir el uso de los recursos de supercomputación de la UNAM para realizar los cálculos teóricos, optimizaciones de geometría y análisis de frecuencia (Proyecto LANCAD-UNAM-DGTIC-293).

También quiero agradecer a la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrados (VIEP) por el apoyo otorgado dentro del Programa IV. Investigación y Posgrado. con No. de oficio VIEP/2423/2019, así como al Posgrado en Ciencias Ambientales y al Instituto de Ciencias (ICUAP) por las facilidades en las gestiones de apoyo que siempre me brindaron.

Contenido

1. INTRODUCCIÓN	8
La necesidad del uso de los plaguicidas	8
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	11
3. JUSTIFICACIÓN.....	15
4. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN	16
5. HIPÓTESIS.....	16
6. OBJETIVOS	16
6.1 Objetivo General	16
6.2 Objetivos Particulares	16
7. MARCO TEÓRICO.....	17
7.1 Plaguicidas	17
7.2 Glifosato.....	17
7.2.1 Producción.....	19
7.2.2 Usos.....	21
7.3 Aspectos toxicológicos del glifosato.....	22
7.3.1 Intoxicaciones por glifosato	23
7.3.2 Toxicodinámia y toxicocinética del glifosato	23
7.3.3 Mutagenicidad.....	24

7.3.4 Carcinogenicidad.....	26
7.4 Presencia del glifosato en los diferentes compartimentos ambientales.....	27
7.4.1 Suelo.....	27
7.4.2 Aire.....	28
7.4.3 Agua.....	29
7.4.4 Seres humanos.....	30
7.5 Persistencia de glifosato en diferentes compartimentos ambientales.....	31
8. DESARROLLO DEL MÉTODO PARA LA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE GLIFOSATO EN AGUA.....	35
8.1 Métodos instrumentales de detección de glifosato en agua.....	35
8.2 MATERIALES Y MÉTODOS	38
8.2.1 Método con lacasa.....	38
8.2.1.1 Actividad catalítica estándar de la lacasa	38
8.2.1.2 Determinación de la inhibición enzimática por el glifosato	39
8.2.1.3 Optimización de las condiciones de inhibición	39
8.2.1.4 Diseño Central Compuesto (DCC).....	39
8.2.2 Método con Bis 5-Fenildipirrinato de níquel (II).....	40
8.2.2.1 Síntesis del compuesto Bis 5-Fenildipirrinato de níquel (II) [Ni(PhDP) ₂].....	41
8.2.2.2 Interacción entre el compuesto [Ni(PhDP) ₂] con glifosato	42
8.2.2.3 Estequiometría del complejo.....	42

8.2.2.4 Determinación de la constante de disociación (K_d).....	42
8.2.2.5 Análisis en muestras de agua.....	43
8.2.2.6 Interferentes.....	43
8.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	44
8.3.1 Detección de glifosato con lacasa	44
8.3.1.1 Velocidad de reacción	44
8.3.1.2 Perfil catalítico de la lacasa contra cambios de pH	45
8.3.1.3 Constantes cinéticas	46
8.3.1.4 Efecto inhibitorio del glifosato en la enzima.....	46
8.3.1.5 Optimización de la detección	48
8.3.2 Detección con Bis 5-Fenildipirrinato de níquel (II) $[Ni(PhDP)_2]$	52
8.3.2.1 Síntesis y caracterización del compuesto $[Ni(PhDP)_2]$	52
8.3.2.2 Estequiometría.....	54
8.3.2.3 Constante de disociación (K_d)	55
8.3.2.4 Selectividad del método	56
8.3.2.5 Análisis de muestras de aguas fortificadas con glifosato	57
8.4 CIFRAS DE MÉRITO DEL MÉTODO DESARROLLADO	61
9. VIDA SOCIAL DE LOS CAMPESINOS DE SAN SIMÓN ATZITZINTLA Y SU RELACIÓN CON EL GLIFOSATO EN EL AGUA	63
9.1 Cultura Campesina.....	63

9.2 MATERIALES Y METODOS	64
9.2.1 Zona de estudio	64
9.2.2 Detección de glifosato en agua de diferentes matrices de San Simón Atzizintla por el método ELISA	69
9.2.3 Técnicas de recolección de datos	69
9.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	70
9.3.1 Campesinado y transmisión de saberes de generación en generación en los grupos familiares de San Simón Atzizintla.....	70
9.3.2 Grado marginación y pobreza de San Simon Atzizintla	73
9.3.3 Tipos de cultivo y plaguicidas más utilizados.....	76
9.3.4 Glifosato en agua de la localidad de San Simón Atzizintla	85
9.3.5 Estado actual de la PTAR en San Simón Atzizintla.....	86
10. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	90
11. REFERENCIAS	92
12. ANEXOS.....	114
12.1 ANEXO 1. Detección espectrofotométrica de glifosato en agua por formación de complejo entre bis 5-fenildipirrinato de níquel (II) y glifosato.....	114
12.3 ANEXO 3. Un método espectroscópico simple para determinar dimetoato en muestras de agua por formación complejo.....	131
12.4 ANEXO 4. Guía de entrevista.....	153

“Desarrollo de un método para la detección y cuantificación del plaguicida glifosato y su aplicación en muestras de agua de San Simón Atzitzintla, Puebla”

1. INTRODUCCIÓN

La necesidad del uso de los plaguicidas

El aumento incontrolado de la población ha traído una clara amenaza mundial en el desarrollo económico, social e incluso para la sostenibilidad ambiental. En 2019 se registró una población de 7.7 billones de habitantes, la cual se estima que aumente a 11 billones de personas en 2055 (United Nations, 2019). El aumento de la población exige constantemente mejorar los sistemas de abastecimiento de alimentos (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, 2009). Tal como ocurrió a nivel mundial (incluido México) en la década de 1950, con la llamada revolución verde, debido al aumento en las tendencias demográficas de la población, fue necesario implementar un programa de desarrollo agrícola con el fin de aumentar las tasas de productividad a partir de una producción extensiva a gran escala, aplicando paquetes tecnológicos con plaguicidas sintéticos, sistemas de riego, semillas mejoradas, entre otros (Grieve et al., 2019). Con el objetivo de abastecer las necesidades de alimentos de la población y que a su vez generara beneficios económicos y políticos (Keswani, Dilmashin, Birla, & Singh, 2019). A pesar de que han transcurrido más de 60 años de la llegada de la revolución verde, hoy en día continúan vigentes los paquetes tecnológicos a base de plaguicidas sintéticos, siendo México uno de los países que más consume plaguicidas sintéticos (Chilón Camacho, 2017).

Sin duda el uso de plaguicidas sintéticos en la agricultura ha ayudado a incrementar la producción de alimentos; sin embargo, el uso de estos productos también ha generado un devastador impacto en los recursos naturales y en la salud humana (Pesticide Action Network Europe, 2018). La implementación de la agricultura extensiva a partir de plaguicidas sintéticos fue con el objetivo de aumentar las tasas en la producción de alimentos para abastecer las necesidades humanas. Pero a pesar de que en 2018 de acuerdo al reporte global de las Naciones Unidas se produjo una cantidad suficiente para alimentar a toda la población mundial, ocurrió la peor crisis de seguridad alimenticia, puesto que más de 113 millones de personas en 53 países experimentaron hambre aguda, revelando que el uso de plaguicidas sintéticos, entre otros paquetes tecnológicos agrícolas no han contribuido a reducir el hambre mundial, debido a que los alimentos se aglomeran

principalmente en países industriales, concluyendo que la agricultura extensiva y el uso de plaguicidas sintéticos no son la solución para producir la cantidad de alimentos necesarios para satisfacer las necesidades humanas, ni mucho menos para combatir el hambre mundial (Food Security Information Network, 2019).

Un plaguicida se define como una sustancia natural o sintética o inclusive una mezcla de estas destinada a prevenir, controlar o destruir todo aquello que se considere como una plaga, (Thundiyil, Stober, Besbelli, & Pronczuk, 2008) incluyendo a todos aquellos vectores (mamíferos, pájaros, artrópodos e insectos) denominados como causantes de enfermedades humanas y animales o simplemente indeseables por causar algún tipo de daño o interferencia en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o también en la comercialización de alimentos para humanos o animales, así como otros productos agrícolas y ganaderos (Hancock et al., 2008). El término plaguicida también incluye, a todas las sustancias que son destinadas para ser usadas como reguladoras del crecimiento de las plantas, con características defoliantes y desecantes, siendo también agentes para reducir la densidad de fruta, o evitar su caída prematura. Siendo los plaguicidas todas las sustancias aplicadas a los cultivos antes o después de la cosecha para proteger al producto contra su deterioro durante el almacenamiento y transporte (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, 2009).

Los plaguicidas constituyen una herramienta importante en el desarrollo de la agricultura y su uso ha contribuido a aumentar la producción de alimentos y materias primas (Satorre, 2005). Los primeros plaguicidas de origen sintético se formularon entre los años 1930 y 1940, como resultado de investigaciones que estaban enfocadas originalmente al desarrollo de armas químicas, los cuales fueron probados por primera vez en insectos (Molina, 2013).

Uno de los primeros plaguicidas sintéticos que se creó fue el diclorodifeniltricloroetano, mejor conocido como DDT, fue sintetizado por Zeidler en 1874, y sus propiedades insecticidas fueron descritas por Paul Müller en 1939. El DDT se utilizó por primera vez durante la segunda Guerra Mundial con el propósito de proteger a los soldados estadounidenses contra enfermedades transmitidas por los mosquitos causantes de malaria y se comercializó en los EE.UU. en 1945 (J. Kim et al., 2015). Donde la industrialización, los intereses económicos de los grandes productores de plaguicidas, así como la necesidad de controlar a las plagas, rápidamente favoreció su fabricación y consumo a escala mundial (Frederick Rowe, 2019).

La introducción de los plaguicidas en México fue apoyada por fuertes inversiones internacionales durante la revolución verde, con el fin de convencer a las autoridades de que el uso de plaguicidas era un camino rápido y seguro para “modernizar” la agricultura mexicana. El gobierno mexicano contribuyó a su prosperidad otorgando fuertes contribuciones a los insumos para convencer a los grandes agricultores que las variedades de alto rendimiento y el uso masivo de agroquímicos les serían muy redituables (Lilia Albert, 2005).

Entre los apoyos internacionales más importantes a esta revolución destaca el que dio la Fundación Rockefeller a las escuelas más reconocidas de agronomía del país con el fin de destacar los monocultivos de especies híbridas de alto rendimiento, así como el uso intensivo de plaguicidas sintéticos y fertilizantes. Promoviendo a los plaguicidas como métodos para mejorar la productividad agrícola, dando como resultado la formación de muchas generaciones de agrónomos mexicanos que conocieran estos métodos de manera exclusiva o predilecta (Ortíz, Irmene; Avila-Chavez, Marco A; Torres, 2013).

Para México en 2009, el mercado de plaguicidas fue aproximadamente de 700 millones de dólares, lo cual representó un incremento del 5% anual dentro de los 5 años previos. En 2011 de los plaguicidas registrados ante COFEPRIS (Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios), alrededor del 90% fueron de origen químico y únicamente el 10% de origen biológico; de estos el 4% eran extremadamente tóxicos, 9% altamente tóxicos, 22% moderadamente tóxicos, y el 65% ligeramente tóxicos (COFEPRIS, 2012).

Hoy en día son evidentes los efectos de los plaguicidas sobre la salud del ser humano, animales, plantas y el medio ambiente (Lee, den Uyl, & Runhaar, 2019). Independientemente de sus beneficios, es evidente que los plaguicidas son sustancias químicas deliberadamente tóxicas, creadas para interferir en sistemas biológicos, careciendo de una selectividad real (Del Puerto, Suárez, & Palacio, 2014). Afectando simultáneamente en mayor o menor grado, tanto a la humanidad como a otras categorías de seres vivos (Özkara, Akyil, & Konuk, 2016). Por todo lo anterior, en este trabajo se aborda una breve descripción de la situación actual de los plaguicidas, particularmente en el herbicida glifosato, el cual es catalogado mundialmente como el plaguicida más utilizado, haciendo hincapié en la necesidad de desarrollar métodos para su detección de manera rápida y sensible en el compartimiento ambiental agua.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En México se encuentran registrados alrededor de 900 formulaciones de plaguicidas, de los cuales anualmente se rocían entre 395 y 13,163 toneladas en cultivos que son de consumo cotidiano para los mexicanos como maíz, tomate, frijol, papa, etc., (Hernández-Antonio & Hansen, 2011). Dentro de los estados con mayor consumo de plaguicidas se encuentra: Sinaloa, Veracruz, Jalisco, Nayarit, Colima, Sonora, Baja California, Tamaulipas, Michoacán, Tabasco, Estado de México, Puebla y Oaxaca, que usan hasta un 80% de las 900 formulaciones de plaguicidas (L Albert, 2005; Bejarano et al., 2017a), inclusive se ha llegado a reportar el uso de 24 plaguicidas prohibidos por la Secretaría de Salud y 13 de uso restringido en cultivos y en zonas urbanas en estos estados (Bejarano et al., 2017b).

La información a detalle en cuanto al volumen y tipos de plaguicidas que se aplican anualmente en los campos agrícolas, así como el grado de contaminación orgánica es prácticamente inexistente (Mendoza Cantú & Ize Lema, 2017), sin mencionar la falta de normas y regulaciones de muchos plaguicidas que se usan ampliamente como el glifosato. Dentro de las Norma Oficiales Mexicanas existe la NOM-201-SSA1-2015, la cual establece las concentraciones que deben de cumplir el agua y hielo para consumo humano, fijando un límite máximo permisible para glifosato de 0.1 mg/L. Por otro lado el glifosato en México aún continúa dentro de la clasificación toxicológica IV (ligeramente tóxico) (Cicoplafest, 2004), mientras que en países como Italia, Francia y Dinamarca está prohibido o es de uso restringido (Malkanathi, Sandareka, Wijerathne, & Sivashankar, 2019).

El problema ambiental producido por el glifosato, y en general los plaguicidas es muy complejo, debido a que intervienen diferentes sectores, los cuáles se relacionan íntimamente, como es la parte cultural que desde la introducción del glifosato en el mercado (1960), en pocos años se ha cambiado la forma de preparar las tierras antes de ser cultivadas, hoy en día simplemente con rociar el plaguicida en el área a cultivar es suficiente para que en unas horas quede listo para ser cultivado, por lo que la aplicación de glifosato se vuelve una técnica más rápida, sencilla y económica. Debido a su gran efectividad se ha convertido en el plaguicida más vendido en el mundo, generando una gran cantidad de intereses monetarios a nivel mundial por empresas agrícolas transnacionales como Monsanto (hoy en día Bayer) (Dill et al., 2010). Actualmente en México no existen normativas o políticas que prohíban o restrinjan el uso de este plaguicida, por lo que su venta continúa en el mercado sin ninguna restricción. El uso de glifosato se ha caracterizado por ser un herbicida eficiente de amplio espectro, donde estos factores fueron clave para desarrollar semillas

modificadas genéticamente para ser resistentes especialmente al glifosato (Beckie, Busi, Bagavathiannan, & Martin, 2019). Sin embargo el uso desmedido del glifosato ha provocado una gran cantidad de afectaciones en la salud humana, animal, así como un ruinoso deterioro de los recursos ambientales (Fernandes et al., 2019a; G. E. Séralini, Mesnage, Defarge, & Spiroux de Vendômois, 2014; Xu, Smith, Smith, Wang, & Li, 2019), lo cual ha provocado múltiples movimientos sociales a escala mundial para prohibir el glifosato, junto con las semillas transgénicas resistentes a éste herbicida (Klein & Agroecology, 2017) (Figura 1). Por lo tanto, la interrelación de los distintos sectores, hace necesario que la atención requerida para combatir este problema complejo sea a diferentes niveles (político, social, ambiental, académico, cultural, tecnológico, entre otros).

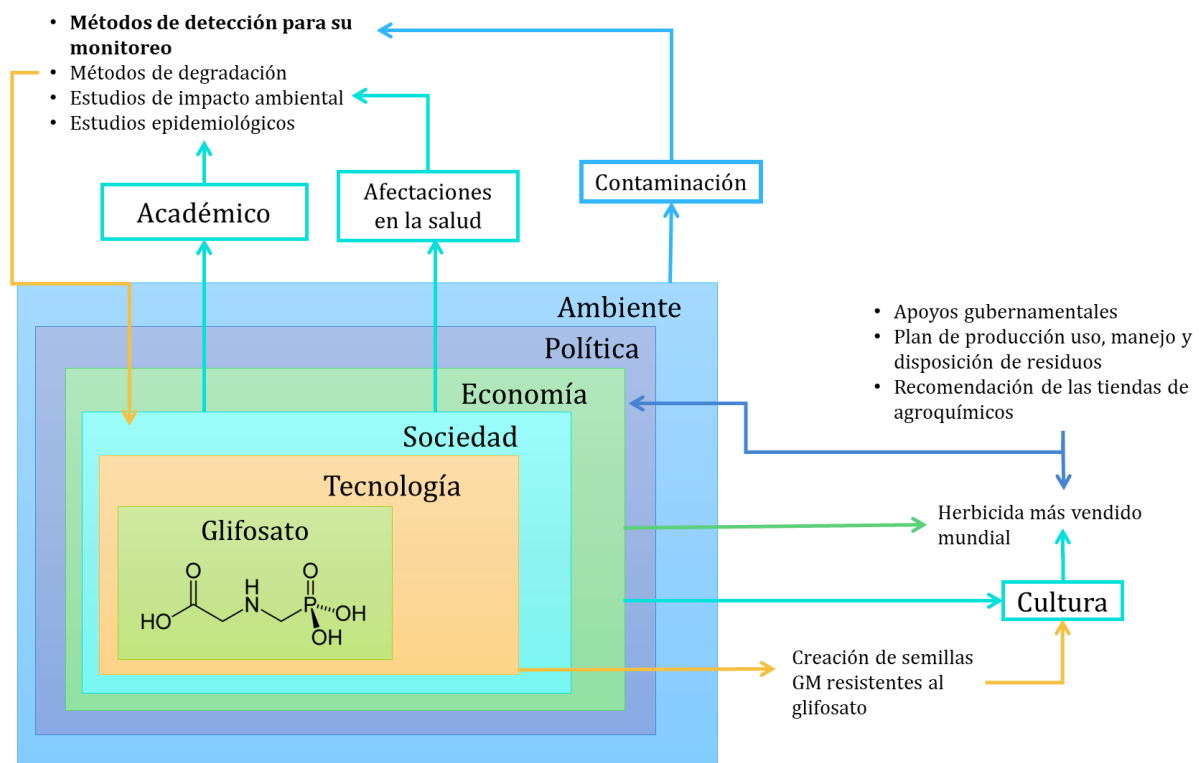


Figura 1. Esquema representativo de los distintos sectores que interactúan en la problemática compleja del glifosato. (Elaboración propia)

El uso desmedido de glifosato ha provocado su presencia en los distintos compartimentos ambientales, inclusive ha sido catalogado por distintos autores como un contaminante común (Myers et al., 2016a; Vandenberg et al., 2017), quedando la población expuesta a los efectos nocivos que este provoca. Algunas afectaciones se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1. Afectaciones del glifosato en distintos sistemas. (Elaboración propia)

Sistema	Afectaciones	Referencias
Salud humana	<ul style="list-style-type: none"> • Posible disruptor endócrino • Posible carcinogénico • Afectación en el sistema nervioso 	(International Agency for Research on Cancer, 2017a; Myers et al., 2016a; Patel & Sangeeta, 2019; Smith et al., 2019; Szepanowski et al., 2018; Zouaoui et al., 2013)
	Disfunción respiratoria, falla renal y cardiaca, así como coma y muerte	
Biodiversidad	<ul style="list-style-type: none"> • Reducción de la expectativa de la vida acuática, así como reducción en las tasas de reproducción 	(Dai et al., 2016; Gill et al., 2018; Guilherme, Gaivão et al., 2012; Mondal, Mukherjee et al., 2018; Williams et al., 2016)
	<ul style="list-style-type: none"> • Mutaciones letales 	
	<ul style="list-style-type: none"> • Daño al ADN en pruebas de laboratorio con tejidos y órganos de ratón 	
	<ul style="list-style-type: none"> • Trastornos reproductivos • Carcinogénesis en ratas macho y de cáncer tiroideo en hembras 	
Suelo-Planta	<ul style="list-style-type: none"> • Pérdida de especies en peligro de extinción. 	(Gaupp-Berghausen et al., 2015; Mertens, Höss et al., 2018; Rose et al., 2017)
	<ul style="list-style-type: none"> • Reducción en la absorción de nutrientes esenciales para los cultivos 	
	<ul style="list-style-type: none"> • Disminución en la fijación de nitrógeno • Mayor vulnerabilidad hacia enfermedades de plantas 	

Ante esta situación aún se necesitan estudios científicos para la completa comprensión de la complejidad del problema asociado al uso del glifosato, ya que parte del problema tiene que ver con la falta de datos ciertos sobre la presencia del herbicida en los diferentes compartimentos ambientales. La detección y cuantificación del glifosato está basado en métodos y técnicas sofisticadas que requieren instrumentos modernos, personal capacitado, pre-tratamientos costosos y largos; por lo que darles seguimiento a estudios de impacto ambiental o análisis de riesgo ambiental es poco probable, ya que solo contadas instituciones tienen acceso a aplicar estos métodos. El método oficial para determinar el herbicida glifosato es el 547 (U.S. Environmental Protection Agency, 1990), el cual se basa principalmente en tres pasos:

- Inyección-acuosa-directa en HPLC
- Derivatización post-columna
- Detección por fluorescencia

El primer paso de este método consiste en la separación del glifosato de la muestra de agua por medio de la inyección en una columna HPLC de intercambio catiónico. Después de la elución por HPLC los componentes separados de la muestra de agua son oxidados con hipoclorito de calcio, para mezclar el producto con o-ftalaldehído-2-mercaptoetanol (OPA), para conferirle la propiedad de absorber luz y fluorescer, lo cual finalmente es detectado por espectrofluorimetría, durando todo el procedimiento alrededor de 15 horas (Figura 2).

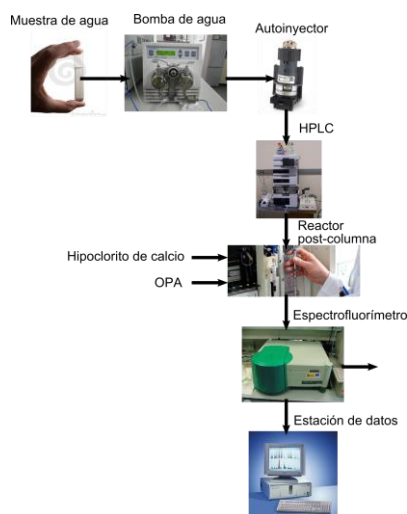


Figura 2. Procedimiento de detección de glifosato usando el método 547 certificado por la Agencia de Protección Ambiental (EPA). (Elaboración propia)

Las ventajas que tiene este método es que permite realizar mediciones de alta selectividad y sensibilidad, pero a la vez es un método complejo, costoso ya que requiere de instrumentos analíticos como la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) y el espectrofluorímetro acoplado, requiriendo de tiempos largos de análisis por las reacciones post-columna (8 horas), así como personal capacitado. Lo anterior ha traído como consecuencia que muy pocas instituciones tengan la capacidad analítica para darle seguimiento a los estudios de impacto ambiental del plaguicida glifosato.

Dada la importancia de la determinación de glifosato en agua de manera rápida, sensible y confiable, en este trabajo se propuso desarrollar una alternativa para la determinación de glifosato en diferentes matrices de agua (potable, urbana, subterránea, superficial y residual tratada), mediante un método innovador. Al método desarrollado se le determinaron sus cifras de mérito (sensibilidad, selectividad, exactitud, reproducibilidad y precisión). Adicionalmente se planteó que el método desarrollado tuviera tiempos cortos de detección, fácil aplicación y bajo costo en comparación al método oficial de la EPA.

3. JUSTIFICACIÓN

La amplia distribución del glifosato en el agua demanda métodos de detección y cuantificación, para su monitoreo. Los métodos actuales requieren de instrumentos sofisticados de alto costo, tiempos largos de análisis, infraestructura compleja y personal altamente capacitado. Debido a lo anterior se decidió plantear el desarrollo de un método espectrofotométrico a partir de la inhibición de la enzima lacasa o por formación de complejo empleando el compuesto metálico Bis 5-Fenildipirrinatode níquel (II), para la detección y cuantificación del herbicida glifosato en agua en tiempos cortos de detección, alta sensibilidad, reproducibilidad, y bajo costo, así como la capacidad de determinar glifosato en diferentes matrices de agua (potable, urbana, subterránea y residual tratada, provenientes de la localidad de San Simón Atzitzintla). El desarrollo de un método alternativo y viable permitiría el análisis a un mayor número de muestras en un menor tiempo. Además, el presente trabajo aborda la situación actual de los plaguicidas en México, enfocándonos principalmente en el herbicida glifosato, útil para generar información científica valiosa. Finalmente, el trabajo se justifica dado que permitió identificar las relaciones causales mediante el estudio cualitativo con entrevistas en profundidad hacia los campesinos de la localidad de San Simón Atzitzintla.

4. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

- ¿Cuál es el desempeño del método desarrollado en términos de sensibilidad y rapidez de la detección por medio de la interacción con sitios metálicos para ser aplicada a distintas matrices de agua provenientes de San Simón Atzitzintla?
- ¿Cuáles son las relaciones causales que explican la presencia de glifosato en agua residual tratada de San Simón Atzitzintla?

5. HIPÓTESIS

- A través del desarrollo de un método espectrofotométrico se podrá detectar el glifosato, de manera sencilla y rápida en comparación a otros métodos ya desarrollados.
- El uso desregulado de herbicidas comerciales que contienen el ingrediente activo glifosato, dentro de las actividades socioeconómicas de San Simón Atzitzintla, favorece su distribución en agua superficial de la localidad.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo General

Desarrollar un método de detección y cuantificación del herbicida glifosato en agua para detectar dicho herbicida en distintas matrices de agua provenientes de la localidad de San Simón Atzitzintla.

6.2 Objetivos Particulares

- Determinar la capacidad del compuesto metalado para detectar glifosato por formación de complejo.
- Determinar las condiciones óptimas de inhibición catalítica de la lacasa por la presencia de glifosato.
- Determinar las cifras de mérito del método al ser aplicado en las diferentes muestras de agua de la localidad de San Simón Atzitzintla.
- Identificar las relaciones causales de la presencia de glifosato en el agua residual tratada de San Simón Atzitzintla, desde un enfoque ambiental, social y económico.

7. MARCO TEÓRICO

7.1 Plaguicidas

La humanidad desde antes del 2000 a. C. ha utilizado los plaguicidas con el fin de proteger a los cultivos de las plagas (Ranga Rao, Rupela, Rameshar Rao, & Reddy, 2007). Un estudio hecho por Ritter, menciona que el primer registro de plaguicida fue el azufre elemental utilizado en la antigua Mesopotamia, incluso en el texto más antiguo de la India “*El Rigveda*”, hace mención del uso de plantas venenosas para el control de plagas, el uso extensivo de plaguicidas a base de arsénico comenzó poco después de la segunda guerra mundial (Ritter, 2009). En 1948, Paul Müller recibió el premio Nobel en medicina por el descubrimiento del insecticida conocido como DDT (Gamboa Fuentes, 1874), convirtiéndose en el plaguicida organoclorado más empleado a nivel mundial, por su extraordinaria eficacia. Sin embargo, para 1975 los plaguicidas organoclorados fueron reemplazados a causa de su alta toxicidad para la biodiversidad en general, por los plaguicidas organofosforados y carbamatos, a partir de ese momento los compuestos de piretrina, se convirtieron en los insecticidas dominantes en la industria (Barr & Angerer, 2006). El uso cotidiano de los herbicidas comenzó en la década de 1960 posterior a la revolución verde, siendo la triazina y ácidos carboxílicos (ácido 2,4-diclorofenoxiacético y glifosato) los más usuales (Ritter, 2009).

7.2 Glifosato

El glifosato es un análogo aminofosfónico del aminoácido natural glicina (Lajin & Goessler, 2019), el cual es utilizado principalmente como plaguicida, dentro de la denominación herbicida defoliante con uso agrícola, urbano y doméstico. El glifosato pertenece a la familia de los plaguicidas organofosforados (C. Zhang et al., 2018), que por su alto grado de toxicidad su uso ha sido restringido en diversos países de primer mundo (Austria, Bélgica y Noruega) (Brookes, Taheripour, & Tyner, 2017).

Hoy en día el glifosato (N-fosfonometilglicina o N-(fosfonometil) glicina-isopropilamina, $C_3H_8NO_5P$) (Figura 3) es el plaguicida más utilizado y producido en el mundo (Soumis, 2018). Los productos a base de glifosato están registrados en más de 130 países, incluido México (Richmond, 2018) y están aprobados para el control de malezas en más de 100 cultivos. No existen otros ingredientes activos de herbicidas que se le comparen en cuanto al número de usos aprobados (Tanveer, Ali, Manalil, Raza, & Chauhan, 2018).

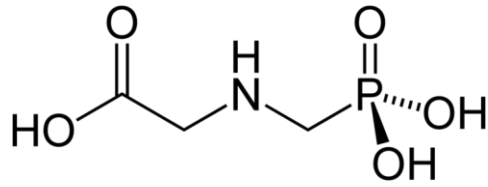


Figura 3. Estructura química del glifosato (Elaboración propia)

El glifosato fue por primera vez sintetizado en 1950 por el químico suizo, Dr. Henri Martin, sin embargo, el trabajo nunca fue publicado (Dill et al., 2010). En 1964 Stauffer Chemical patentó el glifosato como agente quelante, por su gran capacidad de unirse y remover minerales en el siguiente orden: $\text{Ca}^{2+} < \text{Mn}^{2+} < \text{Zn}^{2+} < \text{Mg}^{2+} < \text{Fe}^{3+} < \text{Al}^{3+}$ (Mertens et al., 2018). La empresa transnacional conocida como Monsanto en 1960 mejoró la fórmula del glifosato para que tuviera mayor actividad herbicida, la cual fue sintetizada por el químico John E. Franz (Dill et al., 2010).

El mecanismo de acción del herbicida glifosato consiste en la inhibición de la enzima 5-enolpiruvilsikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS), la cual participa metabólicamente en la producción de aminoácidos aromáticos y otros componentes aromáticos esenciales para la sobrevivencia de las plantas (Petter et al., 2016). La inhibición de la EPSPS evita que la planta produzca los compuestos esenciales para el crecimiento de la planta, incluyendo aquellos involucrados en la defensa de la planta (Caetano, Ramalho, Botrel, da Cunha, & de Mello, 2012), perturbando el crecimiento microbiano esencial para la nutrición vegetal (Johal & Huber, 2009).

El glifosato como producto químico puro muestra las siguientes propiedades físicas y químicas (Tabla 2), las cuales son esenciales para tener una noción cercana en cuanto a la distribución en los compartimientos ambientales, así como el impacto que puede causar en la biodiversidad.

Tabla 2. Propiedades físicas y químicas del glifosato (International Agency for Research on Cancer, 2017a)

Nombre Químico	(N-fosfonometil) glicina
Apariencia y olor	Sólido cristalino blanco e inodoro
Peso Molecular	169.7 g/mol
Densidad	1.70 g/cm ³
Punto de Fusión	184.5°C (se descompone a 187°C)
Solubilidad	Soluble: agua 11.6 g/L (25°C). Insoluble en solventes orgánicos: Acetona, etanol y xileno.
Inflamabilidad	No es inflamable
Corrosividad	Corrosivo al acero y al zinc. No corrosivo al acero inoxidable y al polietileno
Estabilidad	32 días (25°C) y pH= 3-9
Presión de vapor	1.84x10 ⁻⁷ mm de Hg (45°C)
Volatilidad	1.31x10 ⁻² mPa (25°C)

Por su alta solubilidad en agua el glifosato puede distribuirse a grandes distancias de donde es normalmente aplicado, a través de las corrientes acuosas. Por otro lado, para su aplicación el glifosato debe ser disuelto en agua y rociado por aspersión, y que por su baja sedimentabilidad se distribuye por aire como aerosoles. Además, sus zonas apolares de las moléculas permiten que sea adsorbido rápida y fuertemente por las partículas del suelo, lo cual impide su movilidad y su lixiviación (Okada, Costa, & Bedmar, 2016; Sprankle, Meggitt, Penner, & Penner2, 2014; Vereecken, 2005).

7.2.1 Producción

Dentro del mercado agrícola tan solo en EE. UU. existen más de 750 productos que contienen el ingrediente activo glifosato. La manufacturación del glifosato está autorizada en 20 diferentes países, siendo China el principal productor, con más del 40% del suministro global con 53 fabricantes autorizados y exporta alrededor del 35 %, seguido de India con 9 productores y 5 en EE. UU., otros de los países que producen glifosato son: Australia, Egipto, Malasia, España, Hungría, Turquía, Reino Unido, Venezuela, Singapur, Israel y México (Soumis, 2018). Como se mencionó anteriormente el glifosato es el plaguicida más empleado en el mundo, debido a la gran demanda

que tiene, en 2008 tuvo una producción aproximada de 600,000 toneladas, la cual aumentó en 2011 a 650,000 toneladas y 720,000 toneladas en 2012 (Brookes et al., 2017). En 1987 tan solo en EE. UU. fueron usadas aproximadamente 4,000 toneladas de glifosato, incrementando esta cifra drásticamente en 2007 con 80,000 toneladas. Este aumento también se ha registrado en Asia en un del 30% en la demanda en los últimos 3 años (Duke, 2018).

Dentro del mercado agrícola mexicano el glifosato se puede encontrar como sal de amonio, sal amina isopropil, glifosato ácido o sal potásica, dependiendo al uso destinado; también se formula a diferentes concentraciones del ingrediente activo por litro: 120, 240, 360, 480, 680 g (Tabla 3) (Cerdeira, Gazziero, Duke, Matallo, & Spadotto, 2007).

Tabla 3. Presentaciones comerciales más vendidas de glifosato en México (Coordinación General de Contaminación y Salud Ambiental, 2018)

Nombre Comercial	Firmas Productoras	Concentración
Faena 320	Proficol SA	320 g/L
Fuete SL	Monsanto	480 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
Glifosato 48 SL	Coagro Ltda	48%
Clinofox Cedar	Crystal Chemical	480 g/L

La principal razón por la que los agricultores han acogido rápidamente el uso de glifosato es por la sencillez que ofrece para el control de malezas, además de que han reducido el número de herbicidas que anteriormente usaban, lo cual significa un ahorro en cuanto costes y tiempo en el mantenimiento de los cultivos (Steinmann, Dickeduisberg, & Theuvsen, 2012).

En 1996, comenzó la introducción de los cultivos transgénicos resistentes al glifosato, los denominados cultivos Roundup Ready, de la empresa Monsanto (hoy Bayer). Las primeras semillas genéticamente modificadas que se desarrollaron fueron: soya, maíz, sorgo, canola, alfalfa, algodón

y trigo. Dichos cultivos dieron a los agricultores la capacidad de controlar malezas de una forma rápida y sencilla, por la capacidad que tienen las semillas transgénicas para ser resistentes al glifosato. El uso de las semillas transgénicas ha tenido un gran auge dentro de la agricultura ya que año con año aumenta su uso, ya que en 2017 se registró que el 87 % de los cultivos de soya en EE. UU. fueron de la variedad transgénica (United States Department of Agriculture, 2018).

Es particularmente importante destacar que México, en 2011 importó 9 millones 515,000 toneladas de maíz provenientes principalmente de EE. UU., donde tratan sus cultivos con grandes cantidades de glifosato (Coordinación General de Contaminación y Salud Ambiental, 2018).

7.2.2 Usos

7.2.2.1 Agricultura

Dentro de la agricultura el glifosato está autorizado para combatir más de 100 especies de malezas anuales y pasto, así como más de 60 especies de malezas perenes. Las tasas de aplicación son alrededor de 1.5-2 kg/ha para antes de cosechar, después de plantar y antes del brote del cultivo, cerca de 4.3 kg/ha son directamente rociados en huertos, pasturas, bosques e industrias para control de malezas, al igual se utiliza como herbicida acuático alrededor de 2 kg/ha (C. Zhang et al., 2018). Los métodos de aplicación del glifosato más comunes son: el aéreo y rociado directo (Malone & Foster, 2019). El uso del glifosato en un principio se limitó únicamente a ser rociado después de cosechar como control de malezas, pero con la introducción de los cultivos transgénicos resistentes al glifosato permitió su aplicación en cualquier momento del cultivo, las veces que sea necesario. Sin embargo, el uso intensivo y continuo del herbicida en los cultivos transgénicos ha creado un mecanismo de resistencia en cuanto a la eliminación de malezas, provocando que los agricultores aumenten la dosis del herbicida (Grube, Kalnenieks, & Muter, 2019).

6.2.2.2 Residencial

El glifosato es extensamente usado para el control de malezas en el hogar en todo el mundo. En EE. UU. entre el 2001 y el 2007 el glifosato se posicionó como el segundo plaguicida más usado para el hogar y el sector de jardín, con un consumo anual entre 2000-4000 toneladas (Myers et al., 2016a). Para el caso de México, se tiene autorizado el glifosato para uso urbano y de jardinería, para control de hierbas no deseadas en campos de golf, parques, y otras áreas urbanas públicas.

6.2.2.3 Otros usos

El glifosato también es utilizado para el control de especies invasivas acuáticas o sistemas de humedales. En EE. UU. aproximadamente entre el 1-2% del glifosato es utilizado en el sector forestal (Fernandes et al., 2019b). Este herbicida se ha rociado en gran escala de forma aérea desde el año 2000 en un programa que tiene como propósito reducir la producción de cocaína en Colombia. Mientras que en México y Sudamérica se utiliza para combatir cultivos de marihuana (Bernal Cáceres, 2019).

7.3 Aspectos toxicológicos del glifosato

Las industrializaciones químicas junto con la modernidad han orillado a los agricultores a sustituir el laboreo mecánico y manual en el campo, por la aplicación de sustancias químicas sintéticas con toxicidad elevada, las cuales representan una amenaza potencial a la agricultura sustentable, tal es el caso del herbicida glifosato. El uso intensivo de plaguicidas implica la exposición de los operadores, así como el efecto residual en alimentos rociados directamente, quedando potencialmente expuestos a sus efectos nocivos quienes los consume. Por lo tanto, en general la población se encuentra en constante riesgo de entrar en contacto con plaguicidas, ya sea de forma directa o indirecta (C. Zhang et al., 2018).

Alrededor del 50% de la población humana, ha estado expuesto a plaguicidas de forma directa (fabricantes, transportadores, expendedores, agricultores, etc.) y el 100 % ha estado expuesto a los residuos presentes en alimentos, agua, aire, suelo (Van Bruggen et al., 2018a). El incremento constante en la producción y aplicación del glifosato ha provocado fuertes afectaciones en la salud humana y animal, debido a su toxicidad, a los malos manejos y disposición de residuos, la falta de normativas de regulación adecuadas y programas que promueven su uso. Por lo anterior, no es de extrañar que el herbicida glifosato haya sido frecuentemente detectado en los diferentes compartimentos ambientales (suelo, atmósfera, aguas superficiales y subterráneas) (Richmond, 2018).

Por otro lado, se ha reportado que en las formulaciones del herbicida además del ingrediente activo glifosato se encuentra en concentraciones entre 6% al 18%, dependiendo de la formulación comercial, el surfactante polioxietilamina (POEA), el cual es principalmente utilizado como emulsionante y agente humectante. Estudios experimentales han hecho mención de que la toxicidad

del POEA, es aún mayor que la del glifosato, lo cual potencializa la toxicidad aguda de las formulaciones del herbicida (Moore et al., 2012).

7.3.1 Intoxicaciones por glifosato

La mayoría de las intoxicaciones accidentales por glifosato ocurren por el hecho de que el herbicida no se encontraba en su envase original (siendo confundidos por productos comestibles); por otro lado, los casos por exposiciones ocupacionales generalmente ocurren por la falta de información y capacitación en el uso del herbicida, debido a que la mayoría de los trabajadores no utilizan el equipo de protección personal durante la aplicación; así como en la preparación de la mezcla para su aplicación. Los síntomas por intoxicación aguda vía oral (5 a 150 mL), se presentan dentro de los primeros minutos después de la ingesta (<30 min), principalmente gastrointestinales, como náuseas, vómito, diarrea y dolor abdominal. En casos por intoxicación grave se ha reportado disfunción respiratoria, falla renal, falla cardíaca, coma y hasta muerte (Kranawetvogl, Siegert, Eyer, Thiermann, & John, 2018; Zouaoui et al., 2013).

Hasta el momento no existe un antídoto especial para tratar intoxicaciones por glifosato, sin embargo, algunos tratamientos que se administran al presentar síntomas por intoxicación de glifosato son reposición de suero bicarbonato molar, reposición hidroeléctrica, hipotensión arterial mantenida, fármacos presores, administración de carbón activado y lavado gástrico para intoxicaciones graves (Zouaoui et al., 2013).

7.3.2 Toxicodinamia y toxicocinética del glifosato

En la década de los 90, comenzaron a darse las primeras consultas por intoxicación de glifosato, cifra que aumentan constantemente debido a su constante uso (Burger & Fernández, 2004; Zouaoui et al., 2013). Las vías de ingreso del herbicida a los organismos pueden ser oral, cutáneo-mucosa y respiratoria, el herbicida ya formulado tiene una toxicidad aguda en base a la DL_{50} oral en agua para ratas de 10537 mg/kg, una DL_{50} dérmica de 7500 mg/kg y una CL_{50} inhalatoria (durante 4 horas) de 3180 mg/m³ de aire (Myers et al., 2016b).

De acuerdo a estudios toxicocinéticos en animales de experimentación, la mayor absorción ocurre a nivel tubo digestivo entre un 30-36 %, mientras que por las demás vías es escasa la absorción. Una vez absorbido el glifosato, se distribuye en todo el organismo, depositándose principalmente en huesos (1% de la dosis oral). Entre el 15-29 % es excretado por la orina, el 2% por aire expirado y

el 70% por heces. El glifosato en el organismo tiene escasa metabolización, ya que se logra excretar sin alteración el 97 % de la dosis total absorbida (Gill et al., 2018).

El único metabolito reportado del glifosato es el ácido amino-metil-fosfónico (AMPA), el cual tiene una vida media entre 26 días a 148 días, dependiendo de las condiciones a la que se encuentre (Degenhardt et al., 2012). Recientemente se comprobó que el herbicida comercial Roundup, es causante de la enfermedad de hígado graso no alcohólico a dosis que son permitidas por los organismos reguladores a nivel mundial (Mesnage, Renney, Séralini, Ward, & Antoniou, 2017). Algunas ratas expuestas a glifosato han mostrado alteraciones significativas en las actividades de las enzimas hepáticas, de las cuales se extrajeron microsomas y mostraron una inhibición superior al 50% del citocromo P450 (CYP). La inhibición del CYP impide la metabolización de sustancias endógenas y exógenas como fármacos antineoplásicos (Larsen et al., 2014).

7.3.3 Mutagenicidad

Algunos estudios han demostrado que el glifosato tiene la capacidad de bioacumularse en los organismos, por ejemplo, en leche materna (Steinborn et al., 2016; Vannini et al., 2016), en tejidos animales (Samanta, Mukherjee, Pal, Kole, & Ghosh, 2016) y en huesos (Krüger et al., 2014). El peligro potencial que representa para la humanidad al estar expuesto a este tipo de herbicidas, hace indispensable determinar el daño genético que podría causar.

La amplia distribución de plaguicidas y otros compuestos tóxicos ha interferido en la identificación de poblaciones expuestas a glifosato que cumplan con los parámetros para realizar un análisis epidemiológico representativo, confiable y además bioético. Por lo anterior, ha sido necesario recurrir a herramientas epidemiológicas para evaluar, como primera instancia la actividad mutagénica, con la finalidad de indagar sobre su potencial carcinogénico (Tabla 4).

Tabla 4. Estudios mutagénicos por exposición de glifosato. (Elaboración propia)

Técnica	Glifosato	Conclusiones	Referencias
Ensayo cometa	4-6.5 mM	Se evidenció daño en el ADN para células humanas normales y células humanas de fibrosarcoma <i>in vitro</i>	(Monroy et al., 2005)
Ensayo cometa	10.3 L/ha	Las formulaciones de glifosato aplicadas por aspersión aérea causan daño en el ADN en individuos expuestos	(Paz-y-Miño et al., 2007)
Ensayo cometa	5, 10 y 15 ppm	Se encontró daño en el ADN en eritrocitos de peces (<i>Carassius auratus</i>) <i>in vivo</i>	(Çavaş & Könen, 2007)
Ensayo cometa	0.62-8.43 mM	Después de 96 h de exposición presento daño en el ADN en peces (<i>Danio rerio</i> y <i>Jenynsia multidentata</i>)	(Sandrini et al., 2013)
Prueba de Salmonella	1.44 y 2.88 mg/L	Se encontró un aumento significativo en las aberraciones cromosómicas a partir de extracciones de médula ósea de ratón tratados con Roundup	(Shehata et al., 2013)

7.3.4 Carcinogenicidad

Existen cuestionamientos sobre la seguridad del glifosato y sus formulaciones comerciales en la salud humana, debido a que el glifosato afecta la estabilidad del ciclo celular, a partir del retraso de la activación de CDK1/ciclina B, provocando daños genéticos (de Oliveira et al., 2019; Seneff & Nigh, 2017), los cuales son cruciales en la generación de cáncer humano (Greim, Saltmiras, Mostert, & Strupp, 2015). Hasta el momento no existen estudios epidemiológicos que muestren evidencia suficiente para asociar la incidencia de cáncer por exposición de glifosato en humanos. Sin embargo, se ha demostrado a través de estudios en animales de experimentación una asociación positiva al cáncer (Tabla 5).

Tabla 5. Estudios sobre incidencia de cáncer asociados al glifosato. (Elaboración propia)

Tipo de cáncer	Glifosato	Conclusiones	Referencias
Cáncer de piel	25 mg/kg	Todos los ratones del grupo III comenzaron a presentar tumorigénesis después de 52 días en la región dorsal de la piel	(George et al., 2010)
Cáncer de mama	5x10 ⁻⁵ , 400 y 2.25x10 ³ mg/L	Ratas hembra presentaron tumores en las glándulas mamarias (principalmente fibroadenomas y adenocarcinomas): 5/10 (50%), 9/10 (90%) y 10/10 (100%)	(Séralini et al., 2014)
Carcinoma renal	1000, 500 y 30000 ppm	Ratones macho presentaron adenomas renales	(Williams et al., 2016)

A partir de los estudios anteriores la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer, concluye en su reporte que existe suficiente evidencia carcinogénica en animales de

experimentación por exposición a glifosato, catalogando al glifosato dentro de la categoría 2A, como probablemente cancerígeno (International Agency for Research on Cancer, 2017b).

7.4 Presencia del glifosato en los diferentes compartimentos ambientales

Debido a su naturaleza química, a sus propiedades fisicoquímicas y a su uso intensivo, el glifosato ha sido detectado en suelo, aire, agua superficial, en agua subterránea, incluso en seres vivos (Figura 4) (Fernandes et al., 2019b; Maqueda, Undabeytia, Villaverde, & Morillo, 2017; Peruzzo, Porta, & Ronco, 2008; Ruiz-Toledo, Castro, Rivero-Pérez, Bello-Mendoza, & S?nchez, 2014; Van Bruggen et al., 2018b).



Figura 4. Ciclo biogeoquímico del glifosato. El plaguicida ha sido detectado en agua, suelo, seres vivos y en algunos alimentos como maíz, soya, algodón (Rubio, Guo, & Emily, 2014; Torretta, Katsoyiannis, Viotti, & Rada, 2018). (Elaboración propia)

7.4.1 Suelo

El suelo es el recurso con mayor presencia de glifosato, por lo tanto, es el compartimento más analizado en cuanto al comportamiento de este plaguicida. Se encuentra reportado que la adsorción del glifosato es alta en cualquier tipo de suelo, sin embargo tiene una particular afinidad por los suelos arcillosos (De Gerónimo, Aparicio, & Costa, 2018; Sprankle, Meggitt, & Penner, 1975). Un estudio realizado por (Veiga, Zapata, Fernandez Marcos, & Alvarez, 2001), monitoreo durante 8 semanas el comportamiento que tiene el glifosato en el suelo, encontrando que el glifosato tiene una

alta movilidad vertical ya que el suelo tratado contenía concentraciones prácticamente inexistentes de glifosato, mientras que el subsuelo presentó altas concentraciones del herbicida. La presencia de glifosato en subsuelos es alarmante ya que la degradación ocurre de manera más lenta. Otro estudio enfocado en el transporte del glifosato en suelo, monitoreo las concentraciones de glifosato, tanto en suelos tratados con el herbicida, como en los suelos aledaños sin tratamiento, encontrando una diferencia del 0.24% de glifosato entre los suelos labrados y fumigados con glifosato, respecto a los no perturbados, no existiendo diferencias significativas entre ellos (Okada et al., 2016). En la Tabla 6 se muestra distintas investigaciones en diferentes países, que han determinado presencia de glifosato en suelo.

Tabla 6. Concentraciones de glifosato en suelo (Elaboración propia)

Ubicación	Concentraciones glifosato (mg/kg)	Referencias
Australia	1-1.2 mg/kg	(Rose et al., 2017)
Argentina	0.093–0.163µg/g	(Lupi et al., 2015)
México	320.6-607.7 mg/kg	(Muñoz et al., 2019)
Unión Europea	0.01-2 mg/kg	(V. Silva et al., 2018)

Como se mencionó anteriormente el suelo es el compartimento ambiental con mayor presencia de glifosato, donde dicha presencia ha traído afectaciones en las propiedades del suelo, de acuerdo al estudio realizado por (Obour, Stahlman, & Holman, 2016) sobre cultivos de maíz y soya tratados con glifosato en EE. UU. determinó las propiedades químicas del suelo, mostrando una afectación en las concentraciones de P, NO₃- N , SO₄ -S y Fe.

7.4.2 Aire

Existen muy pocos estudios en cuanto a la presencia del glifosato en la atmósfera, debido a que es prácticamente desconocido su comportamiento en este compartimento (Ravier et al., 2019). Una de las primeras investigaciones enfocadas en la medición de glifosato en aire fue en 1991 por Jauhainen, quien reportó concentraciones de glifosato de 15.7 µg/m³ durante los periodos de fumigación silvícolas (International Agency for Research on Cancer, 2017b). En otro estudio se

cuantificó el glifosato utilizando muestras de aire y agua de lluvia en tres áreas de EE. UU. (Mississippi, Iowa e Indiana), encontrándose un rango entre el 60 - 100% de muestras positivas por glifosato, y un rango de concentración de <math><0.01-9.1 \text{ ng/m}^3</math> en muestras de aire y <math><0.1- 2.5 \text{ ng/m}^3</math> en muestras de agua de lluvia (F. chih Chang, Simcik, & Capel, 2011).

7.4.3 Agua

Después del suelo, el agua es el segundo compartimento con mayor presencia de glifosato. La presencia del herbicida en aguas superficiales por aplicación directa, deposición atmosférica y por deposición de partículas de suelo suspendidas, es muy común como (Tabla 7). Inclusive se ha llegado a determinar su presencia en agua subterránea, de acuerdo a los resultados obtenido en un estudio realizado por (Sanchís et al., 2012), reportando concentraciones máximas de 2.5 $\mu\text{g/L}$ y una concentración media de 200 ng/L de glifosato.

Tabla 7. Concentraciones de glifosato en aguas superficiales. (Elaboración propia)

Ubicación	Concentraciones glifosato ($\mu\text{g/L}$)	Referencias
Argentina	0.1-1.7	(Pérez et al., 2017)
EE. UU.	0.04-73	(Coupe et al., 2012)
Argentina	0.6	(Ronco et al., 2016)
Canadá	30-41	(Struger et al., 2008)
Hungría	0.5-1	(Mörthl et al., 2013)

También existen estudios en México donde reportar presencia de glifosato en agua superficial, subterránea, inclusive en agua para beber (Tabla 8).

Tabla 8. Presencia de glifosato en diferentes matrices de agua en México

Ubicación	Concentraciones glifosato (µg/L)	Características	Referencias
Chiapas	<0.13-36.71	23 sitios de muestreo, incluyendo campos de cultivo y 2 áreas naturales protegidas (Gancho-Murillo y Cabildo-Amatal)	(Ruiz-Toledo et al., 2014)
Campeche	0.47-1.42	La concentraciones más elevadas de glifosato se encontraron en muestras de agua subterránea y agua para beber	(Rendón-Von et al., 2017a)

La presencia de glifosato en agua se ha logrado determinar inclusive en lugares completamente lejanos de donde fueron aplicados, tal es el caso del estudio realizado por (Ruiz-Toledo, Castro, Rivero-Pérez, Bello-Mendoza, & Sánchez, 2014), donde encontraron presencia del herbicida en agua de río que pertenecen a áreas naturales protegidas, lejanas a las zonas donde se practica agricultura.

7.4.4 Seres humanos

Como se documentó arriba el glifosato se encuentra en los diferentes compartimentos ambientales, por lo que la población en general se encuentra expuesta potencialmente a su presencia. Diversos estudios que no están enfocados principalmente a la exposición ocupacional al glifosato, han encontrado la presencia de este plaguicida no solo en trabajadores sino también en personas ajenas a esta plaguicida, los datos detallados se encuentran en la Tabla 9.

Tabla 9. Presencia de glifosato en seres humanos (Elaboración propia)

Ubicación	Concentraciones de glifosato	Características	Referencias
EE.UU.	3-233 ppb	Se monitoreo la presencia de glifosato en orina de agricultores, como de sus familiares. Algunos familiares (esposas e hijos) se les detectó concentraciones del herbicida	(Acquavella et al., 2004)
EE. UU.	5-37 ppb	Se analizaron muestras de orina tanto a trabajadores como a la población en general, donde personas ajenas a la jardinería presentaron concentraciones de glifosato	(Curwin et al., 2007)
México	0.22-0.47 µg/L	Analizaron 81 muestras de orina de agricultores de diferentes estados	(Rendón-Von Osten et al., 2017b)
Tailandia	0-2.92 ng/mL	Se analizaron muestras de sangre de agricultores y personas ajenas a prácticas agrícola, dando positivo a presencia de glifosato los trabajadores agrícolas	(Wongta et al., 2018)

La presencia de glifosato dentro del organismo humano, también se ha logrado determinar en leche materna, de acuerdo a los resultados encontrados en el estudio estadounidense realizado por (Honeycutt, Zen.; Rowlands, 2014), donde reporta concentraciones de glifosato entre 76 ug/L-166 ug/L, los cuales exceden 760 a 1600 veces el límite máximo permisible de plaguicidas de la Unión Europea.

7.5 Persistencia de glifosato en diferentes compartimentos ambientales

La vida media en aguas naturales del glifosato es de un promedio de >60 días, de acuerdo a distintos estudios (Bonnet, Bonnemoy, Dusser, & Bohatier, 2007; Primost, Marino, Aparicio, Costa, & Carriquiriborde, 2017), y su persistencia va a depender de acuerdo a las condiciones en la que se encuentre el glifosato, así como en el compartimento ambiental, en la Tabla 10 reporta la vida

media del glifosato en suelo, sedimentos y diferentes matrices de agua (Mercurio, Flores, Mueller, Carter, & Negri, 2014).

Tabla 10 Vida media de glifosato en suelo, sedimentos y agua.

Vida media (días)	Matriz
4-180	Suelo
87	Sedimento
>63	Agua de lago
70	Agua de estanque
63	Agua de pantano
49	Agua de Ciénega
49-70	Agua natural

La persistencia del glifosato depende de la temperatura y la cantidad de luz a la que se encuentra expuesto. El estudio realizado por (Mercurio et al., 2014); expone que el glifosato es moderadamente persistente en agua marina (47 días), bajo condiciones de poca luz y altamente persistente en la oscuridad (267-315 días) a una temperatura entre 25 y 30°C.

Por todo lo anterior, el estudio del impacto del glifosato aún requiere de varias vías de trabajo para una completa comprensión del tamaño y de la complejidad del problema. Algunas de las áreas que requieren atención para abordar la complejidad relacionada con el glifosato son la toxicología, degradación, migración, así como su detección (siendo esta última donde se centra este trabajo).

Para cumplir con los objetivos establecidos de la investigación fue necesario dividirla en tres secciones como se muestra en la figura 5.

1. *Recopilación de información.* Consistió en una continua recopilación de información científica, técnica y normativa, para documentar la problemática actual de los plaguicidas en México, enfocándose principalmente en el glifosato, además se generó información acerca del impacto ambiental del glifosato en los diferentes compartimentos ambientales, principalmente agua.
2. *Parte experimental de laboratorio.* Radicó en desarrollar un método de detección de glifosato en agua en el Laboratorio de Bioinorgánica aplicada del Centro de Química-ICUAP, así como la aplicación del método desarrollado, en distintas matrices de agua

(potable, urbana, residual tratada, subterránea) provenientes de la localidad de San Simón Atzitzintla.

3. *Parte experimental de campo.* Consistió tomar muestras de agua (potable, urbana, superficial, residual, residual tratada, subterránea, y canales de riego) provenientes de la localidad de San Simón Atzitzintla, Puebla; así como identificar las relaciones causales de la presencia del glifosato en la matriz agua en dicha localidad, desde un enfoque ambiental, social y económico, a partir de entrevistas en profundidad, complementadas con observación hacia los campesinos de la localidad.

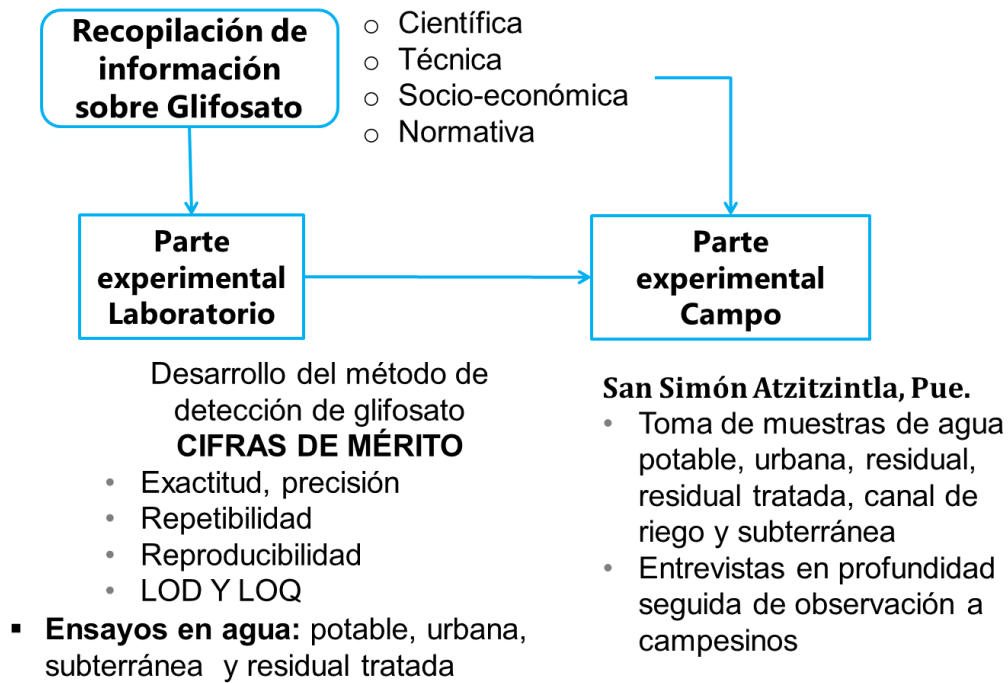


Figura 5. Estrategia de trabajo. (Elaboración propia)

Parte experimental de laboratorio

8. DESARROLLO DEL MÉTODO PARA LA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE GLIFOSATO EN AGUA

8.1 Métodos instrumentales de detección de glifosato en agua

Hoy en día el herbicida glifosato está considerado como el contaminante más común a nivel global (Hu, Zhao, & Sorohan, 2011; Ruiz-Toledo, Castro, Rivero-Pérez, Bello-Mendoza, & Sánchez, 2014), debido a que ha sido determinado en los diferentes compartimentos ambientales (Martínez et al., 2018; Valle, Mello, Alves-Balvedi, Rodrigues, & Goulart, 2018; Van Bruggen et al., 2018b). El desarrollo de métodos de detección rápidos y confiables para determinar glifosato en agua es considerado como un área relevante de investigación. Como ya fue mencionado el método oficial para determinar glifosato en agua es el desarrollado por la EPA nombrado como EPA-547 (U.S. Environmental Protection Agency, 1990), el cual requiere de una derivatización post-columna del herbicida con OPA (Kaczyński & Łozowicka, 2015). Otros métodos emplean cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) (M. Kim, Stripeikis, Iñón, & Tudino, 2007) acoplado a masas (E.a. Lee, a.P. Strahan, 2002; Ibáñez, Pozo, Sancho, López, & Hernández, 2005, 2006; Wu et al., 2005), fluorescencia (Padilla-Alonso et al., 2017) o electroforesis capilar (M. P. Moraes, Gonçalves, & Pereira, 2018). Sin embargo, estos métodos son complejos, ya que las muestras requieren de pre tratamiento y tiempos largos de análisis, por lo que no siempre es posible analizar un gran número de muestras *in situ* (Botero-Coy, Ibáñez, Sancho, & Hernández, 2013; Yoshioka et al., 2011). Recientemente, se han desarrollado otros métodos alternativos para monitorear muestras ambientales *in situ* con la característica de tiempos cortos de análisis. Además, algunos otros métodos analíticos han logrado notablemente límites de detección bajos: espectrofotométricos (Y. Chang, Zhang, Hao, Yang, & Tang, 2016; De Almeida, Chigome, Torto, Frost, & Pletschke, 2015; Rawat et al., 2016; Waiman, Avena, Garrido, Fernández Band, & Zanini, 2012), electroquímicos (Bettazzi, Romero Natale, Torres, & Palchetti, 2018; Sánchez-Bayo, Hyne, & Deseille, 2010; Songa et al., 2009), y por la técnica de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) (Mörtl et al., 2013; Sanchís et al., 2012). El desarrollo de nuevos métodos rápidos, sensibles, reproducibles y económicos representan una alternativa viable a los métodos instrumentales actuales, permitiendo el análisis de un mayor número de muestras ya sea en el campo o en el laboratorio (Farkas et al., 2018; Noori, Dimaki, Mortensen, & Svendsen, 2018; Vaghela, Kulkarni, Haram, Aiyer, & Karve, 2018).

Dada la importancia de detección de glifosato en agua de manera rápida, sensible y confiable, en este trabajo, se propone el desarrollo de una alternativa para la determinación de glifosato en diferentes matrices de agua, mediante un método innovador basado en la capacidad que tiene el glifosato de unirse e incluso remover minerales como calcio, magnesio, níquel, cobre y zinc (Gros, Ahmed, Kühn, & Leinweber, 2019; Ramrakhiani, Ghosh, Mandal, & Majumdar, 2019).

Para ello es necesario hablar de la enzima lacasa (Figura 6), la cual debe su nombre debido a que fue aislada por primera vez del árbol laca *Rhus vernicifera* (Zhou, Deng, Pan, Chen, & Mo, 2010) y proveniente de la cepa *Corioloopsis gallica* UAMH 8260, con un peso molecular de 66 kDa y se caracteriza por tener en su centro activo cuatro átomos de cobre. Tiene un amplio rango de compuestos que puede reconocer como sustratos, es decir, moléculas que pueda transformar, además de las propiedades catalíticas que presenta (Kupski et al., 2019). Dentro de las propiedades catalíticas estudiadas, la lacasa tiene la capacidad de catalizar la oxidación de plaguicidas organofosforados, (Rangelov & Nicell, 2019). Sin embargo, en materia de biosensores, hasta la fecha existen pocos reportes, por lo que se considera un elemento innovador en este trabajo. De esta enzima se conoce su comportamiento cinético, mecanismo de reacción, su estructura tridimensional, y es posible simular su interacción con sustratos mediante métodos computacionales. Todo ello se utilizó para el desarrollo del presente trabajo. Cabe resaltar que en el centro activo de la enzima lacasa tiene 4 átomos de cobre, dicha característica dio lugar a trabajar con esta enzima para desarrollar un método de detección de glifosato en agua, puesto que existen diversos estudios que han logrado la detección de glifosato por medio de la interacción con cobre, (F. C. Moraes, Mascaro, Machado, & Brett, 2010; Pintado, Montoya, Rodríguez-Amaro, Mayén, & Mellado, 2012).



Figura 6. Estructura tridimensional de la enzima lacasa

Por otro lado se encuentran los dipirrometenos, los cuáles son agentes quelantes bipirrólicos monoácidos, donde su química de coordinación ha sido ampliamente estudiada debido a sus propiedades ópticas y fluorescentes para formar compuestos estables con metales (Yamamura et al., 2014), este tipo de ligantes son estructuralmente rígidos, completamente conjugados y capaces de funcionalizar diferentes posiciones de su estructura (1, 5 y 9) (Figura 7b). La coordinación con iones metálicos por dipirrometenos meso-sustituidos (posición 5) permite la introducción de nuevos fragmentos aromáticos sustituidos, para poder aumentar la conjugación de la molécula, dicha característica ha logrado que los dipirrometenos sean aplicados para diseñar sensores (Pereira, Lemos, Serra, & Pinho E Melo, 2013) volviéndose una alternativa a los métodos de detección cromatográficos.

El estudio de (Zhai et al., 2012) basado en pruebas fluorescentes con el dipirrometeno de boro funcionalizado con un grupo de ácidos fenilborónicos (BODIPY-PBA) tiene la capacidad de detectar diferentes monosacáridos en un rango de concentración entre 0.1–100 mM, con buena reproducibilidad y fotoestabilidad. En otro estudio se desarrolló un biosensor electroquímico utilizando un dipirrometeno-Cu (II) para determinar la forma oligomérica de beta amiloide (A β 16-23) con concentraciones en el rango de 0.001–1.00 μ M, que induce la disfunción neuronal asociada con la enfermedad de Alzheimer (Jargilo et al., 2013). La investigación realizada por (Jarocka et al., 2015) reporta sobre un biosensor desarrollado a partir de un dipirrometeno-Cu electroactivo para detectar anticuerpos contra el virus de la gripe aviar tipo H5N1 en sueros de gallinas.

Para esta investigación se trabajaron con dos procedimientos para desarrollar un método de determinación de glifosato en agua. El primero consistió en determinar el glifosato a partir de la inhibición de la enzima lacasa, partiendo de que el centro activo de la enzima contiene 4 átomos de cobre, particularmente uno de los cobres se encuentra en la superficie de la enzima, susceptible de interactuar con el glifosato. El segundo procedimiento consistió en explorar la capacidad quelante del glifosato para unirse con el compuesto el Bis 5-fenildipirrinato de níquel (II) [Ni(PhDP) $_2$] (Figura 7c). En más casos, la espectroscopia UV-visible es empleada para caracterizar a estos compuestos por la facilidad de absorber luz ya sea por los productos de reacción de la enzima, o del compuesto de níquel, por lo que la posible interacción con glifosato es potencialmente medible por esta técnica.

8.2 MATERIALES Y MÉTODOS

8.2.1 Método con lacasa

Reactivos de la compañía Sigma Aldrich, sustratos estándar de la enzima lacasa: acetato de tionina (AT), 3,3', 5, 5'tetrametilbencidina (TMB), 4, 6, dimetildibenzotiofeno (DMDBT) y 3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA), glifosato como analito, así como sales y disolventes necesarios para el medio de reacción. La enzima lacasa del hongo *Corioloropsis gallica* fue adquirida de la compañía Altazymes Alberta Canada.

8.2.1.1 Actividad catalítica estándar de la lacasa

Para la determinación de las velocidades de reacción se utilizó el espectrofotómetro UV-Vis Varian Cary 50 equipado con una lámpara de Xenon, donde se monitorearon los cambios en la concentración de los sustratos oxidados (AT), o en la concentración del producto generado (TMB, L-DOPA), respecto al tiempo de reacción, conocida como velocidad de reacción enzimática. Para ello se realizaron mezclas de cada uno de los sustratos a una concentración 10 μ M (AT, TMB, DMDBT y L-DOPA), con la lacasa (2.04×10^{-04} mM) en un medio amortiguador a diferentes pH y temperaturas, todo en 1mL de reacción. El progreso de la reacción se monitoreo por los cambios de absorción de luz. Para el sustrato AT se monitorearon los cambios a 598 nm; TMB a 450 nm, L-DOPA a 460 nm. El sustrato DMDBT, también fue monitoreado por fluorescencia a $\lambda_{exc} = 240$ nm y $\lambda_{em} = 340$ nm con slits= 5, 5. El cambio de absorbancia o emisión de luz respecto al tiempo son las velocidades de reacción que al ser divididas entre la concentración de la enzima y el coeficiente de absorptividad molar de los compuestos, se obtuvo la velocidad en moles del sustrato oxidado por mol de enzima por minuto.

Para determinar las constantes cinéticas se calcularon las velocidades de reacción a diferentes concentraciones del sustrato estándar dentro de un intervalo suficientemente amplio para ajustar los datos al modelo de Michaelis Menten (Ecuación 1). Con ellos se determinaron los valores de V_{max} y K_m

$$V = \frac{v_{max} [S]}{K_m + [S]} \quad (1)$$

Donde V representa la velocidad de reacción, V_{max} es la velocidad máxima, K_m es igual a la constante de Michaelis Menten y [S] es la concentración del sustrato. El cálculo de las constantes se

realizó ajustando los datos experimentales al modelo de Michaelis-Menten por medio de un ajuste no lineal usando el algoritmo de Marquardt - Levenberg no lineal de mínimos cuadrados incluido en el Software Origin 8.0.

8.2.1.2 Determinación de la inhibición enzimática por el glifosato

En un primer acercamiento para determinar la inhibición de la lacasa por el glifosato se calculó la velocidad de reacción a una concentración fija del sustrato (L-DOPA), como se explicó en el apartado anterior, en presencia de diferentes concentraciones de glifosato (0.0011 a 0.0116 mM). A partir de estos ensayos se calculó el grado de inhibición como un porcentaje de la actividad catalítica en ausencia y en presencia de glifosato, mediante la siguiente fórmula (Ecuación 2):

$$\text{Grado de inhibición} = \left(\frac{V_0 - V_1}{V_0} \right) * 100 \quad (2)$$

Dónde V_0 representa las velocidades de reacción sin glifosato y V_1 es igual a las velocidades de reacción con glifosato

8.2.1.3 Optimización de las condiciones de inhibición

Se aplicó un diseño central compuesto (DCC), con tres variables a dos niveles para optimizar la respuesta en la determinación de glifosato (medida como una inhibición de la enzima). Las variables que se ensayaron fueron concentración de enzima, concentración de sustrato y pH. El DCC se aplicó para optimizar la inhibición enzimática (variable respuesta, usando L-DOPA como sustrato) mediante el método de superficie respuesta (Tabla 11).

Tabla 11. Variables y valores para la optimización (Elaboración propia)

Factor	Unidades	Nivel -1	Nivel +1
Lacasa	μM	0.05	0.22
L-DOPA	mM	1	4
pH		4.5	5.5

8.2.1.4 Diseño Central Compuesto (DCC)

A partir del diseño factorial 2^3 se construyó DCC, tomando puntos axiales y centrales, lo cual resultó a 20 experimentos, como se muestra en la Tabla 12. Se ensayaron los factores a tres niveles

de composición (inferior, intermedio y superior) para sus análisis mediante la metodología de superficie de respuesta por medio del programa Design Expert 7.0.0 trial. Las respuestas obtenidas del DCC, se evaluaron por medio de un análisis de varianza (ANOVA) de tres vías, con un intervalo de confianza del 95%.

Tabla 12. Matriz de experimentos resultantes a ensayar (Elaboración propia)

Std	Corrida	Factor 1 A: Lacasa μM	Factor 2 B: L- DOPA mM	Factor 3 C: pH	Respuesta: %de inhibición enzimática
11	1	0.13	5.00	5.25	
15	2	0.13	10.00	5.25	
6	3	0.20	5.00	6.00	
7	4	0.05	15.00	6.00	
8	5	0.20	15.00	6.00	
4	6	0.20	15.00	4.50	
9	7	0.05	10.00	5.25	
3	8	0.05	15.00	4.50	
20	9	0.13	10.00	5.25	
14	10	0.13	10.00	6.00	
2	11	0.20	5.00	4.50	
19	12	0.13	10.00	5.25	
10	13	0.20	10.00	5.25	
5	14	0.05	5.00	6.00	
1	15	0.05	5.00	4.50	
16	16	0.13	10.00	5.25	
18	17	0.13	10.00	5.25	
13	18	0.13	10.00	4.50	
17	19	0.13	10.00	5.25	
12	20	0.13	15.00	5.25	

8.2.2 Método con Bis 5-Fenildipirrinatode níquel (II)

Glifosato, gel de sílice, pirrol, ácido trifluoroacético (TFA), benzaldehído, trietilamina (Et_3N), 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona (DDQ) son de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.), Cloruro de metileno (CH_2Cl_2), hexano, metanol (CH_3OH) son de Fermont (Monterrey, México), acetato de etilo de JT BAKER (Center Valley, EE. UU.), Todos los reactivos usados son de grado reactivo. El instrumento analítico que se utilizó fue el espectrofotómetro UV-Vis (Varian Cary 50).

8.2.2.1 Síntesis del compuesto Bis 5-Fenildipirrinato de níquel (II) [Ni(PhDP)₂]

Empleando el procedimiento usado por (Brückner, Karunaratne, Rettig, & Dolphin, 1996) para sintetizar el compuesto [Ni(PhDP)₂]. En un primer paso fue necesario sintetizar el 5-Fenildipirrometano (Figura 7a) a partir de benzaldehído (1 mmol), pirrol (25 mmol) y 5 gotas ácido trifluoroacético (TFA). Posteriormente se adicionó 2,3-Dicloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone (1 mmol) y se dejó en agitación durante 30 min a temperatura ambiente. Después se agregó a la solución Et₃N (0.5 mL), dejándose nuevamente en agitación (30 min) a temperatura ambiente. Posterior a la eliminación del solvente, el producto fue disuelto en CH₂Cl₂ para ser filtrado con el fin de remover los precipitados. Después de remover nuevamente el solvente, se llevó a cabo una columna de cromatografía corta con gel de sílice para purificar el producto, empleando acetato de etilo como eluyente. La primera fracción color amarillo fue recolectada para llevarla a sequedad, siendo este el 5-fenildipirrometano (Figura 7b). Se tomó una relación 2:1 de 5-Fenildipirrometano (2mmol) respecto de sulfato de níquel hexahidratado (1 mmol) disueltos en una mezcla de CHCl₃ y CH₃OH. La solución se agitó y calentó bajo reflujo durante 4 h. Finalmente la solución se concentró en el rotavapor hasta obtener un sólido café oscuro. El remanente seco se disolvió en CH₂Cl₂ y CH₃OH (1:1), dejándolo en evaporación lenta hasta la obtención de cristales. El compuesto Bis-5-Fenildipirrinato de Ni(II) (Figura 7c) presenta un espectro UV-Vis (λ nm): 330 y 480.

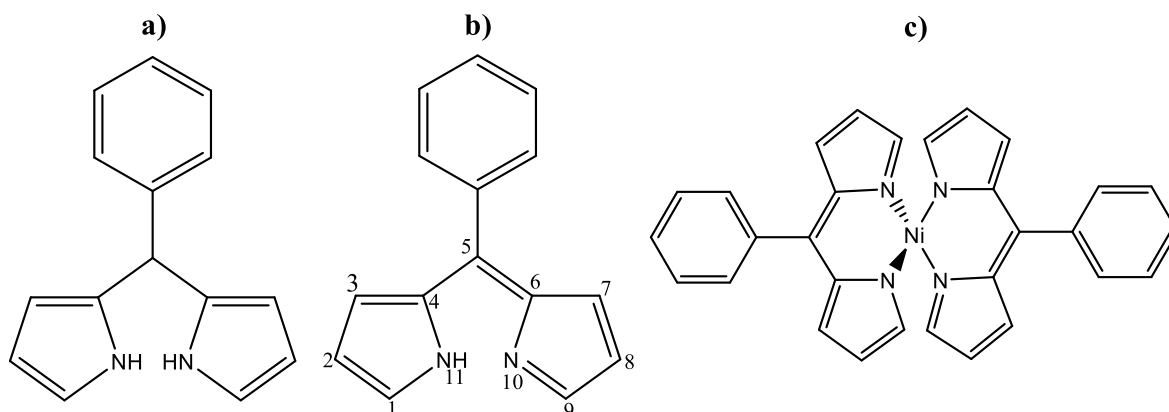


Figura 7. a) 5-Fenildipirrometano, b) 5-Fenildipirrometano y c) Bis-5Fenildipirrinato de Ni(II).
(Elaboración propia)

8.2.2.2 Interacción entre el compuesto [Ni(PhDP)₂] con glifosato

Debido a la adaptabilidad y flexibilidad estructural del [Ni(PhDP)₂], se procedió a trabajar con él para desarrollar un método de detección de glifosato, por formación del complejo [NiGlyp(PhDP)₂]. La formación del complejo se monitoreo a partir de los cambios obtenidos en los espectros de absorción del compuesto [Ni(PhDP)₂] anterior y posterior a la adición del glifosato en 1 mL de reacción (99% CH₃OH y 1% agua). Se construyó una curva de calibración donde se registraron los cambios de absorbancia debido a la formación de una nueva banda a 362 nm, adicionando diferentes concentraciones de glifosato (5.9x10⁻⁷ a 1.1x10⁻⁵ mol/L).

8.2.2.3 Estequiometría del complejo

Fue aplicado el método de Job (Renny, Tomasevich, Tallmadge, & Collum, 2013a) para determinar la estequiometría del complejo [NiGlyp(PhDP)₂]. El cual consistió en preparar dos soluciones madre, para ser mezcladas de tal manera que el total de la concentración se mantuviera constante (5x10⁻⁵ y 1x10⁻⁴ mol/L para los dos diferentes ensayos). Se monitoreó la absorbancia a 362 nm después de ser mezclada en 1 mL de reacción durante 10 s (99% CH₃OH – 1% agua).

8.2.2.4 Determinación de la constante de disociación (K_d)

Se construyeron dos curvas para determinar la constante de disociación, las cuáles consistieron en registrar los cambios de absorbancia a 362 nm del compuesto [Ni(PhDP)₂] a dos diferentes concentraciones (3.6x10⁻⁵ y 1.08x10⁻⁴ mol/L), donde se adicionaron diferentes concentraciones de glifosato (5.9x10⁻⁷-2.3x10⁻⁴ mol/L), hasta alcanzar la saturación del compuesto [Ni(PhDP)₂], por la presencia de glifosato. La unión entre el glifosato y el compuesto [Ni(PhDP)₂] se puede representar como: Glifosato + [Ni(PhDP)₂] → [NiGlyp(PhDP)₂].

Los cambios de absorbancia a 362 nm del complejo [Ni (PhDP)₂] a una concentración diferente de glifosato se transformaron en un porcentaje de cambio y se ajustaron al modelo de unión de un sitio (Ecuación 3) para determinar K_d:

$$\Delta A = \frac{\Delta A_{max} * G_0}{K_d + G_0}$$

Donde ΔA es el porcentaje de cambio de absorbancia a 362 nm al agregar concentraciones de glifosato, ΔA_{max} es el porcentaje máximo de cambio (100%) cuando $[\text{Ni}(\text{PhDP})_2]$ está saturado por glifosato, y G_0 es la concentración total de glifosato. Los valores reportados son la media de tres repeticiones, donde dichos datos fueron ajustados a la ecuación de Hill mediante un procedimiento de iteración siguiendo el algoritmo de mínimos cuadrados no lineales de Marquardt-Levenberg utilizando el software Origin 8.0 (Originlab Corporation, Northampton, MA, EE. UU.).

8.2.2.5 Análisis en muestras de agua

Se analizaron cuatro diferentes matrices de agua (potable, urbana, subterránea y residual tratada) con el fin de conocer el potencial del método desarrollado, a dichas muestras se le adicionó intencionalmente concentraciones de glifosato (4.1×10^{-6} y 5.9×10^{-6} mol/L), llevándose a cabo los análisis en 1 mL (99% CH_3OH – 1% agua) de reacción, para determinar la precisión del método a través del coeficiente de variación (C.V), el cual se expresa como la desviación estándar como porcentaje de la media aritmética, mostrando una interpretación relativa del grado de variabilidad. También se determinó el porcentaje de recuperación para conocer la exactitud del método que mide el grado de concordancia entre el valor obtenido y el valor real de cada muestra. Para el caso particular del agua residual tratada esta fue filtrada para remover los sólidos suspendidos. Las cuatro muestras de agua en todo momento se mantuvieron almacenadas a 4 °C hasta su caracterización fisicoquímica por métodos convencionales: pH, conductancia específica, demanda química de oxígeno (DQO) y Demanda Biológica de Oxígeno (DBO_5). Se determinaron distintos aniones y cationes: Ca^{2+} , Fe^{2+} , SO_4^{2-} , Mg^{2+} , NO_3^- , $\text{NO}_3\text{-N}$, PO_4^{3-} , P_2O_5 y cloro libre.

8.2.2.6 Interferentes

Para identificar posibles factores de interferencia, fueron incorporados distintas sales a las concentraciones máximas encontradas en las distintas muestras de agua: $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (6.6×10^{-4} mol/L), $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (9.8×10^{-4} mol/L), NaNO_3 (1.2×10^{-2} mol/L) y $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (4.9×10^{-5} mol/L), así como las sales de fosfatos $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ y $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ a una concentración de 4.1×10^{-6} mol/L. Al igual se probaron, otros plaguicidas organofosforados con el mismo propósito: paratión, dimetoato y diclophention a una concentración de 4.1×10^{-6} mol/L, para cada uno de ellos. Evaluándose también el efecto que ocurre la mezcla de las sales; así como la mezcla de los plaguicidas. Para estos análisis, el tiempo de ensayo fue de 10 s, estableciendo una concentración de glifosato de 4.1×10^{-6} mol/L y 1.08×10^{-4} mol/L de $[\text{Ni}(\text{PhDP})_2]$. Todos los ensayos experimentales se

realizaron por triplicado para evaluar la repetibilidad de los resultados. El análisis estadístico de los datos se realizó utilizando Origin Software V 8.0.

8.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.3.1 Detección de glifosato con lacasa

Las reacciones enzimáticas de oxidación de los sustratos: AT, TMB y DMDBT no presentaron ningún efecto debido a la presencia del glifosato, por esta razón los sustratos AT, TMB y DMDBT fueron descartados y se continuó trabajando únicamente con el sustrato L-DOPA.

8.3.1.1 Velocidad de reacción

En un primer ensayo se adiciono el sustrato L-DOPA a una concentración de 10 mM, en un volumen total de reacción de 1 mL, se agregaron 5 μ L de lacasa de concentración 2.7 mg/mL y el resto de amortiguadores acetatos a pH 4.5, 5 y 5.5 (60 mM), para completar el volumen de reacción, a temperatura ambiente (25°C), con la finalidad de medir la absorbancia del producto de oxidación del sustrato en el espectrofotómetro UV-Vis en un tiempo total de 2 minutos. El cambio de absorbancia con respecto al tiempo durante los primeros 20 segundos representa la pendiente, que se utiliza para calcular la velocidad inicial de reacción (Figura 8), la cual a su vez se divide por el coeficiente de extinción de producto ($3.9 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y la concentración de la enzima. La figura 9 ilustra la cinética de reacción y el cálculo de la velocidad. Como puede observarse, la reacción enzimática genera la aparición rápida del producto desde los primeros segundos, con un incremento lineal, indicativo de que la concentración de sustrato es suficientemente alta para tener a la enzima reaccionando a su máxima velocidad.

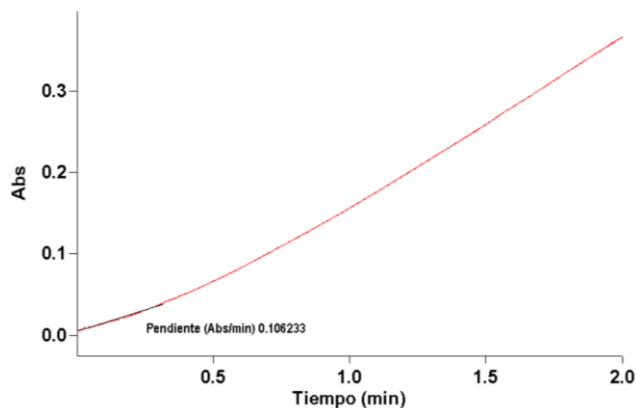


Figura 8. Transformación del L-DOPA por la enzima lacasa. El incremento en la señal indica que aparece el producto de oxidación que absorbe luz a medida que incrementa su concentración al avanzar la reacción. La velocidad se calcula respecto a la pendiente inicial, que representa los cambios de absorbancia con respecto al tiempo. (Elaboración propia)

8.3.1.2 Perfil catalítico de la lacasa contra cambios de pH

Un factor importante que gobierna en la inhibición es el pH, dado que la misma depende del estado de ionización de la enzima, del sustrato y del glifosato, por ellos se determinó el perfil de actividad contra diferentes valores de pH. El pH de mayor actividad de la lacasa con el sustrato L-DOPA fue de 5.5 (Figura 9), también se encontró que la enzima lacasa tiene una alta actividad catalítica entre pH 4.5 y 5.5.

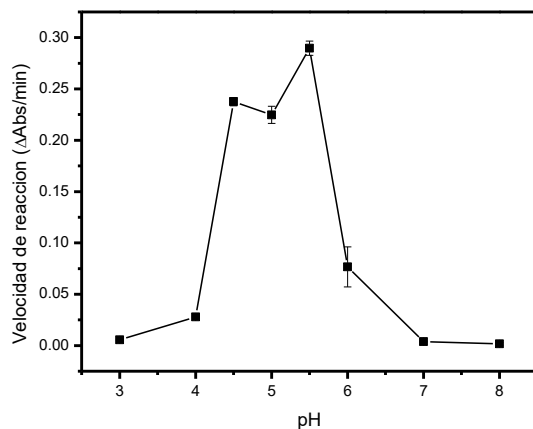


Figura 9. Perfil de pH de la lacasa. (Elaboración propia)

8.3.1.3 Constantes cinéticas

Para conocer el comportamiento cinético de la lacasa se determinaron las constantes cinéticas V_{max} y K_m , se determinaron las velocidades de reacción a diferentes cantidades de L-DOPA en un rango de 0.5 a 4.5 mM.

Los datos obtenidos se graficaron contra la concentración del sustrato, para el cálculo de la V_{max} y K_m , se realizó un cálculo no lineal de la ecuación Michaelis-Menten usando el Software Origin 8.0 (Figura 10).

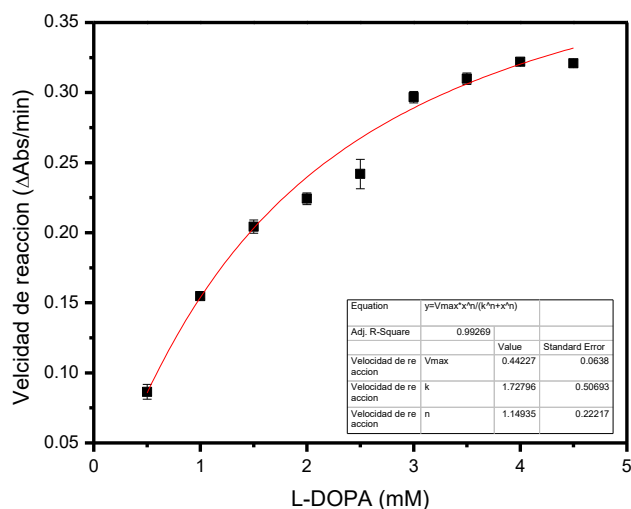


Figura 10. Comportamiento cinético de la lacasa por la oxidación del L-DOPA. (Elaboración propia)

Como puede observarse en la figura 10, la lacasa sigue un comportamiento tipo Michaelis Menten al ajustar los datos de velocidad con un excelente coeficiente de determinación. Los valores de V_{max} y K_m fueron 0.44 Abs/min y 1.71 mM, los cuales se encuentran en el intervalo reportado para esta enzima con otros sustratos.

8.3.1.4 Efecto inhibitorio del glifosato en la enzima

Una vez determinadas las constantes cinéticas en la oxidación del sustrato L-DOPA por la enzima lacasa, se realizó un primer ensayo de inhibición de la enzima por la presencia del glifosato. Para

ello, fue necesario determinar las velocidades de oxidación del L-DOPA en presencia de diferentes concentraciones del glifosato (Figura 11).

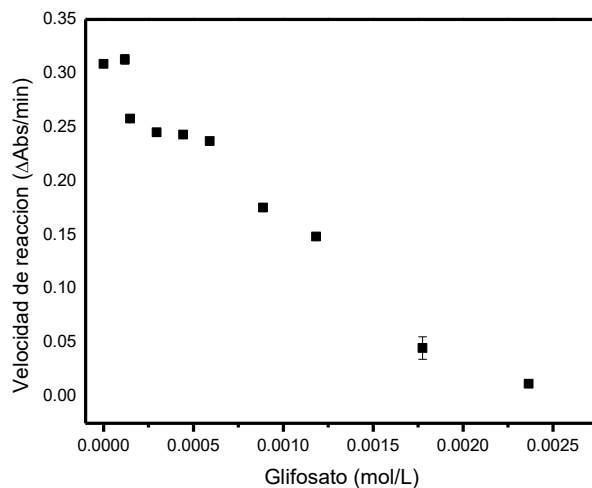


Figura 11. Perfil de inhibición de la lacasa en presencia de glifosato. (Elaboración propia).

Empleando una concentración de 10 μM del sustrato L-DOPA.

En la Figura 12 se muestra la parte lineal de la curva de inhibición, conocida como rango dinámico. La parte lineal abarca desde 1×10^{-5} hasta 1.7×10^{-3} mol/L de glifosato. La Ecuación 4 describe la relación entre las variables. Siendo V igual a la velocidad inicial ($\text{Abs}/\text{min}^{-1}$) y $[G]$ igual a la concentración del Glifosato (mol/L).

$$V = -148.76[G] + 0.3148 \quad (4)$$

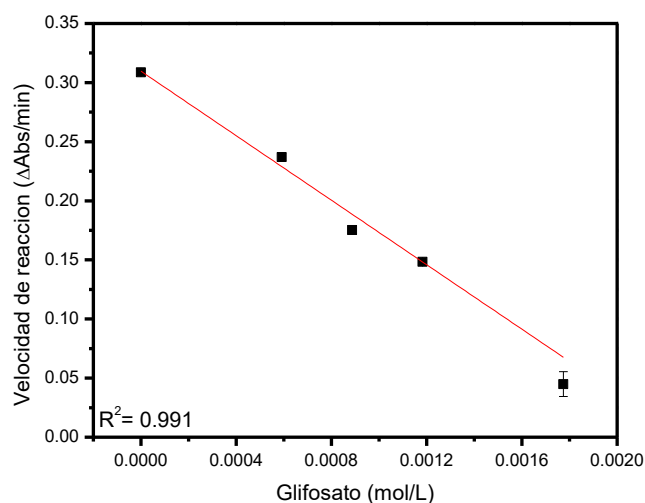


Figura 12. Curva de calibración del glifosato en solución modelo. (Elaboración propia)

A partir de esta curva de calibración se podría aplicar para detectar y cuantificar glifosato en mezclas modelos con una certeza de 99%, dado su coeficiente de determinación. Donde a partir de la Ecuación 4, fue posible determinar el límite de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ). El LOD obtenido fue de 8.2×10^{-5} mol/L y el LOQ de 1.8×10^{-4} mol/L.

8.3.1.5 Optimización de la detección

La optimización de la inhibición de la enzima por el glifosato, medida como disminución del porcentaje de actividad catalítica de la enzima se llevó a cabo por medio de un DCC (Diseño Central Compuesto) y el método de superficie respuesta, para lo cual se ensayaron las variables independientes: concentración de sustrato, concentración de enzima y pH a tres niveles (Tabla 13). Los ensayos se realizaron usando una concentración de glifosato de 6×10^{-4} mol/L.

Tabla 13. Parámetros de las variables del diseño central compuesto (DCC). (Elaboración propia)

Factor	Unidades	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3
Lacasa	μM	0.05	0.14	0.22
L-DOPA	mM	1	2.5	4
pH	-	4.5	5	5.5

La Tabla 14 ilustra los 20 experimentos que componen el DCC, junto con sus porcentajes de inhibición determinados experimentalmente. Como se puede observar, la máxima inhibición de la

enzima fue del 19.93% (corrida 10), con las condiciones: pH= 4.5, L-DOPA 1 mM y lacasa 0.05 μ M.

Tabla 14. Matriz experimental del DCC. (Elaboración propia)

Corrida	Lacasa (μ M)	L-DOPA		Inhibición (%)
		(mM)	pH	
1	0.14	2.5	5	0.00
2	0.05	4	4.5	0.00
3	0.14	4	5	8.79
4	0.05	1	5.5	13.45
5	0.05	4	5.5	9.54
6	0.22	2.5	5	1.96
7	0.22	4	4.5	8.93
8	0.14	2.5	5	0.00
9	0.14	2.5	5	0.00
10	0.05	1	4.5	19.93
11	0.14	1	5	10.08
12	0.14	2.5	5	0.00
13	0.22	1	4.5	11.49
14	0.05	2.5	5	13.74
15	0.22	4	5.5	0.00
16	0.14	2.5	4.5	0.02
17	0.14	2.5	5	0.44
18	0.14	2.5	5.5	0.00
19	0.14	2.5	5	0.00
20	0.22	1	5.5	0.00

Utilizando las condiciones de la corrida 10 obtenidas del DCC, se midieron las velocidades de oxidación del sustrato a diferentes cantidades de glifosato en un rango de 2.0×10^{-5} - 1×10^{-3} mol/L (Figura 13).

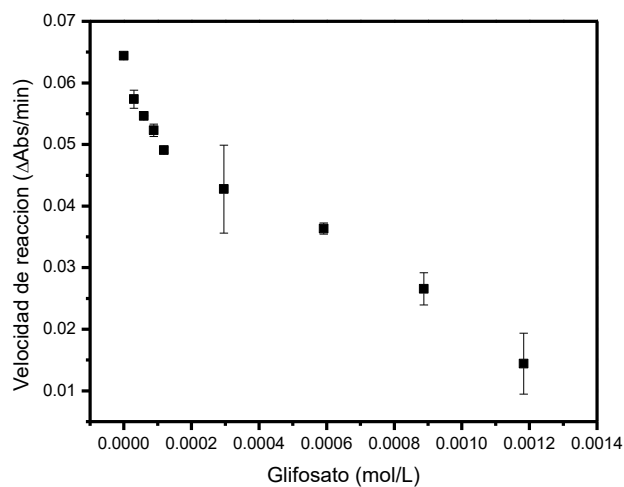


Figura 13. Perfil de Inhibición a condiciones: pH: 4.5, L-DOPA: 1mM y lacasa: 0.05 mM.
(Elaboración propia)

A partir del rango lineal dinámico de la Figura 14, se obtuvo la Ecuación 5, la cual se podría aplicar para detectar y cuantificar el glifosato con una certeza del 94%.

$$V = -39.292[G] + 0.0644 \quad (5)$$

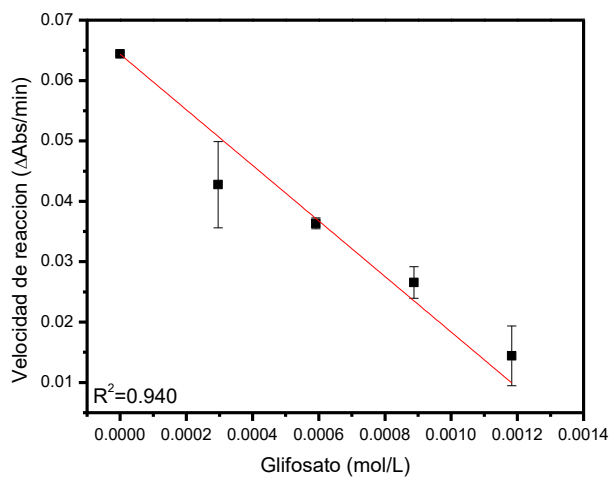


Figura 14. Curva de calibración a condiciones de pH= 4.5, L-DOPA: 1mM y lacasa: 0.05 mM.
(Elaboración propia)

Con base en la ecuación 4, se determinó el LOD=1.92x10⁻⁵ mol/L y un LOQ= 6.4x10⁻⁵ mol/L, que en comparación con las primeras pruebas (Tabla 15), se logró mejorar la sensibilidad de la detección, Sin embargo, estos límites aún se encuentran por arriba del límite máximo permisible en agua para beber de la EPA de 0.7 ppm (4x10⁻⁶ mol/L) (United States Environmental Protection Agency, 2019).

Tabla 15. Resumen de Límites de detección y cuantificación. (Elaboración propia)

pH	L-DOPA (mM)	Lacasa (µM)	LOD (mol/L)	LOQ (mol/L)	R²
4.5	1	0.05	1.92x10 ⁻⁵	6.4x10 ⁻⁵	0.94
4.5	1	0.22	2.38x10 ⁻⁵	1.3x10 ⁻⁴	0.91
5	1	0.22	2.69x10 ⁻⁵	9x10 ⁻⁵	0.90
5.5	3	0.20	8.19x10 ⁻⁵	2x10 ⁻⁴	0.99

Una característica que se busca al desarrollar este método es que los límites de detección y cuantificación se encuentren cercanos o por debajo del límite máximo permisible (4x10⁻⁶ mol/L) establecido por la EPA y por la NOM-014-COAGUA-2003, que establece los requisitos para la recarga artificial de acuíferos con agua residual tratada. Sin embargo, con los resultados obtenidos anteriormente aún no se cumple esta particularidad por lo que se continuó trabajando con el compuesto 5-Fenildipirrinato de níquel (II) [Ni(PhDP)₂], con el propósito de mejorar las condiciones de ensayo para alcanzar los límites mencionados.

El compuesto Bis 5-Fenildipirrinato de níquel (II), se probó para desarrollar un nuevo método de detección y cuantificación de glifosato, debido a la gran diversidad de aplicaciones que tienen este tipo de compuestos y principalmente por la capacidad que tienen para la formación de complejos estables que presentan espectros electrónicos de absorción en la zona ultravioleta visibles (Brückner et al., 1996). La formación de complejo entre el compuesto [Ni(PhDP)₂] y el glifosato ocurre por la gran afinidad que tiene el glifosato hacia distintos metales como es el níquel (Mertens et al., 2018; Rawat et al., 2016).

8.3.2 Detección con Bis 5-Fenildipirrinato de níquel (II) [Ni(PhDP)₂]

8.3.2.1 Síntesis y caracterización del compuesto [Ni(PhDP)₂]

El compuesto [Ni(PhDP)₂] fue sintetizado de acuerdo a procedimiento reportado por (Brückner et al., 1996) y se caracterizó por UV-Vis (λ nm): 330, 480; así como por y por espectrometría de masas ¹H. Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) basada en la simetría estructural por señales para los protones aromáticos. Se caracterizó al compuesto [Ni(PhDP)₂] por RMN ¹H para tener (500 MHz, CDCL₃) δ = 9,426 (s, 4, α -dipirrina), 7.500 (d, J = 2.5 Hz, 6H, Ar-H), 7,483–7.331 (m, 8H, Ar-H, β -dipirrina), 6.741 (d, J = 3.5 Hz, 4H, β -dipirrina), que corresponde con lo informado (Wang, Xue, Dong, & Zhu, 2015).

La formación del complejo entre [Ni(PhDP)₂] y el glifosato [NiGlyp(PhDP)₂] consistió en monitorear los cambios de absorbancia del [Ni(PhDP)₂] antes y después de la adición de glifosato, en un volumen total 1 mL (CH₃OH al 99% y agua al 1%). El espectro de absorción electrónico de [Ni(PhDP)₂] (1.08×10^{-4} mol/L) presenta una banda característica a 480 nm, indicativa de la transferencia de carga del doble enlace (Fig. 15, línea negra), la cual aumentó notablemente en presencia de glifosato (1.1×10^{-5} mol/L). Además, se observó una nueva banda de absorción a 362 nm. El cambio en la absorbancia a 480 nm, así como la formación de la nueva banda de absorción se atribuye a la formación de un complejo entre ambas especies, con características medibles en la región límite visible ultravioleta.

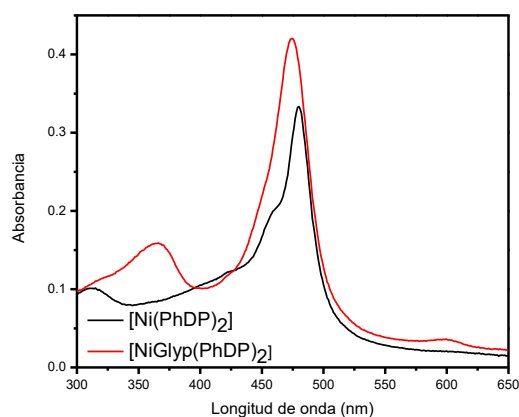


Figura 15. Espectro de absorción electrónica de [Ni(PhDP)₂] (1.08×10^{-4} mol/L) en ausencia (negro) y en presencia de glifosato (1.1×10^{-5} mol/L) (rojo). (Elaboración propia).

Como el propósito del presente estudio es la cuantificación del glifosato en muestras de agua, se determinó la dependencia del cambio de absorbancia en la concentración del glifosato. Como se puede ver en la Figura 16, la absorbancia a 362 nm dependía de la concentración del glifosato, con un rango lineal de 5.9×10^{-7} a 1.1×10^{-5} mol/L de glifosato.

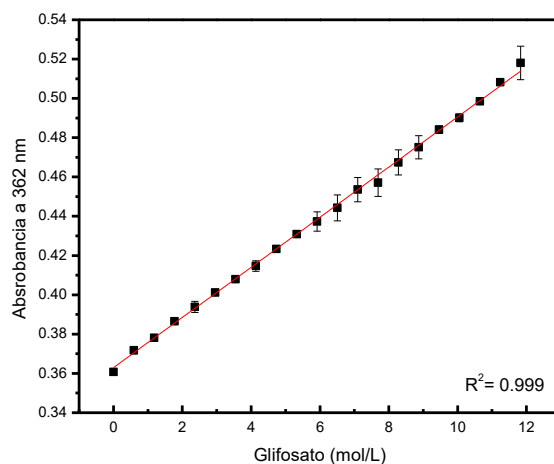


Figura 16. Curva de calibración para la detección de glifosato (5.9×10^{-7} - 1.1×10^{-5} mol/L) basada en la interacción con el compuesto $[\text{Ni}(\text{PhDP})_2]$ (1.08×10^{-4} mol/L). Condiciones de reacción: 99% CH_3OH -1% agua. (Elaboración propia)

La Ecuación 6 describe la relación entre las dos variables, donde Abs es la absorbancia a 362 nm y [G] es la concentración de glifosato (mol/L). El modelo de regresión lineal tiene un buen ajuste respecto a los datos, con un coeficiente de determinación superior al 0.99. Además, otros resultados estadísticos (análisis de varianza y gráficos dinámicos) respaldan la calidad del modelo lineal.

$$\text{Abs} = 0.0128[\text{G}] + 0.3629 \quad (6)$$

Usando la Ecuación 6, se calcularon el límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ). El LOD y el LOQ son numéricamente iguales a 3 y 10 veces la absorbancia media más la desviación estándar del compuesto $[\text{Ni}(\text{PhDP})_2]$ en ausencia de glifosato. Sustituyendo estos valores en la Ecuación 6, se determinó un LOD de 2.01×10^{-7} mol/L ($34.98 \mu\text{g/L}$) y un LOQ de 9.87×10^{-7} mol/L ($166 \mu\text{g/L}$). Estos valores son lo suficientemente buenos de acuerdo al límite máximo de glifosato en agua potable para beber ($700 \mu\text{g/L}$) establecido por la EPA de EE. UU.

(United States Environmental Protection Agency, 2018). Sin embargo aún es necesario mejorar la sensibilidad de la detección para la aplicación del método en países europeos donde el nivel máximo de glifosato no debe ser superior a 0.1 µg/L (Z. Li & Jennings, 2017). Los valores de LOD y LOQ están dentro del rango de otros métodos alternativos para detectar el herbicida en una muestra de agua, con las ventajas de que el tiempo de respuesta es más corto y no hay necesidad de derivatización o adición de precursores de reacción (Tabla 16).

Tabla 16. Comparación de distintos métodos de determinación de glifosato con el desarrollado en este proyecto (Elaboración propia)

Método	LOD (mol/L)	LOQ (mol/L)	Observaciones	Referencias
Este método	2.01×10^{-7}	9×10^{-7}	Rápido, efectivo, fácil y sensible	-
Espectrofotometría	1×10^{-6}	3×10^{-6}	Rápido, efectivo y selectivo, necesita pretratamientos	(Silva et al., 2011)
Fluorescencia	6×10^{-7}	-	Rápido, efectivo y selectivo, necesita equipo costoso	(Yuan et al., 2017)
Electroquímica	2×10^{-6}	-	Rápido, efectivo y selectivo, necesita equipo y reactivos costosos	(Noori et al., 2018)
Colorimetría	6×10^{-7}	-	Efectivo y sensible, requiere de pasos complejos de síntesis	(De Almeida et al., 2015)

8.3.2.2 Estequiometría

Para la estequiometría del complejo [NiGlyp(PhDP)₂], la determinación de los cambios de absorbancia se puede presentar en función de la fracción molar en función del glifosato o del compuesto [Ni(PhDP)₂] (Figura 17), el experimento se realizó a dos concentraciones totales. Una vez medidos los cambios de absorbancia a 362 nm, respecto a la fracción mol del compuesto de níquel, estos se graficaron mostrando una forma triangular que, de acuerdo a la literatura, esta apariencia sugiere una interacción molecular fuerte entre los compuestos. Además de que el punto máximo en las curvas tiene lugar a una fracción molar de 0.5, lo que indica que la asociación

molecular se produce con estequiometria 1: 1 (Hill & MacCarthy, 1986; Renny, Tomasevich, Tallmadge, & Collum, 2013b).

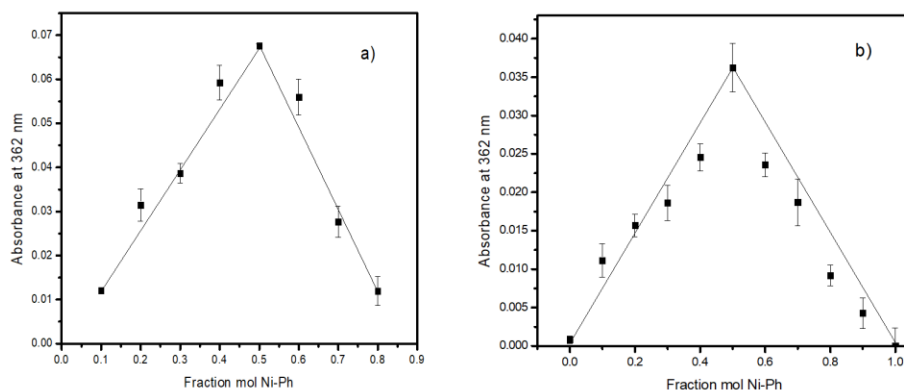


Figura 17. Gráfico de Job indicando estequiometria 1: 1 para el complejo $[\text{NiGlyp}(\text{PhDP})_2]$. A dos concentraciones totales a) 5×10^{-5} mol/L y b) 1×10^{-4} mol/L. (Elaboración propia)

8.3.2.3 Constante de disociación (K_d)

La K_d se determinó ajustando los datos al modelo de enlace de un sitio utilizando un análisis de regresión no lineal (Figura 18). Obteniendo valores de K_d de 1.75×10^{-6} y 6.9×10^{-6} mol/L a dos concentraciones de $[\text{Ni}(\text{PhDP})_2]$ (3.6×10^{-5} y 1.08×10^{-4} mol/L), lo cual explica que el $[\text{Ni}(\text{PhDP})_2]$ tiene una afinidad por el glifosato.

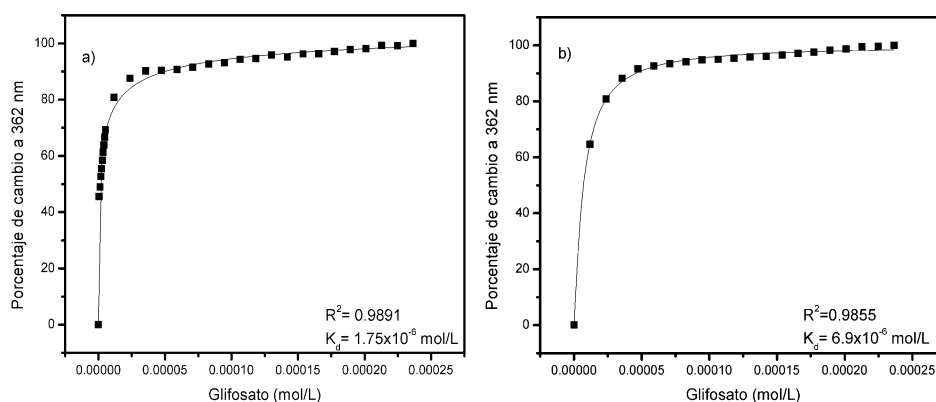


Figura 18. Modelo de ajuste de un sitio con concentraciones de $[\text{Ni}(\text{PhDP})_2]$ a) 1.08×10^{-4} mol/L y b) 3.6×10^{-5} mol/L, en presencia de glifosato (5.9×10^{-7} - 2.36×10^{-4} mol/L). (Elaboración propia)

De acuerdo a los estudios de (Chenprakhon, Sucharitakul, Panijpan, & Chaiyen, 2010; Y. Pan et al., 2016) un valor pequeño de K_d se refiere a una alta afinidad de unión del ligando por su objetivo, que en este caso el ligando es el $[\text{Ni}(\text{PhDP})_2]$ y por ende el objetivo sería el glifosato. Aunque los valores de afinidad son tres órdenes de magnitud más bajos en comparación con el sistema antígeno-anticuerpo, el ligando dipirrinato tiene la ventaja de que la respuesta analítica no necesita pasos adicionales para la separación y cuantificación como en el método por inmunoensayo.

8.3.2.4 Selectividad del método

Con el fin de conocer la aplicabilidad del método, se determinaron componentes que regularmente se encuentran presentes en el agua, para conocer si estos interfieren en la detección del glifosato. Es bien sabido que el glifosato puede formar enlaces de coordinación fuertes con iones metálicos de Fe^{2+} , Ca^{2+} y Mg^{2+} (Caetano et al., 2012; Ololade et al., 2014). Los resultados mostraron que la presencia de cationes no interfirieron significativamente en la formación del complejo $[\text{NiGlyp}(\text{PhDP})_2]$. El mismo conjunto de experimentos se llevó a cabo con otros plaguicidas organofosforados, que se utilizan continuamente en la agricultura, como el paratión (Yola, 2019), el dimetoato (Mondal et al., 2018) y el diclofentión (Ccanccapa, Masiá, Navarro-Ortega, Picó, & Barceló, 2016), así como sus mezclas. Los valores de absorbancia del complejo $[\text{NiGlyp}(\text{PhDP})_2]$ en presencia de los plaguicidas organofosforados y sus mezclas no mostraron una interferencia superior al 10%, por lo que se pueden descartar como interferentes. Se probó una mezcla entre $[\text{NiGlyp}(\text{PhDP})_2]$ y AMPA, debido a que el metabolito AMPA se encuentra frecuentemente en agua junto con glifosato (Demonte et al., 2018; Fernandes et al., 2019a). El metabolito no mostró ningún cambio adicional en la detección del glifosato. Finalmente, se probaron diferentes sales de fosfato, ya que se sabe que el ion fosfato puede formar complejos con otros metales como el níquel (Menelaou et al., 2009; Peleka, Mavros, Zamboulis, & Matis, 2006; Subramaniam & Hoggard, 1988), los cuales tampoco mostraron interferencia. Por lo tanto, todos los ensayos sugieren una buena selectividad del método ante la presencia de otros componentes (Tabla 17).

Tabla 17. Efectos de sales, plaguicidas organofosforados y fosfatos en la selectividad del método.
(Elaboración propia)

Compuestos	Absorbancia a 362 nm	D. S.	Interferencia (%) ¹
Control			
[NiGlyp(PhDP) ₂]	0.42	0.012	0.0
Sales			
FeCl ₃ · 6 H ₂ O	0.43	0.008	2.57
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0.41	0.008	0.19
NaNO ₃	0.42	0.007	0.78
MgCl ₂ · 6 H ₂ O	0.44	0.008	3.66
Mezcla de sales	0.45	0.010	5.49
Plaguicidas Organofosforados			
Paration	0.42	0.012	1.47
Dimetoato	0.45	0.011	4.28
Diclofenthión	0.43	0.002	0.22
Mezcla de plaguicidas	0.46	0.002	7.51
Fosfatos			
Na ₂ PO ₄ · H ₂ O	0.41	0.003	2.57
Na ₂ HPO ₄ · 7 H ₂ O	0.41	0.003	2.75
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0.42	0.008	0.81
Mezcla de fosfatos	0.43	0.005	0.67
Metabolito del glifosato			
AMPA	0.42	0.12	0.0

¹ Se calculó el porcentaje de interferencia, tomando como 0% de interferencia la absorbancia de 0.42 obtenida del complejo formado entre [Ni(PhDP)₂] (1.08x10⁻⁴ mol/L) y glifosato (4.1x10⁻⁶ mol/L), menos la absorbancia del complejo en presencia de los posibles interferentes entre la absorbancia del complejo multiplicado por cien.

8.3.2.5 Análisis de muestras de aguas fortificadas con glifosato

Se analizaron cuatro muestras de agua de diferentes matrices (potable, residual tratada, urbana y subterránea) para cotejar la aplicabilidad del método propuesto. A cada una de las muestras de agua intencionalmente se les adicionaron concentraciones de glifosato (4.1X10⁻⁶ y 5.9X10⁻⁶ mol/L).

Antes de la adición del glifosato la muestra de agua residual tratada, fue filtrada para eliminar los sólidos en suspensión.

Las muestras de agua urbana, residual tratada y agua subterránea fueron recolectadas dentro de la localidad de San Simón Atzitzintla, Puebla (de acuerdo a la NOM-230-SSA1-2002). Cabe señalar que las cuatro muestras de agua desde su recolección hasta su uso permanecieron almacenadas a 4 ° C, y se caracterizaron fisicoquímicamente mediante métodos convencionales de pH, conductividad, temperatura, demanda química de oxígeno (DQO) y demanda bioquímica de oxígeno (DBO); también se realizaron análisis de aniones y cationes: Ca^{2+} , Fe^{2+} , SO_4^{2-} , Mg^{2+} , NO_3^- , $\text{NO}_3\text{-N}$, PO_4^{3-} , P_2O_5 y cloro libre.

La Tabla 18 muestra los resultados de los parámetros fisicoquímicos de las cuatro matrices de agua analizadas. Las 4 muestras de agua previamente a las pruebas, fueron analizadas por el método ELISA disponible comercialmente (PN 500086) por Abraxis LLC (Warminster, PA, EE. UU.), para verificar que las muestras no tuvieran concentraciones de glifosato.

Las mayoría de las muestras analizadas se encuentran dentro de los parametros permisibles, con excepcion del agua residual tratada que de acuerdo a la NOM-067-ECOL-1994, la DQO se encuentra fuera de los límites máximos permisibles (250 mg/L), también se presentaron altos valores de nitratos (NO_3^-) en todas las matrices de agua, con respecto a la NOM-127-SSA1-1994 (10 mg/L), los cuales podrían estar asociados con las actividades agrícolas (Brena et al., 2005).

Tabla 18. Análisis fisicoquímico de las diferentes matrices de agua. (Elaboración propia)

Parámetros	Matrices de agua			
	Potable	Urbana	Subterránea	Residual Tratada
pH	7	7	7	7
Conductividad (µs/cm)	0.055	424	523	1448
Temperatura (°C)	25	25.3	25.3	24.7
DQO (mg/L)	2	152.7	97.2	651.38
DBO (mg/L)	0.73	76.48	42	320.62
Ca ²⁺ (mg/L)	20	75	115	145
Fe ²⁺ (µg/L)	51	68	67.5	178.5
SO ₄ ²⁻ (mg/L)	0	27.5	40	90
Mg ²⁺ (mg/L)	0	10	30	10
NO ₃ -N (mg/L)	1.1	1.65	18.35	24
NO ₃ ⁻ (mg/L)	5	82.75	99.45	104
PO ₄ ³⁻ (mg/L)	0.1	4.8	0.94	40.2
P ₂ O ₅ (mg/L)	0.08	4.53	0.67	31
Cloro libre (mg/L)	0.065	0.35	0.065	0.1

Posteriormente las diferentes muestras de agua fueron fortificadas intencionalmente con glifosato (4.1×10^{-6} y 5.9×10^{-6} mol/L) para monitorear los cambios de absorbancia en presencia del compuesto $[\text{Ni}(\text{PhDP})_2]$ (1.08×10^{-4} mol/L), con el objetivo de verificar si las absorbancias correspondían a las concentraciones adicionadas de acuerdo a la ecuación 6.

Tabla 19. Detección de glifosato en diferentes matrices de agua fortificadas intencionalmente (Elaboración propia)

Matriz de agua	Glifosato adicionado		C.V. (%)	Recuperación (%)
	($\times 10^{-6}$ mol/L)	Glifosato determinado ($\times 10^{-6}$ mol/L)		
Potable	4.1	3.72	2.89	89.58
	5.9	5.14	0.34	87.20
Urbana	4.1	3.66	2.09	88.64
	5.9	5.32	0.61	89.97
Subterránea	4.1	4.02	2.38	96.49
	5.9	6.32	0.82	106.99
Residual tratada	4.1	4.90	1.31	118.67
	5.9	7.03	0.99	119.04

Los porcentajes de recuperación de acuerdo a los resultados obtenidos en las muestras de agua varían entre 87.20-119.04% (Tabla 19), indicando que el método tiene una buena exactitud. Además, se obtuvo una alta precisión como se refleja en los coeficientes de variación (C.V.), debido a que no hubo variaciones superiores al 10% (Westgard, Barry, Quam, & Ehrmeyer, 2010). En general, la presencia de distintas sales y metales a diferentes concentraciones no afectó la detección, por lo que el método se puede aplicar para diferentes fuentes de agua.

Los resultados anteriores se publicaron en la revista “Water”, de la editorial MDPI, con doi:10.3390/w11040719. En colaboración de la Dra Mayra Avelar de la Universidad Nacional Autónoma de México (Anexo 1), se logró modelar la estructura molecular del complejo $[\text{NiGlyp}(\text{PhDP})_2]$, donde los resultados teóricos muestran que el níquel de $[\text{Ni}(\text{PhDP})_2]$ forma enlaces de coordinación con los átomos de nitrógeno y oxígeno del glifosato en una geometría molecular octaédrica distorsionada (Anexo 2).

Por otro lado, el compuesto $[\text{Ni}(\text{PhDP})_2]$, también tiene la capacidad de formar complejo con el plaguicida dimetoato, dicha capacidad dio lugar a desarrollar un nuevo método de detección de dicho plaguicida, los resultados fueron enviados para ser publicados en la revista “Journal of environmental science and health part b” (Anexo 3).

8.4 CIFRAS DE MÉRITO DEL MÉTODO DESARROLLADO

Empleando la enzima lacasa y el sustrato L-DOPA se logró determinar glifosato ($\text{LOD} = 1.92 \times 10^{-5}$ y $\text{LOQ} = 6.4 \times 10^{-5}$ mol/L) en muestras de agua modelo, sin embargo, los límites de detección y cuantificación exceden los límites máximos permisibles de la NOM-014-CONAGUA-2007A (4.14×10^{-6} mol/L). Por otro lado, empleando el $[\text{Ni}(\text{PhDP})_2]$ ha sido posible determinar glifosato por formación de complejo con estequiometría 1: 1, logrando un LOD de 2.07×10^{-7} mol/L y un LOQ de 9.8×10^{-7} mol/L. El método desarrollado garantiza repetibilidad de los datos, alta sensibilidad y detección rápida (10 s).

El método desarrollado a partir del compuesto $[\text{Ni}(\text{PhDP})_2]$ fue aplicado para determinar concentraciones conocidas de glifosato (4.1×10^{-6} y 5.9×10^{-6} mol/L) en diferentes matrices de agua (potable, urbana, subterránea y residuales tratada). Los porcentajes de recuperación y los coeficientes de variación obtenidos muestran una buena precisión y exactitud del método para poder ser aplicado en muestras ambientales. La presencia de las sales; otros plaguicidas organofosforados, y fosfatos, así como sus mezclas en el agua, no interfieren con la detección de glifosato.

Parte experimental de campo

9. VIDA SOCIAL DE LOS CAMPESINOS DE SAN SIMÓN ATZITZINTLA Y SU RELACIÓN CON EL GLIFOSATO EN EL AGUA

9.1 Cultura Campesina

En México, la agricultura siempre ha sido parte fundamental de las actividades económicas del país, por ello a lo largo de la historia esta ha sido constantemente manipulada, intervenida y con el tiempo modernizada (Gómez-Oliver, 1959). Una de las primeras transformaciones que sufrió la sociedad campesina, ocurrió con la llegada de los españoles y la introducción de técnicas como el monocultivo y las herramientas de metal, lo que permitió una agricultura extensiva con fines mercantiles. Previo a este suceso los campesinos practicaban el policultivo, manteniendo un equilibrio socio-espacial entre el campo y la ciudad, el cual fue alterado por completo con la introducción de las prácticas agrícolas europeas.(Troyo-Diéguéz et al., 2010).

Pichardo González (2006) argumenta que la Revolución Verde desarrollada durante la época de los años 50's ha sido el suceso con mayor impacto dentro de la historia agrícola en México, ya que a partir de apoyos políticos, sociales y económicos se consiguió la implementación de paquetes tecnológicos, provenientes de Estados Unidos de América, con la promesa de resolver el desabasto de alimentos que se vivía en ese tiempo. El campo era considerado anticuado respecto al desarrollo de la ciudad por el hecho de emplear fuerza animal y humana durante el proceso de producción y no una fuerza mecanizada. Los paquetes tecnológicos introducidos durante la revolución verde, mantienen su vigencia al día de hoy, con herramientas tan diversas como presas, sistemas de riego, semillas mejoradas, plaguicidas y fertilizantes de origen químico; así como maquinaria y herramienta que requieren de combustible para su funcionamiento (Pichardo González, 2006).

Distintos autores como (Ceccon, 2008; Qaim, 2016) reportan que la implementación de los paquetes tecnológicos de la revolución verde, han generado más perjuicios que beneficios, en distintos sectores. Por un lado, la sociedad campesina está siendo diferenciada y marginada espacialmente debido a la diversificación social, donde la palabra campesino ha pasado a ser sinónimo de pobreza, tal como ocurre en la zona de estudio (San. Simón Atzitzintla), donde ellos mismos dicen “a nosotros nadie nos apoya” refiriéndose a la falta de apoyos de las mismas autoridades, la incertidumbre de las ganancias sobre sus productos, así como la desprotección que sufren en caso de pérdida de las cosechas y la constante alza de precios de los fertilizantes,

plaguicidas y cualquier tipo de herramienta que empleen, viéndose marcada la visión de que la ciudad y el campo son completamente opuestos en sus actividades.

De acuerdo con (Bartra, 2019), la modernización del campo no ha cumplido con la promesa de una seguridad alimenticia, sino el de garantizar poder político; así como el enriquecimiento de los productores de agroquímicos, a costa del deterioro devastador de los recursos naturales y de las propias tierras de cultivo.

Ante el deterioro del estado de los recursos ambientales, diversos organismos internacionales como el Informe del Club Roma (1972), la Conferencia de las Naciones Unidas sobre Medio Ambiente (1972), el Informe Brundtland de la Comisión Mundial de Medio Ambiente y Desarrollo (1987) y la Conferencia de las Naciones Unidas sobre Medio Ambiente y Desarrollo (Río de Janeiro, 1992) (González, 2005), además de grupos ambientalistas y personalidades, han conformado un movimiento de presión con la finalidad de poder adquirir productos agrícolas libres de agroquímicos, además de exigir alternativas de producción menos agresivas para el medio ambiente así como para la salud (Artaraz, 2002; Guimaraes & Bárcena, 2002; UNEP, 2017).

Recientemente debido a la magnitud de los problemas ambientales y de salud que han provocado el uso descontrolado de plaguicidas y fertilizantes sintéticos, se ha retomado la práctica milenaria del manejo sustentable de plagas, el cual se conforma de distintas estrategias para controlar las plagas agrícolas, pero de una forma armónica con el ambiente y los seres vivos. Hoy en día se le ha denominado con el concepto de Manejo Integrado de Plagas (MIP), el cual consiste en la aplicación de distintas tecnologías agrícolas amigables con el medio ambiente que influyen sobre la conservación y disponibilidad espacio-temporal de los recursos naturales desde un enfoque ambiental, socioeconómico, cultural, religioso, político; así como las decisiones y consecuencias de su aplicación. Sin embargo, la adopción del MIP se ha convertido en un gran desafío principalmente por el bajo grado de estudios de los campesinos, la falta de políticas de fomento integral agropecuario que implique el desarrollo rural junto con los campesinos, falta de difusión de estas tecnologías amigables con el medio ambiente y la falta de conocimiento y sensibilización de todos los actores relacionados con estas tecnologías sintéticas con los problemas de su entorno social (Garcerán-Sáez & García-Sánchez, 2019; Holland et al., 2017; Molina, 2013; Zepeda Jazo, 2018).

9.2 MATERIALES Y METODOS

9.2.1 Zona de estudio

La presente investigación se realizó en la localidad de San Simón Atzizintla (Figura 19), que pertenece al municipio de San Salvador el Verde, en el estado de Puebla, ubicado en las coordenadas 098 ° 28'21" longitud oeste, 19 ° 15'58" latitud norte y una altitud de 2320 metros sobre el nivel del mar (INEGI, 2010). El municipio de San Salvador el Verde está catalogado como urbanización metropolitana, sin embargo, San Simón Atzizintla conserva las características de una zona rural: "la vida del campo". Tiene una población de 3,404 habitantes, ubicada aproximadamente a 5 km de la cabecera municipal. El clima es subhúmedo, con una temperatura media anual de entre 12 y 18 ° C, aunque la temperatura puede descender hasta los -3 ° C en invierno. Tiene un suelo *Haelic Phaeozem*, que se caracteriza por ser rico en materia orgánica y nutrientes (CONABIO, 2012), lo que permite que la agricultura de riego se practique ampliamente durante todo el año. Presenta lluvias en verano y un bajo porcentaje de precipitación en invierno. Durante el verano los campos son regados con agua proveniente de pozos profundos. La principal actividad económica en la localidad es la agricultura, y los principales cultivos son granos, flores y vegetales (INEGI, 2010).

La agricultura que se practica se caracteriza por ser dependiente de plaguicidas y fertilizantes sintéticos. De acuerdo a otros estudios se ha reportado que los mismos campesinos están conscientes de que los fertilizantes y plaguicidas son los causantes de que año con año se vuelva más evidente la degradación de sus tierras de cultivo, pero argumentan que si no emplearan estos paquetes tecnológicos sería imposible producir y pondrían en riesgo su fuente de ingresos (Misnaza, 2010).

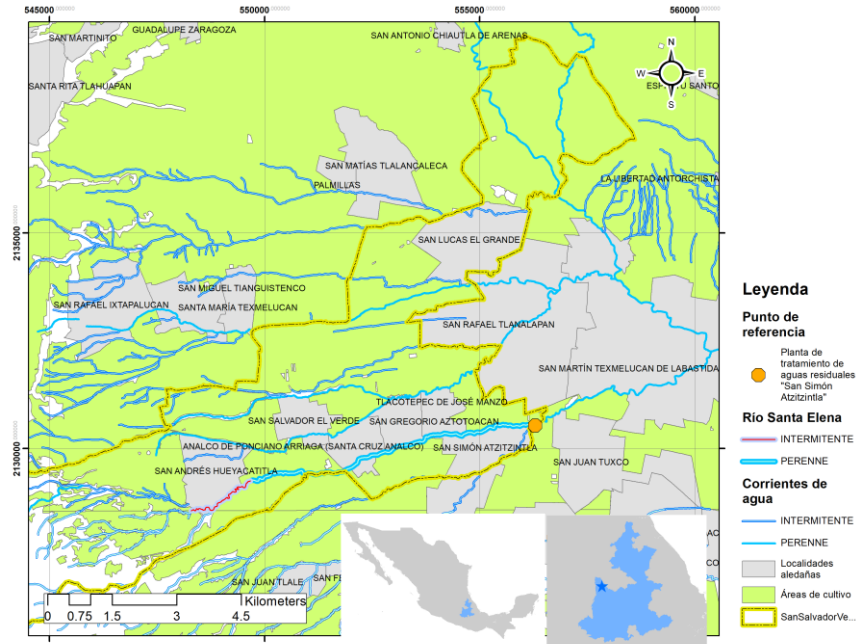


Figura 19. Ubicación del Municipio de San Salvador el Verde, sus localidades, Planta de tratamiento de Aguas Residuales y fuentes de agua (Elaboración propia con asistencia de Sánchez-Porrás, con datos de INEGI, 2010)

Dentro de la localidad de San Simón Atzitzintla se encuentra instalada una planta de tratamiento de aguas residuales (PTAR), que recibe descargas de cuatro localidades diferentes (San Simón Atzitzintla, Tlacotepec de José Manzo, Analco y San Gregorio) provenientes de diferentes actividades (domésticas, agrícolas e industriales). La PTAR tiene una capacidad instalada de 24 L/s, conformada por un pretratamiento que consta de dos canales de arena, una estación de bombeo, un reactor anaeróbico que consta de seis tanques de ocho metros de profundidad, un reactor biológico de lodo activado con cuatro aireadores, operando a 3.5 L de aire/s, un espesador de lodos con una capacidad máxima de 400 Kg y un sistema de cloración, administrando cuatro mililitros de hipoclorito al 11% por cada diez litros de agua (Figura 20). El lodo resultante es tratado para producir fertilizante, el cual es obsequiado cada seis meses a los campesinos de la zona.

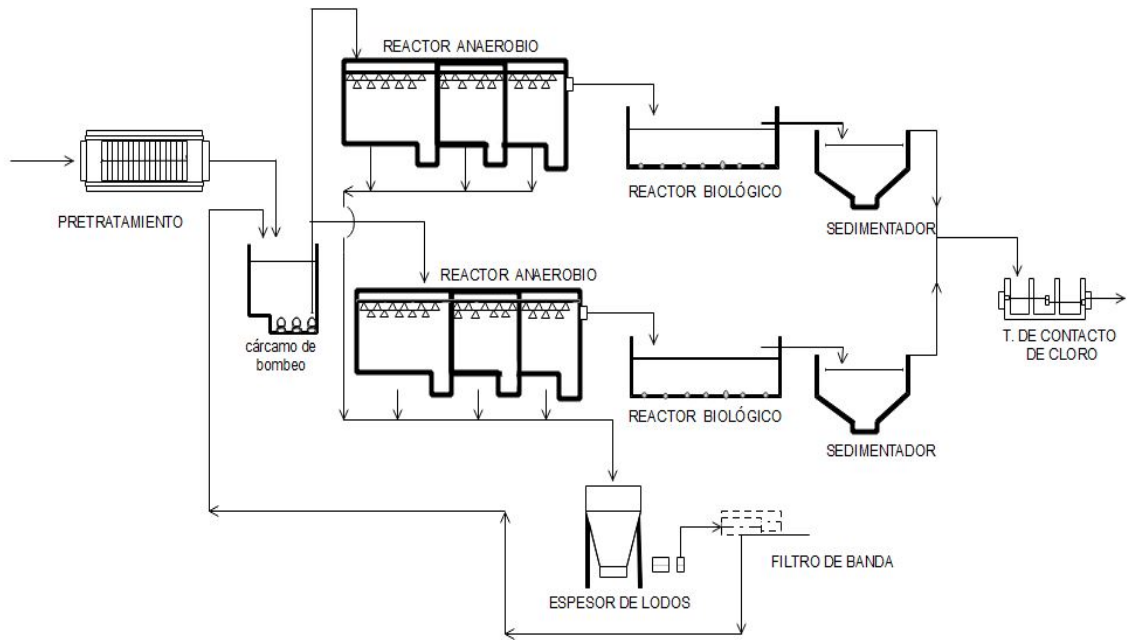


Figura 20. Diagrama de flujo de la PTAR de instalada en San Simón Atzitzintla

El agua tratada es descargada directamente en el río Santa Elena, que pertenece a la cuenca del río Atoyac, que a su vez forma parte de la región hidrológica de Balsas 18-A (DOF, 1998) (Figura 21). Las descargas están reguladas de acuerdo a la NOM-003-SEMARNAT-1997, que establece límites permisibles para contaminantes básicos (coliformes, sólidos suspendidos totales, huevos de helmintos, DBO5, grasas y aceites). El encargado de la PTAR menciona que las descargas son analizadas por CONAGUA cada tres meses para asegurarse de que cumplan con los límites establecidos. Sin embargo, esta normativa no regula otros contaminantes, como los plaguicidas.

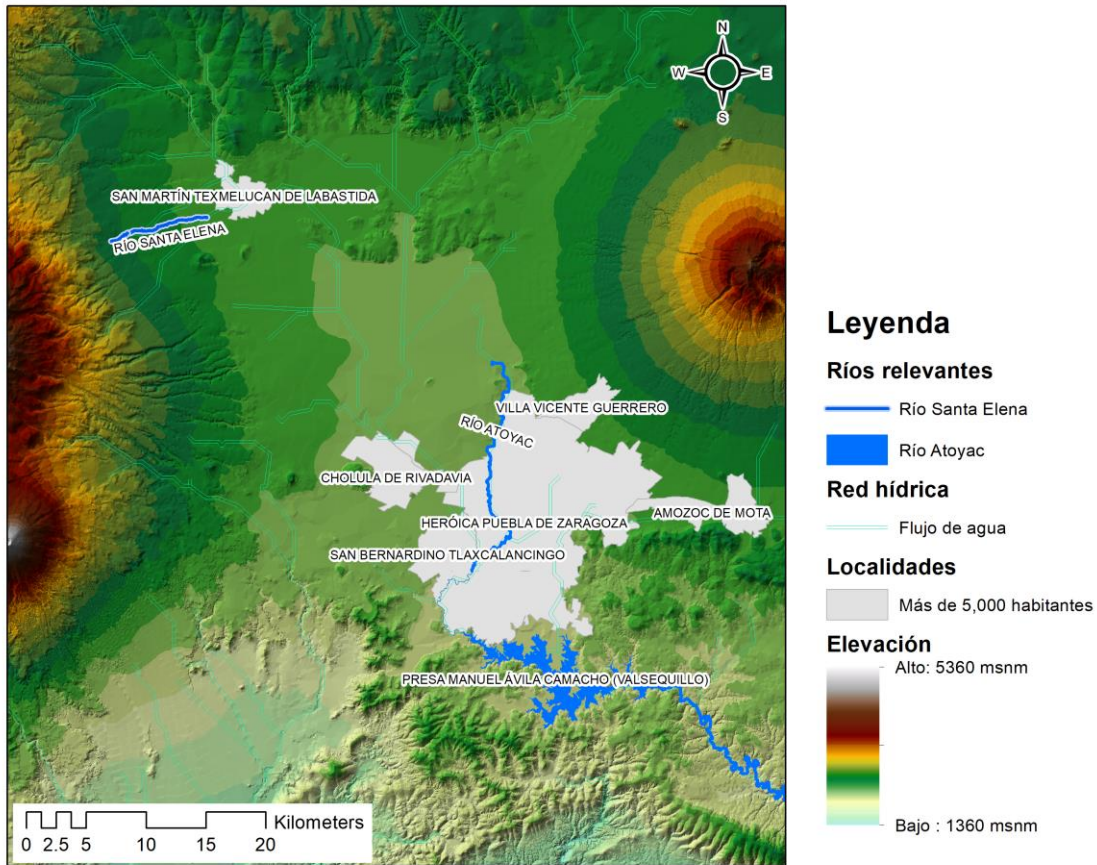


Figura 21. Ubicación del río Santa Elena y río Atoyac (Elaboración propia con asistencia de Sánchez-Porras, con datos de INEGI, 2010 y CONAGUA)

Durante las visitas de campo se observó que el río Santa Elena representa una fuente de agua importante para la región, ya que por un lado es empleado por las distintas actividades socio-económicas, como un cuerpo receptor de desechos, así como una fuente de agua gratuita principalmente para muchos campesinos ya que es empleada para regar los cultivos aledaños al río.

El criterio de selección de la localidad de San Simón Atzitzintla fue debido a que su principal actividad económica es la agricultura con dependencia a plaguicidas como el glifosato de acuerdo a datos obtenidos por INEGI (2010) y encuestas realizadas a vendedores de agroquímicos dentro de la región, esto siempre dependiendo de la accesibilidad a la localidad y la disponibilidad de participación de los campesinos.

9.2.2 Detección de glifosato en agua de diferentes matrices de San Simón Atzitzintla por el método ELISA

Para tener un primer indicio sobre la calidad del agua de la localidad de San Simón Atzitzintla en cuanto a presencia de glifosato, se analizaron 6 diferentes muestras de agua (potable, urbana, subterránea, canal de riego, residual y residual tratada) empleando el kit comercial de Abraxis LLC (Warminster, PA, USA).

9.2.3 Técnicas de recolección de datos

Para explicar las interrelaciones de la presencia de glifosato en diferentes matrices de agua de la localidad de San Simón Atzitzintla, se realizó trabajo de campo seguido de una observación no participativa y se desarrolló una estrategia de corte cualitativa. Lo anterior implicó la realización del trabajo etnográfico y el desarrollo de 10 entrevistas en profundidad a jefes de familia de campesinos que viven en un área de aproximadamente 300 ha, en las cercanías de la PTAR de San Simón Atzitzintla. Los campesinos entrevistados fueron hombres entre 38 y 65 años, dueños de sus tierras de cultivo. Las entrevistas fueron transcritas y analizadas, con la finalidad de conocer usos y prácticas de los campesinos de San Simón Atzitzintla en relación con el uso de glifosato en su vida cotidiana; así como identificar los diferentes aspectos de la vida cotidiana de los campesinos locales.

Las entrevistas fueron en profundidad (no estructuradas), en las que se incluyó contenido sobre patrones de uso de la tierra, adopción de tecnología agrícola, aplicación de plaguicidas, razones para aplicar plaguicidas adicionales y actitudes hacia el medio ambiente, así como los efectos que provoca el uso de plaguicidas en su salud. También fueron entrevistados 7 vendedores de plaguicidas de San Simón Atzitzintla para obtener información sobre su percepción de la dependencia de plaguicidas y para observar la interacción entre el agricultor y el vendedor cuando los agricultores compran los plaguicidas. Durante las entrevistas se permaneció durante la aplicación de plaguicidas y otras actividades agrícolas. El análisis socioeconómico se realizó a través de una caracterización del área de estudio utilizando datos del Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática (INEGI), y de la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). La información se descargó de los sitios web y se analizó con el software ArcGIS 10.3. El Anexo 4 incluye la guía que se empleó para realizar las entrevistas.

9.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9.3.1 Campesinado y transmisión de saberes de generación en generación en los grupos familiares de San Simón Atzitzintla

Una práctica típica que se logró identificar al realizar las entrevistas respecto el aprendizaje del oficio campesino, es que este es enseñado a los hijos a través de la experiencia directa de los padres, para que también se dediquen a la agricultura con el argumento de que puede ser una oportunidad de trabajo y fuente de ingresos. Manifestando que siempre han sido gente de campo durante generaciones y que disfrutaban de su oficio. Este proceso de transmisión de conocimientos incluye factores como la preparación de la tierra, identificación de plagas y la preparación de plaguicidas. La agricultura de la zona depende de fertilizantes y plaguicidas de origen químico, siendo estos insumos parte de la instrucción de los padres a los hijos y, muchas veces, la única capacitación que reciben al respecto de la aplicación de plaguicidas. Tal como lo expuso el señor Alberto, cuando se le preguntó sobre si había recibido capacitaciones para aplicar plaguicidas, el contestó: (2018, entrevista en profundidad, campesino de 58 años), *“no como tal, pero si me enseñó mi papá a como se usa la herramienta y se aplican los venenos, no es tan difícil hacerlo”* o como dice Don Augusto (2018, entrevista en profundidad, campesino de 56 años) *“¿Ya para qué?, si mi padre me enseñó todo lo que tenía que saber”*.

Por otro lado, con el paso de los años las fórmulas y concentraciones van cambiando, por lo tanto, los plaguicidas que aplican actualmente, no son los mismos que solían aplicar con sus padres. La resistencia de hierbas no deseadas, entre otras plagas, ha llevado a los campesinos a utilizar concentraciones más elevadas a las indicadas en las etiquetas de los envases de plaguicidas. Otra práctica común de los campesinos ante la resistencia de plagas es recurrir a las tiendas de agroquímicos para pedir información sobre qué hacer ante la resistencia de plagas o para que se les recomiende un producto nuevo y efectivo, como dice Don Cosme (2018, entrevista en profundidad, campesino de 74 años): *“pues hay que seguirle luchando contra las malezas ya sea aumentando o cambiando a otro y le pregunto a los ingenieros para que me digan que hacer, el chiste es no perder la cosecha”*, o como dice el señor Cristóbal (2018, entrevista en profundidad) *“nosotros le seguimos echando el matapasto y ya si nomás no se puede pues ya ahí en las tiendas nos van diciendo que hacer, ahí nos venden todo lo que vayamos a necesitar”*. Así como Don Cosme que aplica dosis mayores a las establecidas en las etiquetas o recomendadas por los vendedores de las tiendas de agroquímicos para combatir la resistencia de hierbas no deseadas, esta es una práctica

cotidiana de los campesinos entrevistados, ya que de manera habitual ocurren estas conductas que se van transmitiendo de padres a hijos. Favoreciendo con estas prácticas la persistencia de glifosato en el agua.

La principal razón por la que se recurre a las casas de agroquímicos, es para mantenerse informados sobre cuáles son las nuevas y más efectivas herramientas, tratamientos, así como plaguicidas que los ayuden a facilitar su labor. Para los campesinos es muy importante siempre estar a la vanguardia, para poder cosechar a tiempo y así continuar en el mercado, tal como lo expresa el señor Cristóbal (2018, entrevista en profundidad) *"si, nosotros vamos a las tiendas con los ingenieros para que nos vayan diciendo que es lo que debemos utilizar, porque si queremos seguir produciendo es necesario cambiar, si no, nos quedamos atrás en la competencia"* o como dice el señor Heradio (2018, entrevista en profundidad, campesino de 54 años) *"pues por eso vamos con los expertos en las tiendas, ellos nos dicen todo desde qué plaga nos está atacando, qué producto debemos utilizar y pues cómo se debe de aplicar, todo se va cambiando, no se puede uno quedar porque si uno se queda, pues ya no produce"*. Siendo evidente la despreocupación que existe de los campesinos sobre los efectos adversos que puede producir el glifosato en el ambiente, así como en su salud y en la de su familia

Los campesinos entrevistados tienen un promedio de escolaridad de 6.8 años, lo que equivaldría entre el primero y segundo de secundaria, solo uno de los campesinos entrevistados tiene carrera profesional. Por ejemplo está Don Cosme que sólo estudió hasta el segundo de primaria, expresando (2018, entrevista en profundidad) *"mi padre no me pudo mandar más tiempo a la escuela, es que éramos muchos hijos y pues no se podía, no había dinero para todos y pues ya mejor desde chico me quede trabajando en el campo, además de que me gusta"* o como el caso del señor Cristóbal que estudio hasta el bachiller (2018, Entrevista a Profundidad, campesino de 44 años) *"cuando termine el bachiller pues ya tenía suficiente edad para trabajar y ayudarle a mi padre, es que antes así se acostumbraba, estudiabas el bachiller y pues ya no era necesario seguir estudiando pues porque ya te ibas a dedicar al campo"*. Es necesario aclarar que independientemente de la escolaridad que tengan, los campesinos recurren a las tiendas de agroquímicos para ser orientados en la aplicación o en las dosis que deben de ser aplicadas principalmente cuando se trata de nuevos productos a utilizar, tal es el caso de Hugo que estudió la carrera de agronomía (2018, Entrevista en profundidad, campesino de 38 años) *"...sé cómo se aplican los plaguicidas porque me enseñó mi papá en un principio y ya más adelante en la universidad me volvieron a enseñar aunque yo ya sabía, pero a veces cuando voy a utilizar un producto nuevo, en las tiendas donde los compro me*

dicen más o menos cuanto ponerle, cada cuanto tiempo y algunos detalles, es que ahí ellos ya le saben porque pues los han probado sus clientes y luego ellos pues les dicen cómo sale mejor el producto, aquí muchas veces es de maña...” Es evidente que el conocimiento empírico, así como por sus propias experiencias sobre cómo se aplican los plaguicidas como el glifosato, prevalece en esta localidad sin importar el grado de estudio que tengan.

Hoy en día el acceso a internet es una herramienta básica, sobre todo de fácil acceso en localidades como San Simón Atzitzintla, ya que el 90 % de los entrevistados dicen tener teléfonos móviles con acceso a internet, el cual podría ser utilizado para buscar información sobre alternativas de herramienta, plaguicidas naturales o nuevas técnicas, sin embargo, ellos prefieren acudir a las casas de agroquímicos para adquirir conocimientos relacionados con el uso y manejo de plaguicidas. Solo uno de los campesinos entrevistados ha sido capacitado formalmente en el manejo de plaguicidas y el resto de los campesinos entrevistados realizan las aplicaciones de manera empírica. Esta conducta puede explicarse a partir de que todo lo relacionado con el campo y el trabajo asociado a ello, es transmitido de padres a hijos y a pesar de la vocación agropecuaria del municipio, no existe en su territorio Centros de Bachillerato Tecnológico Agropecuario, que son los institutos que el gobierno federal ha dispuesto para capacitar en el área, ni a nivel de educación básica (desde formación preescolar hasta la secundaria), ni media básica (bachillerato), ni mucho menos profesional; pues en ese rubro la universidad más cercana es la Universidad Tecnológica de San Martín Texmelucan, lo anterior pone de manifiesto la gran distancia que existe entre la política educativa y las necesidades de capacitación para el trabajo en las diferentes localidades del municipio. A este rubro puede sumarse, que las trayectorias educativas de sus habitantes, es breve y al menos en los entrevistados se reduce al nivel básico de forma incompleta; con lo que además se reproduce la falsa idea y estigma de que los más ignorantes e incapaces son los que deben dedicarse al campo.

Por otro lado, la cultura de leer los envases de los plaguicidas aplicados es prácticamente nula, ya que los mismos campesinos dicen tener la experiencia suficiente para aplicar los diferentes productos químicos sin leer las indicaciones, además de que los vendedores de agroquímicos les informan sobre las dosis que deben de ocupar. Como argumenta el señor Augusto (2018, entrevista en profundidad) *“no ya nosotros con la experiencia vamos viendo si se necesita más o menos químico, primero pues le ponemos lo que nos recomiendan los ingenieros, pero ya de ahí pues va por nuestra cuenta, es que luego aquí es conforme nos van pasando las cosas uno va preparando las cantidades porque no aplicamos uno a la vez se le ponen dos o tres o más productos”*

O lo que dice el productor Cristóbal, que solo lee las etiquetas en caso de que un producto sea nuevo (2018, entrevista en profundidad) *“normalmente cuando es un producto nuevo, sí, sí las leemos, ya cuando lo conocemos pues ya no lo leemos, leemos la etiquetas porque no lo conocemos o porque queremos saber qué tipo de propiedades trae, en este caso pueden ser proteínas, nitrógeno, fósforo, magnesio, potasio, entonces queremos saber cuánta cantidad y qué es lo que necesitamos en este caso, no sé a lo mejor quiero este producto pero lo quiero con proteínas pero también quiero que tenga de nitrógeno y pues por eso tenemos que recurrir a las tiendas para que ellos nos vendan justamente lo que necesitamos, al fin ellos son los que saben”*. Es evidente que los campesinos tienen mucha confianza en los vendedores, quizá aún mayor que en las mismas etiquetas de los plaguicidas, ignorando su lectura casi por completo.

De todo lo anterior, es indudable que, entre los hábitos adquiridos o aprendidos relacionados con minimizar los riesgos sobre el uso inadecuado de los diferentes plaguicidas, como el glifosato es una constante en la vida cotidiana de la comunidad. La invisibilidad del riesgo debido al manejo de glifosato en la localidad, probablemente no sean manifiestos de forma inmediata, pero si afectan a los procesos medioambientales en todo el municipio y deja expuestos no solo a la vulnerabilidad social a los campesinos, sino también a la vulnerabilidad medioambiental a largo plazo.

9.3.2 Grado marginación y pobreza de San Simon Atzitzintla

De acuerdo a INEGI (2015) la localidad tiene un tipo de urbanización metropolitana, que dispone de alumbrado público, calles pavimentadas, pozo de agua comunitario, mercado fijo, una red de agua potable y drenaje que descarga finalmente en la PTAR de San Simón Atzitzintla. La localidad cuenta con un total de 841 viviendas censadas, de las cuales 597 el jefe de familia es hombre, 699 con piso de tierra y 706 disponen de luz eléctrica, agua entubada de la red pública y drenaje, 709 con televisor, 404 con refrigerador, 113 con computadora, 206 con teléfono, 409 celular y 55 con acceso a internet (Instituto Nacional de Estadística y Geografía, 2015).

Los servicios de salud que se disponen dentro de la localidad son un centro de salud y consultorios médicos particulares, 455 habitantes son derechohabientes para recibir servicios médicos ya sea por el IMSS o ISSSTE, sin embargo, para recibir este servicio es necesario acudir hasta el municipio de San Martín Texmelucan. Los servicios de IMSS e ISSSTE se encuentran a 5.4 Km de la localidad, siendo necesario tomar 2 transportes públicos, que tienen un costo de \$7.00 MXN por cada uno, tardándose alrededor de 45 minutos desde la localidad de San Simón hasta la dependencia médica.

En cuestión de servicios educativos la localidad cuenta con niveles desde preescolar hasta bachillerato, teniendo un promedio de escolaridad de 8.36 años, que corresponde aproximadamente al segundo año de secundaria (INEGI, 2010; SEDESOL, 2010).

La localidad se caracteriza por ser rica en abastecimiento de alimentos, principalmente de semillas, carne y lácteos, ya que es muy común observar traspatios en la localidad en donde se encuentran desde pequeños sembradíos, principalmente de maíz, frijol y alfalfa, hasta animales como vacas, cerdos, borregos, gallinas y guajolotes; producción destinada principalmente para el autoconsumo.

Hacer mención de los servicios con los que cuenta la localidad, es necesario puesto que son indicadores esenciales para conocer el grado de marginación, rezago social y así como carencia de vivienda en la localidad (Gutiérrez-Pulido & Gama-Hernández, 2010). Retomando la definición de pobreza y rezago social del CONEVAL (2010), el cual define a la pobreza como un problema social que impone graves limitaciones en el desarrollo intelectual y social de las personas que la padecen, la cual a su vez niega la igualdad de oportunidades entre individuos y evidencia en materia del ejercicio de los derechos humanos, económicos y sociales de una sociedad y define al rezago social, como una medida ponderada que resumen 4 indicadores de carencias sociales (educación, salud, servicio básicos y espacios en la vivienda) en un solo índice que tiene como finalidad ordenar a la unidades de observación según sus carencias sociales (Consejo Nacional de Evaluación de la Política de Desarrollo Social, 2010). También es necesario retomar el concepto de marginación empleado por el Consejo Nacional de Población, expresándola como la persistente desigualdad en la participación de los ciudadanos y grupos sociales de desarrollo y en el disfrute de sus beneficios (Cortés, 2002).

Dentro del municipio de San Salvador el Verde, la única localidad catalogada con alto grado de marginación es San Antonio Chautla, mientras que existen otras 10 localidades de las cuáles no existen datos sobre el índice de marginación (SEDESOL, 2010). San Simón Atzitzintla, se encuentra catalogada dentro de un rezago social bajo. En 2005 la localidad se catalogó con un bajo grado de marginación, el cual aumento a medio en 2010. Al ser una localidad con bajo rezago social y con un grado de marginación medio (Figura 22). San Simón Atzitzintla no está catalogada como una zona que requiera atención prioritaria en materia de acciones urgentes para superar insuficiencias y rezagos para el desarrollo social y fortalecimiento del desarrollo regional equilibrado (Gutiérrez-Pulido & Gama-Hernández, 2010). Sin embargo, durante las entrevistas se

observó que los campesinos presentan carencias y limitaciones en la igualdad de oportunidades de servicios básicos, salud y educación.

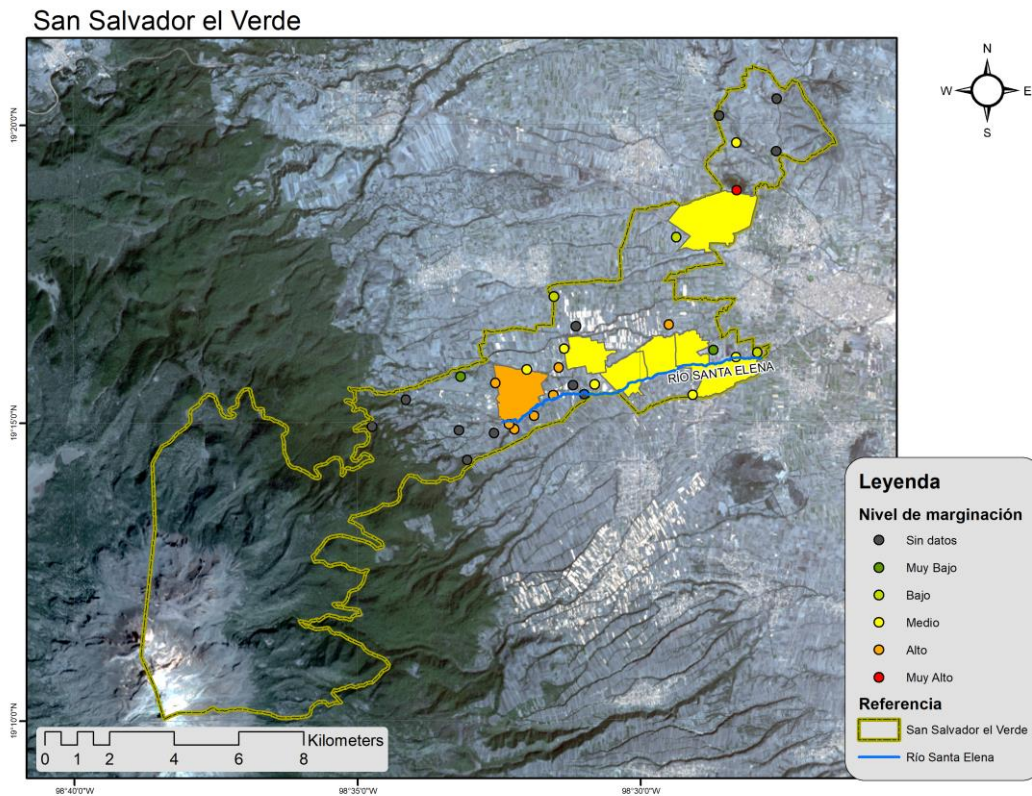


Figura 22. Mapa de índice de marginación en el Municipio de San Salvador el Verde (Elaboración propia con asistencia de Sánchez-Porrás, con datos de INEGI, 2010 y SEDESOL, 2013)

Al ser clasificada la localidad de San Simón en Rezago medio, no se está considerada para programas como el Programa para el Desarrollo de Zonas Prioritarias (SEDESOL, 2013a), que atiende rezagos vinculados con la infraestructura básica comunitaria, y la carencia de servicios básicos en las viviendas, ni en la Cruzada Nacional contra el Hambre (SEDESOL, 2013b), que busca abatir la pobreza, desnutrición y la marginación social en México; este tipo de programas son otorgados únicamente a zonas con un alto grado de marginación y rezago social.

A pesar de que la población de San Simón está catalogada como zona urbana conforme a los criterios estadísticos del INEGI, su modo de vida, de acuerdo a los campesinos entrevistados es de gente de campo (Salvador & Lamo de Espinosa, 2006) definen este estilo de vida como aquella clase social que se conforma por familias rurales que explotan la tierra, obteniendo una baja

remuneración de capital y a partir de un fuerte empleo de la fuerza de trabajo por parte de la familia, con el fin de utilizar lo producido para el sustento y reproducción de la unidad familiar, lo cual coincide con lo registrado en las entrevistas y observaciones que se realizaron a los campesinos de la localidad de San Simón Atzitzintla.

También existe la definición dada por la Real Academia Española, que define al campesinado como conjunto de personas que viven y trabajan de forma habitual en el campo; sin embargo, la definición de campesinado de Salvador y Lamo (2006), se considera la más adecuada para este trabajo puesto que describe una serie de costumbres que se identificaron durante las observaciones de esta investigación. Por ejemplo, la participación del núcleo familiar durante todo el proceso de producción, tanto en la horticultura, como en la floricultura, así como la costumbre de utilizar las ganancias en beneficio de la misma familia y en la compra de insumos para la producción, como plaguicidas, semillas y herramienta que deba ser sustituida.

En la localidad se identificaron conflictos por la propiedad de tierras, originados por el desempleo y la migración indocumentada en su mayoría con destino a Estados Unidos, para integrarse en el sector primario o terciario; además de que en años recientes se ha incrementado notablemente la delincuencia, debido al robo y distribución ilegal de hidrocarburos, puesto que San Simón Atzitzintla se encuentra dentro del triángulo rojo del estado de Puebla (Observatorio Nacional Ciudadano, 2019). Estos problemas se ven agravados por la falta de un cuerpo de policía preventiva en la zona, por lo que los pobladores de la localidad se ven afectados directamente (Instituto Nacional de Estadística y Geografía, 2015).

9.3.3 Tipos de cultivo y plaguicidas más utilizados

Los dos sistemas de producción agrícola que se identificaron durante las entrevistas fueron 7 horticultores y 3 floricultores. Los horticultores entrevistados acostumbran cultivar espinacas, frijol, avena, haba, alfalfa, cilantro, cebolla y rábano, aproximadamente cada 3 meses cambian de cultivo, ya que no suelen sembrar lo mismo dos cosechas seguidas, una parte de la cosecha es destinada para consumo de la familia y el resto es comercializado en la central de abastos de la ciudad de Puebla o en el mercado El Hoyo de San Martín Texmelucan. Los productos son vendidos por medio de subasta a los “acaparadores” que ofrecen el mejor precio, por lo que es imposible establecer un precio fijo por sus productos. Dentro de los plaguicidas que utilizan en sus campos de cultivo son: Arribo, Candela Super, Folicur, Manzate, Faena, Coloso, Flama y Rodeo (Tabla 20).

Tabla 20. Plaguicidas utilizados por los horticultores (Elaboración propia)

Nombre comercial	Ingrediente activo	Tipo de plaguicida	CT	Clasificación
Arraza	glifosato	herbicida	IV	organofosforado
Candela super	glifosato	herbicida	IV	organofosforado
Coloso	glifosato	herbicida	IV	organofosforado
Desafío	glifosato	herbicida	IV	organofosforado
Faena	glifosato	herbicida	IV	organofosforado
Rodeo	glifosato	herbicida	IV	organofosforado
Flama	paraquat	herbicida	II	bipiridilo
Folicur	tebuconazole	fungicida	IV	benzimidazol
Manzate	mancozeb	fungicida	IV	ditiocarbamato
Arrivo	cipermetrina	Insecticida	III	piretroide

Todos los herbicidas que emplean los horticultores contienen el ingrediente activo glifosato (Arraza, Candela Super, Coloso, Desafío, Faena y Rodeo), y estos se aplican cada dos o tres meses, como un control para eliminar las hierbas no deseadas en los campos antes de ser cultivados. También hacen uso de fungicidas (Folicur y Manzate) para atacar la cenicilla, la roya, septoriosis y un hongo que llaman pudrición gris. Por último, como insecticida utilizan “Arrivo” para combatir gusanos y arañas.

En el caso de los floricultores producen rosa, gladiola, crisantemo y astromelia, sus productos son comercializados en la central de abastos de la Ciudad de México o en la de Puebla. Cabe resaltar que dos de los floricultores entrevistados son el presidente y el secretario de Floricultores de Texmelucan Sociedad Rural de Responsabilidad Ilimitada, mencionando que el principal beneficio que han logrado con esta asociación es una zona especial para la venta de sus productos en la central de abastos de México. La venta se lleva a cabo por subasta al igual que los horticultores, sin embargo, el tener un espacio asignado facilita la comercialización. Algunos de los herbicidas que utilizan para controlar las hierbas no deseadas de los linderos y canales de riego alrededor de sus invernaderos son Gramoxone, Arraza, Faena, Flama y Rival, ya que los floricultores suelen remover las hierbas de forma manual. De los fungicidas para combatir la cenicilla y la Peronóspora, son “Folicur” y “Mazate”, además del insecticida “Foley” para los gusanos (Tabla 21).

Tabla 21. Plaguicidas utilizados por los floricultores (Elaboración propia)

Nombre comercial	Ingrediente activo	Tipo de plaguicida	CT	Clasificación
Gramoxone	paraquat	herbicida	II	bipiridilo
Faena	glifosato	herbicida	IV	organofosforado
Rival	glifosato	herbicida	IV	organofosforado
Flama	paraquat	herbicida	II	bipiridilo
Folicur	tebuconazole	fungicida	IV	benzimidazol
Manzate	mancozeb	fungicida	IV	ditiocarbamato
Foley	clorpirifos etil	insecticida	III	organofosforado

Los floricultores no aplican herbicidas durante el proceso de producción ya que ellos mismos remueven las hierbas no deseadas de forma manual. Pero, por otro lado, los herbicidas los llegan a emplear en época de lluvias con el fin de controlar el crecimiento excesivo del pasto en los senderos, para evitar que animales venenosos se escondan en estos y así prevenir que los campesinos sean mordidos o picados por animales venenosos. Otro de los usos del “Faena” (herbicida con el ingrediente activo glifosato) es su aplicación en canales de riego con el propósito de eliminar pastos u otras hierbas que impidan el paso del agua.

En promedio en ambos sistemas de producción cumplen con una jornada de trabajo de 8 horas al día, utilizando agua proveniente de pozos profundos para regar sus campos de cultivo. Ante todo lo anterior podemos concluir que ambos sistemas de producción utilizan el ingrediente activo glifosato, además de que dentro de las mismas entrevistas se logró identificar que este herbicida también es utilizado en los alrededores de sus hogares, para el control de hierbas no deseadas.

La clasificación de los plaguicidas de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud se basa en la peligrosidad o grado de toxicidad de acuerdo con su dosis letal (LD), considerando las siguientes categorías: Clase IA (extremadamente peligrosos); Clase IB (altamente peligrosos), Clase II (moderadamente peligrosos); clase III (ligeramente peligrosos). Para México existe un ajuste en la Categoría Toxicológica (CT), que respeta la clasificación realizada por la OMS, designando como CT I, II, III, y IV de acuerdo al Catálogo de plaguicidas de la Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas (CICOPLAFEST, 2004). De acuerdo con esta clasificación, en los campos de cultivo los horticultores aplican

plaguicidas de la categoría altamente peligrosos, como es el caso del plaguicida “Flama”. Los floricultores también utilizan plaguicidas de esta misma categoría como el “Gramoxone” y el mismo “Flama”. El glifosato dentro de la regulación mexicana se encuentra dentro de la CT IV (ligeramente peligroso), mientras que para otros países es de uso restringido o ya se encuentra prohibido (Malkanathi et al., 2019).

Se revisaron las fichas técnicas y de seguridad de las seis fórmulas comerciales que contienen el ingrediente activo glifosato y que son utilizadas por los campesinos entrevistados. Se compararon las acciones tomadas por los agricultores con respecto a las indicaciones de las hojas técnicas y de seguridad con el fin de buscar relaciones causales entre la presencia de glifosato en aguas de la localidad y las actividades agrícolas de la misma. Por último, se realizó una revisión de los efectos ambientales señalados en las fichas técnicas con respecto a la literatura (Tabla 22).

Tabla 22. Procedimientos, instrucciones de uso y efectos señalados de las marcas comerciales que contienen el ingrediente activo glifosato (Elaboración propia)

Marca comercial	Concentración de glifosato (%)	Presentación	Procedimientos de manipulación de acuerdo a la compañía	Instrucciones de la compañía	Efectos señalados por la compañía
RODEO (MONSANTO)	35.5	Emulsión Aceite en Agua	Uso reservado para agricultores y aplicadores profesionales	Prever un sistema de lavado ocular cerca de las zonas, en las que pueda producirse un contacto con los ojos. Mantenerlo alejado de desagües, alcantarillas, fosos y corrientes de agua	Provoca irritación ocular grave, poco peligro para el medio ambiente
ARRAZA	41.00	Emulsión Aceite en Agua	No se recomienda su uso en mezclas	Aplicación dirigida a la maleza en los cultivos de aguacatero. Limón, naranjo, toronjo, pomelo, plátano	Es fitotóxico para todas las plantas verdes y puede dañar a las especies que no son objeto de control
FAENA Fuerte 360 (MONSANTO)	35.6	Emulsión Aceite en Agua	Realice triple lavado de los envases vacíos al momento de hacer la mezcla del producto para su aplicación, depositando el agua en el tanque de la aspersora.	Destruya los envases vacíos y sus residuos conforme lo establece la Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos.	No tiene actividad en el suelo por lo que no daña la emergencia del cultivo
CANDELA* SUPER	66.89	Emulsión Aceite en Agua	Evite que el material fluya hacia lagos, corrientes de agua, estanques y drenajes.	Utilice overol o uniforme de manga larga y cubierta para la cabeza	Movilidad baja; no se espera que llegue a las aguas subterráneas. Muy tóxico para los organismos

					acuáticos, con efectos nocivos duraderos
RIVAL (MONSANTO)	68	Gránulos	No aplique directamente sobre el agua o cerca de cuerpos de agua	Quítese la ropa inmediatamente si es contaminada con plaguicidas y lávela cuidadosamente.	se encuentra en un rango de prácticamente no tóxico a ligeramente tóxico en una gran variedad de especies acuáticas y aves
DESAFÍO	62	Gránulos	Dispóngase los envases vacíos de acuerdo al Reglamento de la Ley de Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente en material de residuos peligrosos.	para prevenir el desarrollo de poblaciones resistentes, siempre respete las dosis y las frecuencias de aplicación; evite el uso repetido de este producto	la biodegradación microbiana es completa formándose finalmente compuestos naturales: co ₂ , agua, n y fosfato. se adsorbe fuertemente en el suelo por lo que no se lixivia, siendo su vida media de más de 60 días. en el suelo se inactiva rápidamente.

La indicación de mantener el producto alejado de desagües, alcantarillas, canales y todo tipo corrientes de agua para evitar su contaminación se encuentra en todas las hojas de seguridad revisadas, siendo una de las indicaciones más ignorada ya que el 100% de los campesinos entrevistados realizan la limpieza de los equipos de fumigación en los canales de riego. Otra mala práctica registrada durante las entrevistas es la aplicación del herbicida en los canales de riego para el control de hierbas no deseadas que crecen dentro de los canales, con el fin de evitar que estas obstaculicen el paso de la corriente de agua. Al igual es muy común abandonar los recipientes vacíos en, o cerca de los canales de agua, el 70% de los entrevistados afirma haberlo hecho, además de que se encontró evidencia de ello durante el proceso de las entrevistas (Figura 23).



Figura 23. Evidencia de abandono de envases de plaguicidas en el campo, cercano a canales de riego (Elaboración propia, 2017)

El equipo de seguridad recomendado para poder cumplir con una aplicación segura del herbicida incluye gorra, overol de algodón, mascarilla, lentes de tipo químico, guantes y botas de neopreno; posterior a la aplicación es necesario descontaminar en el lugar de aplicación con detergente y una solución alcalina (lejía), tanto al equipo de protección como al de aplicación. Los entrevistados afirman hacer uso de todo el equipo de protección, sin embargo, durante las visitas se observó en múltiples ocasiones la aplicación de plaguicidas, constatando que como equipo de protección se usan únicamente gorra o sombrero y botas de neopreno (Figura 24). Por otro lado, los agricultores no suelen realizar una descontaminación adecuada de sus equipos: las mochilas de motor y botas se lavan en los canales de riego únicamente con agua, sin ningún tipo de detergente y la ropa de trabajo la lavan las mujeres de la casa empleando detergentes comerciales.



Figura 24. Campesino aplicando mezcla de plaguicidas (Elaboración propia, 2018)

Para prevenir el desarrollo de poblaciones resistentes se recomienda siempre respetar las dosis y frecuencias de aplicación; así como evitar el uso repetido del producto. El 70% de los agricultores entrevistados no respetan esta indicación y tienden a aumentar las concentraciones y frecuencias de aplicación del producto hasta lograr eliminar las hierbas no deseadas.

En las fichas técnicas se encuentra el apartado de identificación de los peligros, indicando que el producto al estar en contacto con los ojos provoca lesiones oculares graves, información que se corroboró durante las entrevistas. El 70% de los agricultores afirmó presentar irritación en los ojos por tener contacto ocular con el producto, incluso aseguran tener problemas visuales por estar expuestos a este tipo de productos.

El 90% de los campesinos nunca han recibido una capacitación oficial, salvo el ingeniero agrónomo que recibió capacitaciones a lo largo de sus estudios profesionales. El resto de los agricultores dicen que la única capacitación recibida para aplicar plaguicidas es la enseñada por sus padres cuando aprendieron el oficio, seguido de las recomendaciones recibidas por los vendedores de las tiendas de agroquímicos. Las hojas de seguridad, sin embargo, limitan el uso del herbicida a agricultores capacitados, y en el caso especial de la fórmula comercial RODEO está se restringe aún más, ya que hace indicación de que el producto solo debe ser aplicado por agricultores y aplicadores profesionales, además de que es necesaria la instalación de un sistema de lavado ocular en caso de

salpicaduras, sin embargo ninguno de los campos de cultivo de los agricultores entrevistados cuenta con este tipo de instalaciones.

El herbicida comercial ARRAZA recomienda no realizar mezclas con otros plaguicidas, sin embargo, el 100% de los entrevistados dicen realizar mezclas con la finalidad de ahorrar tiempo en las aplicaciones y conseguir una mejor apariencia de los productos.

Las hojas de seguridad afirman que la presencia de su producto en el suelo tiene baja movilidad por lo que no es posible su migración a aguas subterráneas, sin embargo, existen estudios que demuestran lo contrario. El estudio realizado por (Rendón-Von Osten & Dzul-Caamal, 2017a), determinó concentraciones de glifosato en el 100 % de sus muestras (agua embotellada, subterránea). Otra investigación realizada por (Sanchís et al., 2012) también determinó en agua subterránea concentraciones de glifosato que excedían los límites máximos permisibles en agua.

Las hojas técnicas de las fórmulas comerciales aseguran que el uso de los productos representa poco peligro para el medio ambiente, pero por otro lado, existe evidencia de la afectación a diferentes servicios ambientales que proporcionan distintos organismos, como es el caso de la población de lombrices de tierra (fundamentales en la fertilidad del suelo, redistribución de la materia orgánica, así como el incremento en la penetrabilidad del suelo) (Gaupp-Berghausen et al., 2015). Del mismo modo, la población microbiana del suelo, que ayuda a descomponer los residuos de las plantas y a mineralizar la materia orgánica, se ve afectada debido al incremento de patógenos y el consumo de nutrientes (Zaller, Heigl, Ruess, & Grabmaier, 2014; Zobiole et al., 2010). También existe un estudio sobre afectaciones en los mecanismos de defensa de las plantas debido a la presencia de glifosato en el medio (Johal & Huber, 2009).

Respecto a la disposición de los residuos y envases vacíos, las hojas de seguridad dictan que estos deben de ser destruidos conforme a lo establecido en la Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos. De acuerdo con la información obtenida en las entrevistas a profundidad, los productores de la zona no conocen de la existencia de alguna ley en materia de plaguicidas o residuos peligrosos, por lo que el 20% los desecha en la basura, el 40% los suele dejar abandonados en el campo y el 30% dice llevarlos a un centro de acopio, sin embargo, durante el tiempo que se realizaron las entrevistas nunca paso la camioneta encargada de la recolección de residuos. Cabe señalar que durante las visitas se observaron envases vacíos abandonados dentro y cerca de los invernaderos. La Ley general para la prevención y gestión integral de los residuos, establece que los

residuos peligrosos como los plaguicidas deben de ser confinados en centros de acopio, donde los residuos serán destruidos por incineración o por termólisis, con el fin de reducir el volumen y descomponer o cambiar la composición física, química o biológica del residuo.

Se compararon las composiciones químicas de las fórmulas comerciales CANDELA SUPER y RIVAL, encontrándose contradicciones entre cada formula comercial, por un lado, la hoja de seguridad del herbicida CANDELA, cataloga al producto como muy tóxico para los organismos acuáticos, con efecto nocivo duradero, caso contrario del RIVAL, ya que se encuentra en un rango de prácticamente no tóxico a ligeramente tóxico, haciendo mención de que se realizaron numerosos experimentos en especies acuáticas y aves. Sin embargo en una revisión bibliográfica se encontraron distintos estudios donde demuestran que por sí solo el ingrediente activo glifosato provoca efectos nocivos en las poblaciones acuáticas así como a aves (de Brito Rodrigues et al., 2019; Fan, Geng, Ren, & Wang, 2013; Kelly, Poulin, Tompkins, & Townsend, 2010; Tsui & Chu, 2003).

9.3.4 Glifosato en agua de la localidad de San Simón Atzitzintla

Empleando el Kit comercial de Abraxis para determinar glifosato en agua, se analizaron 6 diferentes muestras de aguas, de las cuales solo el agua de canal de riego, el agua residual y el agua residual tratada resultaron positivas a la presencia de glifosato. La tabla 23 muestra las concentraciones de las muestras que dieron positivo a presencia de glifosato.

Tabla 23. Detección de glifosato en matrices de agua provenientes de la Localidad de San Simón Atzitzintla, empleando el Kit ELISA de Abraxis (Elaboración propia)

Matriz de agua	Glifosato (ppt)	D. S.
Canal de riego	72.91	0.009
Agua residual	1162.69	0.002
Agua residual tratada	1486.01	0.007

Por lo tanto, la presencia de glifosato en diferentes matrices de agua, nos confirma que en la localidad de San Simón Atzitzintla, el glifosato es utilizado ampliamente durante sus actividades agrícolas, puesto que se detectó en los canales de riego. Además, la presencia de glifosato en agua residual tratada, quiere decir que el tratamiento recibido por la PTAR es inadecuado.

9.3.5 Estado actual de la PTAR en San Simón Atzitzintla

Fueron realizadas visitas en distintos momentos a la PTAR de San Simón Atzitzintla; en las que se observó que su ubicación está en el centro de una zona habitacional, pues en un radio de 20 metros se encuentran asentamientos humanos (casas), que descargan sus aguas residuales de uso habitacional al caudal del río Santa Elena, que finalmente llegan a la PTAR, dentro del mismo radio el principal uso del suelo está referido a tierras cultivo (Figura 25), donde habitantes y campesinos cercanos a la PTAR son potencialmente vulnerables a la exposición directa de gases, malos olores, e indirectamente debido a los lodos residuales generados durante el tratamiento. Por lo que se decidió platicar con habitantes cercanos a la PTAR sobre los beneficios o afectaciones que han presenciado, desde que comenzó a operar esta. Se platicó con la Sra. Rosa que llegó a vivir en la zona hace 17 años (antes de la construcción de la PTAR), su domicilio se encuentra aproximadamente a 200 metros de donde se encuentra instalada la PTAR, la cual argumenta (56 años, 2018) “*nunca fuimos avisados sobre su construcción, sino que supimos de su existencia por los malos olores que se comenzaron a producir por su operación*”. Lo que pone de manifiesto la separación o distancia existente entre el ciudadano común y los órganos de gobierno, pues a pesar de que el proyecto se implementa siguiendo los procedimientos establecidos por las legislaciones ambientales vigentes, los habitantes no reconocen la necesidad de dicha planta de tratamiento ni el impacto benéfico de la misma en la región.



Figura 25. Campos de cultivo y casas habitacionales cercanos a la PTAR de San Simón Atzitzintla

(Elaboración propia, 2017)

Durante el desarrollo de la investigación, otro informante encargado en la operación de la PTAR señalaba (2019): “*uno de los problemas que afecta constantemente el tratamiento son las descargas de textileras, las cuales provocan la desestabilización de la planta dejándola inactiva por hasta tres meses o más*”. Ante este problema los responsables de su operación han optado por cerrar el flujo

de la entrada a la planta, cada vez que el operador detecta descargas coloridas, con el fin de evitar la desestabilización de la misma (Figura 26).



Figura 26. Contaminación de agua por colorantes rojo y azul. (Elaboración propia, 2017)

Es notable que otro problema que aqueja a la PTAR, conforme a los expuesto por nuestros informantes es es la falta de mantenimiento (Figura 27), así como la capacitación técnica de los operadores, además de que no existe un programa de capacitación oficial para operar la planta. Estas deficiencias (falta de capacitación y mantenimiento) podrían ser factores fundamentales que influyen potencialmente en el adecuado tratamiento de las aguas residuales.



Figura 27. Evidencia de corrosión en reactor anaeróbico provocada por los gases en la PTAR de San Simón Atzitzintla. (Elaboración propia, 2017)

La PTAR en San Simón Atzitzintla se encuentra regulada únicamente en contaminantes básicos, por lo que el tratamiento en si es inadecuado para el resto de contaminantes. La implementación de un tratamiento eficiente en la PTAR de San Simón Atzitzintla es necesaria, puesto que algunos campesinos de las localidades de Analco y Tlacotepec de José Manzo continúan regando sus campos de cultivo con agua del río Santa Elena, sin tener conocimiento sobre la calidad del agua y

con ello, se sigue produciendo para el autoconsumo y la comercialización de hortalizas y flores que en su mayoría se comercializa en el mercado local. Los campesinos de Analco y Tlacotepec de José Manzo cosechan usualmente calabazas, lechugas y tomates; que son distribuidas en el mercado “El Hoyo” de San Martín Texmelucan o en las centrales de abasto de las ciudades de Puebla y México, debido a su cercanía. Por otra parte, los informantes refieren que hay campesinos que han suspendido el riego de sus cultivos con agua del río Santa Elena, debido a que sufren de irritación en piel y ojos al estar en contacto con el agua. Además de que en 2016 el río Santa Elena se catalogó como un cuerpo de agua con alto grado de contaminación debido a los malos olores que genera y efectos negativos que provocaba a los campesinos por usar agua del río (Espinoza Galindo, 2016). Sin embargo, no se pueden identificar estudios científicos que comprueben ese dicho que refieren, ni los parametros en los que se atribuye dicha causalidad.

La presencia tanto de plaguicidas y otros contaminantes emergentes en el agua, es un riesgo potencial importante para la salud, ya que puede estar contribuyendo a la incidencia de enfermedades crónico degenerativas (Scarsi et al., 2017). Más del 50% de las PTAR en México han sido calificadas a nivel global por tener un pésimo funcionamiento, debido a que ninguna aplica medidas específicas para la remoción de contaminantes emergentes. Donde la mayoría de las PTAR en México emplea la cloración como tratamiento en la eliminación de microorganismos, sin embargo estudios revelan que la cloración no es una practica segura, puesto que no garantiza la eliminación completa de microorganismos resistentes como virus y parásitos (Merino-Pérez & Velázquez-Montes, 2018).

El agua contaminada con glifosato arriba al cauce del río Santa Elena, junto con descargas industriales que contienen una gran cantidad de contaminantes desconocidos. Dichos contaminantes son desplazados a distancias lejanas de donde fueron aplicados en un principio, debido al flujo del cauce del río Santa Elena, el cual tiene una trayectoria hacia el río Atoyac, quedando potencialmente expuestos a los efectos negativos que provoca el glifosato, tanto la población; como los compartimentos ambientales que tienen contacto con esta agua. La PTAR de San Simón Atzitzintla trata solo una parte del cauce del río Santa Elena; sin embargo, como se mencionó anteriormente este tratamiento es inadecuado, debido a la presencia de glifosato que se determinó en las muestras de aguas tomadas, por lo tanto la población y los compartimentos continúan expuestos a los efectos adversos del glifosato, ya que el agua residual tratada es nuevamente descargada al cauce del río Santa Elena (Figura 28).

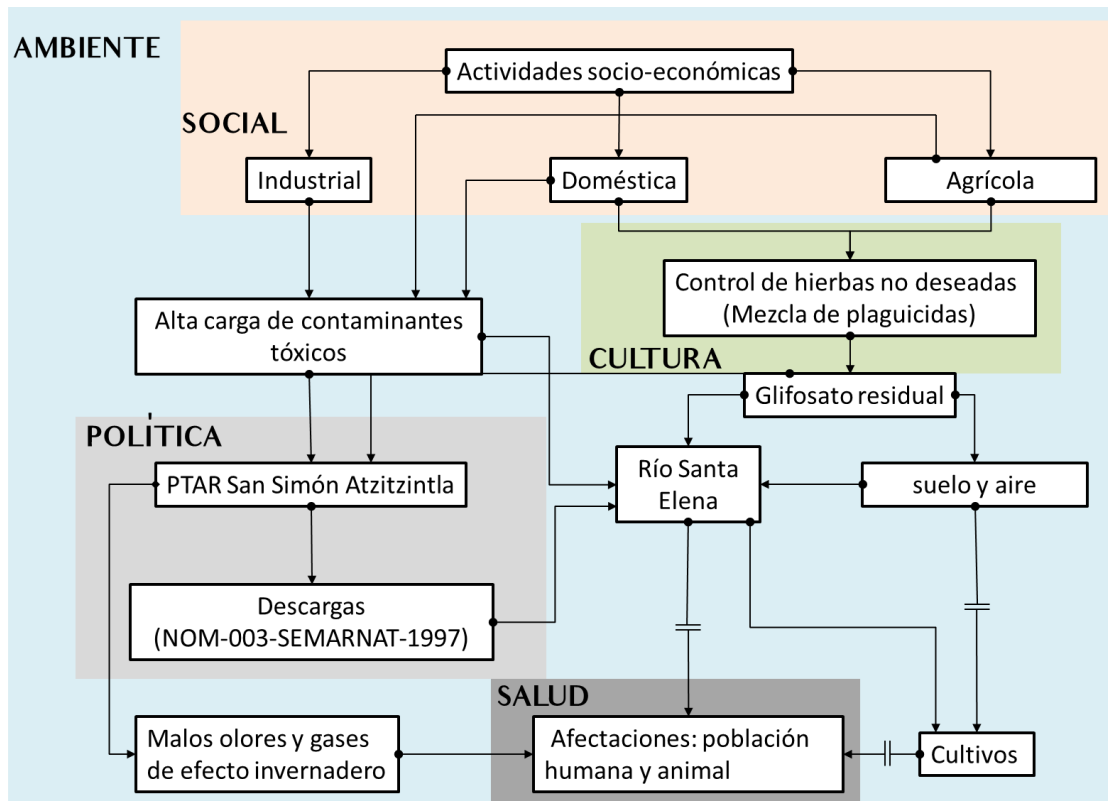


Figura 28. Causas de la presencia de glifosato en agua superficial de San Simón Atzitzintla (Elaboración propia)

Debido a las observaciones durante las visitas a la PTAR de San Simón Atzitzintla, se puede decir que la ineficiencia del tratamiento ocurre por la falta de mantenimiento de ésta, seguido de la gran cantidad de contaminantes desconocidos que llegan a la planta, los cuales impiden un eficaz tratamiento, debido a que la planta está normalizada únicamente para tratar contaminantes básicos. A la fecha no existe estudios ni análisis sobre los efectos adversos a través de diferentes compartimentos ambientales en contacto con el río Santa Elena, así como las poblaciones cercanas al mismo río.

El oficio de campesino es transmitido de generación en generación, lo que ha permitido la supervivencia de diversas generaciones de campesinos que mantienen la esperanza de que seguirán siendo beneficiados de esta fuente de agua para regar sus cultivos y en general como eje de su vida cotidiana en casas, traspatis y demás espacios en lo individual y en lo comunitario.

10. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

En este estudio se han abordado diversas causas de la presencia de glifosato en diferentes matrices de agua de la localidad de San Simón Atzitzintla. Una de las que mayor peso tiene es la cultura agrícola dependiente de plaguicidas sintéticos que se practica en esta zona, se logró identificar que el glifosato es uno de los herbicidas preferidos por los campesinos entrevistados, por la familiaridad que tienen con el mismo y la relevancia que les dan a las recomendaciones de los técnicos de las tiendas de agroquímicos. Adicionalmente, los campesinos no tienen una cultura de prevención de la contaminación, es necesario fomentar la toma de conciencia y difusión de la información puesto que existe una falta de conciencia y desinformación. Es una realidad que los campesinos no reciben capacitaciones oficiales, lo que ha traído como consecuencia una serie de malas prácticas al aplicar los plaguicidas, ya sea en la forma de aplicaciones directas o cercanas a los cuerpos de agua, el uso de concentraciones mayores a las recomendadas o inclusive desconocidas por los mismos campesinos y mala disposición de envases.

Por otro lado, las políticas y programas gubernamentales de capacitación agrícola se enfocan en el uso seguro de plaguicidas, sin proponer el dejar de utilizarlos. Donde el garantizar este uso seguro de plaguicidas significa excluir la complejidad de los efectos que ocasionan este tipo de compuestos tanto en la salud como en los recursos naturales, que en el caso particular del glifosato aún existe una controversia sobre sus efectos. Es necesario un cambio de paradigma tecnológico en el campo, con el que se pueda implementar un manejo integrado de plagas puesto que se trata de un problema complejo que requiere de atención en múltiples sectores y disciplinas, para poder defender a la biodiversidad, mejorar la calidad ambiental y lograr una sostenibilidad del ambiente a largo plazo que garantice el bienestar de la población humana, así como el de su entorno.

A pesar de que en el mercado ya existen paquetes tecnológicos agrícolas amigables con el medio ambiente, estos no han logrado una aceptación inmediata en comparación a los introducidos durante la revolución verde. Para una implementación exitosa de un manejo integrado de plaguicidas a partir de tecnologías amigables con el medio ambiente, es necesario realizar capacitaciones sobre conocimiento técnico, seguido de cambios culturales regulados bajo proyectos de educación ambiental, así como estudios socioculturales sobre la implementación de estos paquetes en el entorno donde son aplicados.

En este estudio se desarrolló un método espectrofotométrico para determinar glifosato en agua por formación de complejo empleando el compuesto $[\text{Ni}(\text{PhDP})_2]$, el método presenta como características detección rápida, alta sensibilidad ya que puede determinar concentraciones de glifosato inferiores al límite máximo permisible establecido por la EPA de EE. UU y por la NOM-014-CONAGUA-2007 (0.7 mg/L), además de que el método puede ser aplicable para monitorear las diferentes matrices de agua de la localidad de San Simón Atzitzintla y de otras matrices de agua que presenten las mismas características fisicoquímicas como las que se analizaron en San Simón Atzitzintla. Monitorear las concentraciones de glifosato con el método desarrollado permitiría conocer si realmente las concentraciones de glifosato presentes en el agua cumplen con los límites establecidos por la EPA y por la NOM-014-CONAGUA-2007, con el fin de dar a conocer si la población se encuentra en riesgo a los efectos adversos que provoca este herbicida.

En la localidad de San Simón Atzitzintla se logró identificar tanto por entrevistas, observación y por análisis que el glifosato es el herbicida más empleado en esta zona, debido a que la agricultura que se practica es dependiente de plaguicidas. Por otro lado, las razones por las que se encuentra presente el glifosato en diferentes matrices de la localidad, es principalmente por la cultura de la región que carece totalmente de una prevención, tanto de los campesinos que aplican este herbicida sin ninguna capacitación oficial, como de las tiendas de agroquímicos que los distribuyen y los recomiendan sin control alguno, así como la falta de programas gubernamentales y políticas públicas, donde está falta de prevención pone en constante riesgo el bienestar de la población en general, así como el bienestar de los recursos ambientales.

11. REFERENCIAS

- Acquavella, J. F., Alexander, B. H., Mandel, J. S., Gustin, C., Baker, B., & Chapman, P. (2004). Glyphosate biomonitoring for farmers and their families: Results from the farm family exposure study. *Environmental Health Perspectives*, 112(3), 321–326. <https://doi.org/10.1289/ehp.6667>
- Albert, L. (2005). Panorama de los plaguicidas en México. *Revista de Toxicología En Línea (RETEL)*, 1–17.
- Albert, Lilia. (2005). Panorama de los plaguicidas en México. *Revista de Toxicología En Línea (RETEL)*, 1–17.
- Artaraz, M. (2002). Teoría de las tres dimensiones de desarrollo sostenible. *Revista de Ecología y Medio Ambiente*, 3(Asociación Española de Ecología Terrestre), 1–6. Retrieved from <http://www.aeet.org/ecosistemas/022/informe1.htm>
- Barr, D. B., & Angerer, J. (2006). Potential uses of biomonitoring data: A case study using the organophosphorus pesticides chlorpyrifos and malathion. *Environmental Health Perspectives*, 114(11), 1763–1769. <https://doi.org/10.1289/ehp.9062>
- Bartra, R. (2019). Campesinado y poder político en México: Un modelo teórico. *Universidad Nacional Autónoma de México*, 34(3/4), 659–684. Retrieved from <https://www.jstor.org/stable/3539254>
- Beckie, H. J., Busi, R., Bagavathiannan, M. V., & Martin, S. L. (2019). Herbicide resistance gene flow in weeds: Under-estimated and under-appreciated. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 283(December 2018), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2019.06.005>
- Bejarano, F., Colín, C., González, I., Eugenia, I., Rodríguez, M., Martínez, C., ... Kubiak, W. (2017a). Los Plaguicidas Altamente Peligrosos en México. *Red de Acción Sobre Plaguicidas y Alternativas En México, A.C. (RAPAM)*, 351. <https://doi.org/10.1097/NNA.0b013e31828958cd>
- Bejarano, F., Colín, C., González, I. G., Eugenia, I., Rodríguez, M., Martínez, C., ... Kubiak, W. (2017b). Los Plaguicidas Altamente Peligrosos en México. *Red de Acción Sobre Plaguicidas y Alternativas En México, A.C. (RAPAM)*, 351. Retrieved from <http://ciudadanosenred.com.mx/en-mexico-se-usan-186-plaguicidas-altamente-peligrosos/>
- Ben Oujji, N., Bakas, I., Istamboulié, G., Ait-Ichou, I., Ait-Addi, E., Rouillon, R., & Noguier, T. (2014). A Simple Colorimetric Enzymatic-Assay, based on immobilization of acetylcholinesterase by adsorption, for sensitive detection of organophosphorus insecticides in olive oil. *Food Control*, 46, 75–80. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.05.006>
- Bernal Cáceres, K. T. (2019). *Fumigación con glifosato en Colombia: Política antidrogas Vs. Derecho a la salud y al medio ambiente*. Universidad Católica de Colbia. Retrieved from [https://repository.ucatolica.edu.co/bitstream/10983/22932/1/Fumigación con glifosato en Colombia Política antidrogas Vs Derecho a la salud y al medio ambiente.pdf](https://repository.ucatolica.edu.co/bitstream/10983/22932/1/Fumigación%20con%20glifosato%20en%20Colombia%20Política%20antidrogas%20Vs%20Derecho%20a%20la%20salud%20y%20al%20medio%20ambiente.pdf)
- Bettazzi, F., Romero Natale, A., Torres, E., & Palchetti, I. (2018). Glyphosate determination by coupling an immuno-magnetic assay with electrochemical sensors. *Sensors (Switzerland)*, 18(9). <https://doi.org/10.3390/s18092965>

- Bonnet, J.-L., Bonnemoy, F., Dusser, M., & Bohatier, J. (2007). Assessment of the Potential Toxicity of Herbicides and Their Degradation Products to Nontarget Cells Using Two Microorganisms, the Bacteria *Vibrio fischeri* and the Ciliate *Tetrahymena pyriformis*. *Environmental Toxicology*, 23, 78–91. <https://doi.org/10.1002/tox>
- Botero-Coy, A. M., Ibáñez, M., Sancho, J. V., & Hernández, F. (2013). Improvements in the analytical methodology for the residue determination of the herbicide glyphosate in soils by liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1292, 132–141. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.12.007>
- Brena, B. M., Arellano, L., Rufo, C., Last, M. S., Montaña, J., Cerni, E. E., ... Last, J. A. (2005). ELISA as an affordable methodology for monitoring groundwater contamination by pesticides in low-income countries. *Environmental Science and Technology*, 39(11), 3896–3903. <https://doi.org/10.1021/es048620d>
- Brookes, G., Taheripour, F., & Tyner, W. E. (2017). The contribution of glyphosate to agriculture and potential impact of restrictions on use at the global level. *GM Crops and Food*, 8(4), 216–228. <https://doi.org/10.1080/21645698.2017.1390637>
- Brückner, C., Karunaratne, V., Rettig, S. J., & Dolphin, D. (1996). Synthesis of meso-phenyl-4,6-dipyrins, preparation of their Cu(II), Ni(II), and Zn(II) chelates, and structural characterization of bis[meso-phenyl-4,6-dipyrinato]Ni(II). *Canadian Journal of Chemistry*, 74(11), 2182–2193. <https://doi.org/10.1139/v96-245>
- Burger, M., & Fernández, S. (2004). Exposición al herbicida glifosato: aspectos clínicos toxicológicos. *Revista Médica Del Uruguay*, 202–207. Retrieved from http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?pid=S0303-32952004000300006&script=sci_arttext
- Caetano, M. S., Ramalho, T. C., Botrel, D. F., da Cunha, E. F. F., & de Mello, W. C. (2012). Understanding the inactivation process of organophosphorus herbicides: A DFT study of glyphosate metallic complexes with Zn²⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Cu²⁺, Co³⁺, Fe³⁺, Cr³⁺, and Al³⁺. *International Journal of Quantum Chemistry*, 112(15), 2752–2762. <https://doi.org/10.1002/qua.23222>
- Çavaş, T., & Könen, S. (2007). Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay. *Mutagenesis*, 22(4), 263–268. <https://doi.org/10.1093/mutage/gem012>
- Ccancapa, A., Masiá, A., Navarro-Ortega, A., Picó, Y., & Barceló, D. (2016). Pesticides in the Ebro River basin: Occurrence and risk assessment. *Environmental Pollution*, 211, 414–424. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.12.059>
- Ceccon, E. (2008). La revolución verde tragedia en dos actos. *Redalyc*, 1(91), 21–29. <https://doi.org/0187-6376>
- Cerdeira, A. L., Gazziero, D. L. P., Duke, S. O., Matallo, M. B., & Spadotto, C. A. (2007). Review of potential environmental impacts of transgenic glyphosate-resistant soybean in Brazil. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 42(5), 539–549. <https://doi.org/10.1080/03601230701391542>
- Chang, F. chih, Simcik, M. F., & Capel, P. D. (2011). Occurrence and fate of the herbicide

- glyphosate and its degradate aminomethylphosphonic acid in the atmosphere. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 30(3), 548–555. <https://doi.org/10.1002/etc.431>
- Chang, Y., Zhang, Z., Hao, J., Yang, W., & Tang, J. (2016). A simple label free colorimetric method for glyphosate detection based on the inhibition of peroxidase-like activity of Cu(II). *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 228, 410–415. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.01.048>
- Chen, N., Liu, H., Zhang, Y., Zhou, Z., Fan, W., Yu, G., ... Wu, A. (2018). A colorimetric sensor based on citrate-stabilized AuNPs for rapid pesticide residue detection of terbuthylazine and dimethoate. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 255, 3093–3101. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.09.134>
- Chenprakhon, P., Sucharitakul, J., Panijpan, B., & Chaiyen, P. (2010). Measuring binding affinity of protein-ligand interaction using spectrophotometry: Binding of neutral red to riboflavin-binding protein. *Journal of Chemical Education*, 87(8), 829–831. <https://doi.org/10.1021/ed1000125>
- Chilón Camacho, E. (2017). " Revolución Verde " Agricultura y suelos, aportes y controversias. *Revistas de La Carrera de Ingeniería Agronómica- UMNSA*, 3(3), 844–859.
- Cicoplafest. (2004). Catalogo de plaguicidas. *Control*, 481.
- COFEPRIS. (2012). *Programa de Acción Específico. Protección contra riesgos sanitarios*. Ciudad de México. Retrieved from https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/400539/pae_cofepris.pdf
- CONABIO. (2012). Portal de Geoinformación. Sistema Nacional de Información sobre Biodiversidad. Retrieved August 14, 2018, from <http://www.conabio.gob.mx/informacion/gis/>
- Consejo Nacional de Evaluación de la Política de Desarrollo Social, C. (2010). *Informe de Pobreza en México en el país, los estados y sus municipios, 2010*. México. Retrieved from https://www.coneval.org.mx/Informes/Coordinacion/INFORMES_Y_PUBLICACIONES_PDF/Informe_de_Pobreza_en_Mexico_2010.pdf
- Coordinación General de Contaminación y Salud Ambiental. (2018). *El herbicida glifosato y su uso en la agricultura con los organismos genéticamente modificados* (Vol. 52). Ciudad de México. Retrieved from https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/425676/Informe__Glifosato__Agricultura_OGMs_24.12.2018_agg.pdf
- Cortés, F. (2002). Consideraciones sobre la marginalidad, marginación, pobreza y desigualdad en la distribución del ingreso Introducción. *Papeles de Población*, 8(31), 9–24. Retrieved from <http://www.redalyc.org/pdf/112/11203101.pdf>
- Coupe, R. H. ., Kalkhoff, S. J. ., Capel, P. D. ., & Gregoire, C. . (2012). Fate and transport of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in surface waters of agricultural basins. *Pest Management Science*, 68(March 2011), 16–30. <https://doi.org/10.1002/ps.2212>
- Curwin, B. D., Hein, M. J., Sanderson, W. T., Striley, C., Heederik, D., Kromhout, H., ... Alavanja, M. C. (2007). Urinary pesticide concentrations among children, mothers and fathers living in farm and non-farm households in Iowa. *Annals of Occupational Hygiene*, 51(1), 53–65. <https://doi.org/10.1093/annhyg/mel062>

- Dai, P., Hu, P., Tang, J., Li, Y., & Li, C. (2016). Effect of glyphosate on reproductive organs in male rat. *Acta Histochemica*, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2016.05.009>
- De Almeida, L. K. S., Chigome, S., Torto, N., Frost, C. L., & Pletschke, B. I. (2015). A novel colorimetric sensor strip for the detection of glyphosate in water. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 206, 357–363. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2014.09.039>
- de Brito Rodrigues, L., Gonçalves Costa, G., Lundgren Thá, E., da Silva, L. R., de Oliveira, R., Morais Leme, D., ... de Oliveira, G. A. R. (2019). Impact of the glyphosate-based commercial herbicide, its components and its metabolite AMPA on non-target aquatic organisms. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 842(July 2018), 94–101. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2019.05.002>
- De Gerónimo, E., Aparicio, V. C., & Costa, J. L. (2018). Glyphosate sorption to soils of Argentina. Estimation of affinity coefficient by pedotransfer function. *Geoderma*, 322(January), 140–148. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2018.02.037>
- de Oliveira, F. G., Lirola, J. R., Salgado, L. D., de Marchi, G. H., Mela, M., Padial, A. A., ... Silva de Assis, H. C. (2019). Toxicological effects of anthropogenic activities in *Geophagus brasiliensis* from a coastal river of southern Brazil: A biomarker approach. *Science of the Total Environment*, 667, 371–383. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.02.168>
- Degenhardt, D., Humphries, D., Cessna, A. J., Messing, P., Badiou, P. H., Raina, R., ... Pennock, D. J. (2012). Dissipation of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in water and sediment of two Canadian prairie wetlands. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 47(7), 631–639. <https://doi.org/10.1080/03601234.2012.668459>
- Del Puerto, A., Suárez, S., & Palacio, D. (2014). Effects of pesticides on health and the environment. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 52(3), 372–387. <https://doi.org/10.1561-3003>
- Demonte, L. D., Michlig, N., Gaggiotti, M., Adam, C. G., Beldoménico, H. R., & Repetti, M. R. (2018). Determination of glyphosate, AMPA and glufosinate in dairy farm water from Argentina using a simplified UHPLC-MS/MS method. *Science of the Total Environment*, 645, 34–43. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.340>
- Dill, G. M., Douglas, S., Feng, P. C. C., Kohn, F., Kretzmer, K., Mehrsheikh, A., ... Hauptfear, E. A. (2010). Glyphosate: discovery, development, applications, and properties. In *Glyphosate Resistance in Crops and Weeds: History, Development, and Management* (pp. 1–34). <https://doi.org/10.1002/9780470634394>
- Duke, S. O. (2018). The history and current status of glyphosate. *Pest Management Science*, 74(5), 1027–1034. <https://doi.org/10.1002/ps.4652>
- E.a. Lee, a.P. Strahan, and E. M. T. (2002). Methods of Analysis by the U.S. Geological Survey Organic Geochemistry Research Group— Determination of Glyphosate, Aminomethylphosphonic Acid, and Glufosinate in Water Using Online Solid-Phase Extraction and High-Performance Liquid Chromatography/Mass Sp.
- Electronic Code of Federal Regulations, (e-CFR). (2019). 40 CFR § 180.204 - Dimethoate; tolerances for residues. Retrieved April 29, 2019, from

<https://www.law.cornell.edu/cfr/text/40/180.204>

Espinoza Galindo, C. (2016). Suspenden uso de río Santa Elena para cultivos en comunidad de El Verde. *Municipios Puebla*. Retrieved from <http://municipiospuebla.mx/nota/2016-04-14/san-salvador-el-verde/suspenden-uso-de-río-santa-elena-para-cultivos-en-comunidad-de>

European Commission. (2017). COMMISSION REGULATION (EU) 2017/1135 of 23 June 2017 amending Annexes II and III to Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council as regards maximum residue levels for dimethoate and omethoate in or on certain products. *Official Journal of the European Union, L 164*(1135), 28–51.

European Food Safety Authority (EFSA) Anastassiadou, M., Arena, M., Auteri, D., Barmaz, S., Brancato, A., Brocca, D., ... Villamar-Bouza, L. (2018). Peer review of the pesticide risk assessment for the active substance bromoxynil in light of negligible exposure data submitted. *EFSA Journal, 16*(12). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5490>

Fan, J., Geng, J., Ren, H., & Wang, X. (2013). Time-Effect Relationship of Toxicity Induced by Roundup® and Its Main Constituents in Liver of *Carassius Auratus*. *Computational Water, Energy, and Environmental Engineering, 02*(02), 20–25. <https://doi.org/10.4236/cweee.2013.22B004>

Farkas, E., Szekacs, A., Kovacs, B., Olah, M., Horvath, R., & Szekacs, I. (2018). Label-free optical biosensor for real-time monitoring the cytotoxicity of xenobiotics: A proof of principle study on glyphosate. *Journal of Hazardous Materials, 351*(February), 80–89. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.02.045>

Fernandes, G., Aparicio, V. C., Bastos, M. C., De Gerónimo, E., Labanowski, J., Prestes, O. D., ... dos Santos, D. R. (2019a). Indiscriminate use of glyphosate impregnates river epilithic biofilms in southern Brazil. *Science of the Total Environment, 651*, 1377–1387. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.292>

Fernandes, G., Aparicio, V. C., Bastos, M. C., De Gerónimo, E., Labanowski, J., Prestes, O. D., ... dos Santos, D. R. (2019b). Indiscriminate use of glyphosate impregnates river epilithic biofilms in southern Brazil. *Science of the Total Environment, 651*, 1377–1387. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.292>

Food Security Information Network. (2019). *Global Report on Food Crises*. Retrieved from <http://www.fao.org/3/a-br323e.pdf>

Frederick Rowe, D. (2019). Pesticides and the perils of synecdoche in the history of science and environmental history. *History and History of Science, 1*–24. <https://doi.org/10.1177/0073275319848964>

Frisch, M. J., Trucks, G. W., Schlegel, H. B., Scuseria, G. E., Robb, M. A., Cheeseman, J. R., ... Fox, D. J. (2016). Gaussian 16, Revision B.01. Wallingford CT: Gaussian, Inc. Retrieved from <http://gaussian.com/citation/>

Gamboa Fuentes, N. (1874). DDT, una revisión histórica. *Revista de Química PUCP, 28*(1–2), 10–13. <https://doi.org/10.1002/cber.18740070278>

Garcerán-Sáez, J., & García-Sánchez, F. (2019). SePeRe: Semantically-Enhanced System for Pest Recognition. *Springer Nature Switzerland, 901*, 3–11.

https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-030-10728-4_1

- Gaupp-Berghausen, M., Hofer, M., Rewald, B., & Zaller, J. G. (2015). Glyphosate-based herbicides reduce the activity and reproduction of earthworms and lead to increased soil nutrient concentrations. *Scientific Reports*, 5(August), 12886. <https://doi.org/10.1038/srep12886>
- George, J., Prasad, S., Mahmood, Z., & Shukla, Y. (2010). Studies on glyphosate-induced carcinogenicity in mouse skin: A proteomic approach. *Journal of Proteomics*, 73(5), 951–964. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2009.12.008>
- Gill, J. P. K., Sethi, N., Mohan, A., Datta, S., & Girdhar, M. (2018). Glyphosate toxicity for animals. *Environmental Chemistry Letters*, 16(2), 401–426. <https://doi.org/10.1007/s10311-017-0689-0>
- Gómez-Oliver, L. (1959). El papel de la agricultura en el desarrollo de México. *Revista de Estudios Agrosociales*, 28, 29–41. Retrieved from http://www.magrama.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/revistas/pdf_reas/r028_02.pdf
- González, A. M. (2005). *CULTURA CAMPESINA, CAMBIO TÉCNICO Y MEDIO AMBIENTE EN EL CONSEJO POPULAR “CUATRO ESQUINA” DE SANTA LUCÍA*. Matanzas, Girona. Retrieved from <http://hdl.handle.net/10803/398989>
- Greim, H., Saltmiras, D., Mostert, V., & Strupp, C. (2015). Evaluation of carcinogenic potential of the herbicide glyphosate, drawing on tumor incidence data from fourteen chronic/carcinogenicity rodent studies. *Critical Reviews in Toxicology*, 45(3), 185–208. <https://doi.org/10.3109/10408444.2014.1003423>
- Grieve, B. D., Duckett, T., Collison, M., Boyd, L., West, J., Yin, H., ... Pearson, S. (2019). The challenges posed by global broadacre crops in delivering smart agri-robotic solutions: A fundamental rethink is required. *Global Food Security*, 23(February), 116–124. <https://doi.org/10.1016/j.gfs.2019.04.011>
- Gros, P., Ahmed, A. A., Kühn, O., & Leinweber, P. (2019). Influence of metal ions on glyphosate detection by FMOC-Cl. *Environmental Monitoring and Assessment*, 191(4). <https://doi.org/10.1007/s10661-019-7387-2>
- Grube, M., Kalnenieks, U., & Muter, O. (2019). Metabolic response of bacteria to elevated concentrations of glyphosate-based herbicide. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 173(June 2018), 373–380. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.02.045>
- Guilherme, S., Gaivão, I., Santos, M. A., & Pacheco, M. (2012). DNA damage in fish (*Anguilla anguilla*) exposed to a glyphosate-based herbicide - Elucidation of organ-specificity and the role of oxidative stress. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 743(1–2), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2011.10.017>
- Guimaraes, R. P., & Bárcena, A. (2002). El Desarrollo Sustentable en América Latina y el Caribe desde Río 1992 y los nuevos imperativos de institucionalidad. *La Transición Hacia El Desarrollo Sustentable*, 6(México), 15–34. <https://doi.org/http://www.inecc.gob.mx/descargas/publicaciones/407.pdf>
- Gutiérrez-Pulido, H., & Gama-Hernández, V. (2010). Limitantes de los índices de marginación de Conapo y propuesta para evaluar la marginación municipal en México. *Papeles de Poblacion*, 16(66), 227–237.

- Hakme, E., Lozano, A., Ferrer, C., Díaz-Galiano, F. J., & Fernández-Alba, A. R. (2018). Analysis of pesticide residues in olive oil and other vegetable oils. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 100, 167–179. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.12.016>
- Hancock, D. B., Martin, E. R., Mayhew, G. M., Stajich, J. M., Jewett, R., Stacy, M. A., ... Scott, W. K. (2008). Pesticide exposure and risk of Parkinson's disease: a family-based case-control study. *BMC.Neurol.*, 8(1471-2377 (Electronic)), 6. <https://doi.org/10.1186/1471-2377-8-6>
- Hernández-Antonio, A., & Hansen, A. M. (2011). Uso de plaguicidas en dos zonas agrícolas de México y evaluación de la contaminación de agua y sedimentos. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 27(2), 115–127.
- Hill, Z. D., & MacCarthy, P. (1986). Novel approach to Job's method: An undergraduate experiment. *Journal of Chemical Education*, 63(2), 162. <https://doi.org/10.1021/ed063p162>
- Hoffmann, U., & Papendorf, T. (2006). Organophosphate poisonings with parathion and dimethoate. *Intensive Care Medicine*, 32(3), 464–468. <https://doi.org/10.1007/s00134-005-0051-z>
- Hohenberg, P., & Kohn, W. (1964). The Inhomogeneous Electron Gas. *Phys. Rev.*, 136(3B), B864. <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.7.1912>
- Holland, J. M., James, L., Stevenson, D. R. W., Kor, L., Douma, J. C., Crowley, L., & Smith, B. M. (2017). Semi-natural habitats support biological control, pollination and soil conservation in Europe. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 37(4). <https://doi.org/10.1007/s13593-017-0434-x>
- Honeycutt, Zen.; Rowlands, H. (2014). Glyphosate testing report : Findings in American mothers ' breast milk , urine and water, 1–19.
- Hong, K. L., & Sooter, L. J. (2018). In vitro selection of a single-stranded DNA molecular recognition element against the pesticide fipronil and sensitive detection in river water. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(1). <https://doi.org/10.3390/ijms19010085>
- Hsu, C. W., Lin, Z. Y., Chan, T. Y., Chiu, T. C., & Hu, C. C. (2017). Oxidized multiwalled carbon nanotubes decorated with silver nanoparticles for fluorometric detection of dimethoate. *Food Chemistry*, 224, 353–358. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.12.095>
- Hu, Y. S., Zhao, Y. Q., & Sorohan, B. (2011). Removal of glyphosate from aqueous environment by adsorption using water industrial residual. *Desalination*, 271(1–3), 150–156. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.desal.2010.12.014>
- Hung, S. H., Lee, J. Y., Hu, C. C., & Chiu, T. C. (2018). Gold-nanoparticle-based fluorescent “turn-on” sensor for selective and sensitive detection of dimethoate. *Food Chemistry*, 260(June 2017), 61–65. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.03.149>
- Ibáñez, M., Pozo, Ó. J., Sancho, J. V., López, F. J., & Hernández, F. (2005). Residue determination of glyphosate, glufosinate and aminomethylphosphonic acid in water and soil samples by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1081(2), 145–155. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.05.041>
- Ibáñez, M., Pozo, Ó. J., Sancho, J. V., López, F. J., & Hernández, F. (2006). Re-evaluation of

glyphosate determination in water by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1134(1–2), 51–55. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.07.093>

- INEGI. (2010). Censo nacional de población y vivienda 2010. *Instituto Nacional de Estadística y Geografía*. Retrieved from http://www.inegi.org.mx/sistemas/consulta_resultados/iter2010.aspx?c=27329&s=est
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía, (INEGI). (2015). Encuesta intercensal. Retrieved November 19, 2019, from <https://www.inegi.org.mx/programas/intercensal/2015/?ps=Microdatos>
- International Agency for Research on Cancer. (2017a). *Glyphosate - Part of Monograph 112* (Vol. 6). Retrieved from <https://monographs.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/06/mono112-10.pdf>
- International Agency for Research on Cancer. (2017b). *IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans - volume 112: Some organophosphate insecticides and herbicides - Glyphosate* (Vol. 112). Retrieved from <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol112/mono112.pdf>
- Jargilo, A., Grabowska, I., Radecka, H., Sulima, M., Marszalek, I., Wyslouch-Cieszyńska, A., ... Radecki, J. (2013). Redox Active Dipyrromethene-Cu(II) Monolayer for Oriented Immobilization of His-Tagged RAGE Domains - the Base of Electrochemical Biosensor for Determination of Aβ16-23'. *Electroanalysis*, 25(5), 1185–1193. <https://doi.org/10.1002/elan.201200537>
- Jarocka, U., Sawicka, R., Stachyra, A., Góra-Sochacka, A., Sirko, A., Zagórski-Ostoja, W., ... Radecka, H. (2015). A biosensor based on electroactive dipyrromethene-Cu(II) layer deposited onto gold electrodes for the detection of antibodies against avian influenza virus type H5N1 in hen sera. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407(25), 7807–7814. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8949-y>
- Jiao, S., Liu, P., Liu, Y., Zou, R., Zhao, Y., Liu, Y., ... Guo, Y. (2018). Binding properties of broad-specific monoclonal antibodies against three organophosphorus pesticides by a direct surface plasmon resonance immunosensor. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410(28), 7263–7273. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1337-7>
- Johal, G. S., & Huber, D. M. (2009). Glyphosate effects on diseases of plants. *European Journal of Agronomy*, 31(3), 144–152. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2009.04.004>
- Kaczyński, P., & Łozowicka, B. (2015). Liquid chromatographic determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid residues in rapeseed with MS/MS detection or derivatization/fluorescence detection. *Open Chemistry*, 13(1), 1011–1019. <https://doi.org/10.1515/chem-2015-0107>
- Kelly, D. W., Poulin, R., Tompkins, D. M., & Townsend, C. R. (2010). Synergistic effects of glyphosate formulation and parasite infection on fish malformations and survival. *Journal of Applied Ecology*, 47(2), 498–504. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2010.01791.x>
- Keswani, C., Dilnashin, H., Birla, H., & Singh, S. P. (2019). Regulatory barriers to Agricultural Research commercialization: A case study of biopesticides in India. *Rhizosphere*, 11(May), 100155. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2019.100155>

- Kim, J., Sun, Q., Yue, Y., Yoon, K. S., Whang, K. Y., Marshall Clark, J., & Park, Y. (2015). 4,4'-Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) and 4,4'-dichlorodiphenyldichloroethylene (DDE) promote adipogenesis in 3T3-L1 adipocyte cell culture. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *131*, 40–45. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2016.01.005>
- Kim, K. H., Kabir, E., & Jahan, S. A. (2017). Exposure to pesticides and the associated human health effects. *Science of the Total Environment*, *575*, 525–535. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.09.009>
- Kim, M., Stripeikis, J., Iñón, F., & Tudino, M. (2007). A simplified approach to the determination of N-nitroso glyphosate in technical glyphosate using HPLC with post-derivatization and colorimetric detection. *Talanta*, *72*(3), 1054–1058. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2006.12.047>
- Klein, L., & Agroecology, F. (2017). Glyphosate: The Fragile Power Behind Argentina's Soy Complex.
- Kohn, W., & Sham, L. J. (1965). Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects*. *PHYSICAL REVIEW*, *140*(4A), A1133–A1138. <https://doi.org/10.1046/j.1365-4362.2002.01376.x>
- Kranawetvogl, A., Siegert, M., Eyer, F., Thiermann, H., & John, H. (2018). Verification of organophosphorus pesticide poisoning: Detection of phosphorylated tyrosines and a cysteine-proline disulfide-adduct from human serum albumin after intoxication with dimethoate/omethoate. *Toxicology Letters*, *299*(June), 11–20. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2018.08.013>
- Krüger, M., Schledorn, P., Schrödl, W., Hoppe, H.-W., Lutz, W., & Shehata, A. A. (2014). Detection of Glyphosate Residues in Animals and Humans. *Journal of Environmental & Analytical Toxicology*, *04*(02), 1–5. <https://doi.org/10.4172/2161-0525.1000210>
- Kupski, L., Salcedo, G. M., Caldas, S. S., de Souza, T. D., Furlong, E. B., & Primel, E. G. (2019). Optimization of a laccase-mediator system with natural redox-mediating compounds for pesticide removal. *Environmental Science and Pollution Research*, *26*(5), 5131–5139. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-4010-y>
- Kwon, Y. S., Nguyen, V. T., Park, J. G., & Gu, M. B. (2015). Detection of iprobenfos and edifenphos using a new multi-aptasensor. *Analytica Chimica Acta*, *868*, 60–66. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.02.020>
- Lajin, B., & Goessler, W. (2019). Direct speciation analysis of organophosphorus environmental pollutants in water by HPLC-ICPMS/MS. *Talanta*, *196*(October 2018), 357–361. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.12.075>
- Larsen, K., Najle, R., Lifschitz, A., Maté, M. L., Lanusse, C., & Virkel, G. L. (2014). Effects of sublethal exposure to a glyphosate-based herbicide formulation on metabolic activities of different xenobiotic-metabolizing enzymes in rats. *International Journal of Toxicology*, *33*(4), 307–318. <https://doi.org/10.1177/1091581814540481>
- Lee, R., den Uyl, R., & Runhaar, H. (2019). Assessment of policy instruments for pesticide use reduction in Europe; Learning from a systematic literature review. *Crop Protection*, *126*(August), 104929. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2019.104929>

- Li, L., Takahashi, N., Kaneko, K., Shimizu, T., & Takarada, T. (2015). A novel method for nickel recovery and phosphorus removal from spent electroless nickel-plating solution. *Separation and Purification Technology*, *147*, 237–244. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2015.04.029>
- Li, S., Luo, J., Yin, G., Xu, Z., Le, Y., Wu, X., ... Zhang, Q. (2015). Selective determination of dimethoate via fluorescence resonance energy transfer between carbon dots and a dye-doped molecularly imprinted polymer. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, *206*, 14–21. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2014.09.038>
- Li, Z., & Jennings, A. (2017). Worldwide regulations of standard values of pesticides for human health risk control: A review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *14*(7). <https://doi.org/10.3390/ijerph14070826>
- Lupi, L., Miglioranza, K. S. B., Aparicio, V. C., Marino, D., Bedmar, F., & Wunderlin, D. a. (2015). Occurrence of glyphosate and AMPA in an agricultural watershed from the southeastern region of Argentina. *Science of the Total Environment*, *536*, 687–694. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.07.090>
- Malkanathi, S. H. P., Sandareka, U. G., Wijerathne, A. W., & Sivashankar, P. (2019). Banning of glyphosate and its impact on paddy cultivation: A study in Ratnapura district in Sri Lanka. *Journal of Agricultural Sciences - Sri Lanka*, *14*(2), 129–144. <https://doi.org/10.4038/jas.v14i2.8515>
- Malone, M., & Foster, E. (2019). A mixed-methods approach to determine how conservation management programs and techniques have affected herbicide use and distribution in the environment over time. *Science of the Total Environment*, *660*, 145–157. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.12.266>
- Maqueda, C., Undabeytia, T., Villaverde, J., & Morillo, E. (2017). Behaviour of glyphosate in a reservoir and the surrounding agricultural soils. *Science of the Total Environment*, *593–594*, 787–795. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.03.202>
- Martínez, M. A., Ares, I., Rodríguez, J. L., Martínez, M., Martínez-Larrañaga, M. R., & Anadón, A. (2018). Neurotransmitter changes in rat brain regions following glyphosate exposure. *Environmental Research*, *161*(September 2017), 212–219. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.10.051>
- Mazouz, Z., Rahali, S., Fourati, N., Zerrouki, C., Aloui, N., Seydou, M., ... Kalfat, R. (2017). Highly selective polypyrrole MIP-based gravimetric and electrochemical sensors for picomolar detection of glyphosate. *Sensors (Switzerland)*, *17*(11), 1–15. <https://doi.org/10.3390/s17112586>
- Mendoza Cantú, A., & Ize Lema, I. A. R. (2017). Las sustancias químicas en México. perspectivas para un manejo adecuado. *Revista Internacional de Contaminacion Ambiental*, *33*(4), 719–745. <https://doi.org/10.20937/RICA.2017.33.04.15>
- Menelaou, M., Dakanali, M., Raptopoulou, C. P., Drouza, C., Lalioti, N., & Salifoglou, A. (2009). pH-Specific synthetic chemistry, and spectroscopic, structural, electrochemical and magnetic susceptibility studies in binary Ni(II)-(carboxy)phosphonate systems. *Polyhedron*, *28*(15), 3331–3339. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2009.05.084>
- Menon, S. K., Modi, N. R., Pandya, A., & Lodha, A. (2013). Ultrasensitive and specific detection of

- dimethoate using a p-sulphonato-calix[4]resorcinarene functionalized silver nanoprobe in aqueous solution. *RSC Advances*, 3(27), 10623–10627. <https://doi.org/10.1039/c3ra40762d>
- Mercurio, P., Flores, F., Mueller, J. F., Carter, S., & Negri, A. P. (2014). Glyphosate persistence in seawater. *Marine Pollution Bulletin*, 85(2), 385–390. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.01.021>
- Merino-Pérez, L., & Velázquez-Montes, A. (2018). *Agenda Ambiental 2018. Diagnóstico y propuestas. Seminario Universitario de Sociedad, Medio Ambiente e instituciones. Universidad Nacional Autónoma de México*. Retrieved from <http://www.fundacionunam.org.mx/ecopuma/presentan-agenda-ambiental-2018-diagnostico-y-propuestas/>
- Mertens, M., Höss, S., Neumann, G., Afzal, J., & Reichenbecher, W. (2018). Glyphosate, a chelating agent—relevant for ecological risk assessment? *Environmental Science and Pollution Research*, 25(6), 5298–5317. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s11356-017-1080-1>
- Mesnage, R., Renney, G., Séralini, G. E., Ward, M., & Antoniou, M. N. (2017). Multiomics reveal non-alcoholic fatty liver disease in rats following chronic exposure to an ultra-low dose of Roundup herbicide. *Scientific Reports*, 7(January), 1–15. <https://doi.org/10.1038/srep39328>
- Misnaza, L. A. (2010). La soledad de los campesinos. Historia, cultura y persistencia de una comunidad.
- Molina, N. (2013). Uso de extractos botánicos en control de plagas y enfermedades. *Manejo Integrado de Plagas*, (59), 76–77. Retrieved from <http://www.sidalc.net/repdoc/a1752e/a1752e.pdf>
- Mondal, R., Mukherjee, A., Biswas, S., & Kole, R. K. (2018). GC-MS/MS determination and ecological risk assessment of pesticides in aquatic system: A case study in Hooghly River basin in West Bengal, India. *Chemosphere*, 206, 217–230. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.04.168>
- Monroy, C. M., Cortés, A. C., Sicard, D. M., & De Restrepo, H. G. (2005). Citotoxicidad y genotoxicidad en células humanas expuestas in vitro a glifosato. *Biomédica*, 25(3), 335. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v25i3.1358>
- Moore, L. J., Fuentes, L., Rodgers, J. H., Bowerman, W. W., Yarrow, G. K., Chao, W. Y., & Bridges, W. C. (2012). Relative toxicity of the components of the original formulation of Roundup® to five North American anurans. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 78, 128–133. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.11.025>
- Moraes, F. C., Mascaró, L. H., Machado, S. A. S., & Brett, C. M. A. (2010). Direct electrochemical determination of glyphosate at copper phthalocyanine/multiwalled carbon nanotube film electrodes. *Electroanalysis*, 22(14), 1586–1591. <https://doi.org/10.1002/elan.200900614>
- Moraes, M. P., Gonçalves, L. M., & Pereira, E. A. (2018). Determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid by capillary electrophoresis with indirect detection using pyridine-2,6-dicarboxylic acid or 3,5-dinitrobenzoic acid. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 98(3), 258–270. <https://doi.org/10.1080/03067319.2018.1446528>

- Mörtl, M., Németh, G., Juracsek, J., Darvas, B., Kamp, L., Rubio, F., & Székács, A. (2013). Determination of glyphosate residues in Hungarian water samples by immunoassay. *Microchemical Journal*, *107*, 143–151. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2012.05.021>
- Mostafalou, S., & Abdollahi, M. (2017). Pesticides: an update of human exposure and toxicity. *Archives of Toxicology*, *91*(2), 549–599. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1849-x>
- Muñoz, R., Guevara-Lara, A., Santos, J. L. M., Miranda, J. M., & Rodriguez, J. A. (2019). Determination of glyphosate in soil samples using CdTe/CdS quantum dots in capillary electrophoresis. *Microchemical Journal*, *146*(July 2018), 582–587. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.01.059>
- Myers, J. P., Antoniou, M. N., Blumberg, B., Carroll, L., Colborn, T., Everett, L. G., ... Benbrook, C. M. (2016a). Concerns over use of glyphosate-based herbicides and risks associated with exposures: a consensus statement. *Environmental Health: A Global Access Science Source*, *15*(1), 19. <https://doi.org/10.1186/s12940-016-0117-0>
- Myers, J. P., Antoniou, M. N., Blumberg, B., Carroll, L., Colborn, T., Everett, L. G., ... Benbrook, C. M. (2016b). Concerns over use of glyphosate-based herbicides and risks associated with exposures: A consensus statement. *Environmental Health: A Global Access Science Source*, *15*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12940-016-0117-0>
- Ndifreke, W. E., & Pasaoglulari Aydinlik, N. (2019). KOH modified Thevetia peruviana shell activated carbon for sorption of dimethoate from aqueous solution. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, *54*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1080/03601234.2018.1501143>
- Nicolopoulou-Stamati, P., Maipas, S., Kotampasi, C., Stamatis, P., & Hens, L. (2016). Chemical Pesticides and Human Health: The Urgent Need for a New Concept in Agriculture. *Frontiers in Public Health*, *4*(July), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2016.00148>
- Noori, J. S., Dimaki, M., Mortensen, J., & Svendsen, W. E. (2018). Detection of glyphosate in drinking water: A fast and direct detection method without sample pretreatment. *Sensors (Switzerland)*, *18*(9). <https://doi.org/10.3390/s18092961>
- Obour, A. K., Stahlman, P. W., & Holman, J. 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. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2016.04.029>
- Observatorio Nacional Ciudadano, (ONC). (2019). *Escenarios de riesgo, Puebla*. Mexico. Retrieved from http://onc.org.mx/mexico-seguro/pdf/PUEBLA_micrositio.pdf
- Okada, E., Costa, J. L., & Bedmar, F. (2016). Adsorption and mobility of glyphosate in different soils under no-till and conventional tillage. *Geoderma*, *263*, 78–85. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2015.09.009>
- Ololade, I. A., Oladoja, N. A., Oloye, F. F., Alomaja, F., Akerele, D. D., Iwaye, J., & Aikpokpodion, P. (2014). Sorption of Glyphosate on Soil Components: The Roles of Metal Oxides and Organic Materials. *Soil and Sediment Contamination*, *23*(5), 571–585. <https://doi.org/10.1080/15320383.2014.846900>
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2009). *La agricultura*

mundial en la perspectiva del año 2050. Retrieved from http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/Issues_papers/Issues_papers_SP/La_agricultura_mundial.pdf

Ortíz, Irmene; Avila-Chavez, Marco A; Torres, L. G. (2013). Plaguicidas en México: usos, riesgos y marco regulatorio. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal*, 4(1), 3. <https://doi.org/10.7603/s40682-013-0003-1>

Özkara, A., Akyil, D., & Konuk, M. (2016). Pesticides, Environmental Pollution, and Health. *Environmental Health Risk - Hazardous Factors to Living Species*, (June). <https://doi.org/10.5772/63094>

Padilla-Alonso, D. J., Garza-Tapia, M., Chávez-Montes, A., González-Horta, A., Waksman de Torres, N. H., & Castro-Ríos, R. (2017). New temperature-assisted ionic liquid-based dispersive liquid–liquid microextraction method for the determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in water samples. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 40(3), 147–155. <https://doi.org/10.1080/10826076.2017.1295057>

Pan, L., Sun, J., Li, Z., Zhan, Y., Xu, S., & Zhu, L. (2018). Organophosphate pesticide in agricultural soils from the Yangtze River Delta of China: concentration, distribution, and risk assessment. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(1), 4–11. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7664-3>

Pan, Y., Sackmann, E. K., Wypisniak, K., Hornsby, M., Datwani, S. S., & Herr, A. E. (2016). Determination of equilibrium dissociation constants for recombinant antibodies by high-throughput affinity electrophoresis. *Scientific Reports*, 6(November), 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep39774>

Patel, S., & Sangeeta, S. (2019). Pesticides as the drivers of neuropsychotic diseases, cancers, and teratogenicity among agro-workers as well as general public. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(1), 91–100. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3642-2>

Paz-y-Miño, C., Sánchez, M. E., Arévalo, M., Muñoz, M. J., Witte, T., De-la-Carrera, G. O., & Leone, P. E. (2007). Evaluation of DNA damage in an Ecuadorian population exposed to glyphosate. *Genetics and Molecular Biology*, 30(2), 456–460. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572007000300026>

Peleka, E. N., Mavros, P. P., Zamboulis, D., & Matis, K. A. (2006). Removal of phosphates from water by a hybrid flotation-membrane filtration cell. *Desalination*, 198(1–3), 198–207. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2006.01.026>

Pereira, N. A. M., Lemos, A., Serra, A. C., & Pinho E Melo, T. M. V. D. (2013). Functionalization of dipyrromethanes via hetero-Diels-Alder reaction with azo- and nitrosoalkenes. *Tetrahedron Letters*, 54(12), 1553–1557. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2013.01.032>

Pérez, D. J., Okada, E., Menone, M. L., & Costa, J. L. (2017). Can an aquatic macrophyte bioaccumulate glyphosate? Development of a new method of glyphosate extraction in *Ludwigia peploides* and watershed scale validation. *Chemosphere*, 185, 975–982. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.07.093>

Peruzzo, P. J., Porta, A. A., & Ronco, A. E. (2008). Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic

- region of Argentina. *Environmental Pollution*, 156(1), 61–66.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.01.015>
- Pesticide Action Network Europe. (2018). *Alternative methods in weed management to the use of glyphosate and other herbicides*. Brussels, Belgium.
<https://doi.org/10.1016/j.optmat.2013.06.026>
- Petter, F. A., Zuffo, A. M., Neto, F. D. A., Pacheco, L. P., de Almeida, F. A., Andrade, F. R., & J??nior, J. M. Z. (2016). Effect of glyphosate and water stress on plant morphology and nutrient accumulation in soybean. *Australian Journal of Crop Science*, 10(2), 251–257.
- Pichardo González, B. (2006). La Revolución verde en México. *Agrária*, 4(Universidad Nacional Autónoma de México), 40–68.
- Pintado, S., Montoya, M. R., Rodríguez-Amaro, R., Mayén, M., & Mellado, J. M. R. (2012). Electrochemical determination of glyphosate in waters using electrogenerated copper ions. *International Journal of Electrochemical Science*, 7(3), 2523–2530.
- Primost, J. E., Marino, D. J. G., Aparicio, V. C., Costa, J. L., & Carriquiriborde, P. (2017). Glyphosate and AMPA, “pseudo-persistent” pollutants under real-world agricultural management practices in the Mesopotamic Pampas agroecosystem, Argentina. *Environmental Pollution*, 229, 771–779. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.06.006>
- Qaim, M. (2016). *Genetically Modified Crops and Agricultural Development*. Springer.
- Rämö, R. A., van den Brink, P. J., Ruepert, C., Castillo, L. E., & Gunnarsson, J. S. (2018). Environmental risk assessment of pesticides in the River Madre de Dios, Costa Rica using PERPEST, SSD, and msPAF models. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(14), 13254–13269. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7375-9>
- Ramrakhiani, L., Ghosh, S., Mandal, A. K., & Majumdar, S. (2019). Utilization of multi-metal laden spent biosorbent for removal of glyphosate herbicide from aqueous solution and its mechanism elucidation. *Chemical Engineering Journal*, 361(November 2018), 1063–1077. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.12.163>
- Ranga Rao, G. V., Rupela, O. P., Rameshar Rao, V., & Reddy, Y. V. R. (2007). Role of biopesticides in crop protection: present status and future prospects. *Indian Journal of Plant Protection*, 35(1), 1–9.
- Rangelov, & Nicell. (2019). Laccase-Catalyzed Oxidation of Mixed Aqueous Phenolic Substrates at Low Concentrations. *Catalysts*, 9(4), 368. <https://doi.org/10.3390/catal9040368>
- Rashidi Nodeh, H., Wan Ibrahim, W. A., Kamboh, M. A., & Sanagi, M. M. (2017). New magnetic graphene-based inorganic–organic sol-gel hybrid nanocomposite for simultaneous analysis of polar and non-polar organophosphorus pesticides from water samples using solid-phase extraction. *Chemosphere*, 166, 21–30. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.09.054>
- Ravier, S., Désert, M., Gille, G., Armengaud, A., Quivet, E., Ravier, S., ... Wortham, H. (2019). Monitoring of Glyphosate, Glufosinate-ammonium, and (Aminomethyl)phosphonic acid in ambient air of Provence-Alpes-Côte-d’Azur Region, France. *Atmospheric Environment*, 204(1), 102–109. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2019.02.023>

- Rawat, K. A., Majithiya, R. P., Rohit, J. V., Basu, H., Singhal, R. K., & Kailasa, S. K. (2016). Mg²⁺-ion as a tuner for colorimetric sensing of glyphosate with improved sensitivity: Via the aggregation of 2-mercapto-5-nitrobenzimidazole capped silver nanoparticles. *RSC Advances*, 6(53), 47741–47752. <https://doi.org/10.1039/c6ra06450g>
- Rebollar-Pérez, G., Lima-Zambrano, F., Bairán, G., Rodríguez-Enríquez, A., Ornelas-Soto, N., Méndez, E., & Torres, E. (2016). Colorimetric Assay for Detection of Organophosphorus Pesticides by Decrease of Standard Catalytic Activity of Chloroperoxidase. *Environmental Engineering Science*, 33(12), 951–961. <https://doi.org/10.1089/ees.2016.0018>
- Rendón-Von Osten, J., & Dzul-Caamal, R. (2017a). Glyphosate residues in groundwater, drinking water and urine of subsistence farmers from intensive agriculture localities: A survey in Hopelchén, Campeche, Mexico. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(6). <https://doi.org/10.3390/ijerph14060595>
- Rendón-Von Osten, J., & Dzul-Caamal, R. (2017b). Glyphosate residues in groundwater, drinking water and urine of subsistence farmers from intensive agriculture localities: A survey in Hopelchén, Campeche, Mexico. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(6). <https://doi.org/10.3390/ijerph14060595>
- Renny, J. S., Tomasevich, L. L., Tallmadge, E. H., & Collum, D. B. (2013a). Method of continuous variations: Applications of job plots to the study of molecular associations in organometallic chemistry. *Angewandte Chemie - International Edition*, 52(46), 11998–12013. <https://doi.org/10.1002/anie.201304157>
- Renny, J. S., Tomasevich, L. L., Tallmadge, E. H., & Collum, D. B. (2013b). Method of Continuous Variations: Applications of Job Plots to the Study of Molecular Associations in Organometallic Chemistry, 52(46), 11998–12013. <https://doi.org/10.1111/j.1743-6109.2008.01122.x>. Endothelial
- Richmond, M. E. (2018). Glyphosate: A review of its global use, environmental impact, and potential health effects on humans and other species. *Journal of Environmental Studies and Sciences*, 8(4), 416–434. <https://doi.org/10.1007/s13412-018-0517-2>
- Ritter, S. K. (2009). Pinpointing Trends in pesticide use. *Chemical & Engineering News*, 87(7), 1. <https://doi.org/10.1021/cr90009a001>
- Romero-Natale, A., Palchetti, I., Avelar, M., González-vergara, E., Garate-Morales, J. L., & Torres, E. (2019). Spectrophotometric Detection of Glyphosate in Water by Complex Formation between Bis 5-Phenyldipyrinate of Nickel (II) and Glyphosate. *Water*, 11(719), 1–14. <https://doi.org/10.3390/w11040719>
- Ronco, A. E., Marino, D. J. G., Abelando, M., Almada, P., & Apartin, C. D. (2016). Water quality of the main tributaries of the Paraná Basin: glyphosate and AMPA in surface water and bottom sediments. *Environmental Monitoring and Assessment*, 188(8). <https://doi.org/10.1007/s10661-016-5467-0>
- Rose, T. J., Claassens, A., Scanlan, C., Zwieter, L. Van, & Rose, M. T. (2017). Glyphosate residues in Australian soils and implications for crop growth. *Proceedings of the 18th Australian Society of Agronomy Conference*, 5(September), 24–26.
- Rubio, F., Guo, E., & Emily, K. (2014). Survey of Glyphosate Residues in Honey, Corn and Soy

Products. *Journal of Environmental & Analytical Toxicology*, 05(01), 1–8.
<https://doi.org/10.4172/2161-0525.1000249>

- Ruiz-Toledo, J., Castro, R., Rivero-Pérez, N., Bello-Mendoza, R., & Sánchez, D. (2014). Occurrence of glyphosate in water bodies derived from intensive agriculture in a tropical region of southern Mexico. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 93(3), 289–293. <https://doi.org/10.1007/s00128-014-1328-0>
- Ruiz-Toledo, J., Castro, R., Rivero-Pérez, N., Bello-Mendoza, R., & Sánchez, D. (2014). Occurrence of glyphosate in water bodies derived from intensive agriculture in a tropical region of southern Mexico. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 93(3), 289–293. <https://doi.org/10.1007/s00128-014-1328-0>
- Salvador, G., & Lamo de Espinosa, E. (2006). *Diccionario de Sociología*. (C. Torres, Ed.) (Segunda Ed). España: Alianza Editorial. Retrieved from <https://sites.google.com/site/batensudis/diccionario-de-sociologia-19626740>
- Samanta, P., Mukherjee, A. K., Pal, S., Kole, D., & Ghosh, A. R. (2016). Toxic effects of glyphosate-based herbicide, Excel Mera 71 on gill, liver, and kidney of *Heteropneustes fossilis* under laboratory and field conditions. *Journal of Microscopy and Ultrastructure*, 4(3), 147–155. <https://doi.org/10.1016/j.jmau.2016.01.002>
- Sánchez-Bayo, F., Hyne, R. V., & Deseille, K. L. (2010). An amperometric method for the detection of amitrole, glyphosate and its aminomethyl-phosphonic acid metabolite in environmental waters using passive samplers. *Analytica Chimica Acta*, 675(2), 125–131. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.07.013>
- Sanchís, J., Kantiani, L., Llorca, M., Rubio, F., Ginebreda, A., Fraile, J., ... Farré, M. (2012). Determination of glyphosate in groundwater samples using an ultrasensitive immunoassay and confirmation by on-line solid-phase extraction followed by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 402(7), 2335–2345. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5541-y>
- Sandrini, J. Z., Rola, R. C., Lopes, F. M., Buffon, H. F., Freitas, M. M., Martins, C. de M. G., & da Rosa, C. E. (2013). Effects of glyphosate on cholinesterase activity of the mussel *Perna perna* and the fish *Danio rerio* and *Jenynsia multidentata*: In vitro studies. *Aquatic Toxicology*, 130–131, 171–173. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.01.006>
- Satorre, E. H. (2005). Cambios tecnológicos en la agricultura argentina actual. *Ciencia Hoy*, 15(87), 6.
- Scarsi, P., Venturini, E., Cecchi, R., Marabotti, C., Piaggi, P., & Pingitore, A. (2017). Mortality for chronic-degenerative diseases in Tuscany: Ecological study comparing neighboring areas with substantial differences in environmental pollution. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health*, 30(4), 641–653. <https://doi.org/10.13075/ijomeh.1896.00972>
- SEDESOL. (2010). Unidad de Microregiones Cédulas de Información Municipal (SCIM). Retrieved January 24, 2019, from <http://www.microrregiones.gob.mx/zap/datGenerales.aspx?entra=pdzp&ent=21&mun=143>
- SEDESOL. (2013a). *Programa para el Desarrollo de Zonas Prioritarias Resultados Cobertura*

Análisis del Sector Análisis del Sector Programa para el Desarrollo de Zonas Prioritarias.
Mexico.

SEDESOL. (2013b). *Sin Hambre Cruzada Nacional. Cruzada Nacional contra el Hambre.* México. Retrieved from <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/120919/CruzadaNacionalContraElHambre.pdf>

Seneff, S., & Nigh, G. L. (2017). Glyphosate and Anencephaly: Death by A Thousand Cuts. *Journal of Neurology and Neurobiology*, 3.2(1), 1–15. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.16966/2379-7150.14015>

Séralini, G.-E., Clair, E., Mesnage, R., Gress, S., Defarge, N., Malatesta, M., ... de Vendômois, J. S. (2014). Republished study: long-term toxicity of a Roundup herbicide and a Roundup-tolerant genetically modified maize. *Environmental Sciences Europe*, 26(1), 14. <https://doi.org/10.1186/s12302-014-0014-5>

Séralini, G. E., Mesnage, R., Defarge, N., & Spiroux de Vendômois, J. (2014). Conflicts of interests, confidentiality and censorship in health risk assessment: the example of an herbicide and a GMO. *Environmental Sciences Europe*, 26(1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/s12302-014-0013-6>

Shehata, A. A., Schrödl, W., Aldin, A. A., Hafez, H. M., & Krüger, M. (2013). The effect of glyphosate on potential pathogens and beneficial members of poultry microbiota in vitro. *Current Microbiology*, 66(4), 350–358. <https://doi.org/10.1007/s00284-012-0277-2>

Silva, A., Tóth, I., Pezza, L., Pezza, H., & Lima, J. (2011). Determination of glyphosate in water samples by multi-pumping flow system coupled to a liquid waveguide capillary cell. *Analytical Sciences: The International Journal of the Japan Society for Analytical Chemistry*, 27(10), 1031–1036. <https://doi.org/10.2116/analsci.27.1031>

Silva, V., Montanarella, L., Jones, A., Fernández-Ugalde, O., Mol, H. G. J., Ritsema, C. J., & Geissen, V. (2018). Distribution of glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) in agricultural topsoils of the European Union. *Science of the Total Environment*, 621, 1352–1359. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.093>

Smith, C. M., Vera, M. K. M., & Bhandari, R. K. (2019). Developmental and epigenetic effects of Roundup and glyphosate exposure on Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Aquatic Toxicology*, 210(December 2018), 215–226. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.03.005>

Songa, E. A., Arotiba, O. A., Owino, J. H. O., Jahed, N., Baker, P. G. L., & Iwuoha, E. I. (2009). Electrochemical detection of glyphosate herbicide using horseradish peroxidase immobilized on sulfonated polymer matrix. *Bioelectrochemistry*, 75(2), 117–123. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2009.02.007>

Soumis, N. (2018). *Glyphosate, the Most Widely Used Herbicide.* Canada. Retrieved from www.chem-tox-ecotox.org/ScientificReviews

Sprankle, P., Meggitt, W. F., & Penner, D. (1975). Mobility, and microbial degradation of glyphosate in the soil. *Weed Science*, 23(3), 229–234. <https://doi.org/10.1080/03601230802062000>

Sprankle, P., Meggitt, W. F., Penner, D., & Penner2, D. (2014). Mobility, and Microbial Degradation

of Glyphosate in the Soil Adsorption, Mobility, and Microbial Degradation of Glyphosate in the Soil. *Weed Science Society of America*, 23(3), 229–234. Retrieved from <http://www.jstor.org/stable/4042279%5Cnhttp://www.jstor.org/page/info/about/policies/terms.jsp%5Cnhttp://www.jstor.org>

- Steinborn, A., Alder, L., Michalski, B., Zomer, P., Bendig, P., Martinez, S. A., ... Costa Pinheiro, N. (2016). Determination of Glyphosate Levels in Breast Milk Samples from Germany by LC-MS/MS and GC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(6), 1414–1421. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b05852>
- Steinmann, H. H., Dickeduisberg, M., & Theuvsen, L. (2012). Uses and benefits of glyphosate in German arable farming. *Crop Protection*, 42, 164–169. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2012.06.015>
- Struger, J., Thompson, D., Staznik, B., Martin, P., McDaniel, T., & Marvin, C. (2008). Occurrence of glyphosate in surface waters of southern Ontario. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 80(4), 378–384. <https://doi.org/10.1007/s00128-008-9373-1>
- Su, Y., Xiang, B., & Xu, J. (2012). Feasibility research on rapid detection of dimethoate in water by near-infrared spectroscopy. *Analytical Methods*, 4(6), 1742–1746. <https://doi.org/10.1039/c2ay05906a>
- Subramaniam, V., & Hoggard, P. E. (1988). Metal Complexes of Glyphosate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36(6), 1326–1329. <https://doi.org/10.1021/jf00084a050>
- Sun, P., Gao, Y. L., Xu, C., & Lian, Y. F. (2018). Determination of six organophosphorus pesticides in water samples by three-dimensional graphene aerogel-based solid-phase extraction combined with gas chromatography/mass spectrometry. *RSC Advances*, 8(19), 10277–10283. <https://doi.org/10.1039/c7ra13316b>
- Szepanowski, F., Szepanowski, L. P., Mausberg, A. K., Albrecht, P., Kleinschnitz, C., Kieseier, B. C., & Stettner, M. (2018). Differential impact of pure glyphosate and glyphosate-based herbicide in a model of peripheral nervous system myelination. *Acta Neuropathologica*, 136(6), 979–982. <https://doi.org/10.1007/s00401-018-1938-4>
- Tanveer, A., Ali, H. H., Manalil, S., Raza, A., & Chauhan, B. S. (2018). Eco-Biology and Management of Alligator Weed [*Alternanthera philoxeroides* (Mart.) Griseb.]: a Review. *Wetlands*, 38(6), 1067–1079. <https://doi.org/10.1007/s13157-018-1062-1>
- Thundiyil, J. G., Stober, J., Besbelli, N., & Pronczuk, J. (2008). Acute pesticide poisoning: A proposed classification tool. *Bulletin of the World Health Organization*, 86(3), 205–209. <https://doi.org/10.2471/BLT.07.041814>
- Tian, F., Liu, W., Fang, H., An, M., & Duan, S. (2014). Determination of six organophosphorus pesticides in water by single-drop microextraction coupled with GC-NPD. *Chromatographia*, 77(5–6), 487–492. <https://doi.org/10.1007/s10337-013-2609-1>
- Tognaccini, L., Ricci, M., Gellini, C., Feis, A., Smulevich, G., & Becucci, M. (2019). Surface Enhanced Raman Spectroscopy for In-Field Detection of Pesticides: A Test on Dimethoate Residues in Water and on Olive Leaves. *Molecules*, 24(2), 292. <https://doi.org/10.3390/molecules24020292>

- Torretta, V., Katsoyiannis, I. A., Viotti, P., & Rada, E. C. (2018). Critical review of the effects of glyphosate exposure to the environment and humans through the food supply chain. *Sustainability (Switzerland)*, *10*(4), 1–20. <https://doi.org/10.3390/su10040950>
- Troyo-Diéguez, E., Arturo, C.-F., Luis Felipe, B.-M., Murillo-Amador, B., Beltrán-Morales, F. A., García-Hernández, J. L., & Valdez-Cepeda, R. D. (2010). Agotamiento hidro-agrícola a partir de la Revolución Verde: extracción de agua y gestión de la tecnología de riego en Baja California Sur, México. *Estudios Sociales*, *18*(36), 178–201. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=829232
- Tsui, M. T. K., & Chu, L. M. (2003). Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: Comparison between different organisms and the effects of environmental factors. *Chemosphere*, *52*(7), 1189–1197. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(03\)00306-0](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(03)00306-0)
- U.S. Environmental Protection Agency. (1990). *Method 547 Determination of Glyphosate in Drinking Water By Direct-Aqueous- Injection Hplc, Post-Column Derivatization, and Fluorescence Detection*. In: *Methods for the determination of organic compounds in drinking water – Supplement II (EPA/600/R-92-129)* (Vol. 1).
- UNEP. (2017). *Asamblea de las Naciones Unidas sobre el Medio Ambiente del Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente*.
- United Nations. (2019). *[World population prospects 2019]*. United Nations. Department of Economic and Social Affairs. *World Population Prospects 2019*. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12283219>
- United States Department of Agriculture. (2018). Adoption of Genetically Engineered Crops in the U.S. Retrieved from <https://www.ers.usda.gov/data-products/adoption-of-genetically-engineered-crops-in-the-us/recent-trends-in-ge-adoption.aspx>
- United States Environmental Protection Agency. (2018). *2018 Edition of the Drinking Water Standards and Health Advisories Tables*. Environmental Protection Agency. Washington, DC. [https://doi.org/EPA 822-F-18-001](https://doi.org/EPA%20822-F-18-001)
- United States Environmental Protection Agency. (2019). What are EPA’s drinking water regulations for glyphosate? Retrieved October 11, 2019, from <https://safewater.zendesk.com/hc/en-us/articles/212076457-4-What-are-EPA-s-drinking-water-regulations-for-glyphosate->
- Vaghela, C., Kulkarni, M., Haram, S., Aiyer, R., & Karve, M. (2018). A novel inhibition based biosensor using urease nanoconjugate entrapped biocomposite membrane for potentiometric glyphosate detection. *International Journal of Biological Macromolecules*, *108*, 32–40. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.11.136>
- Vahid, B. (2017). Specific Fluorescence Probe for Direct Recognition of Dimethoate Using Molecularly Imprinting Polymer on ZnO Quantum Dots. *Journal of Fluorescence*, *27*(4), 1339–1347. <https://doi.org/10.1007/s10895-017-2068-4>
- Valle, A. L., Mello, F. C. C., Alves-Balvedi, R. P., Rodrigues, L. P., & Goulart, L. R. (2018). Glyphosate detection: methods, needs and challenges. *Environmental Chemistry Letters*, (0123456789). <https://doi.org/10.1007/s10311-018-0789-5>

- Van Bruggen, A. H. C., He, M. M., Shin, K., Mai, V., Jeong, K. C., Finckh, M. R., & Morris, J. G. (2018a). Environmental and health effects of the herbicide glyphosate. *Science of the Total Environment*, 616–617(November 2017), 255–268. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.309>
- Van Bruggen, A. H. C., He, M. M., Shin, K., Mai, V., Jeong, K. C., Finckh, M. R., & Morris, J. G. (2018b). Environmental and health effects of the herbicide glyphosate. *Science of the Total Environment*, 616–617, 255–268. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.309>
- Vandenberg, L. N., Blumberg, B., Antoniou, M. N., Benbrook, C. M., Carroll, L., Colborn, T., ... Myers, J. P. (2017). Is it time to reassess current safety standards for glyphosate-based herbicides? *Journal of Epidemiology and Community Health*, 71(6), 613–618. <https://doi.org/10.1136/jech-2016-208463>
- Vannini, A., Guarnieri, M., Paoli, L., Sorbo, S., Basile, A., & Loppi, S. (2016). Bioaccumulation, physiological and ultrastructural effects of glyphosate in the lichen *Xanthoria parietina* (L.) Th. Fr. *Chemosphere*, 164, 233–240. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.08.058>
- Veiga, F., Zapata, J. M., Fernandez Marcos, M. L., & Alvarez, E. (2001). Dynamics of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in a forest soil in Galicia, north-west Spain. *Science of the Total Environment*, 271(1–3), 135–144. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(00\)00839-1](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(00)00839-1)
- Vereecken, H. (2005). Mobility and leaching of glyphosate: A review. *Pest Management Science*, 61(12), 1139–1151. <https://doi.org/10.1002/ps.1122>
- Waiman, C. V., Avena, M. J., Garrido, M., Fernández Band, B., & Zanini, G. P. (2012). A simple and rapid spectrophotometric method to quantify the herbicide glyphosate in aqueous media. Application to adsorption isotherms on soils and goethite. *Geoderma*, 170, 154–158. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2011.11.027>
- Wang, Y., Xue, Z., Dong, Y., & Zhu, W. (2015). Synthesis and electrochemistry of meso-substituted dipyrromethene nickel (II) complexes. *Polyhedron*, 102, 578–582. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2015.10.020>
- Weber, R., Bell, L., Watson, A., Petrlik, J., Paun, M. C., & Vijgen, J. (2019). Assessment of pops contaminated sites and the need for stringent soil standards for food safety for the protection of human health. *Environmental Pollution*, 249(May), 703–715. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.03.066>
- Westgard, J. O., Barry, P. L., Quam, E. F., & Ehrmeyer, S. S. (2010). *Basic method validation: training in analytical quality management for healthcare laboratories* (Westgard Q). Retrieved from <https://www.westgard.com/downloads/free-book-preview-chapters-downloads/56-basic-qc-practices-3rd-edition.html>
- Williams, G. M., Berry, C., Burns, M., de Camargo, J. L. V., & Greim, H. (2016). Glyphosate rodent carcinogenicity bioassay expert panel review. *Critical Reviews in Toxicology*, 46, 44–55. <https://doi.org/10.1080/10408444.2016.1214679>
- Wongta, A., Sawang, N., Tongchai, P., Sutan, K., Kerdnoi, T., Prapamontol, T., & Hongsibsong, S. (2018). The Pesticide Exposure of People Living in Agricultural Community, Northern Thailand. *Journal of Toxicology*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/4168034>

- World Health Organization. (2004). *Dimethoate in Drinking-water. Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality. Guidelines for Drinking-water Quality*. <https://doi.org/WHO/HSE/WSH/10.01/14>
- World Health Organization & International Programme on Chemical Safety. (1988). Dimethoate: health and safety guide. Retrieved from <https://apps.who.int/iris/handle/10665/39127>
- Wu, Y., Peng, X., Guo, B., Fan, J., Zhang, Z., Wang, J., ... Gao, Y. (2005). Boron dipyrromethene fluorophore based fluorescence sensor for the selective imaging of Zn(, (c), 1387–1392. <https://doi.org/10.1039/b501795e>
- Xu, J., Smith, S., Smith, G., Wang, W., & Li, Y. (2019). Glyphosate contamination in grains and foods: An overview. *Food Control*, 106(June). <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106710>
- Xue, Z., Dong, Y., Ma, J., wang, Y., & Zhu, W. (2017). Synthesis, characterization and electrochemistry of dipyrinato nickel(II) complexes with different aromatic rings to meso-position. *Polyhedron*, 127, 287–292. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2017.02.022>
- Yamamura, M., Albrecht, M., Albrecht, M., Nishimura, Y., Arai, T., & Nabeshima, T. (2014). Red/near-infrared luminescence tuning of group-14 element complexes of dipyrins based on a central atom. *Inorganic Chemistry*, 53(3), 1355–1360. <https://doi.org/10.1021/ic402116j>
- Yang, F., Zhang, S., Sun, Y., Tsang, D. C. W., Cheng, K., & Ok, Y. S. (2019). Assembling biochar with various layered double hydroxides for enhancement of phosphorus recovery. *Journal of Hazardous Materials*, 365(October 2018), 665–673. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.11.047>
- Yola, M. L. (2019). Electrochemical activity enhancement of monodisperse boron nitride quantum dots on graphene oxide: Its application for simultaneous detection of organophosphate pesticides in real samples. *Journal of Molecular Liquids*, 277, 50–57. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.12.084>
- Yoshioka, N., Asano, M., Kuse, A., Mitsuhashi, T., Nagasaki, Y., & Ueno, Y. (2011). Rapid determination of glyphosate, glufosinate, bialaphos, and their major metabolites in serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1218(23), 3675–3680. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.04.021>
- Yuan, Y., Jiang, J., Liu, S., Yang, J., zhang, H., Yan, J., & Hu, X. (2017). Fluorescent carbon dots for glyphosate determination based on fluorescence resonance energy transfer and logic gate operation. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 242, 545–553. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.11.050>
- Zaller, J. G., Heigl, F., Ruess, L., & Grabmaier, A. (2014). Glyphosate herbicide affects belowground interactions between earthworms and symbiotic mycorrhizal fungi in a model ecosystem. *Scientific Reports*, 4, 1–8. <https://doi.org/10.1038/srep05634>
- Zepeda Jazo, I. (2018). Manejo sustentable de plagas agrícolas en México. *Agricultura Sociedad y Desarrollo*, 15(1), 99. <https://doi.org/10.22231/asyd.v15i1.752>
- Zhai, J., Pan, T., Zhu, J., Xu, Y., Chen, J., Xie, Y., & Qin, Y. (2012). Boronic acid functionalized boron dipyrromethene fluorescent probes: Preparation, characterization, and saccharides

sensing applications. *Analytical Chemistry*, *84*(23), 10214–10220.
<https://doi.org/10.1021/ac301456s>

Zhang, C., Sun, Y., Hu, R., Huang, J., Huang, X., Li, Y., ... Chen, Z. (2018). A comparison of the effects of agricultural pesticide uses on peripheral nerve conduction in China. *Scientific Reports*, *8*(1), 4–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27713-6>

Zhang, Y., Fa, H. bao, He, B., Hou, C. jun, Huo, D. qun, Xia, T. ci, & Yin, W. (2017). Electrochemical biomimetic sensor based on oxime group-functionalized gold nanoparticles and nitrogen-doped graphene composites for highly selective and sensitive dimethoate determination. *Journal of Solid State Electrochemistry*, *21*(7), 2117–2128.
<https://doi.org/10.1007/s10008-017-3560-0>

Zhou, Y., Deng, T., Pan, C., Chen, C., & Mo, J. (2010). Purification of a laccase from fungus combs in the nest of *Odontotermes formosanus*. *Process Biochemistry*, *45*(7), 1052–1056.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.03.012>

Zobiole, L. H. S., Oliveira, R. S., Kremer, R. J., Constantin, J., Yamada, T., Castro, C., ... Oliveira, A. (2010). Effect of glyphosate on symbiotic N₂ fixation and nickel concentration in glyphosate-resistant soybeans. *Applied Soil Ecology*, *44*(2), 176–180.
<https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2009.12.003>

Zouaoui, K., Dulaurent, S., Gaulier, J. M., Moesch, C., & Lachatre, G. (2013). Determination of glyphosate and AMPA in blood and urine from humans: About 13 cases of acute intoxication. *Forensic Science International*, *226*(1–3), 20–25.
<https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2012.12.010>

12. ANEXOS

12.1 ANEXO 1. Detección espectrofotométrica de glifosato en agua por formación de complejo entre bis 5-fenildipirrinato de níquel (II) y glifosato

Article

Spectrophotometric Detection of Glyphosate in Water by Complex Formation between Bis 5-Phenyldipyrinate of Nickel (II) and Glyphosate

Aline Romero-Natale ¹, Ilaria Palchetti ², Mayra Avelar ^{3,4}, Enrique González-Vergara ¹, José Luis Garate-Morales ⁵ and Eduardo Torres ^{1,*}

¹ Centro de Química, ICUAP, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, 14 Sur y Av. San Claudio, Col. San Manuel, Puebla 72570, México; aline_natale@hotmail.com (A.R.-N.); enrique.gonzalez@correo.buap.mx (E.G.-V.)

² Dipartimento di Chimica, Università Degli Studi di Firenze, Via della Lastruccia 3, 50019 Sesto Fiorentino (Fi), Italy; ilaria.palchetti@unifi.it

³ Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 2001 Chamilpa, Cuernavaca 62210, Morelos, México; mavelarf@gmail.com

⁴ Department of Biotechnology, Chemistry, and Pharmacy, University of Siena, Via A. Moro 2, 53100 Siena, Italy

⁵ Facultad de Ciencias Químicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, 14 Sur y Av. San Claudio, Col. San Manuel, Puebla 72570, México; jose.garate@correo.buap.mx

* Correspondence: eduardo.torres@correo.buap.mx; Tel.: +52-222-2295500 ext. 7273

Received: 26 February 2019; Accepted: 3 April 2019; Published: 6 April 2019

Abstract: A spectrophotometric method for the determination of glyphosate based on the monitoring of a complex formation between bis 5-phenyldipyrinate of nickel (II) and the herbicide was developed. The method showed a short response time (10 s), high selectivity (very low interference from other pesticides and salts), and high sensitivity (LOD 2.07×10^{-7} mol/L, LOQ 9.87×10^{-7} mol/L, and a K_a from 1.75×10^{-6} to 6.95×10^{-6} mol/L). The Job plot showed that complex formation occurs with a 1:1 stoichiometry. The method was successfully applied in potable, urban, groundwater, and residual-treated water samples, showing high precision (0.34–2.9%) and accuracy (87.20–119.04%). The structure of the complex was elucidated through theoretical studies demonstrating that the nickel in the bis 5-phenyldipyrinate forms a distorted octahedral molecular geometry by expanding its coordination number through one bond with the nitrogen and another with the oxygen of the glyphosate' carboxyl group, at distances between 1.89–2.08 Å.

Keywords: environmental analysis; glyphosate; pesticides; phenyldipyrinate; spectrophotometry; water pollution

1. Introduction

Glyphosate (N-(phosphonomethyl)glycine) (gryp) (Figure 1c) is the most intensively used herbicide worldwide because of its high effectiveness against annual grasses and aquatic weeds [1,2], with a global annual production estimated to be over 825,804 tons in 2014 [3]. Its use is allowed in agricultural, urban, and domestic activities [4], with the agricultural application being the most intensive one. The physical and chemical properties of gryp allow its distribution in the environmental compartments [5–7]. Furthermore, its chelating ability and the absorption constant in soil allows for its accumulation in several types of soils, mainly clays [8]; it is considered a stable compound in a pH range between 4 and 9 for hydrolysis and photolysis [9,10]. Gryp pollution in

water, soil, and food samples are becoming a serious health concern [11–13]. In addition, its metabolite, aminomethylphosphonic acid (AMPA), also represents a potential danger to human and animal health [14,15]. Both compounds have been detected in groundwater and surface water in several countries [6,16,17]. As glyph has been labeled as a global pollutant [18,19], assessing its presence in several environmental matrices is a vigorous area of research [20–22].

There are some analytical methods to determine the presence of glyph and the metabolite AMPA in different media, such as water, urine, and serums. The official method to determine glyph in water, the EPA-547 [23], requires herbicide derivatization post-column with *o*-phthalaldehyde (OPA) [24]. Other methods employ high-performance liquid chromatography (HPLC) [25] coupled with mass spectrometry [26–29], fluorescence [30], or capillary electrophoresis [31]. However, these methods are complex, as they require pre-treatment steps for the samples and lengthy analysis times, by which it is not always possible to analyze massive samples in situ [32,33]. Recently, other methods have been reported as alternative tools for monitoring environmental samples in situ with the added benefit of short analysis times. Furthermore, some other analytical methods can have remarkably low detection limits, such as spectrophotometric [34–37], electrochemical [38–40], and Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) techniques [17,41]. The development of new methodologies that are quick, sensitive, reproducible, and inexpensive represent a viable alternative to the current methods and instruments by allowing the analysis of a larger number of samples either on the field or at the lab [42–44].

Dipyrromethenes are chelators of bipyrrrolic monoacids that can form stable complexes with metals due to their coordination chemistry and optic and fluorescent properties [45]. These ligands are structurally rigid, completely conjugated, and capable of functionalizing several positions of their structure (1, 5, and 9) (Figure 1a). Hence, the coordination with metallic ions of meso-substituted dipyrromethenes (position 5) has been applied to the design of sensors. For instance, there is a study based on fluorescent probes on a boron dipyrromethene functionalized with a group of phenylboronic acids (BODIPY-PBAs) that can detect several monosaccharides in a concentration range of 0.1–100 mM, with good reproducibility and photostability [46]. In another study, an electrochemical biosensor was developed using a dipyrromethene-Cu(II) to determine the oligomeric form of amyloid beta (A β 16–23) with concentrations in the range of 0.001–1.00 μ M, which induces the neuronal dysfunction associated with Alzheimer's disease (AD) [47]. Another paper reported on the electroactive dipyrromethene-Cu biosensor to detect antibodies against avian influenza virus type H5N1 in hen sera [48].

In this study, the chelating capacity of glyph was exploited to bind the metallic moiety of the compound bis 5-phenyldipyrinate of nickel (II) (Ni(PhDP) $_2$) (Figure 1b). Based on this molecular association, a method for glyph determination in several water samples is developed for the quantification of the complex formed between glyph and (Ni(PhDP) $_2$). The resulting method is fast, sensitive, accurate, and useful for the quantification of glyph in drinking, urban, and ground waters, and residual-treated wastewater.

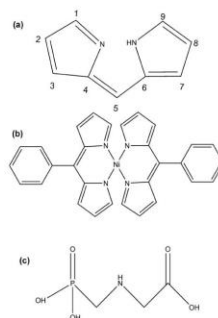


Figure 1. Chemical structure of (a) dipyrromethene ligand, (b) (Ni(PhDP) $_2$), and (c) glyph.

2. Materials and Methods

2.1. Reagents and Chemicals

Glyphosate, silica gel, pyrrole, trifluoroacetic acid (TFA), benzaldehyde, triethylamine (Et₃N), and 2,3-Dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone (DDQ) were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). The methylene chloride (CH₂Cl₂), chloroform (CHCl₃), hexane, and methanol (CH₃OH) were from Fermont (Monterrey, Mexico), and ethyl acetate was purchased from JT Baker (Center Valley, PA, USA). All the used reagents are analytical grade.

2.2. Apparatus

Electronic absorbance spectra measurements were obtained using a Varian Cary 50 spectrophotometer equipped with a xenon lamp (Australia). To perform electronic spectra measurements, quartz cuvettes (1 cm path length) were used.

2.3. Synthesis of the (Ni(PhDP)₂)

The procedure used by Brückner et al. [49] was followed to synthesize (Ni(PhDP)₂). First, the 5-phenyldipyrromethane with benzaldehyde (1 mmol), pyrrole (1 mmol), and trifluoroacetic acid were synthesized. Then 2,3-Dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone (1 mmol) was added and stirred for 30 min at room temperature. After that Et₃N (0.5 mL) was added to the solution and stirred for another 30 min at room temperature. After the elimination of the solvent, the residue was dissolved in CH₂Cl₂ and the solution was filtered to remove precipitates. The solvent was removed, and the product was purified by short silica gel column chromatography using ethyl acetate as an eluent. The first eluted yellow fraction was evaporated to afford the crude product. Later, 2 mmol of 5-Phenyldipyrromethane and 1 mmol of nickel sulfate hexahydrate were dissolved in a mixture of CHCl₃ and CH₃OH. The solution was agitated and heated under reflux for 6 h, and then 0.5 mL of Et₃N were added and heated again under reflux for 4 h. The solution was evaporated in a rotary evaporator until a dark brown solid was obtained. The dried remainder was dissolved in CH₂Cl₂ and CH₃OH (1:1), leaving it to slowly evaporate until crystals were obtained.

2.4. The interaction between the (Ni(PhDP)₂) Compound and Glyp

The formation of the complex between (Ni(PhDP)₂) and glyp (NiGlyp(PhDP)₂) was followed by the changes in the electron absorption spectrum of (Ni(PhDP)₂) (1.08 × 10⁻⁴ mol/L) after the addition of glyp, in 1 ml of a 99% methanol, 1% water solution. A calibration curve was developed, registering the absorbance changes of the new band at 362 nm at different glyp concentrations (5.9 × 10⁻⁷ to 1.1 × 10⁻⁵ mol/L).

2.5. Complex Stoichiometry

The Job method of continuous variation [50] was used to determine the stoichiometry of (NiGlyp(PhDP)₂). Two equimolar stock solutions were prepared and mixed in a way that the total concentration was kept constant (5 × 10⁻⁵ and 1 × 10⁻⁴ mol/L for two different assays). The absorbance at 362 nm was measured after mixing for 10 s in a 1 mL reaction mixture (99% CH₃OH–1% water).

2.6. Determination of the Dissociation Constant (K_d)

To determine the dissociation constant, a curve was constructed, in which the absorbance changes at 362 nm of (Ni(PhDP)₂) (3.6 × 10⁻⁵ and 1.08 × 10⁻⁴ mol/L for two different assays) were monitored at different concentrations of glyp (5.9 × 10⁻⁷ to 2.3 × 10⁻⁴ mol/L), until its saturation was reached. The binding between the glyp and the (Ni(PhDP)₂) can be represented as Glyp + (Ni(PhDP)₂) → (NiGlyp(PhDP)₂).

The absorbance changes at 362 nm of the (Ni(PhDP)₂) complex at different concentrations of glyph were transformed to a percentage of change and adjusted to the one-site binding model [51] (Equation (1)) to determine K_d:

$$\Delta AG = \Delta A_{\max} \times K_d / G_0 \quad (1)$$

where ΔAG is the percentage of absorbance change at 362 nm upon adding each glyph concentration, ΔA_{\max} is the maximum percentage of change (100%) when the (Ni(PhDP)₂) is saturated with glyph, and G_0 is the total concentration of glyph. The reported values are the mean of the three replicates. The data were fit to the Hill equation using an iteration procedure following the Marquardt–Levenberg nonlinear least-squares algorithm, using Origin 8.0 software (Originlab Corporation, Northampton, MA, USA).

2.7. The analysis in Water Samples

Four different water samples were analyzed to assess the potential of the methodology: potable, treated wastewater, urban, and groundwater, with each of them containing concentrations of glyph (4.1×10^{-6} and 5.9×10^{-6} mol/L) added intentionally. The analyses were carried out, in 1 mL of a 99% methanol, 1% water solution. Treated wastewater was filtered to remove suspended solids. The four water samples were stored at 4 °C until used and physicochemically characterized by following conventional methods: pH, specific conductance, Chemical Oxygen Demand (COD), and Biochemical Oxygen Demand (BOD). Several anion and cation analyses were performed as well: Ca²⁺, Fe²⁺, SO₄²⁻, Mg²⁺, NO₃⁻, NO₃-N, PO₄³⁻, P₂O₅, and free chlorine.

2.8. Interfering Factors

To identify possible interfering factors, various salts were added at the maximum concentrations found in the environmental water samples: FeCl₃·6 H₂O (6.6×10^{-4} mol/L showed 34 μs/cm), CaCl₂·2 H₂O (9.8×10^{-4} mol/L showed 240 μs/cm), NaNO₃ (1.2×10^{-2} mol/L showed 140 μs/cm), and MgCl₂·6 H₂O (4.9×10^{-3} mol/L showed 8 μs/cm), as well as the phosphate salts Na₂PO₄·H₂O (140 μs/cm), Na₂HPO₄·7 H₂O (140 μs/cm), and (NH₄)₂HPO₄ (146 μs/cm) at a concentration of 4.1×10^{-6} mol/L. Furthermore, other organophosphorus pesticides were tested: parathion (0.85 μs/cm), dimethoate (0.82 μs/cm), and diclofenthion (0.80 μs/cm), at a concentration of 4.1×10^{-6} mol/L for each one. The effect of the mix of salts (420 μs/cm) and pesticides (0.88 μs/cm) was also evaluated. For these studies, the assay time was 10 s, the glyph concentration of 4.1×10^{-6} mol/L (0.81 μs/cm) and the (Ni(PhDP)₂) concentration of 1.08×10^{-4} mol/L were set.

All the experimental assays were made in triplicate to assess the repeatability of the results. The statistical analysis of the data was performed using Origin Software V 8.0.

2.9. Theoretical Structure of the (NiGlyph(PhDP)₂) Complex

All calculations were performed using Density Functional Theory (DFT) [52,53] implemented in Gaussian 16 [54]. Geometry optimizations and frequency analysis were done in a vacuum with B3LYP functional and LANLD2Z basis sets. The local minima were identified with zero number of imaginary frequencies (NIMAG = 0). All calculations were made with no symmetry constraints.

3. Results and Discussion

3.1. Synthesis and Characterization of the (Ni(PhDP)₂) Compound

The (Ni(PhDP)₂) was successfully synthesized according to the procedure reported by Brückner et al. [49], and then it was characterized by UV-Vis (λ nm): 330, 480, and by mass spectrometry ¹H NMR spectroscopy based on the structural symmetry by signals for the aromatic protons. Xue et al. [55] characterized the Ni(PhDP)₂ with ¹H NMR to have (500 MHz, CDCl₃) δ = 9.426 (s, 4, α-dipyrin), 7.500 (d, J = 2.5 Hz, 6H, Ar-H), 7.483–7.331 (m, 8H, Ar-H, β-dipyrin), 6.741 (d, J = 3.5 Hz, 4H, β-dipyrin), which corresponds with what was reported.

3.2. The Interaction between Glyph with (Ni(PhDP)₂)

As mentioned, the electronic absorption spectrum of (Ni(PhDP)₂) showed a characteristic band at 480 nm, indicative of double-bond electron transition metals (Figure 2, line), which significantly increased in the presence of glyph (1.1×10^{-5} mol/L); in addition, a new band at 362 nm was observed. The change in absorbance at 480 nm, as well as the formation of a new absorption band, is attributed to the formation of a complex between both species, with measurable characteristics in the ultraviolet-visible boundary region. The complex formation was almost instantaneous, and no additional changes in the absorbance were detected after mixing and measuring immediately (average time 10 seconds).

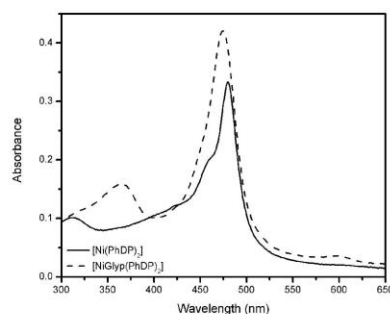


Figure 2. The electronic absorption spectrum of (Ni(PhDP)₂) (1.08×10^{-4} mol/L) in the absence (solid line) and the presence of glyph (1.1×10^{-5} mol/L) (dotted line). Reaction conditions: 99% CH₃OH–1% water.

Changes in the pH of the glyphosate solution, or the (Ni(PhDP)₂) concentration, did not lead to improved results. Therefore, the pH of the water was kept at pH 7.0, (Ni(PhDP)₂) of 1.08×10^{-4} mol/L, and incubation time of 10 s.

As the purpose of the present study is the quantification of glyph in water samples, the dependence of the absorbance change on glyph concentration was determined. As can be seen in Figure 3, the absorbance at 362 nm was dependent on the glyph concentration, with a linear range from 5.9×10^{-7} to 1.1×10^{-5} mol/L of glyph.

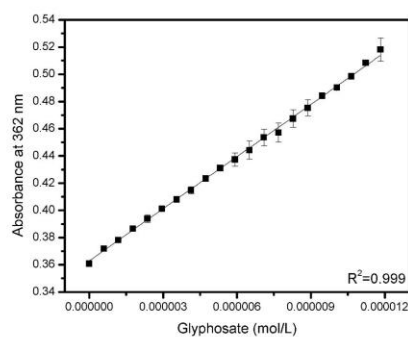


Figure 3. Calibration curve for the detection of glyph (5.9×10^{-7} – 1.1×10^{-5} mol/L) based on the interaction with the compound (Ni(PhDP)₂) (1.08×10^{-4} mol/L). Reaction conditions: 99% CH₃OH–1% water.

Equation (2) describes the relationship between the two variables, where A is the absorbance at 362 nm, and G is the concentration of glyph (mol/L). The linear regression model fits the data very well, with a correlation coefficient higher than 0.99. Also, other statistical results (analysis of variance and dynamic graphs, i.e., normal probability plot of the standardized residuals, scatter plots of the standardized residual against the predictor variable, and the index plot of the standardized residuals) support the quality of the linear model.

$$A = 0.0128G + 0.3629 \quad (2)$$

Using Equation (2), the detection limit (LOD) and the quantification limit (LOQ) were calculated. The LOD and the LOQ are numerically equal to 3 and 10 times the standard deviation of the mean absorbance of (Ni(PhDP)₂) without glyph (blank absorbance). Substituting these values in Equation (1), a LOD of 2.01×10^{-7} mol/L (34.98 µg/L) and an LOQ of 9.87×10^{-7} mol/L (166 µg/L) were determined. These values are good enough for glyph determination in drinking water in the USA, as the EPA Maximum Contaminant Level (the highest level of a contaminant that is allowed in drinking water) of 700 µg/L has been set [56], and, in principle, should be higher for environmental water samples. A study by Botta et al. [57] reported concentrations of glyph of 4.4×10^{-7} – 5.32×10^{-7} mol/L (75–90 µg/L) in surface water. Therefore, it is possible to find high concentrations of glyph in environmental water that are within the LOD and LOQ obtained in this work. However, an improvement in detection is needed for application of the method in European countries, where the maximum level of glyph must not be higher than 0.1 µg/L [58]. In addition, our LOD and LOQ values are within the range of other alternative methods to detect the herbicide in a water sample (Table 1), with the advantages that the response time is shorter and there is no need for derivatization or the addition of reaction precursors.

Table 1. Comparison between other glyph determination in water.

Method	LOD (mol/L)	LOQ (mol/L)	Remarks
This method	2.01×10^{-7}	9.87×10^{-7}	Rapid, effective, selective, facile, and sensitive
Spectrophotometry with multi-pumping flow system [59]	1×10^{-6}	3×10^{-6}	Rapid, effective and selective, but needs pre-treatments
Fluorescence resonance energy transfer [60]	6×10^{-7}	1	Rapid, effective and selective, but needs expensive equipment
Electrochemical sensing [43]	2×10^{-6}	1	Rapid, effective and selective, but needs expensive equipment and reagents
Colorimetric sensor [35]	6×10^{-7}	1	Effective and sensitive, but it requires complex synthesizing steps

Note: 1 Not reported.

3.3. Stoichiometry

For the complex stoichiometry, determination of the absorbance changes was plotted as a function of the mole fraction of the Glyph or (Ni(PhDP)₂) (Figure 4) at two total concentrations. The Job plots show a triangular shape, which according to literature suggests a strong molecular interaction between the compounds; also, the maximum point in the curves takes place at 0.5 mole fraction, indicating that the molecular association occurs with stoichiometry 1:1 [50,61].

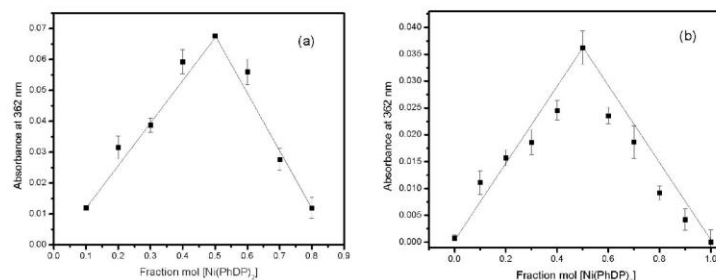


Figure 4. Job plot indicating the 1:1 stoichiometry for the $(\text{NiGlyp}(\text{PhDP})_2)$ complex, with a total concentration of (a) 5×10^{-5} mol/L and (b) 1×10^{-4} mol/L.

3.4. Dissociation Constant

The K_d was determined by fitting the data to the one-site binding model using nonlinear regression analysis (Figure 5). The obtained K_d values were 1.75×10^{-6} and 6.9×10^{-6} mol/L at two $(\text{Ni}(\text{PhDP})_2)$ concentrations (3.6×10^{-5} and 1.08×10^{-4} mol/L), which account for the affinity of the dipyrinate ligand to glyphosate. According to Chenprakhon et al. and Pan et al. [51,62], a small K_d value refers to a high binding affinity of the ligand to its target. Although the affinity values are three orders of magnitude lower compared to the antibody-antigen system, the dipyrinate ligand has the advantage that the analytic response does not need additional steps for separation and quantification, as in the immunoassay format.

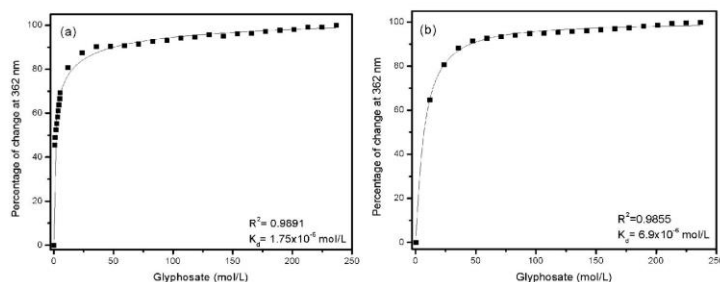


Figure 5. One site model fitting at (a) 1.08×10^{-4} mol/L of $(\text{Ni}(\text{PhDP})_2)$ and (b) 3.6×10^{-5} mol/L of $(\text{Ni}(\text{PhDP})_2)$ in the presence of glyph (5.9×10^{-7} to 2.36×10^{-4} mol/L).

3.5. Method Selectivity

The interference caused by other components that are usually present in water was determined to know the potential applicability of the method. It is well known that glyph can form strong coordination bonds with metal ions Fe^{2+} , Ca^{2+} , and Mg^{2+} [63,64]. The results showed that the presence of individual cations and its mixture did not interfere significantly in the complexation of glyph with $(\text{Ni}(\text{PhDP})_2)$. The same set of experiments were carried out with other organophosphorus pesticides, which are continuously used in agriculture, such as parathion [65], dimethoate [66], and diclofenthion [67], as well as their mixtures. The absorbance values of the $(\text{NiGlyp}(\text{PhDP})_2)$ complex in the presence of the organophosphorus pesticides and its mixtures did not show an interference

greater than 10% and thus are discarded as interferences. A mixture was tested between (NiGlyp(PhDP)₂) and AMPA because AMPA is frequently detected in water together with glyp [68,69]. Interestingly, the metabolite showed no additional change in the detection of glyp. Finally, different phosphate salts were tested, as it is already known that the phosphate ion may form complexes with nickel and other metals [70–72], which also showed no interference. All the assays suggest a good selectivity of the method (Table 2).

Table 2. Effects of the added salts, organophosphorus pesticides, and phosphates on the method selectivity.

Compounds	Absorbance at 362 nm	Standard Deviation	Interference (%) ¹
None (NiGlyp(PhDP) ₂)	0.42	0.012	0.0
Salts			
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0.43	0.008	2.57
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.41	0.008	0.19
NaNO ₃	0.42	0.007	0.78
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.44	0.008	3.66
Mixture of salts	0.45	0.010	5.49
Organophosphorus pesticides			
Parathion	0.42	0.012	1.47
Dimethoate	0.45	0.011	4.28
Diclofenthion	0.43	0.002	0.22
Mixture of pesticides	0.46	0.002	7.51
Phosphates			
Na ₂ PO ₄ ·H ₂ O	0.41	0.003	2.57
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	0.41	0.003	2.75
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0.42	0.008	0.81
Mixture of phosphates	0.43	0.005	0.67
Metabolite of glyp			
AMPA	0.42	0.12	0.0

¹ The percentage of interference was calculated, taking the absorbance of 0.42 obtained from the complex (Ni(PhDP)₂) 1.08 × 10⁻⁴ mol/L and glyp 4.1 × 10⁻⁶ mol/L as 0% of interference, minus the absorbance of the complex in the presence of interference between the absorbance of the complex, multiplied by one hundred.

3.6. Analysis of Spiked Water Samples

Table 3 shows the results of the physicochemical parameters of the four water matrices used to check the applicability of the proposed method. The parameter values are indicative of the different sources; as expected, treated wastewater shows the highest COD and BOD. The amount of dication metals was determined because of their possible interference behavior. No glyp was detected using the commercially available ELISA method (PN 500086) (Abraxis LLC, Warminster, PA, USA).

Table 3. Physicochemical analysis of the different water matrices.

Parameters	Water Matrix			
	Potable	Urban	Groundwater	Treated Wastewater
pH	7.00	7.00	7.00	7.00
Specific conductance (µs/cm)	0.05	424.00	523.00	1448.00
Temperature (°C)	25.00	25.30	25.30	24.70
COD (mg/L)	2.00	152.70	97.20	651.38
BOD (mg/L)	0.73	76.48	42.00	320.62
Ca ²⁺ (mg/L)	20.00	75.00	115.00	145.00
Fe ²⁺ (µg/L)	51.00	68.00	67.50	178.50
SO ₄ ²⁻ (mg/L)	0.00	27.50	40.00	90.00
Mg ²⁺ (mg/L)	0.00	10.00	30.0	10.00
NO ₃ -N (mg/L)	1.10	1.65	18.35	24.00
NO ₃ ⁻ (mg/L)	5.00	82.75	99.45	104.00
PO ₄ ³⁻ (mg/L)	0.10	4.80	0.94	40.20
P ₂ O ₅ (mg/L)	0.08	4.53	0.67	31.00
Free chlorine (mg/L)	0.07	0.35	0.007	0.10

Then, the samples were spiked with glyph (4.1×10^{-6} and 5.9×10^{-6} mol/L) and added to the (Ni(PhDP)₂) solution. The glyph concentrations in the samples were calculated using Equation (2).

The percentages of recovery vary between 87.20–119.04% (Table 4), which indicates good accuracy of the methodology. Furthermore, a high precision was obtained, as reflected by the coefficients of variation (0.34–2.89%). Overall, it seems that the presence of several salts and metals at different concentrations did not affect the detection, and the method may be applied for different water sources. It is important to note that the LOD and LOQ reported here suggests that the method may be used for screening purposes in heavily polluted water samples, such as those in agricultural lands or treatment facilities, where the pollutants are concentrated. Regarding urban or groundwater, where pollutants are in lower concentrations, a preconcentration step should be necessary, as it is usually carried out with other methods.

Table 4. Detection of glyph in spiked water samples.

Water Matrix	Glyph Added ($\times 10^{-6}$ mol/L)	Glyph Determined ($\times 10^{-6}$ mol/L)	Coefficient	
			of Variation (%)	Recovery (%)
Potable	4.10	3.72	2.89	89.58
	5.90	5.14	0.34	87.20
Urban	4.10	3.66	2.09	88.64
	5.90	5.32	0.61	89.97
Groundwater	4.10	4.02	2.38	96.49
	5.90	6.32	0.82	106.99
Treated wastewater	4.10	4.90	1.31	118.67
	5.90	7.03	0.99	119.04

3.7. Theoretical Results

To predict the possible complex between (Ni(PhDP)₂) and glyph quantum (QM), calculations were undertaken, starting the geometry optimization of probable compounds at the DFT level.

The structure complex shown in Figure 6 is the most probable compound found for the reaction of (Ni(PhDP)₂) with glyph, where the nickel in the (NiGlyph(PhDP)₂) complex expands its coordination number from 4 to 6 with a nitrogen and an oxygen atom of the glyph' carboxyl group, at distances between 1.89–2.08 Å in a distorted octahedral molecular geometry. The calculated bond distances are reported in Table 5. As can be seen, the distance values are similar to those reported in experimental conditions in the literature [55,70].

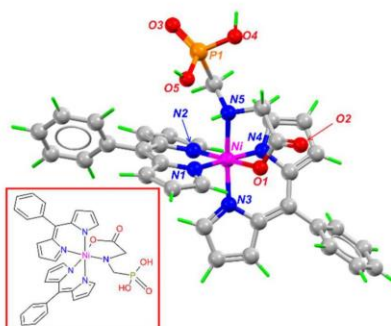


Figure 6. Optimized structure of the (NiGlyp(PhDP)₂) complex.

The oxygen atoms of phosphonic did not interact with the nickel atom because during the optimization this complex is not stable. Although it is known that the glyp could coordinate to nickel in a tridentated fashion, it appears that a heptacoordinate compound, in this case, is not stable. The shorter distance of the oxygen of the carboxyl group indicates a stronger interaction of the glyp with the title compound.

Table 5. Bond distances (Å) for the coordination atoms of the optimized structure (NiGlyp(PhDP)₂). Experimental values of (Ni(PhDP)₂) fragment (a) and Ni(Glyp)₂ (b) from the literature are provided for comparison [55,70].

(NiGlyp(PhDP) ₂)		(Ni(PhDP) ₂) (a) and Ni(Glyp) ₂ (b)	
Bond	Distance (Å)	Bond	Distance (Å)
Ni-N(1)	1.93	Ni-N (a)	1.88
Ni-N(2)	1.93	Ni-N (b)	2.01
Ni-N(3)	1.94	Ni-O (b)	2.05
Ni-N(4)	1.90		
Ni-N(5)	2.08		
Ni-O	1.89		

4. Conclusions

It has been possible to detect glyp by complex formation with stoichiometry 1:1, achieving a LOD of 2.07×10^{-7} mol/L and an LOQ of 9.8×10^{-7} mol/L. The method developed assures data repeatability, high sensitivity, and quick detection (10 s).

The method was applied to determine known concentrations of glyp (4.1×10^{-6} and 5.9×10^{-6} mol/L) in potable and urban water, as well as groundwater and treated wastewater. The recovery percentages and the coefficients of variation obtained show good precision and accuracy of the method to be applied in environmental samples. The presence of the salts, other organophosphorus pesticides, and phosphates, as well as their mixtures in the water, do not interfere with glyp detection. The theoretical results show that the nickel of (Ni(PhDP)₂) forms coordination bonds with the nitrogen and oxygen atoms of glyp in a distorted octahedral molecular geometry.

Author Contributions: A.R.-N. carried out the experiment, analysis and wrote the first draft of the paper; E.T. contributed to conducting a research and investigation process, oversight and leadership responsibility; I.P. contributed to verification of experiments and revision of the first draft; J.L.G.-M. contributed in synthesis process and preparation of published work; M.A. contributed to application of computational study and creation of molecular structure; E.G.-V. analyzed the study data and editing of publisher work.

Funding: This research project was funded by the Ph.D. Grant Number 494272 from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

Acknowledgments: Thanks to Marcela Ayala for allowing the use of UNAM supercomputing resources to perform the theoretical calculations, geometry optimizations, and frequency analysis (Project LANCAD-UNAM-DGTIC-293).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Dill, G.M.; Douglas, S.; Feng, P.C.C.; Kohn, F.; Kretzmer, K.; Mehrsheikh, A.; Bleeke, M.; Honegger, J.L.; Farmer, D.; Wright, D.; et al. Glyphosate: Discovery, development, applications, and properties. In *Glyphosate Resistance in Crops and Weeds: History, Development, and Management*; John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, USA, 2010; pp. 1–34, ISBN 9780470410318.
2. Grube, A.; Donaldson, D.; Kiely, T.; Wu, L. *Pesticides Industry Sales, and Usage: 2006 and 2007 Market Estimates*; USA Environment Protection Agency: Washington, DC, USA, 2011; pp. 1–41.
3. Benbrook, C.M. Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. *Environ. Sci. Eur.* **2016**, *28*, 1–42.
4. Steinmann, H.H.; Dickeduisberg, M.; Theuvsen, L. Uses, and benefits of glyphosate in German arable farming. *Crop Prot.* **2012**, *42*, 164–169.
5. Battaglin, W.A.; Meyer, M.T.; Kuivila, K.M.; Dietze, J.E. Glyphosate and its degradation product AMPA occur frequently and widely in U.S. soils, surface water, groundwater, and precipitation. *J. Am. Water Resour. Assoc.* **2014**, *50*, 275–290.
6. Rendón-Von Osten, J.; Dzul-Caamal, R. Glyphosate residues in groundwater, drinking water and urine of subsistence farmers from intensive agriculture localities: A survey in Hopelchén, Campeche, Mexico. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2017**, *14*, 596.
7. Wijekoon, N.; Yapa, N. Assessment of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on potential biodegradation of glyphosate in contaminated soil and aquifers. *Groundw. Sustain. Dev.* **2018**, *7*, 456–469.
8. Okada, E.; Costa, J.L.; Bedmar, F.R.; Ramsier, C.; Kloepper, J.W. Changes in rhizosphere bacterial gene expression following glyphosate treatment. *Sci. Total Environ.* **2016**, *553*, 32–41.
9. Krüger, M.; Schledom, P.; Schrödl, W.; Hoppe, H.-W.; Lutz, W.; Shehata, A.A. D. Adsorption and mobility of glyphosate in different soils under no-till and conventional tillage. *Geoderma* **2016**, *263*, 78–85.
10. Degenhardt, D.; Humphries, D.; Cessna, A.J.; Messing, P.; Badiou, P.H.; Raina, R.; Farenhorst, A.; Pennock, D.J. Dissipation of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in water and sediment of two Canadian prairie wetlands. *J. Environ. Sci. Health Part B Pestic. Food Contam. Agric. Wastes* **2012**, *47*, 631–639.
11. Mercurio, P.; Flores, F.; Mueller, J.F.; Carter, S.; Negri, A.P. Glyphosate persistence in seawater. *Mar. Pollut. Bull.* **2014**, *85*, 385–390.
12. Byer, J.D.; Struger, J.; Klawunn, P.; Todd, A.; Sverko, E.D. Low-cost monitoring of glyphosate in surface waters using the ELISA method: An evaluation. *Environ. Sci. Technol.* **2008**, *42*, 6052–6057.
13. Çetin, E.; Şahan, S.; Ülgen, A.; Şahin, U. DLLME-spectrophotometric determination of glyphosate residue in legumes. *Food Chem.* **2017**, *230*, 567–571.
14. Newman, M.M.; Lorenz, N.; Hoilett, N.; Lee, N.R.; Dick, R.P.; Liles, M. Detection of Glyphosate Residues in Animals and Humans. *J. Environ. Anal. Toxicol.* **2014**, *4*, 1–5.
15. Zouaoui, K.; Dularent, S.; Gaulier, J.M.; Moesch, C.; Lachatre, G. Determination of glyphosate and AMPA in blood and urine from humans: About 13 cases of acute intoxication. *Forensic Sci. Int.* **2013**, *226*, 20–25.
16. Aparicio, V.C.; De Gerónimo, E.; Marino, D.; Primost, J.; Carriquiriborde, P.; Costa, J.L. Environmental fate of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in surface waters and soil of agricultural basins. *Chemosphere* **2013**, *93*, 1866–1873.
17. Mörtl, M.; Németh, G.; Juracek, J.; Darvas, B.; Kamp, L.; Rubio, F.; Székács, A. Determination of glyphosate residues in Hungarian water samples by immunoassay. *Microchem. J.* **2013**, *107*, 143–151.
18. Hu, Y.S.; Zhao, Y.Q.; Sorohan, B. Removal of glyphosate from aqueous environment by adsorption using water industrial residual. *Desalination* **2011**, *271*, 150–156.
19. Ruiz-Toledo, J.; Castro, R.; Rivero-Pérez, N.; Bello-Mendoza, R.; Sánchez, D. Occurrence of glyphosate in water bodies derived from intensive agriculture in a tropical region of southern Mexico. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **2014**, *93*, 289–293.

20. Martínez, M.A.; Ares, I.; Rodríguez, J.L.; Martínez, M.; Martínez-Larrañaga, M.R.; Anadón, A. Neurotransmitter changes in rat brain regions following glyphosate exposure. *Environ. Res.* **2018**, *161*, 212–219.
21. Valle, A.L.; Mello, F.C.C.; Alves-Balvedi, R.P.; Rodrigues, L.P.; Goulart, L.R. Glyphosate detection: Methods, needs and challenges. *Environ. Chem. Lett.* **2019**, *17*, 291–371.
22. Van Bruggen, A.H.C.; He, M.M.; Shin, K.; Mai, V.; Jeong, K.C.; Finckh, M.R.; Morris, J.G. Environmental and health effects of the herbicide glyphosate. *Sci. Total Environ.* **2018**, *616–617*, 255–268.
23. USA Environmental Protection Agency. *Method 547 Determination of Glyphosate in Drinking Water By Direct-Aqueous-Injection HPLC, Post-Column Derivatization, and Fluorescence Detection*; USA Environmental Protection Agency: Washington, DC, USA, 1990; Volume 1.
24. Kaczyński, P.; Łozowicka, B. Liquid chromatographic determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid residues in rapeseed with MS/MS detection or derivatization/fluorescence detection. *Open Chem.* **2015**, *13*, 1011–1019.
25. Kim, M.; Stripeikis, J.; Iñón, F.; Tudino, M. A simplified approach to the determination of N-nitroso glyphosate in technical glyphosate using HPLC with post-derivatization and colorimetric detection. *Talanta* **2007**, *72*, 1054–1058.
26. Guo, Z.X.; Cai, Q.; Yang, Z. Determination of glyphosate and phosphate in water by ion chromatography-Inductively coupled plasma mass spectrometry detection. *J. Chromatogr. A.* **2005**, *1100*, 160–167.
27. Ibáñez, M.; Pozo, Ó.J.; Sancho, J.V.; López, F.J.; Hernández, F. Re-evaluation of glyphosate determination in water by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1134*, 51–55.
28. Lee, E.A.; Strahan, A.P.; Thurman, E.M. *Methods of Analysis by the USA Geological Survey Organic Geochemistry Research Group—Determination of Glyphosate, Aminomethylphosphonic Acid, and Glufosinate in Water Using Online Solid-Phase Extraction and High-Performance Liquid Chromatography/Mass Sp*; Department of the Interior Washington: Washington, DC, USA, 2002.
29. Ibáñez, M.; Pozo, Ó.J.; Sancho, J.V.; López, F.J.; Hernández, F. Residue determination of glyphosate, glufosinate and aminomethylphosphonic acid in water and soil samples by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2005**, *1081*, 145–155.
30. Padilla-Alonso, D.J.; Garza-Tapia, M.; Chávez-Montes, A.; González-Horta, A.; Waksman de Torres, N.H.; Castro-Ríos, R. New temperature-assisted ionic liquid-based dispersive liquid-liquid microextraction method for the determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in water samples. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2017**, *40*, 147–155.
31. Moraes, M.P.; Gonçalves, L.M.; Pereira, E.A. Determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid by capillary electrophoresis with indirect detection using pyridine-2, 6-dicarboxylic acid or 3, 5-dinitrobenzoic acid. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **2018**, *98*, 258–270.
32. Botero-Coy, A.M.; Ibáñez, M.; Sancho, J.V.; Hernández, F. Improvements in the analytical methodology for the residue determination of the herbicide glyphosate in soils by liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2013**, *1292*, 132–141.
33. Yoshioka, N.; Asano, M.; Kuse, A.; Mitsuhashi, T.; Nagasaki, Y.; Ueno, Y. Rapid determination of glyphosate, glufosinate, bialaphos, and their major metabolites in serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using hydrophilic interaction chromatography. *J. Chromatogr. A.* **2011**, *1218*, 3675–3680.
34. Chang, Y.; Zhang, Z.; Hao, J.; Yang, W.; Tang, J. A simple label-free colorimetric method for glyphosate detection based on the inhibition of the peroxidase-like activity of Cu(II). *Sens. Actuators B Chem.* **2016**, *228*, 410–415.
35. De Almeida, L.K.S.; Chigome, S.; Torto, N.; Frost, C.L.; Pletschke, B.I. A novel colorimetric sensor strip for the detection of glyphosate in water. *Sens. Actuators B Chem.* **2015**, *206*, 357–363.
36. Rawat, K.A.; Majithiya, R.P.; Rohit, J.V.; Basu, H.; Singhal, R.K.; Kailasa, S.K. Mg²⁺ ion as a tuner for colorimetric sensing of glyphosate with improved sensitivity: Via the aggregation of 2-mercapto-5-nitrobenzimidazole capped silver nanoparticles. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 47741–47752.
37. Waiman, C.V.; Avena, M.J.; Garrido, M.; Fernández Band, B.; Zanini, G.P. A simple and rapid spectrophotometric method to quantify the herbicide glyphosate in aqueous media. Application to adsorption isotherms on soils and goethite. *Geoderma* **2012**, *170*, 154–158.

38. Bettazzi, F.; Romero Natale, A.; Torres, E.; Palchetti, I. Glyphosate determination by coupling an immuno-magnetic assay with electrochemical sensors. *Sensors* **2018**, *18*, 2965.
39. Sánchez-Bayo, F.; Hyne, R.V.; Desseille, K.L. An amperometric method for the detection of amitrole, glyphosate and its aminomethyl-phosphonic acid metabolite in environmental waters using passive samplers. *Anal. Chim. Acta* **2010**, *675*, 125–131.
40. Songa, E.A.; Arotiba, O.A.; Owino, J.H.O.; Jahed, N.; Baker, P.G.L.; Iwuoha, E.I. Electrochemical detection of glyphosate herbicide using horseradish peroxidase immobilized on the sulfonated polymer matrix. *Bioelectrochemistry* **2009**, *75*, 117–123.
41. Sanchís, J.; Kantiani, L.; Llorca, M.; Rubio, F.; Ginebreda, A.; Fraile, J.; Garrido, T.; Farré, M. Determination of glyphosate in groundwater samples using an ultrasensitive immunoassay and confirmation by on-line solid-phase extraction followed by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *402*, 2335–2345.
42. Farkas, E.; Szekacs, A.; Kovacs, B.; Olah, M.; Horvath, R.; Szekacs, I. Label-free optical biosensor for real-time monitoring the cytotoxicity of xenobiotics: A proof of principle study on glyphosate. *J. Hazard. Mater.* **2018**, *351*, 80–89.
43. Noori, J.S.; Dimaki, M.; Mortensen, J.; Svendsen, W.E. Detection of glyphosate in drinking water: A fast and direct detection method without sample pretreatment. *Sensors* **2018**, *18*, 2961.
44. Vaghela, C.; Kulkarni, M.; Haram, S.; Aiyer, R.; Karve, M. A novel inhibition based biosensor using urease nanocomposite entrapped biocomposite membrane for potentiometric glyphosate detection. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *108*, 32–40.
45. Yamamura, M.; Albrecht, M.; Albrecht, M.; Nishimura, Y.; Arai, T.; Nabeshima, T. Red/near-infrared luminescence tuning of group-14 element complexes of dipyrrins based on a central atom. *Inorg. Chem.* **2014**, *53*, 1355–1360.
46. Zhai, J.; Pan, T.; Zhu, J.; Xu, Y.; Chen, J.; Xie, Y.; Qin, Y. Boronic acid functionalized boron dipyrromethene fluorescent probes: Preparation, characterization, and saccharides sensing applications. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 10214–10220.
47. Jargilo, A.; Grabowska, I.; Radecka, H.; Sulima, M.; Marszalek, I.; Wyslouch-Cieszyńska, A.; Dehaen, W.; Radecki, J. Redox-Active Dipyrromethene-Cu(II) Monolayer for Oriented Immobilization of His-Tagged RAGE Domains—the Base of Electrochemical Biosensor for Determination of A β 16–23'. *Electroanalysis* **2013**, *25*, 1185–1193.
48. Jarocka, U.; Sawicka, R.; Stachyra, A.; Góra-Sochacka, A.; Sirko, A.; Zagórski-Ostoja, W.; Sączyńska, V.; Porębska, A.; Dehaen, W.; Radecki, J.; et al. A biosensor based on electroactive dipyrromethene-Cu(II) layer deposited onto gold electrodes for the detection of antibodies against avian influenza virus type H5N1 in hen sera. *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, *407*, 7807–7814.
49. Brückner, C.; Karunaratne, V.; Rettig, S.J.; Dolphin, D. Synthesis of meso-phenyl-4, 6-dipyrrins, preparation of their Cu(II), Ni(II), and Zn(II) chelates, and structural characterization of bis[meso-phenyl-4, 6-dipyrinato]Ni(II). *Can. J. Chem.* **1996**, *74*, 2182–2193.
50. Renny, J.S.; Tomasevich, L.L.; Tallmadge, E.H.; Collum, D.B. Method of continuous variations: Applications of job plots to the study of molecular associations in organometallic chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 11998–12013.
51. Chenprakhon, P.; Sucharitakul, J.; Panijpan, B.; Chaiyen, P. Measuring binding affinity of protein-ligand interaction using spectrophotometry: Binding of neutral red to riboflavin-binding protein. *J. Chem. Educ.* **2010**, *87*, 829–831.
52. Hohenberg, P.; Kohn, W. The Inhomogeneous Electron Gas. *Phys. Rev.* **1964**, *136*, B864.
53. Kohn, W.; Sham, L.J. Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects *. *Phys. Rev.* **1965**, *140*, A1133–A1138.
54. Frisch, M.J.; Trucks, G.W.; Schlegel, H.B.; Scuseria, G.E.; Robb, M.A.; Cheeseman, J.R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Petersson, G.A.; Nakatsuji, H.; et al. *Gaussian 16*, Revision B.01; Gaussian, Inc.: Wallingford, CT, USA, 2016.
55. Wang, Y.; Xue, Z.; Dong, Y.; Zhu, W. Synthesis and electrochemistry of meso-substituted dipyrromethene nickel (II) complexes. *Polyhedron* **2015**, *102*, 578–582.
56. United States Environmental Protection Agency. *2018 Edition of the Drinking Water Standards and Health Advisories Tables*; United States Environmental Protection Agency: Washington, DC, USA, 2018.

57. Chevreuil, M.; Blanchoud, H.; Guery, B.; Moreau-Guigon, E.; Couturier, G.; Botta, F.; Alliot, F.; Fauchon, N.; Lavisson, G. Transfer of glyphosate and its degradate AMPA to surface waters through urban sewerage systems. *Chemosphere* **2009**, *77*, 133–139.
58. Li, Z.; Jennings, A. Worldwide regulations of standard values of pesticides for human health risk control: A review. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2017**, *14*, 826.
59. Silva, A.S.; Tóth, I. V.; Pezza, L.; Pezza, H.R.; Lima, J.L.F.C. Determination of glyphosate in water samples by multi-pumping flow system coupled to a liquid waveguide capillary cell. *Anal. Sci.* **2011**, *27*, 1031–1036.
60. Yuan, Y.; Jiang, J.; Liu, S.; Yang, J.; Zhang, H.; Yan, J.; Hu, X. Fluorescent carbon dots for glyphosate determination based on fluorescence resonance energy transfer and logic gate operation. *Sens. Actuators B Chem.* **2017**, *242*, 545–553.
61. Hill, Z.D.; MacCarthy, P. Novel approach to Job's method: An undergraduate experiment. *J. Chem. Educ.* **1986**, *63*, 162.
62. Pan, Y.; Sackmann, E.K.; Wypisniak, K.; Hornsby, M.; Datwani, S.S.; Herr, A.E. Determination of equilibrium dissociation constants for recombinant antibodies by high-throughput affinity electrophoresis. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 1–11.
63. Caetano, M.S.; Ramalho, T.C.; Botrel, D.F.; da Cunha, E.F.F.; de Mello, W.C. Understanding the inactivation process of organophosphorus herbicides: A DFT study of glyphosate metallic complexes with Zn^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Co^{3+} , Fe^{3+} , Cr^{3+} , and Al^{3+} . *Int. J. Quantum Chem.* **2012**, *112*, 2752–2762.
64. Ololade, I.A.; Oladoja, N.A.; Oloye, F.F.; Alomaja, F.; Akerele, D.D.; Iwaye, J.; Aikpokpodion, P. Sorption of Glyphosate on Soil Components: The Roles of Metal Oxides and Organic Materials. *Soil Sediment Contam.* **2014**, *23*, 571–585.
65. Yola, M.L. Electrochemical activity enhancement of monodisperse boron nitride quantum dots on graphene oxide: Its application for simultaneous detection of organophosphate pesticides in real samples. *J. Mol. Liq.* **2019**, *277*, 50–57.
66. Mondal, R.; Mukherjee, A.; Biswas, S.; Kole, R.K. GC-MS/MS determination and ecological risk assessment of pesticides in the aquatic system: A case study in Hooghly River basin in West Bengal, India. *Chemosphere* **2018**, *206*, 217–230.
67. Ccancapa, A.; Masiá, A.; Navarro-Ortega, A.; Picó, Y.; Barceló, D. Pesticides in the Ebro River basin: Occurrence and risk assessment. *Environ. Pollut.* **2016**, *211*, 414–424.
68. Demonte, L.D.; Michlig, N.; Gaggiotti, M.; Adam, C.G.; Beldoménico, H.R.; Repetti, M.R. Determination of glyphosate, AMPA and glufosinate in dairy farm water from Argentina using a simplified UHPLC-MS/MS method. *Sci. Total Environ.* **2018**, *645*, 34–43.
69. Fernandes, G.; Aparicio, V.C.; Bastos, M.C.; De Gerónimo, E.; Labanowski, J.; Prestes, O.D.; Zanella, R.; dos Santos, D.R. Indiscriminate use of glyphosate impregnates river epilithic biofilms in southern Brazil. *Sci. Total Environ.* **2019**, *651*, 1377–1387.
70. Menelaou, M.; Dakanali, M.; Raptopoulou, C.P.; Drouza, C.; Lalioti, N.; Salifoglou, A. pH-Specific synthetic chemistry, and spectroscopic, structural, electrochemical and magnetic susceptibility studies in binary Ni(II)-(carboxy)phosphonate systems. *Polyhedron* **2009**, *28*, 3331–3339.
71. Peleka, E.N.; Mavros, P.P.; Zamboulis, D.; Matis, K.A. Removal of phosphates from water by a hybrid flotation-membrane filtration cell. *Desalination* **2006**, *198*, 198–207.
72. Subramaniam, V.; Hoggard, P.E. Metal Complexes of Glyphosate. *J. Agric. Food Chem.* **1988**, *36*, 1326–1329.



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

12.2 ANEXO 2. Estructura teórica del complejo [NiGlyp(PhDP)₂]

Todos los cálculos se realizaron utilizando la Teoría Funcional de Densidad (DFT) (Hohenberg & Kohn, 1964; Kohn & Sham, 1965) implementada en Gaussian 16 (Frisch et al., 2016). Las optimizaciones de geometría y el análisis de frecuencia se realizaron al vacío con B3LYP funcional y el conjunto de bases LANLD2Z. Los mínimos locales se identificaron con un número cero de frecuencias imaginarias (NIMAG = 0). Todos los cálculos se realizaron sin restricciones de simetría.

Para predecir el posible complejo entre [Ni(PhDP)₂] y glifosato, se realizaron cálculos a partir de la optimización de la geometría de los compuestos probables en el nivel de DFT.

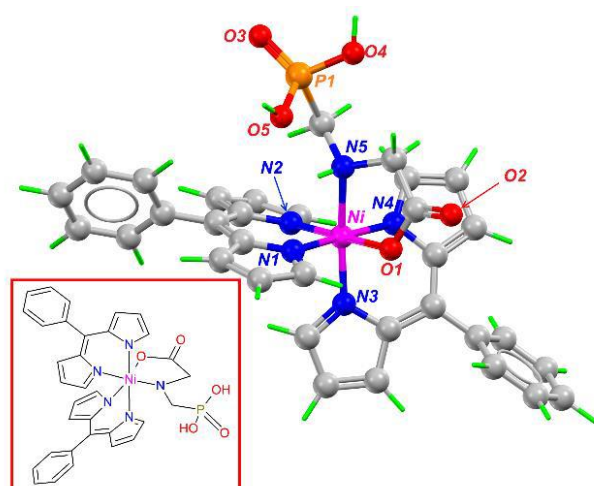


Figura A1. Estructura optimizada del complejo [NiGlyp(PhDP)₂] (Elaboración propia)

El complejo estructural que se muestra en la Figura A1 es el compuesto más estable y probable que se encontró durante la modelación de la reacción entre [Ni(PhDP)₂] y el glifosato. Dicha estructura muestra como el níquel en el complejo [NiGlyp(PhDP)₂] expande su número de coordinación de 4 a 6 con un átomo de nitrógeno y uno de oxígeno del grupo carboxilo del glifosato, a distancias entre 1.89-2.08 Å en una geometría molecular octaédrica distorsionada. Los valores de las distancias que se calcularon (Tabla 19), son similares a los reportados por Menelaou et al. (2009), Subramaniam (1988) y Xue et al (2017), lo cuáles se realizaron bajo condiciones experimentales (Menelaou et al., 2009; Peleka et al., 2006; Subramaniam & Hoggard, 1988; Xue, Dong, Ma, wang, & Zhu, 2017).

Los átomos de oxígeno del grupo fosfónico no interactuaron con el átomo de níquel debido a que durante la optimización este complejo no presenta estabilidad. La distancia más corta del oxígeno del grupo carboxilo indica una interacción más fuerte del glifosato con el compuesto [Ni(PhDP)₂].

Tabla 19. Distancias de enlace (Å) para los átomos de coordinación de la estructura optimizada [NiGlyp(PhDP)₂]. Los valores experimentales del fragmento [Ni(PhDP)₂] (a) y Ni(Glyp)₂ (b) de la literatura se proporcionan para comparación (Menelaou et al., 2009; Xue et al., 2017).

[NiGlyp(PhDP) ₂]		[Ni(PhDP) ₂] (a) and Ni(Glyp) ₂ (b)	
Enlace	Distancia (Å)	Enlace	Distancia (Å)
Ni-N(1)	1.93	Ni-N (a)	1.88
Ni-N(2)	1.93	Ni-N(b)	2.01
Ni-N(3)	1.94	Ni-O(b)	2.05
Ni-N(4)	1.90		
Ni-N(5)	2.08		
Ni-O	1.89		

12.3 ANEXO 3. Un método espectroscópico simple para determinar dimetoato en muestras de agua por formación complejo

A simple spectroscopic method to determine dimethoate in water samples by complex formation

Aline Romero-Natale¹, Georgette Rebollar-Pérez², Irmene Ortiz³, María Guadalupe Tenorio-Arvide¹, Ricardo Munguía-Pérez¹, Ilaria Palchetti⁴, Eduardo Torres^{1*}

¹ Posgrado en Ciencias Ambientales, ICUAP, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Edificio IC 6 Ciudad Universitaria, Col. San Manuel, 72570, Puebla, México; ² Facultad de Ingeniería Química, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, 18 Sur y Av. San Claudio, Col. San Manuel, 72579, Puebla, México; ³ Depto. Procesos y Tecnología. Universidad Autónoma Metropolitana-Cuajimalpa. Av. Vasco de Quiroga 4871, Col. Santa Fe. C.P. 05348, México City, Mexico; ⁴ Dipartimento di Chimica, Università Degli Studi di Firenze, Via della Lastruccia 3, Sesto Fiorentino (Fi), C.P. 50019 Firenze, Italia

Abstract

A simple and rapid method for the determination of dimethoate in water was developed based on the monitoring of the complex formation between Bis 5-phenyldipyrrinate of nickel (II) and the herbicide dimethoate. The method showed a short response time (10 s), high selectivity (very low interference from other sulfate and salts), high sensitivity (limit of detection (LOD) 0.45 μM , limit of quantitation (LOQ) of 1.39 μM), and a K_d of 2.4 μM . Stoichiometry experiments showed that complex formation occurred with a 1:1 relation. The method was applied to different environmental water samples such as lagoon, stream, urban, and groundwater samples. The results indicated that independently from the water source, the method exhibited high precision (0.25%–2.47% variation coefficient) and accuracy (84.42%–115.68% recovery). In addition, the method was also tested using an effluent from a

wastewater treatment plant from Mexico; however, the results indicated that the presence of organic matter had a pronounced effect on the detection.

*Address correspondence to Eduardo Torres, *Centro de Química, ICUAP, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, 14 Sur y Av. San Claudio, Col. San Manuel, Puebla 72570, México*; Phone: +52-222-2295500 ext. 7273; E-mail: eduardo.torres@correo.buap.mx

KEYWORDS: Dimethoate, detection assay, metal dipyrinate, organophosphorus pesticide

Introduction

Organophosphorus pesticides (OPs) are widely used in crop management and agricultural productivity due to their high efficiency and low cost to ensure harvest. ^[1,2] Although OPs show a higher degradability compared to other pesticides, ^[3] their widespread usage and improper handling practices mean that, they can migrate between environmental settings, causing serious environmental pollution and food safety issues. ^[4-6] Numerous negative health effects have been reported, as well as their acute toxicity effects, particularly in humans. ^[3,7-9]

Dimethoate (O,O-dimethyl S-(2-(methylamino)-2-oxoethyl) dithiophosphate) (Fig. 1a) is one of the most used OPs in the cultivation of vegetables and fruit trees, particularly olive trees. ^[1,10,11] It is widely used in the treatment of plant diseases and insect pests, which have made its application quite feasible in the food industry but at a very high health cost, because it can cause adverse effects to human health by bioaccumulation in the food chain. ^[12,13] The Electronic Code of Federal Regulations of the United States has published a list of Tolerances and Exemptions for Pesticide Chemical Residues in Food. ^[14] In the European Union, several countries set limits for dimethoate in water or food at 0.02 mg/kg or 87 nM. ^[2,15] However, information of maximum acceptable concentrations of dimethoate is still scarce.

According to the World Health Organization guidelines for drinking-water quality, dimethoate can be determined by gas-liquid chromatography, with a detection limit of 0.5 µg/L. ^[16] Liquid chromatography coupled to mass spectrometry or diode array detectors, as well as spectrophotometric methods, have been proved to be reliable for dimethoate detection in olive oil samples. ^[17]

Recently, several methods have been developed to determine dimethoate from aqueous solutions, i.e., colorimetric, ^[2,18–21] fluorescence, ^[22–25] electrochemical, ^[26–28] and Raman (SERS) assays, ^[10,29,30] with high sensitivity, reproducibility, and a short detection time, representing potential alternatives to traditional methods, which are expensive and require trained personnel. Nevertheless, alternative methods still have some drawbacks, such as complexity in the preparation of recognizing elements or in the sample pretreatment.

Previously, the bis 5-phenyldipyrinate of nickel (II) [Ni(PhDP)₂] compound was used for the detection of the herbicide glyphosate by a complex formation with specific spectroscopic properties in such a way that the presence of several organophosphorus pesticides or inorganic salts did not interfere. ^[31] In this work, we extend the application of the metal [Ni(PhDP)₂] for the detection of dimethoate in water samples. The resulting complex exhibited different spectroscopic properties compared to that glyphosate complex, which allowed for selective, fast, and sensitive detection of dimethoate.

Materials and method

Materials

Dimethoate, parathion, dichlofenthion, terbufos, silica gel, pyrrole, trifluoroacetic acid (TFA), benzaldehyde, triethylamine (Et₃N), and 2,3-Dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone (DDQ) were supplied from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Methylene chloride (CH₂Cl₂), chloroform (CHCl₃), hexane, and methanol (CH₃OH) were procured from Fermont (Monterrey, Mexico). Ethyl acetate was purchased to JT BAKER (Center Valley, USA). All the reagents used were of analytical grade (purity > 99%).

Instrumentation

Electronic absorbance spectra measurements were obtained using a Varian Cary 50 spectrophotometer equipped with a xenon lamp (Australia). To perform electronic spectra measurements, quartz cuvettes (1 cm path length) were used.

Synthesis of the [Ni(PhDP)₂]

The synthesis of the nickel compound was based on the work of Brückner.^[32] Briefly, the 5-phenyldipyrromethane with benzaldehyde (1 mmol), pyrrole (1 mmol), and trifluoroacetic acid were synthesized. Then DDQ (1 mmol) was added and stirred for 30 min at room temperature. After that Et₃N (0.5 mL) was added to the solution and stirred for another 30 min at room temperature. After the elimination of the solvent, the residue was dissolved in CH₂Cl₂, and the solution was filtered to remove precipitates. The solvent was removed, and the product was purified by short silica gel column chromatography using ethyl acetate as an eluent. The first eluted yellow fraction was evaporated to afford the crude product. Then, 2 mmol of 5-Phenyldipyrromethene and 1 mmol of nickel sulfate hexahydrate were dissolved in a mixture of CHCl₃ and CH₃OH. The solution was agitated and heated under reflux for 6 h, and then 0.5 mL of Et₃N was added and heated again under reflux for 4 h. The solution was evaporated in a rotary evaporator until a dark brown solid was obtained. The dried remainder was dissolved in CH₂Cl₂ and CH₃OH (1:1), leaving it to slowly evaporate until crystals were obtained.

Dimethoate detection

The formation of the complex between [Ni(PhDP)₂] and dimethoate was evidenced by the changes in the electron absorption spectrum of [Ni(PhDP)₂] (72 μM) after the addition of dimethoate (2 μM) in 1 mL of a solution of 99% CH₃OH and 1% water. This CH₃OH–H₂O mixture was necessary for the solubility of [Ni(PhDP)₂] compound, and also because allows the best interaction with dimethoate (data not shown).

A calibration curve was obtained registering the absorbance changes of the new band at 422 nm using 72 μM [Ni(PhDP)₂] and different dimethoate concentrations (0.4 to 2.6 μM).

Stoichiometry

The stoichiometry of the [NiDmt(PhDP)₂] complex was determined using the Job method of continuous variation.^[33] To this end, an equimolar stock solution was prepared and mixed so that the total concentration was kept constant (50 μM). The absorbance at 422 nm was measured as described above.

Dissociation constant

The dissociation constant (K_d) was determined by adjusting the absorbance changes at 422 nm to the following one-site binding model (Equation 1):

$$\Delta A = \Delta A_{\max} \times D_0 / (K_d + D_0) \quad (1)$$

where ΔA is the increase of percentage change upon addition of each dimethoate concentration, ΔA_{\max} is the maximum percentage of change (100%) when the $[\text{Ni}(\text{PhDP})_2]$ is saturated with dimethoate, and D_0 is the concentration of dimethoate. The reported values are the mean of three replicates. The data were fit to the Hill equation using an iteration procedure following the Marquardt–Levenberg nonlinear least-squares algorithm using Origin 8.0 software (Originlab Corporation, Northampton, MA, USA).

Dimethoate analysis in water samples

Five different water matrices were employed to assess the potential of the method: lagoon, stream, urban, groundwater, and treated wastewater. Each of them contained dimethoate added intentionally at different concentrations (0.44 – 2.62 μM). Treated wastewater was previously filtered to remove suspended solids. The five water samples were stored at 4°C until used, and were physicochemically characterized to determine pH, conductivity, temperature, Chemical Oxygen Demand (COD), and Biochemical Oxygen Demand (BOD); several anion and cation analyses were performed as well: Ca^{2+} , Fe^{2+} , SO_4^{2-} , Mg^{2+} , NO_3^{-} , $\text{NO}_3\text{-N}$, PO_4^{3-} , Ni^{2+} , and free chlorine. For the analysis, 999 μL of the $[\text{Ni}(\text{PhDP})_2]$ solution were mixed (72 μM in CH_3OH) with 1 μL of spiked water samples. After mixing, the dimethoate detection was carried out as described previously.

Method selectivity

To identify possible interfering factors, various salts were added at the maximum concentrations found in the environmental water samples: 112.2 μM of $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (16.5 mg/L), 3153.3 μM of NaNO_3 (268 mg/L), and 147.5 μM of $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (30 mg/L), as well as the phosphates salts $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, and $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ at a concentration of 397.28 μM (106.5 mg/L). Furthermore, other organophosphorus pesticides were tested with the same purpose (terbufos, parathion, glyphosate, and dichlofenthion) all of them at a concentration of 1.4 μM . The effect of the mixture of salts and pesticides was also evaluated. For these studies, the assay time was 10 s, and the

concentrations of dimethoate (concentration determined as limit of quantitation (LOQ)) and [Ni(PhDP)₂] used were 1.4 μM and 72 μM, respectively.

All the experiments were made in triplicate to assess the repeatability of the results. The statistical analysis of the data was done using Origin Software V 8.0. Results and discussion

Characterization of the [Ni(PhDP)₂] compound

The [Ni(PhDP)₂] compound was characterized by UV-Vis (λ nm: 330, 480), and by ¹H NMR spectroscopy based on the structural symmetry by signals for the aromatic protons. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ= 9.426 (s, 4, α-dipyrin), 7.500 (d, *J*=2.5 Hz, 6H, Ar-H), 7.483-7.331 (m, 8H, Ar-H, β-dipyrin), 6.741 (d, *J* = 3.5 Hz, 4H, β-dipyrin), as reported by Xue et al. [34]

Dimethoate detection

As previously reported, the electronic absorption spectrum of [Ni(PhDP)₂] showed a characteristic band at 480 nm, indicative of double-bond electron transition metals (Fig. 2, dashed line). [34] The absorbance of this band significantly decreased in the presence of dimethoate; in addition, a new signal at 422 nm was observed (Fig. 2, dotted line). The absorbance change at 480 nm, as well as the formation of the new peak at 422 nm, may be explained by the formation of a complex between both species. As previously reported, [Ni(PhDP)₂] interacts with nitrogen and oxygen atoms from glyphosate in a distorted octahedral molecular geometry, producing a stable chemical complex. The presence of an isosbestic point indicates that two chemical species are related linearly by stoichiometry. Indeed, Figure 3 shows that the absorbance at 422 nm followed an increasing linear behavior with the dimethoate concentration ranging from 0.43 to 6.54 μM. Equation 2 describes the relationship between the two variables.

$$\text{Absorbance} = 0.0401[\text{Dimethoate}] + 0.2872 \quad (2)$$

Using Equation 2, the calculated limit of detection (LOD) and the limit of quantitation (LOQ) were 0.45 μM and 1.39 μM, respectively. The European Union set the maximum permissible level of OPs at 0.5 μg/L (2x10⁻³ μM) in drinking water. [8] Meanwhile, the maximum allowable concentration of dimethoate in surface water is 0.03 mg/ L (0.1 μM), established by the World Health Organization. [35] Therefore, a pre concentration step would be necessary to apply this method in drinking and surface water samples, which is a very common step for pesticides analysis.

Nevertheless, the LOD and LOQ obtained in this work are in the same range with other values reported in the literature (Table 1). The method developed in this work presents the advantage of shorter response time without the need for the derivatization step or the addition of reaction precursors.

Stoichiometry of the [NiDmt(PhDP)₂] complex

As the observed isosbestic points remained stable after 15 min, which indicated that the stoichiometry of the complex remained unchanged and that no secondary changes occurred during the considered time range, the next step was the determination of stoichiometry using the Job plot. Figure 4a shows a triangular shape at the total concentration of 50 μM , which suggests a strong molecular interaction between the compounds. The maximum change was observed at the mole fraction of 0.45, which suggests that the molecular association occurred with stoichiometry of 1:1 or 1:2.^[33,36] In the case of glyphosate detection, the complex was formed with a 1:1 stoichiometry, where the nickel interacted with the nitrogen and oxygen atom of the glyphosate carboxyl group. The titration experimental data were fitted by nonlinear regression analysis to the one-site binding model to determine K_d , as shown in Figure 4b. The non-linear regression model fit the data very well, with a correlation coefficient higher than 0.98. In addition, the residual distribution, distributed randomly, indicated the model correctness (Fitting the data to two-site binding model resulted in a minor r^2 value and in a less random distribution of residuals). The calculated K_d value was 2.4 μM . According to Chenprakhon et al.^[37] and Pan et al.^[38], a micromolar K_d value indicates a high binding affinity of the ligand for its target. The K_d values obtained in this work were comparable with some studies that determined the K_d for pesticide detection (Table 2); however, the K_d value was still far from those reported for antibodies as recognizing elements in immunoassays. As previously reported, the K_d values using [Ni(PhDP)₂] for glyphosate detection were similar to the one obtained in this work, which suggests similar affinities for both pesticides.

Method selectivity

The potential applicability of the method was also evaluated by determining the interference caused by other components usually present in environmental water. In general, the experimental results showed that the presence of inorganic salts ($\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, and NaNO_3 with an interference between 0.5% and 1.5%) did not interfere significantly in the complexation of dimethoate with [Ni(PhDP)₂]. Additionally, different phosphate salts were tested ($(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4$ and

[Na₂HPO₄] \cdot 7 H₂O) with a negative effect between 1.2% and 8.9%. It is already known that the phosphate ion may form complexes with nickel and other metals,^[39–41] but in this case the phosphate salts did not show an interference greater than 10%. On the other hand, an interference of 16% was determined with (NH₄)₂SO₄, which means that the sulfate salts somehow affected the complex formation. The same set of experiments was carried out with other organophosphorus pesticides that are continuously used in agriculture, such as terbufos,^[42] parathion,^[43] glyphosate,^[44] and dichlofenthion,^[45] as well as their mixtures. The absorbance values of the [NiDim(PhDP)₂] complex in the presence of the organophosphorus pesticides did not show an effect greater than 10% and thus they were discarded as an interferent. As mentioned before, glyphosate did not influence the detection of dimethoate, because the absorbance changes were observed at different wavelengths. The mixture 1, composed of sulfate and phosphates salts, showed pronounced effects at 71%. On the contrary, the mixtures 2 and 3 did not show interference; thus, it follows that the sulfate had a negative role in the complex formation. All the assays suggested that for a good selectivity of the method, the sulfate ions should first be removed (Table 3).

Analysis of water in samples spiked with dimethoate

The physicochemical parameters of the five water matrices from different sources are shown in Table 4. As no dimethoate was detected in either of the analyzed samples using this method, the samples were spiked with dimethoate (0.44–2.62 μ M) and added to the [Ni(PhDP)₂] solution. The dimethoate concentrations in the samples were calculated using Equation 2. The percentages of recovery varies between 84.42% and 115.68% for groundwater, urban, lagoon, and stream water, which indicated good accuracy of the method for these samples. On the contrary, for the treated wastewater sample it showed a low accuracy, probably due to the presence of sulfate ions, which were shown to be the main interferents (Table 3). Additionally, a high precision was obtained, as reflected by the coefficients of variation (0.37%–3.30%), for all water samples (Table 5). For groundwater, urban, lagoon and stream water, it seems that the presence of several salts and metals at different concentrations did not affect the dimethoate detection, and the method may be applied for different water sources. It is important to note the proposed method may be used for screening purposes in different water samples; a pre-concentration step is necessary because environmental concentrations of pesticides are usually in the ng/ L level.^[46,47]

Conclusion

This work presented a spectrophotometric method for the determination of dimethoate in water samples by using $[\text{Ni}(\text{PhDP})_2]$ as the selective ligand. The stoichiometry of the complex formation was 1:1. With the optimized method, the LOD and the LOQ were calculated to be $0.45 \mu\text{M}$ and $1.39 \mu\text{M}$, respectively. The developed method assures repeatability, high sensitivity, and rapid determination (10 s) of dimethoate in complex matrices. The method was successfully applied to determine known concentrations of dimethoate ($0.44\text{--}2.62 \mu\text{M}$) in groundwater, urban water, lagoon, and stream water samples, with good precision and accuracy. The presence of inorganic and phosphate salts and other organophosphorus pesticides did not interfere with the dimethoate determination. For more complex samples, like residual treated water, both parameters were compromised.

Acknowledgment

This research project was funded by the Ph.D. Grant Number 494272 from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

References

- [1] Hsu, C.W.; Lin, Z.Y.; Chan, T.Y.; Chiu, T.C.; Hu, C.C. Oxidized multiwalled carbon nanotubes decorated with silver nanoparticles for fluorometric detection of dimethoate. *Food Chem.* **2017**, *224*, 353–358.
- [2] Chen, N.; Liu, H.; Zhang, Y.; Zhou, Z.; Fan, W.; Yu, G.; Shen, Z.; Wu, A. A colorimetric sensor based on citrate-stabilized AuNPs for rapid pesticide residue detection of terbuthylazine and dimethoate. *Sensors Actuators, B Chem.* **2018**, *255*, 3093–3101.
- [3] Pan, L.; Sun, J.; Li, Z.; Zhan, Y.; Xu, S.; Zhu, L. Organophosphate pesticide in agricultural soils from the Yangtze River Delta of China: concentration, distribution, and risk assessment. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2018**, *25*(1), 4–11.
- [4] Kim, K.H.; Kabir, E.; Jahan, S.A. Exposure to pesticides and the associated human health effects. *Sci. Total Environ.* **2017**, *575*, 525–535.
- [5] Mostafalou, S.; Abdollahi, M. Pesticides: an update of human exposure and toxicity. *Arch. Toxicol.* **2017**, *91*(2), 549–599.

- [6] Weber, R.; Bell, L.; Watson, A.; Petrlik, J.; Paun, M.C.; Vijgen, J. Assessment of pops contaminated sites and the need for stringent soil standards for food safety for the protection of human health. *Environ. Pollut.* **2019**, *249*(May), 703–715.
- [7] Kranawetvogl, A.; Siegert, M.; Eyer, F.; Thiermann, H.; John, H. Verification of organophosphorus pesticide poisoning: Detection of phosphorylated tyrosines and a cysteine-proline disulfide-adduct from human serum albumin after intoxication with dimethoate/omethoate. *Toxicol. Lett.* **2018**, *299*(June), 11–20.
- [8] European Food Safety Authority (EFSA) Anastassiadou, M.; Arena, M.; Auteri, D.; Barmaz, S.; Brancato, A.; Brocca, D.; Bura, L.; Carrasco Cabrera, L.; Chiusolo, A.; Civitella, C.; Court Marques, D.; Crivellente, F.; Ctverackova, L.; Lentdecker, C. De; Egsmose, M.; Fait, G.; Ferreira, L.; Greco, L.; Ippolito, A.; Istace, F.; Jarrah, S.; Kardassi, D.; Leuschner, R.; Lostia, A.; Lythgo, C.; Magrans, J.O.; Medina, P.; Mineo, D.; Miron, I.; Nave, S.; Molnar, T.; Padovani, L.; Parra Morte, J.M.; Pedersen, R.; Reich, H.; Sacchi, A.; Santos, M.; Serafimova, R.; Sharp, R.; Stanek, A.; Streissl, F.; Sturma, J.; Szentes, C.; Tarazona, J.; Terron, A.; Theobald, A.; Vagenende, B.; Dijk, J. Van; Villamar-Bouza, L. Peer review of the pesticide risk assessment for the active substance bromoxynil in light of negligible exposure data submitted. *EFSA J.* **2018**, *16*(12).
- [9] Nicolopoulou-Stamati, P.; Maipas, S.; Kotampasi, C.; Stamatis, P.; Hens, L. Chemical Pesticides and Human Health: The Urgent Need for a New Concept in Agriculture. *Front. Public Heal.* **2016**, *4*(July), 1–8.
- [10] Tognaccini, L.; Ricci, M.; Gellini, C.; Feis, A.; Smulevich, G.; Becucci, M. Surface Enhanced Raman Spectroscopy for In-Field Detection of Pesticides: A Test on Dimethoate Residues in Water and on Olive Leaves. *Molecules* **2019**, *24*(2), 292.
- [11] Su, Y.; Xiang, B.; Xu, J. Feasibility research on rapid detection of dimethoate in water by near-infrared spectroscopy. *Anal. Methods* **2012**, *4*(6), 1742–1746.
- [12] Hoffmann, U.; Papendorf, T. Organophosphate poisonings with parathion and dimethoate. *Intensive Care Med.* **2006**, *32*(3), 464–468.
- [13] Ndifreke, W.E.; Pasaoglulari Aydinlik, N. KOH modified *Thevetia peruviana* shell activated carbon for sorption of dimethoate from aqueous solution. *J. Environ. Sci. Heal. - Part B Pestic.*

Food Contam. Agric. Wastes **2019**, *54*(1), 1–13.

[14] Electronic Code of Federal Regulations, (e-CFR). 40 CFR § 180.204 - Dimethoate; tolerances for residues. <https://www.law.cornell.edu/cfr/text/40/180.204> (accessed Apr. 2019).

[15] European Commission. COMMISSION REGULATION (EU) 2017/1135 of 23 June 2017 amending Annexes II and III to Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council as regards maximum residue levels for dimethoate and omethoate in or on certain products. *Off. J. Eur. Union* **2017**, *L 164*(1135), 28–51.

[16] World Health Organization. Dimethoate in Drinking-water. Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality. *Guidelines for Drinking-water Quality*. . 2004.

[17] Hakme, E.; Lozano, A.; Ferrer, C.; Díaz-Galiano, F.J.; Fernández-Alba, A.R. Analysis of pesticide residues in olive oil and other vegetable oils. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **2018**, *100*, 167–179.

[18] Oujji, N. Ben; Bakas, I.; Istamboulié, G.; Ait-Ichou, I.; Ait-Addi, E.; Rouillon, R.; Noguer, T. A Simple Colorimetric Enzymatic-Assay, based on immobilization of acetylcholinesterase by adsorption, for sensitive detection of organophosphorus insecticides in olive oil. *Food Control* **2014**, *46*, 75–80.

[19] Rebollar-Pérez, G.; Lima-Zambrano, F.; Bairán, G.; Rodríguez-Enríquez, A.; Ornelas-Soto, N.; Méndez, E.; Torres, E. Colorimetric Assay for Detection of Organophosphorus Pesticides by Decrease of Standard Catalytic Activity of Chloroperoxidase. *Environ. Eng. Sci.* **2016**, *33*(12), 951–961.

[20] Menon, S.K.; Modi, N.R.; Pandya, A.; Lodha, A. Ultrasensitive and specific detection of dimethoate using a p-sulphonato-calix[4]resorcinarene functionalized silver nanoprobe in aqueous solution. *RSC Adv.* **2013**, *3*(27), 10623–10627.

[21] Bala, R.; Dhingra, S.; Kumar, M.; Bansal, K.; Mittal, S.; Sharma, R.K.; Wangoo, N. Detection of organophosphorus pesticide – Malathion in environmental samples using peptide and aptamer based nanoprobe. *Chem. Eng. J.* **2017**, *311*, 111–116.

- [22] Hung, S.H.; Lee, J.Y.; Hu, C.C.; Chiu, T.C. Gold-nanoparticle-based fluorescent “turn-on” sensor for selective and sensitive detection of dimethoate. *Food Chem.* **2018**, *260*(June 2017), 61–65.
- [23] Li, S.; Luo, J.; Yin, G.; Xu, Z.; Le, Y.; Wu, X.; Wu, N.; Zhang, Q. Selective determination of dimethoate via fluorescence resonance energy transfer between carbon dots and a dye-doped molecularly imprinted polymer. *Sensors Actuators, B Chem.* **2015**, *206*, 14–21.
- [24] Yuan, Y.; Jiang, J.; Liu, S.; Yang, J.; zhang, H.; Yan, J.; Hu, X. Fluorescent carbon dots for glyphosate determination based on fluorescence resonance energy transfer and logic gate operation. *Sensors Actuators, B Chem.* **2017**, *242*, 545–553.
- [25] Hu, T.; Xu, J.; Ye, Y.; Han, Y.; Li, X.; Wang, Z.; Sun, D.; Zhou, Y.; Ni, Z. Visual detection of mixed organophosphorous pesticide using QD-AChE aerogel based microfluidic arrays sensor. *Biosens. Bioelectron.* **2019**, *136*(April), 112–117.
- [26] Zhang, Y.; Fa, H. bao; He, B.; Hou, C. jun; Huo, D. qun; Xia, T. ci; Yin, W. Electrochemical biomimetic sensor based on oxime group-functionalized gold nanoparticles and nitrogen-doped graphene composites for highly selective and sensitive dimethoate determination. *J. Solid State Electrochem.* **2017**, *21*(7), 2117–2128.
- [27] Sgobbi, L.F.; Machado, S.A.S. Functionalized polyacrylamide as an acetylcholinesterase-inspired biomimetic device for electrochemical sensing of organophosphorus pesticides. *Biosens. Bioelectron.* **2018**, *100*, 290–297.
- [28] Jahromi, M.N.; Tayadon, F.; Bagheri, H. A new electrochemical sensor based on an Au-Pd/reduced graphene oxide nanocomposite for determination of Parathion. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **2019**, *00*(00), 1–17.
- [29] Tan, M.J.; Hong, Z.Y.; Chang, M.H.; Liu, C.C.; Cheng, H.F.; Loh, X.J.; Chen, C.H.; Liao, C.D.; Kong, K.V. Metal carbonyl-gold nanoparticle conjugates for highly sensitive SERS detection of organophosphorus pesticides. *Biosens. Bioelectron.* **2017**, *96*, 167–172.
- [30] Xu, Q.; Guo, X.; Xu, L.; Ying, Y.; Wu, Y.; Wen, Y.; Yang, H. Template-free synthesis of SERS-active gold nanopopcorn for rapid detection of chlorpyrifos residues. *Sensors Actuators, B*

Chem. **2017**, *241*, 1008–1013.

[31] Romero-Natale, A.; Palchetti, I.; Avelar, M.; González-vergara, E.; Garate-Morales, J.L.; Torres, E. Spectrophotometric Detection of Glyphosate in Water by Complex Formation between Bis 5-Phenyldipyrinate of Nickel (II) and Glyphosate. *Water* **2019**, *11*(719), 1–14.

[32] Brückner, C.; Karunaratne, V.; Rettig, S.J.; Dolphin, D. Synthesis of meso-phenyl-4,6-dipyrins, preparation of their Cu(II), Ni(II), and Zn(II) chelates, and structural characterization of bis[meso-phenyl-4,6-dipyrinato]Ni(II). *Can. J. Chem.* **1996**, *74*(11), 2182–2193.

[33] Renny, J.S.; Tomasevich, L.L.; Tallmadge, E.H.; Collum, D.B. Method of Continuous Variations: Applications of Job Plots to the Study of Molecular Associations in Organometallic Chemistry. **2013**, *52*(46), 11998–12013.

[34] Xue, Z.; Dong, Y.; Ma, J.; wang, Y.; Zhu, W. Synthesis, characterization and electrochemistry of dipyrinato nickel(II) complexes with different aromatic rings to meso-position. *Polyhedron* **2017**, *127*, 287–292.

[35] World Health Organization & International Programme on Chemical Safety. Dimethoate: health and safety guide. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/39127> .

[36] Hill, Z.D.; MacCarthy, P. Novel approach to Job's method: An undergraduate experiment. *J. Chem. Educ.* **1986**, *63*(2), 162.

[37] Chenprakhon, P.; Sucharitakul, J.; Panijpan, B.; Chaiyen, P. Measuring binding affinity of protein-ligand interaction using spectrophotometry: Binding of neutral red to riboflavin-binding protein. *J. Chem. Educ.* **2010**, *87*(8), 829–831.

[38] Pan, Y.; Sackmann, E.K.; Wypisniak, K.; Hornsby, M.; Datwani, S.S.; Herr, A.E. Determination of equilibrium dissociation constants for recombinant antibodies by high-throughput affinity electrophoresis. *Sci. Rep.* **2016**, *6*(November), 1–11.

[39] Menelaou, M.; Dakanali, M.; Raptopoulou, C.P.; Drouza, C.; Lalioti, N.; Salifoglou, A. PH-Specific synthetic chemistry, and spectroscopic, structural, electrochemical and magnetic susceptibility studies in binary Ni(II)-(carboxy)phosphonate systems. *Polyhedron* **2009**, *28*(15), 3331–3339.

- [40] Li, L.; Takahashi, N.; Kaneko, K.; Shimizu, T.; Takarada, T. A novel method for nickel recovery and phosphorus removal from spent electroless nickel-plating solution. *Sep. Purif. Technol.* **2015**, *147*, 237–244.
- [41] Yang, F.; Zhang, S.; Sun, Y.; Tsang, D.C.W.; Cheng, K.; Ok, Y.S. Assembling biochar with various layered double hydroxides for enhancement of phosphorus recovery. *J. Hazard. Mater.* **2019**, *365*(October 2018), 665–673.
- [42] Rämö, R.A.; Brink, P.J. van den; Ruepert, C.; Castillo, L.E.; Gunnarsson, J.S. Environmental risk assessment of pesticides in the River Madre de Dios, Costa Rica using PERPEST, SSD, and msPAF models. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2018**, *25*(14), 13254–13269.
- [43] Mondal, R.; Mukherjee, A.; Biswas, S.; Kole, R.K. GC-MS/MS determination and ecological risk assessment of pesticides in aquatic system: A case study in Hooghly River basin in West Bengal, India. *Chemosphere* **2018**, *206*, 217–230.
- [44] Fernandes, G.; Aparicio, V.C.; Bastos, M.C.; Gerónimo, E. De; Labanowski, J.; Prestes, O.D.; Zanella, R.; Santos, D.R. dos. Indiscriminate use of glyphosate impregnates river epilithic biofilms in southern Brazil. *Sci. Total Environ.* **2019**, *651*, 1377–1387.
- [45] Ccancapa, A.; Masiá, A.; Navarro-Ortega, A.; Picó, Y.; Barceló, D. Pesticides in the Ebro River basin: Occurrence and risk assessment. *Environ. Pollut.* **2016**, *211*, 414–424.
- [46] Rashidi Nodeh, H.; Wan Ibrahim, W.A.; Kamboh, M.A.; Sanagi, M.M. New magnetic graphene-based inorganic–organic sol-gel hybrid nanocomposite for simultaneous analysis of polar and non-polar organophosphorus pesticides from water samples using solid-phase extraction. *Chemosphere* **2017**, *166*, 21–30.
- [47] Sun, P.; Gao, Y.L.; Xu, C.; Lian, Y.F. Determination of six organophosphorus pesticides in water samples by three-dimensional graphene aerogel-based solid-phase extraction combined with gas chromatography/mass spectrometry. *RSC Adv.* **2018**, *8*(19), 10277–10283.
- [48] Tian, F.; Liu, W.; Fang, H.; An, M.; Duan, S. Determination of six organophosphorus pesticides in water by single-drop microextraction coupled with GC-NPD. *Chromatographia* **2014**, *77*(5–6), 487–492.

- [49] Vahid, B. Specific Fluorescence Probe for Direct Recognition of Dimethoate Using Molecularly Imprinting Polymer on ZnO Quantum Dots. *J. Fluoresc.* **2017**, 27(4), 1339–1347.
- [50] Kwon, Y.S.; Nguyen, V.T.; Park, J.G.; Gu, M.B. Detection of iprobenfos and edifenphos using a new multi-aptasensor. *Anal. Chim. Acta* **2015**, 868, 60–66.
- [51] Mazouz, Z.; Rahali, S.; Fourati, N.; Zerrouki, C.; Aloui, N.; Seydou, M.; Yaakoubi, N.; Chehimi, M.M.; Othmane, A.; Kalfat, R. Highly selective polypyrrole MIP-based gravimetric and electrochemical sensors for picomolar detection of glyphosate. *Sensors (Switzerland)* **2017**, 17(11), 1–15.
- [52] Jiao, S.; Liu, P.; Liu, Y.; Zou, R.; Zhao, Y.; Liu, Y.; Zhu, G.; Guo, Y. Binding properties of broad-specific monoclonal antibodies against three organophosphorus pesticides by a direct surface plasmon resonance immunosensor. *Anal. Bioanal. Chem.* **2018**, 410(28), 7263–7273.
- [53] Hong, K.L.; Sooter, L.J. In vitro selection of a single-stranded DNA molecular recognition element against the pesticide fipronil and sensitive detection in river water. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, 19(1).

FIGURE CAPTIONS

Figure 1. Chemical structure of (a) dimethoate and (b) $[\text{Ni}(\text{PhDP})_2]$

Figure 2. Electronic absorption spectrum of $[\text{Ni}(\text{PhDP})_2]$ compound (72 μM) in the absence (dashed line) and in the presence of dimethoate (2 μM) (dotted line). Reaction conditions: 99% CH_3OH -1% water, and dimethoate (2 μM) (line) dissolved in water

Figure 3. Calibration curve for the detection of dimethoate (0.43-6.54 μM) based on the interaction with the compound $[\text{Ni}(\text{PhDP})_2]$ (72 μM). Reaction conditions: 99% CH_3OH -1% water

Figure 4. (a) Job plot for the $[\text{NiDim}(\text{PhDP})_2]$ complex. With a total concentration of 50 μM . (b) Hyperbolic saturation curve with dissociation constant results of fitting at 36 μM of $[\text{Ni}(\text{PhDP})_2]$ in the presence of dimethoate (0.43 to 11 μM)

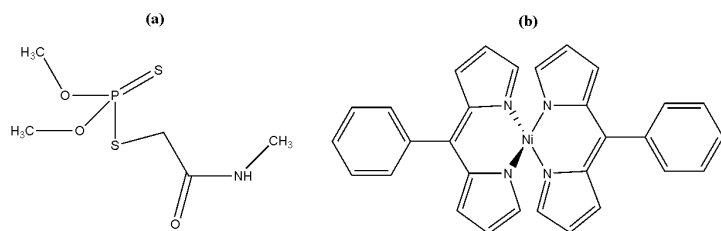


Fig. 1

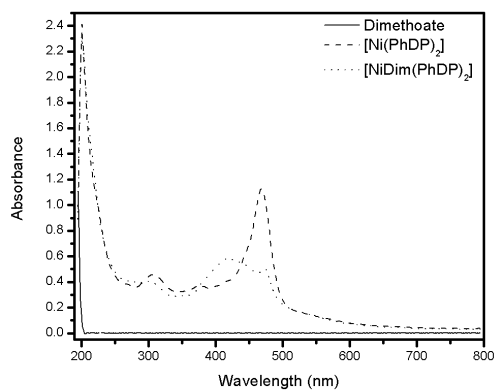


Fig. 2

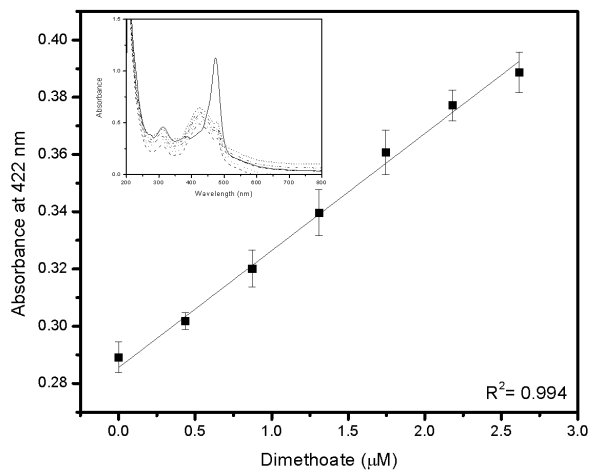


Fig. 3

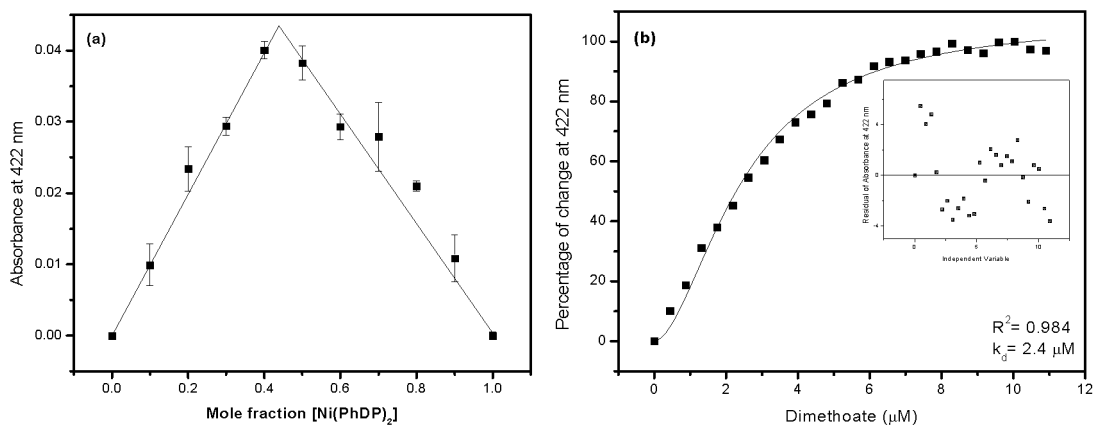


Fig. 4

Table 1. Comparison between other methods of determination of dimethoate in water with the one developed in this work.

Technique	LOD (μM)	Remarks
GC/MS ^[47]	1×10^{-3}	Sensitive and selective, but it needs pre-treatments like solid-phase extraction, sample optimization, expensive equipment and reagents, complex procedure, and long determination time (19 min)
GC- μECD ^[46]	1×10^{-4}	Effective, sensitive and selective but it needs complex synthesizing steps of the magnetic nanocomposite, pre-treatments, expensive equipment, complex procedure, pH control for the sample, and approximately 3 min for the determination
GC-NPD ^[48]	2×10^{-3}	Sensitive and selective but it needs expensive equipment, long determination time (14 min), microextraction treatment with a modified microsyringe, and high temperature control (up to 320°C)
Fluorescence ^[22]	0.01	Selective, sensitive, and rapid determination but it needs expensive reagents like gold-nanoparticle-based, several extraction and centrifugation are required

Fluorescence ^[49]	0.02	Sensitive, selective and rapid determination but it needs synthesizing steps of ZnO quantum dots based molecularly imprinting polymer, and long pre-treatments
Raman and SERS ^[10]	0.5	Sensitive, selective and rapid but it needs sample preparation, expensive equipment and expensive reagents (silver nanoparticles),
This study	0.4	Rapid (10 s), sensitive, effective, selective, and facile

Table 2. Comparison of the K_d between other pesticide detection methods with the developed method in this work

Study	Ligand	Pesticide: K_d (μM)
This study	[Ni(PhDP) ₂]	Dimethoate: 1.35
Romero-Natale et al ^[31]	[Ni(PhDP) ₂]	Glyphosate: 1.75 and 6.9
Kwon et al (2015) ^[50]	EIA2 aptamer,	Iprobenfos: 1.67 and
		Edifenphos: 0.038
Mazouz et al (2017) ^[51]	Polypyrrole	Glyphosate
		Electrochemical: 1.6
		Gravimetric: 0.3
Jiao et al (2018) ^[52]	Broad-specific monoclonal antibodies (mAbs)	Parathion: 1.4×10^{-3}
		Methyl-parathion: 4.2×10^{-3}
		Fenitrothion: 0.012
Hong & Sooter (2017) ^[53]	single-stranded DNA	Fipronil: 0.048

Table 3. Effects of the added salts, phosphates, sulfate, and organophosphorus pesticides on the method selectivity.

Absorbance at 422 nm		
Compounds	± Standard deviation	Interference (%)
[NiDmt(PhDP) ₂]	0.36 ± 0.001	0.00
Inorganic salts		
MgCl ₂ · 6 H ₂ O	0.37 ± 0.002	1.48
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0.36 ± 0.002	0.55
NaNO ₃	0.37 ± 0.012	1.53
Sulfate salt		
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.31 ± 0.009	16.15
Phosphate salts		
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0.36 ± 0.013	1.22
[Na ₂ HPO ₄] · 7 H ₂ O	0.34 ± 0.006	8.93
Organophosphorus pesticides		
Parathion	0.36 ± 0.010	0.70
Dichlofention	0.37 ± 0.003	0.95
Terbufos	0.37 ± 0.010	0.56
Glyphosate	0.36 ± 0.006	0.00
Mixtures*		
Mixture 1	0.10 ± 0.012	71.18
Mixture 2	0.33 ± 0.011	9.43
Mixture 3	0.37 ± 0.011	1.28

* Mixture 1: mixture of inorganic salts, sulfate salt, phosphates salts and organophosphorus pesticides; Mixture 2: mixture of inorganic salts, organophosphorus pesticides and phosphates salts and Mixture 3: mixture of parathion, dichlofention, terbufos and glyphosate.

Table 4. Physicochemical analysis of the different water matrices

Parameters	Water matrix				
	Lagoon	Stream	Urban	Groundwater	Treated Wastewater
pH	8.84	7.50	7.34	7.00	7.27
Specific conductance ($\mu\text{s cm}^{-1}$)	593.00	872.00	685.00	523.00	1423.00
COD (mg L ⁻¹)	0.60	16.50	6.00	2.00	0.85
BOD (mg L ⁻¹)	92.70	137.20	98.00	42.00	481.30

Ca ²⁺ (mg L ⁻¹)	103.50	10.00	0.00	115.00	0.00
Fe ²⁺ (µg L ⁻¹)	42.10	36.00	66.00	67.50	78.25
SO ₄ ²⁻ (mg L ⁻¹)	74.00	137.00	52.5	40.00	97.00
Mg ²⁺ (mg L ⁻¹)	15.00	20.00	30.00	30.00	15.00
NO ₃ -N (mg L ⁻¹)	6.35	8.20	17.83	18.35	60.45
NO ₃ ⁻ (mg L ⁻¹)	27.45	39.7	80.45	99.45	268.00
PO ₄ ³⁻ (mg L ⁻¹)	1.78	0.51	0.81	0.94	106.50
Ni ⁺² (mg L ⁻¹)	0.03	0.06	0.03	0.00	0.00
Free chlorine (mg L ⁻¹)	0.08	0.16	0.08	0.07	0.05

Table 5. Detection of dimethoate in spiked water samples*.

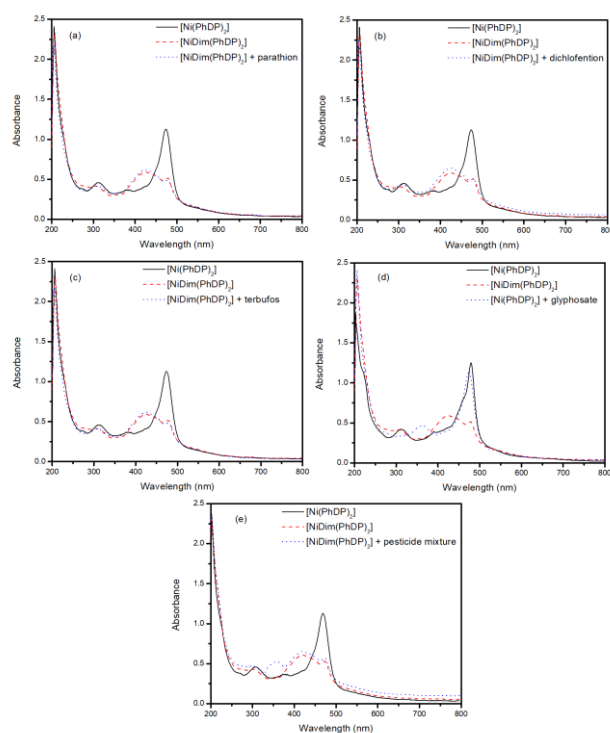
Water matrix	Dimethoate added (µM)	Dimethoate determined (µM)	Coefficient of variation (%)	Recovery (%)
Groundwater	0.44	0.50	1.77	115.30
	0.87	0.92	2.47	105.39
	1.31	1.42	1.83	108.82
	1.74	1.94	1.45	111.39
	2.18	2.42	1.50	110.80
	2.62	2.69	1.85	102.69
Urban	0.44	0.43	1.46	97.95
	0.87	0.82	0.37	93.57
	1.31	1.37	2.87	104.75
	1.74	1.78	1.76	102.24
	2.18	2.29	2.14	104.85
	2.62	2.56	1.71	97.76
Lagoon	0.44	0.39	1.30	88.81
	0.87	0.74	1.98	84.42
	1.31	1.31	2.62	100.31
	1.74	1.78	0.25	101.96
	2.18	2.19	1.44	100.55
	2.62	2.62	1.34	100.27
Stream				

	0.44	0.50	2.42	115.68
	0.87	0.90	1.50	103.58
	1.31	1.35	1.12	103.23
	1.74	1.87	1.32	107.44
	2.18	2.27	1.50	103.86
	2.62	2.54	1.39	97.16
Treated Wastewater	0.44	0.27	2.43	62.51
	0.87	0.57	2.85	64.89
	1.31	0.89	2.10	68.23
	1.74	1.33	3.30	76.42
	2.18	1.93	1.91	88.39
	2.62	2.35	2.32	89.63

*The results are the average of three water samples. Reaction conditions: 99% CH₃OH -1% water

SUPPORTING MATERIALS

Figure 1S. Electronic absorption spectrum of [Ni(PhDP)₂] and [NiDim(PhDP)₂] with (a) parathion, (b) dichlofention, (c) terbufos, (d) glyphosate, and (e) mixture of parathion, dichlofention, terbufos, and glyphosate. Reaction conditions: 99% CH₃OH -1% water



12.4 ANEXO 4. Guía de entrevista

BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



Doctorado en Ciencias Ambientales-ICUAP

Área: Tecnología Ambiental



“Desarrollo de un método para la detección y cuantificación del plaguicida glifosato y su aplicación en muestras de agua de San Simón Atzitzintla”

Datos generales (estadístico)

Nº de Encuesta: _____ Edad: _____ años Sexo: M F

Lugar de residencia:

San Simón Atzitzintla Otro _____

¿Cuánto tiempo lleva viviendo en la región? _____

¿Tiene una ocupación diferente a la de agricultor? Sí No

Ocupación (es) _____

¿Habla una lengua indígena? _____

Escolaridad: _____

Estado civil: Soltero Casado Divorciado Viudo

¿Cómo considera su estado de salud? _____

Fuma _____ Consume alcohol _____

¿Considera que tiene una alimentación balanceada? Sí No

Peso

a) Peso bajo

b) Peso normal

c) Sobrepeso

d) Obesidad

GUÍA DE ENTREVISTA SOBRE PLAGUICIDAS

• Aspectos sobre calidad de vida

1. ¿Cuánto tiempo lleva trabajando como agricultor?
2. ¿Por qué se dedica a trabajar en el campo?
3. ¿Tuvo otras opciones además de trabajar en el campo?
4. ¿Le gusta trabajar en el campo?
5. ¿Cuánto tiempo lleva viviendo en la región?
6. ¿Cuántas horas al día trabaja en el campo?
7. ¿Cuáles son sus principales gastos?
8. ¿Qué tipo y cuantos vehículos tiene? (**auto, moto, bicicleta, tractor, etc.**)
9. ¿Usted acostumbra salir de vacaciones?
10. ¿Cada cuándo acostumbra salir de vacaciones?
11. ¿Normalmente cómo se divierten, usted y su familia?
12. ¿Considera que tiene usted y su familia tienen una alimentación balanceada?
13. ¿En que gasta sus ahorros?
14. ¿Normalmente usted toma alguna capacitación o cursos en general?
15. ¿La casa que habita es propia o paga renta? (**¿cuánto paga de renta?**)
16. ¿Cuántas personas viven en su hogar?
17. ¿Cuántos hijos tiene?
18. ¿Sus hijos van a la escuela? **en caso de ser adultos** ¿Sus hijos fueron a la escuela?
19. ¿Hasta qué grado escolar?
20. ¿Quién(es) es el miembro de familia que tiene mayor grado académico?
21. ¿Número de años en la escuela del miembro de familia que tiene mayor grado académico?
22. ¿A parte de la casa donde habita, usted es dueño de otra casa?
23. En su hogar:
Tipo de techo y suelo:
Numero de cuartos:

Estufa de gas:

Internet:

Televisión de paga (cable):

Cuenta de ahorro:

Numero de baños:

Número de celulares de las personas que habitan en su hogar:

NOTA IMPORTANTE: Antes de pasar a la pregunta 24, es necesario primero entablar una conversación de confianza (Hacer comentario de que la información es confidencial y que será utilizada para términos estadísticos).

24. ¿Cuánto gasta aproximadamente en la quincena en los siguientes rubros?:

Vestido o ropa:

Transporte:

Gasolina:

Alimento:

Vivienda:

Educación:

Salud:

Teléfono:

Gas:

Luz:

25. ¿Compra sus alimentos o los cocina?

26. ¿Consume los alimentos que produce?

27. ¿Quién prepara los alimentos?

28. ¿Pertenece a algún programa o apoyo de política pública? (**CATÁLOGO DE PROGRAMA FEDERAL PARA MUNICIPIOS 2017 SEGOB INAFED) Posibles opciones SAGARPA, SEDESOL, PROSPERA, PROSOFT, FONDO NACIONAL (FNE), Programa de Apoyo al Empleo PAE).**

● **Dinámica Familiar**

29. ¿Quién toma las decisiones sobre cómo se distribuye el dinero dentro de la familia?

30. ¿En su familia quien tiene el mayor ingreso?

31. ¿Cómo se distribuyen las actividades de la casa y/o el cuidado de los hijos?

32. Quién se encarga de las decisiones sobre el cuidado de:

Salud:

Educación:

Valores:

Alimentación:

Iglesia:

Actitudes que son perjudiciales para la familia:

33. ¿Quién distribuye el salario o las ganancias dentro de la familia?
34. ¿Cómo se distribuye el tiempo del cuidado de los hijos? (Roles de género)
35. ¿Su familia participa durante todo el proceso de la producción? ¿Por qué?

● Aspectos Económicos

36. ¿Vende sus productos?
37. ¿Cuánto le pagan por sus productos?
38. ¿Quién le compra sus productos?
39. ¿Porque le vende sus productos a esa persona?
40. ¿Ha pensado en vender en otros lugares?
41. ¿Tiene un crédito para sostener su producción?
42. ¿Están aseguradas sus tierras o que ocurriría en caso de un desastre natural?
43. ¿Qué hace en caso de pérdida de sus cultivos?
44. ¿Sabe si existe un apoyo gubernamental en caso de pérdida de cultivos por un evento meteorológico?
45. ¿Ha recibido algún apoyo para la producción?
46. ¿Quién le ayuda a gestionarlo?
47. ¿Qué tanto estos apoyos influyen en su producción?
48. ¿Cada cuando recibe ingresos por sus cultivos?
49. ¿Cuánto invierte en herramienta para trabajar?
50. ¿Cuánto invierte en plaguicidas?
51. ¿Cuánto invierte en el glifosato?
52. ¿Aplicar glifosato le deja mayor ganancia?
53. ¿Qué ingresos reciben por la producción?
54. ¿Les paga un ingreso a sus familiares?
55. ¿Tiene usted empleados?
56. ¿Cómo se distribuyen los ingresos, en cuanto al salario?
57. ¿Les paga a lo mismo a los hombres que a las mujeres?
58. ¿Tiene otro ingreso, además de dedicarse a la agricultura?
59. ¿Tiene familiares en USA que lo apoyan económicamente?
60. ¿Qué hace con el dinero que le envían de USA?

● Aspectos sobre plagas y malezas (malas hierbas)

61. ¿La presencia de plagas ha significado un problema fuerte en sus cultivos?
62. ¿Cuáles son las plagas que afectan a los cultivos de la zona?
63. ¿Cuáles son las plagas más frecuentes en su cultivo?
64. ¿Cuáles son las malezas más frecuentes en sus cultivos?
65. ¿En qué cantidad son más frecuentes las malezas con respecto a otras plagas?
66. ¿Cada cuánto aplican el glifosato?

67. ¿Qué cantidades aplica de glifosato para sus cultivos?
68. ¿Quién le enseñó a identificar las malezas?
69. ¿Qué tanto pueden ser las malezas atacadas de forma natural?
70. ¿Qué hace en caso de resistencia de malezas?

● Aspectos sobre producción

71. ¿Qué es lo que cultiva?
72. ¿Cuál es el volumen de la producción?
73. ¿Cómo prepara sus tierras antes de cultivarlas?
74. ¿Siembra lo mismo todo el año? ¿Por qué?
75. ¿Qué plaguicidas utiliza en sus cultivos?
76. ¿Cuál es el herbicida más común que conoces?
77. ¿Usted utiliza el glifosato para sembrar?
78. ¿Por qué utiliza glifosato?
79. ¿Quién le beneficia los herbicidas?
80. ¿Ha recibido una capacitación para el uso de los plaguicidas?
81. ¿Pertenece a alguna asociación de agricultores? (**¿A cuál?**)
82. ¿Cómo se ha visto beneficiado por esta asociación(es)?
83. ¿Quién le proporciona las semillas que utiliza para sembrar?
84. ¿Quién le proporciona las herramientas y vehículos de trabajo?
85. ¿Quién le enseñó a trabajar en el campo también utilizan glifosato?
86. ¿Es más barato o caro producir con glifosato?
87. ¿Su producción aumentó o disminuyó con el uso del glifosato?
88. ¿Cada cuando aplican el glifosato?
89. ¿Cuánto tiempo lleva usando los plaguicidas?
90. ¿Cómo quedan mejor sus productos con o sin plaguicidas, incluyendo el glifosato?
91. ¿Cómo se informa sobre qué tipo de plaguicidas debe utilizar y como se lleva a cabo la producción del campo?
92. ¿A su forma de ver sus productos, piensa que tienen mejor aspecto usando glifosato?
93. ¿Qué características tienen sus productos rociados con glifosato en cuanto: altura, grosor, tamaño; sabor etc.?
94. ¿Qué les hace a sus productos?
95. ¿Usted consume los productos de sus cultivos?
96. ¿Alguna vez ha dejado de cultivar? ¿Por qué?

● Percepción de riesgo

97. ¿Ha recibido pláticas o cursos de capacitación para proteger sus cultivos de algún evento meteorológico? (**¿Quién lo impartió?**)
98. ¿Viven familias en los alrededores de los terrenos de cultivo? (**¿A qué distancia aproximadamente?**)
99. ¿Se encuentran escuelas cercanas en los terrenos de cultivo? (**¿A qué distancia aproximadamente?**)

100. ¿Se ha percatado de muertes de animales en la región causados por los plaguicidas?
101. ¿Considera que el uso de plaguicidas ha afectado al ganado? (**¿Qué síntomas han presentado?**)
102. ¿Considera que el uso de plaguicidas afecta a la vegetación alrededor de la zona de cultivo? ¿Por qué?
103. ¿En qué lugar almacena los plaguicidas? ¿Por qué los almacena ahí? (**en su hogar, almacén especial para plaguicida; etc.**)
104. ¿Utiliza los plaguicidas en su hogar? (**¿Por qué? ¿Qué plaguicidas?**)
105. ¿Cómo y/o en que transporta los plaguicidas hasta el sitio de aplicación?
106. ¿Conoce alguna legislación o ley en materia de plaguicidas? (**¿Cuál legislación? ¿Le ha servido de algo saber de esta?**)
107. ¿Quién y cómo lavan la ropa que utiliza para fumigar
- **Aspectos ambientales** *Datos INEGI: sobre pozos y flora y fauna de la región*

108. ¿Qué tipo de animales se pueden ver por la zona?

109. ¿Cuáles son los recursos naturales de su localidad más importantes? (**suelo, agua, aire, flora, fauna, etc.**)

110. ¿Considera que los recursos naturales se han deteriorado? ¿En qué grado?

111. ¿Cuál es la causa del deterioro?

112. ¿Se ha percatado de muertes de animales en la región causados por los plaguicidas?

113. ¿Considera que el uso de plaguicidas ha afectado a los animales?

114. ¿Considera que el uso de plaguicidas afecta a la vegetación alrededor de la zona de cultivo?

115. ¿De dónde proviene el agua que se utiliza para regar? Si viene de pozo ¿Cómo se llama?

116. ¿Paga una cuota por el agua que utiliza para regar sus cultivos?

117. ¿Cuánto paga?

118. ¿Se preocupa por la calidad del agua? ¿Por qué?

119. ¿Usted utiliza esta agua para otras actividades, como: bañarse beber, lavandería y cocina?

120. ¿Cada cuando tiene acceso al agua que utiliza para regar?

121. ¿Cada cuánto tiempo riega?

122. ¿Cómo considera la calidad del agua a su percepción?

123. ¿Cuenta con un sistema de captación de agua en su hogar?

124. ¿Qué características tiene el agua que utiliza para regar: color olor, sabor, etc.?

125. ¿Por qué utilizan esa agua para regar sus cultivos?

126. ¿Conoce si existen fuentes de agua cercanas de dónde cultiva? (**ríos, lagunas, pozos, manantiales; etc.**)

127. ¿Sabe que el glifosato se acumula en el suelo y en el agua?

128. ¿Considera que es importante conocer si hay y cuánto hay de glifosato en el agua? ¿Por qué?
129. ¿Estaría de acuerdo en la implementación de un dispositivo capaz de detectar glifosato en agua? ¿Por qué?
130. ¿Tienen una práctica para cuidar la calidad del suelo, para que no pierda sus propiedades?
131. ¿Ha observado un cambio de temperatura de un año a otro?
132. ¿Cuáles son los cambios en el clima o fenómenos meteorológicos que pueden interferir en su producción?
133. ¿Se ha visto afectado en sus ingresos debido a un fenómeno meteorológico? **(lluvias, granizo, heladas negras, tormentas eléctricas, calor y frío extremo)**
134. ¿Ha notado construcción de casas en tierras de cultivo? **¿Por qué considera que este ocurriendo la construcción de casas en zonas de cultivo?**
135. ¿Tiene usted la capacidad de tomar medidas de prevención para proteger a su familia y a sus cultivos de un evento meteorológico extremo como los anteriores? **(¿Cómo cuáles?)**
136. ¿Cómo se entera cuando va a ocurrir un fenómeno meteorológico extremo?
137. ¿En su localidad acostumbran realizar trabajos comunitarios para resolver problemas relacionados con fenómenos meteorológicos? **(¿Quiénes participan y que medidas toman?)**
138. ¿Usted o alguien de su familia ha tenido que emigrar en busca de trabajo, debido a la afectación de sus cultivos por un fenómeno meteorológico?

• **Condiciones de aplicación / seguridad en el trabajo.**

OBJETIVO DE ESTAS PREGUNTAS. La finalidad de estas preguntas es para conocer cómo los agricultores interactúan y en qué condiciones se encuentran expuestos regularmente a los plaguicidas durante la jornada de trabajo. Además de que estas preguntas nos pueden revelar o dar un indicio de la relación causal de la presencia de glifosato en el agua de la planta de tratamiento de aguas residuales.

139. ¿Qué actividades desarrollan los hombres y mujeres dentro de la jornada?
140. ¿Reciben apoyo de mano de obra de otra localidad? ¿Por cuánto tiempo y que temporadas?
141. ¿Tienen acceso a un servicio de salud los trabajadores?
142. ¿Cómo se protegen sus trabajadores en caso de algún accidente? **(seguro médico, acuden a un médico particular, médico de farmacias del ahorro o similares, huesero, homeópata u otros)**
143. ¿Qué método utiliza para aplicar los plaguicidas? **(espolvoreo, pistola pulverizadora manual, mochila pulverizadora, fumigación, aplicación directa en el suelo)**
144. ¿A qué hora del día aplica los plaguicidas? ¿Por qué?

145. ¿Cuántas veces a la semana aplica los plaguicidas?
146. ¿Quién o quienes aplican el plaguicida? ¿Por qué ellos?
147. ¿Cómo prepara el glifosato antes de aplicarlo?
148. ¿Qué medida de seguridad utiliza para la mezcla y/ o aplicación de plaguicida? (**guantes, mascarilla, lentes de seguridad, botas, overol, delantal, máscara de cobertura**)
149. ¿Quién le enseñó a tomar estas medidas de seguridad?
150. ¿Conoce la peligrosidad de los plaguicidas que aplica?
151. ¿Realiza lectura de etiquetas/ hojas de seguridad antes de aplicar el producto? ¿Por qué?
152. ¿Mezcla los plaguicidas?
153. ¿Con que mezcla los plaguicidas? ¿Obtiene mejores resultados al realizar estas mezclas? (**aditivos, fertilizantes, surfactantes, otros plaguicidas**)
154. ¿Qué hace con el plaguicida sobrante? (**guardarlos ¿Dónde?, tirarlos ¿Dónde?, llevarlos a un centro de acopio especial para plaguicidas ¿Por qué toma esa medida?**)
155. ¿Qué hace con los envases vacíos? (**guardarlos ¿Dónde?, tirarlos ¿Dónde?, llevarlos a un centro de acopio especial para plaguicidas ¿Dónde se encuentra el centro de acopio para plaguicida?, ¿Por qué toma esa medida?**)
156. ¿Qué hace con los plaguicidas caducos? (**guardarlos ¿Dónde?, tirarlos ¿Dónde?, llevarlos a un centro de acopio especial para plaguicidas, ¿Por qué toma esa medida?**)
157. ¿Ha aplicado alguna vez plaguicidas caducos en sus cultivos? (**¿Observó alguna diferencia o un cambio por haberlo aplicado? ¿Por qué lo realiza?**)
158. ¿Tienen una disposición especial los plaguicidas que utiliza?

- **Aspectos sobre salud** (*Se tomarán datos del Centro de salud o clínica de la localidad*)

159. ¿Cuáles son las enfermedades humanas, más comunes que usted ha observado en la comunidad, en su familia o incluso amigos y conocidos?
160. ¿Considera que su estado de salud, el de su familia o alguien que usted conozca se ha deteriorado por el uso de plaguicidas? (**¿El de quién? ¿De qué manera?**)
161. ¿Alguna vez ha tenido un accidente mientras aplicaba algún plaguicida?
162. ¿Qué parte de su cuerpo estuvo expuesto al plaguicida durante el accidente?
163. ¿Presento algún síntoma cuando tuvo el accidente con el plaguicida? (**¿Qué síntoma(s)?**)
164. ¿Recibió algún tratamiento después del accidente? (**¿Qué tratamiento? ¿Quién lo atendió y en donde fue atendido?**)
165. ¿Ha manifestado síntomas después de aplicar algún plaguicida? (**síntomas relacionados de acuerdo a intoxicaciones con glifosato: vómito, irritación mucosa, vías respiratorias, piel, diarrea, mareos, abortos espontáneos**)
166. ¿Con que plaguicida ha manifestado estos síntomas?

167. ¿Qué enfermedades presentan o han presentado usted y su familia?
(enfermedades que se le asocian con el glifosato: fallas renales, cardiacas, en el sistema nervioso, abortos espontáneos, defectos de nacimiento, autismo, Alzheimer, cáncer, depresión, malformaciones)
168. ¿Algún familiar suyo se ha visto afectado por el uso de plaguicidas?
(¿Cómo se han visto afectados?, ¿Cómo piensa o como ocurrió?, ¿Estado de salud actual? ¿Qué tratamiento recibió?)
169. ¿Conservan alguna tradición indígena en cuanto a su producción del campo?
170. ¿Utiliza las mismas herramientas, plaguicidas, procedimientos y tecnologías que usaba la persona que le enseñó a cultivar?
171. ¿Ha cambiado algunas herramientas, plaguicidas, procedimientos y tecnologías, desde que inicio a laborar en la agricultura? ¿Por qué?
172. ¿Utiliza los mismos plaguicidas que la persona que le enseñó a trabajar en la agricultura?
173. ¿Qué maquinaria y herramientas utiliza para todo el proceso de cultivo?
174. ¿Quién le proporciona esa maquinaria?
175. ¿Ha recibido una oferta para cambiar su maquinaria o los plaguicidas? **(¿Sí o no porque lo han tomado?)**