



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**

**INSTITUTO DE CIENCIAS**

**POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES**



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

# **DETECCIÓN ELECTROQUÍMICA DE GLIFOSATO EN GRANOS DE MAÍZ MEDIANTE LA MODIFICACIÓN DE ELECTRODOS DE GRAFITO EPOXI**

TESIS

Que para obtener el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS AMBIENTALES**

Presenta

**LAURA SELENE CAHUANTZI MUÑOZ**

Asesora de tesis:  
**Dra. Alia Méndez Albores**

Noviembre 2017





**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**

**INSTITUTO DE CIENCIAS**

**POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES**



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

# **DETECCIÓN ELECTROQUÍMICA DE GLIFOSATO EN GRANOS DE MAÍZ MEDIANTE LA MODIFICACIÓN DE ELECTRODOS DE GRAFITO EPOXI**

TESIS

Que para obtener el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS AMBIENTALES**

Presenta

**LAURA SELENE CAHUANTZI MUÑOZ**

Comité tutorial:

Asesora y Tutora	Dra. Alia Méndez Albores
Integrante Comité Tutorial	Dr. Manuel Huerta Lara
Integrante Comité Tutorial	Dra. María Teresa Zayas Pérez
Integrante Comité Tutorial	Dr. Miguel Ángel Valera Pérez
Integrante Comité Tutorial	Dr. Miguel Ángel Gonzalez Fuentes

Noviembre 2017





**C. LAURA SELENE CAHUANTZI MUÑOZ**

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

<i>Dr. Miguel Ángel González Fuentes</i>	<i>Presidente</i>
<i>Dr. Eduardo Torres Ramírez</i>	<i>Secretario</i>
<i>Dr. Felipe De Jesús González Bravo</i>	<i>1er. Vocal</i>
<i>Dra. Sonia Emilia Silva Gómez</i>	<i>2do. Vocal</i>
<i>Dra. Fabiola Avelino Flores</i>	<i>Suplente</i>

designado para la defensa de su tesis “*Detección electroquímica de glifosato en granos de maíz mediante la modificación de electrodos de grafito epoxy*” han manifestado mediante su voto que ésta cumple con los méritos suficientes para ser defendida como tesis de grado de Maestría en Ciencias Ambientales, por lo que este Posgrado le autoriza la impresión de la misma.

Sin otro asunto en lo particular, quedo de usted.

ATENTAMENTE

“PENSAR BIEN, PARA VIVIR MEJOR”

H. PUEBLA DE Z., NOVIEMBRE 22 DE 2017

**DR. RICARDO DARÍO PEÑA MORENO**  
SECRETARIO ACADÉMICO



RDPM/anma  
c.c.p. Archivo  
c.c.p. Minutario

Posgrado en Ciencias Ambientales  
Instituto de Ciencias (ICUAP)

Edificio IC6,  
Ciudad Universitaria,  
Col. San Manuel, Puebla, Pue. C.P. 72570  
01 (222) 229 55 00 Ext. 7056



Hago extensivo mi agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para realizar este trabajo de investigación.



## AGRADECIMIENTOS

La elaboración de esta tesis, no es solo producto del esfuerzo individual sino también del colectivo, por lo que estos párrafos servirán para expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a quienes me han apoyado a lo largo de este proceso.

En el plano institucional, agradezco a la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla institución que me abrió sus puertas y me permitió concluir mis estudios de maestría.

Al cuerpo docente del Posgrado en Ciencias Ambientales quienes con su experiencia y conocimientos me nutrieron durante los cursos del plan de estudios de maestría.

Se agradece el espacio brindado en el Laboratorio de Química Bioinorgánica, del Centro de Química del ICUAP, por permitirme realizar todos los experimentos para el trabajo de investigación.

Agradezco en especial a mi asesora de tesis, la Dra. Alia Méndez Albores quien sin su generosidad, atención, consejos y sobre todo motivación no hubiera sabido ponerle fin a este trabajo.

Especial reconocimiento merece el interés mostrado a mi trabajo de investigación al Dr. Eduardo Torres Ramírez, agradezco de corazón la paciencia y profesionalidad con la que me guio, ayudándome siempre con las peticiones que le hacía, facilitándome inmensamente el trabajo, gracias porque su participación a enriquecido el trabajo realizado.

Quiero expresar también mi agradecimiento al Dr. Miguel Ángel Gonzalez Fuentes por su disponibilidad, ayuda y buena voluntad así como por sus observaciones críticas en el transcurso del trabajo.

A mi comité tutorial y Jurado por su acompañamiento, colaboración y orientación para alcanzar mi objetivo.

Agradezco también los consejos, apoyo y ayuda de mis compañeros de laboratorio, gracias por hacer que los días fueran más gratos y llevaderos. Gracias Aline por estar en mis horas de frustración y también de alegría, gracias por tu amistad. A Gaby compañera de maestría y amiga de laboratorio fue muy grato conocerla y compartir contigo esta etapa de mi vida.

Gracias a todas las personas que de una manera u otra han sido claves para la culminación de este proyecto de investigación.



## DEDICATORIA

**A Dios** por su amor y bondad infinita, por bendecirme y permitirme llegar hasta este punto.

*El Señor es mi pastor, nada me falta. En verdes praderas me hace reposar, junto a aguas de reposo me conduce y conforta mi alma; me guía por los senderos de justicia, por amor a su nombre, aunque vaya por un valle tenebroso, no tengo miedo a nada, porque tú estás conmigo, tu voz y tu cayado me sostienen. (Salmos, 23)*

**A mi hermana Maritza** por tu apoyo, paciencia y ánimo porque todo lo que realizo es pensando en ser un buen ejemplo para ti, mis logros son para ti eres lo más importante en mi vida.

**A May** por tu cariño y amor, tus palabras de aliento y sobre todo porque siempre estás ahí para apoyarme y motivarme, eres una excelente persona, disfruto mucho recorrer juntos este viaje llamado vida.

**A mi abue Lore**, por eres el ejemplo perfecto de perseverancia e inspiración a ser mejor persona.

**A mis abuelos, tíos, mis padrinos y demás familia** porque este trabajo es gracias a ustedes que no dudaron ni un instante en apoyarme y ser mis ángeles terrenos.

**A mis amigas "Lu y Chela"** por su compañía, su apoyo y amistad incondicional, las quiero mucho.

**A la memoria de mi madre, ROSY**, que se le acabó la vida antes de verme en este proyecto. A ella se lo debo todo, porque me enseñó con su propia vida a ser optimista, a luchar por lo que uno desea y a tener siempre una sonrisa en mi rostro, yo no estaría aquí si no fuera por ti, siempre estarás en mi recuerdo, en mi corazón y en mi esencia.



## CONTENIDO

RESUMEN.....	1
ABSTRACT .....	3
I. INTRODUCCIÓN .....	4
II. JUSTIFICACIÓN .....	8
III. OBJETIVOS .....	10
3.1 Objetivo general .....	10
3.2 Objetivos específicos .....	10
IV. MARCO TEÓRICO .....	11
4.1.2 Cultivo del maíz.....	13
4.1.3 Historia de los herbicidas .....	13
4.1.4 Problemática ambiental asociada a glifosato.....	13
4.1.5 Glifosato .....	15
4.1.6 Persistencia del glifosato.....	17
4.1.7 Efectos en el ambiente por el uso de glifosato .....	17
4.1.7.1 Suelo .....	17
4.1.7.2 Agua .....	18
4.1.7.3 Aire .....	18
4.1.8 Efectos en la salud humana causados por la ingesta y exposición al glifosato .....	18
4.1.9 Residuos de glifosato en alimentos .....	20
4.1.10 Monitoreo de glifosato .....	20
4.1.11 Límites máximos residuales (LMR) de glifosato en maíz .....	21
4.1.12 Retos en la cuantificación del glifosato .....	21
4.1.13 Métodos analíticos para la determinación de glifosato en cereales .....	22
4.1.13.1 Métodos convencionales.....	22
4.1.13.2 Métodos alternos.....	22
V. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	1
VI. HIPOTESIS.....	1
6.1 Hipótesis general.....	1

CAPÍTULO 1.....	25
Detección de glifosato utilizando electrodos grafito-epoxi modificados con nanopartículas de plata (GE/Agnps).....	25
1.1 INTRODUCCIÓN .....	26
1.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	27
1.2.1 Elaboración de electrodos GE.....	27
1.2.2 Síntesis de nanopartículas de plata (Agnps) .....	27
1.2.3 Depósito de nanopartículas de plata sobre electrodo de GE (GE/Agnps) mediante electroforesis. ....	27
1.2.4 Caracterización voltamperométrica de los electrodos GE/ Agnps mediante voltametría cíclica.....	27
1.2.5 Detección de glifosato sobre electrodos de grafito epoxi y nanopartículas de plata (GE/Agnps).....	29
1.3. CONCLUSIONES.....	33
CAPÍTULO 2.....	34
Elaboración de biosensor para la detección de glifosato en grano de maíz utilizando electrodos GE/MWCNTs-HRP .....	34
2.1 INTRODUCCIÓN .....	35
2.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	36
2.2.1 Elaboración de electrodos GE.....	36
2.2.2 Elaboración de una suspensión acuosa de nanotubos de carbono .....	36
2.2.3 Estudio de la estabilidad de la suspensión acuosa de nanotubos de carbono .....	38
2.2.4 Depósito electroforético de los nanotubos de carbono sobre electrodos GE .....	40
2.2.5 Caracterización electroquímica de los electrodos GE/MWCNTs.....	40
2.2.6 Inmovilización de la enzima peroxidasa de rábano (HRP) sobre la superficie de electrodos GE/MWCNTs.....	42
2.2.7 Caracterización electroquímica de los electrodos GE/MWCNTs-HRP.....	42
2.2.8 Estabilidad de los electrodos GE/MWCNTs-HRP .....	44
2.2.9 Caracterización morfológica de los electrodos GE/MWCNTs-HRP.....	45
2.2.10 Detección de glifosato sobre electrodos de GE/MWCNTs-HRP .....	47
2.2.11 Análisis de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> sobre electrodos GE/MWCNTs-HRP.....	48

2.2.12 Determinación del glifosato utilizando electrodos GE/MWCNTs-HRP .....	50
2.2.13 Determinación de glifosato en muestras de maíz .....	53
2.3 CONCLUSIONES.....	55
ANEXOS.....	56
Anexo I. Elaboración de electrodos de grafito epoxi (GE) .....	56
I.II Caracterización por voltametría cíclica de los electrodos GE.....	57
Anexo II. Electroforesis .....	58
Anexo III Voltamperometría Cíclica (VC) .....	59
III.II Instrumentación Electroquímica y celda de trabajo .....	60
Anexo IV Amortiguador de amplio espectro pH 4.....	62
Anexo V. Turbidimetría.....	63
REFERENCIAS .....	64

## LISTADO DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Centro de origen de la domesticación y diversificación genética de plantas cultivadas Fuente: UNAM, 2009.....	12
<b>Figura 2.</b> Estructura química del glifosato (Elaboración propia, 2017) .....	16
<b>Figura 3.</b> VC de los electrodos a) GE, b) GE/AgNps en amortiguador de amplio espectro pH 4 a 100 mV.s <sup>-1</sup> comenzando el ciclado a potencial de circuito abierto (ocp). (Elaboración propia ,2017). ...	28
<b>Figura 4.</b> Complejo de la molécula de glifosato con Ag. (Elaboración propia, 2017) .....	29
<b>Figura 5.</b> Curva de especiación de la molécula de glifosato respecto al pH. ....	30
<b>Figura 6.</b> VCs obtenidos usando el electrodo GE/AgNps en amortiguador pH 4 a diferentes concentraciones de glifosato: 0, 1, 3, 6, 7, 9, 20, 40, 60, 90 μM (a-j), a 100 mV.s <sup>-1</sup> . (Elaboración propia, 2017) .....	31
<b>Figura 7.</b> Curvas analíticas de glifosato. Porcentaje de cambio relativo en I <sub>pa</sub> vs concentración de glifosato. (Elaboración propia, 2017) .....	32
<b>Figura 8.</b> Representación de un biosensor. (Elaboración propia, 2017).....	35
<b>Figura 9.</b> Representación esquemática de posibles interacciones entre MWCNTs y CTAB en solución (Elaboración propia, 2017).....	38
<b>Figura 10.</b> Perfil de transmitancia de la suspensión de MWCNTs en presencia de CTAB en función del tiempo (0-24 h) y altura de la muestra (0-53 mm). (Elaboración propia, 2017) .....	39
<b>Figura 11.</b> VCs de los electrodos a) GE, b) GE/MWCNTs tratado con EtOH/HCl, en amortiguador de amplio espectro pH 4 a 100 mV.s <sup>-1</sup> comenzando el ciclado a potencial de circuito abierto. (Elaboración propia, 2017) .....	40
<b>Figura 12.</b> VCs de los electrodos GE/MWCNTs antes (b) y después de la adsorción física de la enzima HRP (c), en amortiguador de amplio espectro a pH 4 a 100 mV.s <sup>-1</sup> . (Elaboración propia, 2017). ....	43
<b>Figura 13.</b> Efecto del ciclado de potencial en el electrodo GE/MWCNTs-HRP en amortiguador de amplio espectro a pH 4 a 100 mV.s <sup>-1</sup> . (Elaboración propia. 2017) .....	44
<b>Figura 14.</b> Imágenes AFM de a) electrodo GE/MWCNTs y b) GE/MWCNTs-HRP. (Elaboración propia, 2017) .....	46
<b>Figura 15.</b> Estructura química de la especie de glifosato (Elaboración propia, 2017).....	47
<b>Figura 16.</b> Respuesta de los electrodos GE-MWCNTs-HRP en presencia de diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno (0.12-120 mM) en una disolución de amortiguador de	

amplio espectro a pH 4. Inseto: Respuesta de los electrodos a concentraciones bajas de peróxido (1.2-12 mM), bajo las mismas condiciones. (Elaboración propia, 2017). .....	49
<b>Figura 17.</b> VCs a 100 mV.s <sup>-1</sup> sobre el electrodo GE/MWCNTs-HRP a diferentes concentraciones de glifosato: a) 0, b) 8000, c) 800, d) 80, e) 8, f) 0.8, g) 0.08 μM, en presencia de 12 mM de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en amortiguador de amplio espectro a pH 4. (Elaboración propia, 2017). .....	51
<b>Figura 18.</b> Curva analítica de glifosato, I% de inhibición vs Concentración. (Elaboración propia, 2017). .....	52
<b>Figura 19.</b> VCs a 100 mV.s <sup>-1</sup> de la adición de glifosato a) 0, b) 8000, c) 800, d) 80, e) 8, f) 0.8, g) 0.08 μM al sistema 12 mM de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en amortiguador de amplio espectro pH 4. (Elaboración propia, 2017). .....	54

## LISTADO DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Valores de LMR de glifosato en maíz (Elaboración propia, 2017) .....	21
<b>Tabla 2.</b> Resumen de trabajos realizados en la detección de glifosato (Elaboración propia 2017). 33	
<b>Tabla 3.</b> Valores de área geométrica (A <sub>ge</sub> ) y electroactiva (A <sub>e</sub> ) de los electrodos GE y GE/MWCNTs. (Elaboración propia, 2017) .....	41
<b>Tabla 4.</b> Resumen de trabajos realizados en la detección de glifosato (Elaboración propia, 2017). .....	53
<b>Tabla 5.</b> Comparación de los valores de I <sub>pc</sub> obtenidos a partir de la curva de calibración (muestras sintéticas) y muestras de maíz. (Elaboración propia, 2017).....	55

## LISTADO DE ANEXOS

<b>Anexo I I</b> Diagrama del proceso de elaboración de electrodos GE (Elaboración propia, con información de (Ramos, 2005). .....	56
<b>Anexo I II.</b> Voltamperograma de blanco de GE a potencial de circuito abierto de 0.1 V, dirección anódica, en amortiguador de amplio espectro pH 4. (Elaboración propia, 2017).....	57
<b>Anexo II.I</b> Sistema electroforético.....	58
<b>Anexo III.I</b> Perturbación en voltametría cíclica.....	59
<b>Anexo III.II</b> Voltamperograma cíclico.....	60

<b>Anexo III.II.I</b> Diseño de la celda electroquímica.....	60
<b>Anexo IV.I Tabla</b> Volumen de solución acida (“A”) y solución básica (“B”) para preparar amortiguador.....	62
<b>Anexo V.I</b> Sistema de Turbidimetría.....	63

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>Abreviación</b>	<b>Significado</b>
<b>FAOSTAT</b>	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, Dirección de Estadísticas
<b>EPA</b>	Agencia de Protección del Medioambiente
<b>COFEPRIS</b>	Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios
<b>FDA</b>	Administración de Drogas y Alimentos de Estados Unidos
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>CODEX alimentariux</b>	Establecido por la FAO y la OMS en 1963 para elaborar normas alimentarias internacionales
<b>FAO</b>	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
<b>CE</b>	Comisión Europea
<b>SENASICA</b>	Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria
<b>LMR</b>	Límite máximo residual (mg. Kg <sup>-1</sup> )
<b>LQ</b>	Límite de cuantificación
<b>LD</b>	Límite de detección
<b>GE</b>	Grafito-epoxi
<b>MWCNTs</b>	Nanotubos de carbono de paredes múltiples
<b>Agnps</b>	Nanopartículas de plata
<b>HRP</b>	Peroxidasa de rábano
<b>VC</b>	Voltamperometría cíclica
<b>Ocp</b>	Potencial a circuito abierto
<b>CTAB</b>	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
<b>SCE</b>	Electrodo de referencia de calomelanos
<b>AFM</b>	Microscopía de fuerza atómica
<b>r.m.s</b>	Rugosidad cuadrática promedio
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrógeno
<b>Gly</b>	Glifosato

## LISTA DE SÍMBOLOS

Símbolo	Significado	Valor	Unidades típicas
E	Potencial		V
$I_{pa}$	Corriente anódica del pico anódico		$\mu A$
$I_{pc}$	Corriente catódica del pico catódico		$\mu A$
$A_e$	Área electroactiva o área real		$cm^2$
$A_{ge}$	Área geométrica		$cm^2$
D	Coeficiente de difusión		$cm^2.s^{-1}$
V	Velocidad de barrido		$V.s^{-1}$
R	Constante de los gases ideales	8.314	$J.K^{-1}.mol^{-1}$
F	Constante de Faraday	96,480	$C.mol^{-1}$
N	Número de electrones		Ninguna
Q	Carga		C
$\rho$	Recubrimiento superficial		$mol.cm^{-2}$
%I	Porcentaje de inhibición		
$I_o$	Porcentaje de inhibición inicial		
$I_i$	Porcentaje de inhibición al tiempo de incubación i		
%I <sub>max</sub>	Porcentaje máximo de inhibición		
K <sub>OC</sub>	Coeficiente de Adsorción Carbono Orgánico		

## RESUMEN

La presente tesis tuvo como objetivo el desarrollo de un sensor electroquímico para la detección de residuos del herbicida glifosato (Gly) en granos de maíz desarrollando para ello nuevos elementos de reconocimiento y detección basados en electrodos compositos de grafito y resina epóxica (GE) modificados con materiales nanoestructurados. Se evaluaron dos sistemas; el primero consistió en un sensor químico basado en electrodos GE modificados con nanopartículas de plata (GE/AgNps); y el segundo se basó en un biosensor constituido por electrodos GE modificados con nanotubos de carbono (MWCNTs), en donde se incorporó a la enzima peroxidasa de rábano como elemento biológico de reconocimiento (GE/MWCNTs-HRP).

En el primer sistema, GE/AgNps, se construyó la curva de calibración monitoreando la señal electroquímica (amperométrica) del proceso de oxidación de las AgNps debido a la presencia de glifosato, la cual fue posible obtenerla en un rango ultrabajo de concentración, desde 1 a 90  $\mu\text{M}$  en estado acuoso. De la curva de calibración generada fue posible identificar dos regiones lineales, la primera en un rango de concentración de 1-9  $\mu\text{M}$  y la segunda de 20 a 90  $\mu\text{M}$ ; con límites de detección (LD) de 0.45  $\mu\text{M}$  y 21.8  $\mu\text{M}$  y límites de cuantificación (LQ) de 2.56  $\mu\text{M}$  y 40  $\mu\text{M}$  respectivamente. Ambos valores son indicativos de que el sistema desarrollado resulta altamente sensible, con potencial aplicación para la detección de glifosato en muestras ambientales, o de alimentos. No obstante, a pesar del amplio intervalo de detección y la sensibilidad alcanzada, el sistema presentó problemas de reproducibilidad que deben ser abordados con mayor detalle en estudios posteriores.

Por otra parte, el principio de cuantificación del biosensor GE/MWCNTs-HRP se basó en la inhibición de la actividad catalítica de la enzima incorporada sobre los electrodos GE/MWCNTs debido que el glifosato interfiere con el ciclo de oxidación de la enzima. El rango de concentraciones de glifosato evaluado fue de 0.08 a 8000

$\mu\text{M}$ , presentando un límite de detección de  $0.08 \mu\text{M}$  y un porcentaje de recuperación del 99% respecto a muestras reales de maíz.

**Palabras clave:** Sensor electroquímico, biosensor, maíz, grafito epoxi (GE), nanotubos de carbono, peroxidasa de rábano (HRP), glifosato

## **ABSTRACT**

The principal objective of this thesis was the development of an electrochemical sensor for the detection of residues of the herbicide glyphosate in corn grains through graphite composite electrodes and epoxy resin (GE) modified with nanostructured materials. Two systems were evaluated; the first one consisted of GE electrodes modified with silver nanoparticles (GE/AgnPs) and the second was based on the development of a biosensor constituted by the immobilization of horseradish peroxidase (HRP) enzyme over GE electrodes previously modified with carbon nanotubes (GE/MWCNTs-HRP).

On the GE/AgnPs electrodes, inhibition of the amperometric signal corresponding to the oxidation process of the AgnPs was monitored in function of the concentration of glyphosate, in the range of 1 – 90  $\mu\text{M}$ . From a graph of glyphosate concentration vs the relative change percentage (PCR) of the current associated to the silver oxidation process, it was possible to identify two linear ranges; the first one with a range of concentration of 1 - 9  $\mu\text{M}$  and the second of 20 - 90  $\mu\text{M}$ , with detection limits (LD) of 0.45  $\mu\text{M}$  and 21.8  $\mu\text{M}$  and quantification limits (LQ) of 2.56  $\mu\text{M}$  and 40  $\mu\text{M}$ , respectively. Despite the wide range of detection, the system presented problems of reproducibility with respect to the electrochemical characterization of immobilized silver nanoparticles.

The principle of quantification of the GE/MWCNTs-HRP biosensor was the inhibition of the redox activity of the HRP enzyme immobilized over the GE/MWCNTs electrodes, due to the presence of glyphosate at pH 4. The evaluated concentration range of glyphosate was from 0.08 to 8000  $\mu\text{M}$ , presenting a detection limit of 0.08  $\mu\text{M}$  and a recovery percentage of 99% based on real corn samples.

**Keywords:** Electrochemical sensor, biosensor, corn, epoxy graphite (GE), carbon nanotubes, horseradish peroxidase (HRP), glyphosate

## I. INTRODUCCIÓN

La importancia del maíz es indiscutible, tal es así que hoy en día es uno de los granos más producidos a nivel mundial. Estados Unidos de América es el primer productor con 357,267,000 toneladas métricas mientras que México ocupa el séptimo lugar con 25,500,000 toneladas métricas según datos del 2016 (CNPAMM, 2016). Así mismo, debido al crecimiento poblacional global, se estima que para el 2030 la cantidad de habitantes supere los 8,000 millones, por lo que será necesario incrementar 60 millones de toneladas a lo actualmente producido (L. Paliwal, 2001). En México el maíz es la base de la dieta de la población, se consume en una gran variedad de alimentos y su uso se extiende a la alimentación animal y es materia prima de diversos procesos industriales (Silva Castro, 2005). Hasta antes del siglo XX la forma de cultivar el maíz en México era considerada “ecológica” en donde la tierra era abonada naturalmente con los desechos que producían los animales, mientras que las hierbas eran arrancadas manualmente; a la fecha estas prácticas han disminuido casi en su totalidad entre los productores, haciéndose necesario la utilización de productos químicos para tales procesos y de esta forma garantizar la eficacia de producción (Renobales Scheifler, 2009).

Como consecuencia de lo anteriormente descrito, el uso de herbicidas ha ido en aumento. Según cifras registradas en la base de datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, Dirección de Estadísticas (FAOSTAT), hasta el 2014 se habían usado 115 millones de toneladas en el mundo, en tanto que en México la cifra alcanzó 26,392,684 toneladas (FAOSTAT, 2015).

El glifosato es el herbicida más utilizado en cultivos de maíz de América Latina y el mundo. Fue introducido en 1974 por la multinacional Monsanto, bajo el nombre de comercial Roundup®, WeatherMax, RoundupPowerMAX™, UltraMax, Full II, y a la fecha es el ingrediente activo de más de 750 herbicidas (Monsanto Co., 2008). Se aplica principalmente para el control de las malezas en diferentes periodos del crecimiento de la planta y como desecante foliar para apresurar la cosecha. Se estima que más del 70% del maíz que se consume en México se produce bajo las

prácticas del control químico, en donde el glifosato forma parte tanto en pre como en postcosecha, así como para desecante en el campo para acelerar las cosechas. Esto se traduce en una alta probabilidad de encontrar residuos de glifosato en el maíz y en sus alimentos derivados; por otra parte, se ha confirmado la presencia del herbicida en muestras biológicas humanas y animales, por lo que la ingesta de residuos de glifosato en maíz puede darse consumiendo sus productos derivados, o por la carne, leche o huevos de animales que fueron alimentados con el producto contaminado. De esta manera se compromete la inocuidad de los alimentos y en consecuencia la salud pública (Mesnage, Defarge, Spiroux de Vendômois, & Séralini, 2015).

Como residuo, este puede permanecer estable en los alimentos por un año o más, incluso si estos son cocinados, refrigerados, secados o procesados (Guyton et al., 2015).

Actualmente, existe un debate acerca de los efectos a la salud del ser humano provocados por el consumo residual del glifosato. Según la Agencia de Protección del Medioambiente (EPA), el riesgo dietético residual crónico es mínimo. No obstante, están las evidencias científicas que vinculan su consumo con el cáncer y con una serie de patologías, que incluyen abortos espontáneos, nacimientos con malformaciones, mutaciones genéticas, disrupción endócrina, autismo y obesidad (Marc, Bellé, Morales, Cormier, & Mulner-Lorillon, 2004; Mesnage et al., 2015).

Lo anterior hace necesario acciones a diferentes niveles para abatir el problema ambiental asociado a glifosato. Para determinar el tamaño del impacto ambiental del glifosato, es necesario monitorearlo en los diferentes compartimientos ambientales, entre ellos los alimentos como el maíz. Actualmente dentro de las técnicas más sensibles y selectivas reconocidas en el análisis residual de glifosato en alimentos se encuentran la cromatografía de gases (CG) y líquidos (CL) acoplado a espectrometría de masas en tándem (MS/MS) (Granby, Johannesen, & Vahl, 2003). Sin embargo, es un análisis que consume mucho tiempo, es costoso, requiere de un manejo especializado de la muestra y son recurrentes los falsos positivos o negativos (Juan, Picó, & Font, 2003).

Así, uno de los retos actuales de la química analítica ambiental es desarrollar técnicas y metodologías sensibles que representen alternativas funcionales para la cuantificación más simple de glifosato en matrices complejas como los alimentos. Lo anterior permitiría sentar las bases para los estudios de riesgo ambiental y de exposición humana debido a la presencia del glifosato en alimentos o en los compartimientos ambientales. Por su alta sensibilidad y fácil manejo, el método electroquímico es una de las alternativas más viables en la identificación de diversas especies químicas incluyendo plaguicidas, surfactantes y hormonas, ya sea de manera independiente o bien acoplado a otras técnicas (Bakker & Telting-Diaz, 2002; Brett & Oliveira-Brett, 2011; Kimmel, Leblanc, Meschievitz, & Cliffel, 2012). Respecto a la detección electroquímica del glifosato, poco se ha abordado al respecto, debido a que la molécula no presenta electroactividad en las ventanas de potencial de los electrodos hasta hoy conocidos. La literatura disponible para la detección electroquímica del glifosato en diversas matrices se centra principalmente en la detección indirecta de la molécula, considerando su afinidad por ciertos iones metálicos como el cobre (formación de complejos) (Sierra, Méndez, Sarria, & Cortés, 2008). Así mismo se ha explorado en la inhibición de la actividad catalítica de la enzima peroxidasa de rábano (HRP), inmovilizada sobre electrodos de oro, mediante la señal electroquímica de la enzima catalizada por el peróxido de hidrógeno (sustrato de la enzima), la cual es alterada por la formación de un complejo de inhibición reversible entre el glifosato y la enzima (Songa, Somerset, Waryo, Baker, & Iwuoha, 2009); o bien por la interferencia de la señal electroquímica de electrodos recubiertos de polímeros metálicos impresos mediante estampado molecular para reconocer al glifosato (Hao et al., 2011). No obstante, los anteriores sistemas presentan principalmente problemas de estabilidad y reproducibilidad, además de un limitado rango lineal que complica la detección del herbicida, sobre todo cuando este se encuentra presente en matrices tan complejas como los alimentos en donde los contenidos típicos de plaguicidas son menores a 0.1 ppm (EPA, 2010).

Por su parte, los electrodos o plataformas de grafito epoxi (GE) se han utilizado como elemento transductor en el desarrollo de sensores electroquímicos. Esto

debido a su gran robustez, buena conductividad electrónica, bajo costo y la facilidad con que este material se regenera y adopta diversas formas y tamaños (Brett & Oliveira-Brett, 2011; Calvo, Arenillas, Menéndez, González, & Viera, 2009). Así mismo, se ha demostrado que su modificación superficial con materiales nanoestructurados como los nanotubos de carbono o nanoestructuras de metales nobles como el oro y la plata mejoran considerablemente las propiedades físico-químicas del material, su capacidad catalítica, y permiten la inmovilización de elementos biológicos como las enzimas; influyendo significativamente en su respuesta para la detección de diversas sustancias (Yugang Sun, 2002).

Por tales motivos, en esta tesis se presenta el desarrollo de dos sistemas enfocados a la cuantificación electroquímica de glifosato en granos de maíz utilizando electrodos de grafito epoxi (GE) como plantillas. El primer sistema corresponde a la modificación de los electrodos GE con nanopartículas de plata GE/AgNPs y el segundo se basa en la construcción de un biosensor enzimático a base de peroxidasa de rábano picante (HRP, por sus siglas en inglés) utilizando electrodos de GE modificados con nanotubos de carbono. Ambos sistemas fueron evaluados mediante su desempeño en la detección electroquímica de glifosato en muestras sintéticas. Los resultados mostraron que es posible detectar residuos de glifosato en matrices complejas de alimentos a niveles ultrabajos de concentración, lo que permitiría eventualmente aplicarlos en programas de monitoreo o trazabilidad para la determinación de la inocuidad de los alimentos.

## II. JUSTIFICACIÓN

El maíz en México representa la fuente de alimentación de sus pobladores y en consecuencia es el cereal más importante del país. Actualmente, la eficiencia de su producción está directamente relacionada al uso de tecnología agropecuaria y de agroquímicos. Dentro de los agroquímicos mayormente utilizados tanto en cultivos convencionales como modificados se encuentra el glifosato, usado en el control de malezas y aplicado de manera intensiva en diferentes etapas de crecimiento de la planta (germinación y floración), y en algunos casos como desecante del grano en el campo (Mesnage et al., 2015). Estas prácticas inciden en la presencia de residuos de glifosato en los granos de maíz cosechados y que posteriormente serán destinados a la alimentación ya sea humana o animal (UNL, 2010). Hasta hace unos años el glifosato era considerado como amigable al medio ambiente y prácticamente inofensivo para la salud del ser humano. Sin embargo, resultados científicos recientes han demostrado lo contrario, relacionando el consumo crónico de residuos de glifosato con diversas patologías y condiciones entre las que destacan daño al hígado, riñones, cáncer y fallos al sistema endocrino (Mesnage et al., 2015).

Por otra parte, se ha demostrado que el glifosato puede permanecer aún en alimentos procesados como es el caso del trigo en donde se ha determinado su presencia en muestras de pan (PRiF, 2014). Lo anterior demanda que su presencia sea monitoreada continuamente para cuantificar el riesgo ambiental y/o la exposición humana.

El método más reconocido para la determinación de residuos de glifosato en la matriz de cereales (Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de Masas en Tándem, LC-MS/MS) depende de procesos eficientes de extracción, requiere de una gran cantidad de insumos, y representa el uso de equipos sofisticados con protocolos complejos que se traducen en tiempos prolongados para la obtención de resultados. De esta manera, resulta de suma importancia la generación y desarrollo de metodologías que permitan la detección rápida y sensible de este herbicida, con

el fin de agilizar los procesos de análisis y con ello incrementar sustancialmente los programas de inspección de la calidad e inocuidad del maíz en nuestro país con el fin de asegurar el consumo de productos seguros. De la misma manera, la técnica a desarrollar podría aplicarse a cualquier compartimiento ambiental, lo que permitiría conocer y cuantificar la distribución ambiental del herbicida, como un primer paso en el diagnóstico de la problemática ambiental generada por el uso intensivo en nuestro país, información que a la fecha es muy escasa.

### **III. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo general**

Desarrollar una metodología con alta sensibilidad y rápida para la detección electroquímica de glifosato en granos de maíz criollo mediante el método electroquímico utilizando electrodos de grafito epoxi (GE) modificados.

#### **3.2 Objetivos específicos**

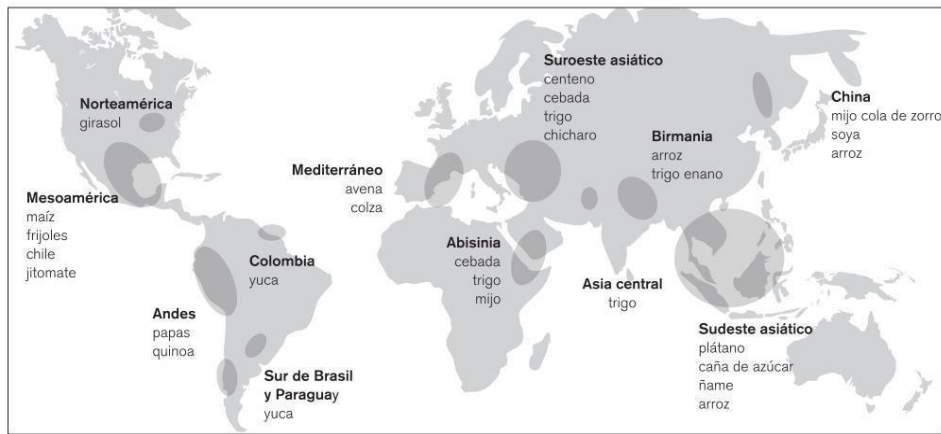
1. Obtención de una suspensión estable de nanotubos de carbono y nanopartículas de plata coloidal en medio acuoso, para la modificación de electrodos GE.
2. Construcción de electrodos GE/Aunps y GE/MWCNTs-HRP con altos valores de área electroactiva.
3. Desarrollo de sensores adecuados para cuantificar glifosato en granos de maíz.
4. Uso de maíz criollo como matriz representativa del impacto de glifosato en cereales.

## IV. MARCO TEÓRICO

### 4.1 El maíz

El maíz (*Zea mays*) es una gramínea que está constituida por cuatro estructuras principales: el pericarpio o cáscara, el germen o embrión, el endospermo y la piloriza. El pericarpio se caracteriza por un elevado contenido de fibra cruda, aproximadamente el 87% es hemicelulosa, celulosa y lignina, el resto son cenizas, proteínas, azúcares y almidón. Su función principal es proteger y contener a las demás estructuras. Por su parte el germen se caracteriza por el elevado contenido de grasas crudas (33%) y de proteínas (19%). El endospermo contiene un alto nivel de almidón (87%) y el resto son proteínas, fibra cruda, cenizas y carbohidratos; su función principal es proveer los nutrientes para la germinación de la semilla. La piloriza está compuesta principalmente de celulosa y hemicelulosa, es una estructura cónica que se une al carozo (olote). En resumen el grano de maíz es rico en almidón, proteínas, aceites, ácidos grasos, vitaminas y minerales (Benítez-Cardoza & Pfeiffer Perea, 2006).

El origen del maíz hasta la fecha se desconoce; sin embargo, rigurosos estudios han dado pie a diversas teorías, algunas de ellas aceptadas por la comunidad científica. Tal es el caso de aquella establecida por Nikolai Vavilov (1887-1943) quien exploró ocho regiones del mundo, en donde se originaron y distribuyeron 15 de las especies más importantes en la alimentación humana, entre las que se destacan el maíz, frijol, chile, jitomate y girasol (Figura 1). En su estudio Vavilov estableció que el origen específico del maíz ocurrió en lo que él denominó centro de origen VII, el cual abarca desde el centro-sur de México hasta la mitad del territorio de Centroamérica (UNAM, 2009).



**Figura 1.** Centro de origen de la domesticación y diversificación genética de plantas cultivadas

**Fuente:** UNAM, 2009.

Otra vertiente considera que el cereal proviene de una forma silvestre del maíz, llamado teocintle. Los teocintles son plantas silvestres que aún se encuentran en México. Estas son gramíneas que comparten una relación genética muy estrecha con el maíz. Algunos estudios han concluido que la especie más cercana al maíz es el *Zea Mays ssp parviglumis*, que según las últimas evidencias arqueológicas, tuvo su origen hace más de 8,700 años a.C. en la región de Iguala, de Guerrero, específicamente en la localidad de Tlaxmalac (Piperno, Ranere, Holst, Iriarte, & Dickau, 2009).

Sin embargo, la domesticación del grano de maíz no ocurrió hasta 3,000 años después de su origen en la cuenca del río Balsas ubicada entre los estados de Tlaxcala y Michoacán (Piperno & Flannery, 2001). La domesticación del maíz en México permitió no únicamente proporcionar alimento a la población, sino que rápidamente se convirtió en un símbolo religioso y de poder. Así mismo, a medida que la producción del maíz creció, fue necesario su almacenamiento; esto dio como resultado la capacidad de comercializar su exceso mediante el intercambio de productos (trueque), generándose con esto diferencias de estatus y de poder, lo que culminó con la formación de las clases sociales. Desde entonces el maíz es símbolo de alimentación y crecimiento social (Suárez, Morales, & Gálvez, 2013).

#### **4.1.2 Cultivo del maíz**

Actualmente la forma de cultivar el maíz en México se clasifica por temporal (secano) o por riego. En la primera, el crecimiento del cultivo depende del agua que aportan las lluvias, mientras que en la de riego, el agua se suministra a través de diversos métodos artificiales (Frenken & Gillet, 2012). En ambas, la metodología de cultivo es la misma y consiste en las siguientes etapas: a) preparación del terreno, ya sea con el uso de productos químicos o instrumentos agrícolas, b) siembra de los granos de maíz, c) deshierbe temprano del cultivo, d) aplicación de fertilizantes, e) control de malezas una vez madura la planta, f) secado natural o inducido de la mazorca en el campo, g) corte, desgrane y limpieza, y h) almacenamiento (Juan, 2006). Hoy en día la eficiencia de la producción del maíz y la mejora de la calidad de las cosechas, están directamente relacionadas con el control químico, el cual se realiza principalmente en el proceso de la preparación de terreno y el deshierbe, aplicando herbicidas para eliminar las hierbas no deseadas que afectan negativamente al cultivo (Silva Castro, 2005) .

#### **4.1.3 Historia de los herbicidas**

El control de las hierbas no deseadas ha existido desde tiempos remotos, tal es así que los romanos utilizaban rocas salinas como herbicida natural. A medida que la producción crecía los métodos naturales de deshierbe se hicieron insuficientes y fue necesario desarrollar otras metodologías. En 1945 se sintetizó el primer herbicida químico con el nombre de 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético); con ello prosiguió la síntesis de un sinnúmero de compuestos como las triazinas en 1954, las dinitroanilinas en 1965, los difeniléteres en 1970 y las sulfonilureas en 1980. Actualmente diversas empresas químicas distribuidas alrededor del mundo se ocupan de la síntesis de una gran variedad de herbicidas, siendo el glifosato el más producido y consumido (Malherbología, 2003).

#### **4.1.4 Problemática ambiental asociada a glifosato**

La primera Ley de Sanidad Fitopecuaria fue publicada en 1924, desarrollada para la correcta aplicación de plaguicidas para su control (Ley de Sanidad Fitopecuaria, 1974). Desde entonces, varios acuerdos han sido publicados con el propósito de

especificar de manera jurídica la regulación de los plaguicidas como insumos fitosanitarios (Ley federal de sanidad vegetal, 2011).

En México la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) considera la actualización de la farmacopea, los acuerdos y los catálogos de las sustancias tóxicas que son comercializadas en México, entre ellas los plaguicidas, así como, prevenir y/o controlar los efectos de dichas sustancias a la salud humana mediante la política Nacional de protección contra riesgos sanitarios. En este sentido, la COFEPRIS autoriza el uso de glifosato en áreas urbanas, jardinería, y cultivos agrícolas y lo clasifica como un herbicida de grado IV de toxicidad; ligeramente tóxico (COFEPRIS, 2009). Por otro lado, el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) estipula los Límites Máximos Permisibles (LMP) de residuos de plaguicidas en productos de origen vegetal, apoyado por la Dirección de Inocuidad Agroalimentaria, Operación Orgánica y Plaguicidas de Uso Agrícola (DIAOPA) así como con el Centro Nacional de Referencia de Plaguicidas y Contaminantes. En materia de sanidad, la Secretaría de Salud (2005), es la responsable de otorgar los permisos a los establecimientos que fabriquen, usen o comercialicen plaguicidas y otras sustancias peligrosas. Por otro lado, la NOM-232-SSA1-2009 y la NOM-045-SSA1-1993, describen los requisitos de embalaje y etiquetado de los plaguicidas. Finalmente, la Ley General de Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente junto con la Ley de Sanidad Fitopecuaria establecen las especificaciones en materia de salud ambiental; así como disposiciones jurídicas aspectos relacionados al uso de plaguicidas, enfatizando en políticas ambientales, protección al ambiente y contaminación del suelo y agua. Sin embargo, es importante mencionar que las mencionadas normas, disposiciones, acuerdos e instituciones no cuentan con enunciados o acciones específicas para el glifosato, el cual es considerado como un contaminante emergente.

A nivel internacional, la Agencia de Protección Ambiental (EPA) considera al glifosato como un agente probablemente carcinogénico para los seres humanos, de toxicidad clase II, toxicidad aguda dérmica y oral relativamente baja (los químicos de clase I, son los de mayor toxicidad en la escala de I a IV (IARC, 2015).

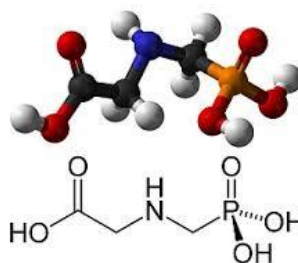
#### 4.1.5 Glifosato

El glifosato [N- (fosfometil) glicina] es un herbicida considerado no selectivo, de amplio espectro y con acción sistémica, esto es, se difunde y se traslada dentro de la planta ejerciendo su efecto lejos del punto en que fue aplicado. La sustancia activa ingresa a la planta a través de las hojas 12 horas después de que este fue aplicado, para después migrar a otras partes del tejido vegetal donde la sustancia es mínimamente metabolizada. El modo de acción del glifosato consiste en inhibir a la enzima 5-enolpiruvil shikimato 3-fosfato sintetasa (EPSPS) encargada de la producción de ciertos aminoácidos esenciales, dentro de los que se encuentran la fenilalanina, tirosina y triptófano, fundamentales para el crecimiento y sobrevivencia de la planta (UNL, 2010).

El glifosato es un ácido orgánico débil, en grado técnico es un polvo cristalino incoloro e inodoro y presenta un peso molecular de  $169 \text{ g.mol}^{-1}$ . Sin embargo, como ingrediente activo de las formulaciones comerciales se presenta en forma de sal principalmente combinado con la isopropilamina de amonio (glifosato de amonio isopropil (PANAP, 2009). Así mismo, las formulaciones de glifosato pueden contener, coadyuvantes y aditivos, con la intención de mejorar la eficacia del herbicida.

El glifosato es comercializado bajo los nombres de Aquamaster, Faena, Mamba, Sankill, Glyfos, Roundup y Ramrod en presentaciones de concentrado soluble, gránulo soluble, líquido soluble, polvo soluble, solución concentrada y solución acuosa (Monsanto Co., 2008). En México se cree que por cada 1,000 hectáreas de cultivo se utilizan 3,307 toneladas de plaguicidas, donde el glifosato es uno de los más consumidos, principalmente por estados como: Sinaloa, Jalisco, Nayarit, Colima, California, Tamaulipas, Chiapas, Veracruz, Michoacán, Tabasco, estado de México, Puebla y Oaxaca, aplicándolo en el proceso de la preparación de terreno el deshierbe y como desecante foliar (Guevara, 2016).

La estructura química del glifosato está constituida por tres grupos funcionales, el grupo amina ( $\text{NR}_2$ ), el grupo carboxilo ( $-\text{COOH}$ ) y el grupo fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) (Figura 2).



**Figura 2.** Estructura química del glifosato (Elaboración propia, 2017)

Debido a la presencia de los tres grupos funcionales mencionados, el glifosato es capaz de unirse fácilmente a iones metálicos especialmente iones de metales de transición ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$ ), resultando en la formación de complejos bidentados y tridentados (Metal-Glifosato) (Coutinho, 2007).

En el suelo un proceso para la adsorción del glifosato es mediante la formación de complejos de coordinación con iones de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  principalmente, el herbicida es adsorbido y rápidamente fijado por el suelo, la materia orgánica, la arcilla, el sedimento o la arena contenidos en el suelo, generalmente cuando una sustancia tiene alta adsorción posee reducida movilidad, como el glifosato con un valor de Koc (Coeficiente de Adsorción Carbono Orgánico) de  $21,700 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  que lo clasifica como un herbicida con movilidad inmóvil y adsorción fuerte (Alfaro-Portuguez, 2013). A pesar de poseer alta afinidad a ser retenido por las partículas del suelo, existen la posibilidad de desorción y lixiviación por efecto de la lluvia o el riego, por lo que el glifosato no unido está disponible para la absorción de raíces, el metabolismo microbiano y la filtración a las aguas subterráneas lo que representa un riesgo ambiental (UNL, 2010).

Por otra parte la movilidad en agua es alta debido a que el glifosato es altamente soluble en agua ( $10.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  a  $20^\circ\text{C}$ ), resistente a la hidrólisis y, aunque se descompone por fotólisis y degradación microbiana, puede persistir durante algún tiempo en el medio acuático, diversos estudios científicos han demostrado la presencia de residuos de glifosato en aguas superficiales, aguas subterráneas y sedimentos marinos (PANAP, 2009) lo que representa un peligro para organismos que ingieren cantidades significativas de suelo durante su alimentación normal, incluyendo peces, aves que se alimentan en las playas de los ríos, anfibios y algunos mamíferos que ingieren agua contaminada (CONICET, 2009).

#### **4.1.6 Persistencia del glifosato**

Respecto a su persistencia en el ambiente, el tiempo requerido para que el herbicida se reduzca a la mitad de la concentración inicial ( $TD_{50}$ ), está directamente relacionada con el tipo de matriz ambiental e influenciada por diversos factores tales como composición, condiciones climáticas, actividad microbiana, así como la manipulación agrícola. Como ejemplo, la persistencia en el suelo es de 20 a 60 días, en el agua es de entre 3 a 70 días, mientras que, en los alimentos, los residuos son estables hasta por un año en tejido vegetal y dos años en tejido animal (UNL, 2010).

#### **4.1.7 Efectos en el ambiente por el uso de glifosato**

##### **4.1.7.1 Suelo**

El uso a largo plazo de glifosato podría tener efectos directos e indirectos en la química del suelo, alterando la dinámica de la comunidad microbiana, la concentración de nutrientes e incrementando la vulnerabilidad de las plantas hacia enfermedades (desequilibrio ecológico) (PANAP, 2009). Aunque tales efectos dependen de una serie de factores, incluyendo el tipo de suelo, las condiciones ambientales y las interacciones entre especies (Lupwayi, Harker, Clayton, O'Donovan, & Blackshaw, 2009), se encuentra reportado que la presencia de este herbicida en esta matriz afecta la población de lombrices de tierra provocando una disminución en la tasa de crecimiento y alteración en su comportamiento (huida); modificando con esto la buena salud del suelo (Casabé et al., 2007).

De igual modo el uso de glifosato en cultivos agrícolas afecta las concentraciones de potasio, hierro, fósforo, nitratos y sulfatos, nutrientes que las plantas necesitan para desarrollarse (Obour, Stahlman, & Holman, 2016). Un estudio vincula su uso con la baja población de hongos saprófitos, organismos beneficiosos que descomponen el material vegetal muerto y son importantes para la fertilidad del suelo (Groosbard, 1985).

Debido a que el glifosato no es selectivo, es capaz de migrar a otras plantas tal como lo demostró el estudio realizado por Yamada y Col., quienes reportaron la absorción del herbicida por árboles cítricos (T. Yamada, Kremer, de Camargo, Castro, & Wood, 2009). De manera semejante otro estudio reveló que las plantas de girasoles disminuyeron su crecimiento cuando se encontraban próximas a

cultivos que fueron tratados con glifosato (Teshamariam, Bott, Cakmak, Römheld, & Neumann, 2009).

#### **4.1.7.2 Agua**

Respecto al daño en la biota acuática, estudios demuestran el efecto negativo del glifosato. Así por ejemplo, la presencia del herbicida en cuerpos de agua provoca eutrofización favoreciendo el crecimiento de cianobacterias como las cianotoxinas que provocan la muerte de fauna acuática (Vera et al., 2010). Otro estudio reportó el daño a peces expuestos a glifosato los cuales sufrieron alteraciones en branquias, hígado, riñones, piel y cerebro, así también malformaciones, todo ello provocó una elevada mortalidad en las poblaciones de peces (Kelly, Poulin, Tompkins, & Townsend, 2010). También existe evidencia científica respecto al daño en anfibios como las ranas, cuyo estudio se evaluó después de 24 horas de exposición a dosis moderadas del herbicida ( $6 \text{ mg.L}^{-1}$ ), donde la población de ranas presentó malformaciones externas en los ojos, bucales, craneofaciales y además efectos sobre el esqueleto hiobranquial (Lajmanovich, Sandoval, & Peltzer, 2003).

#### **4.1.7.3 Aire**

La presencia de glifosato en aire se encuentra poco documentada debido principalmente a su baja volatilidad, aunque la forma de aplicación por aspersión puede llevar a la formación de aerosoles que pueden mantenerse por mayor tiempo en el aire, y pueden migrar a otras localidades. Un estudio realizado en tres localidades pertenecientes a Alberta, Canada, reveló la presencia del herbicida en aire en concentraciones ultrabajas de  $172 \text{ ng.m}^3$ , producto de su empleo durante la fumigación en cultivos de canola (Dave Humphries, Gary Byrtus, 2005).

Otra investigación realizada en Bélgica en 2001 monitoreó diversos plaguicidas, donde el glifosato fue uno de los herbicidas más frecuentemente detectados en el agua de lluvia en concentraciones de hasta  $620 \text{ ng.m}^3$  (Quaghebeur, De Smet, De Wulf, & Steurbaut, 2004).

#### **4.1.8 Efectos en la salud humana causados por la ingesta y exposición al glifosato**

En 2012 se estimó que de las 12.6 millones de muertes en todo el mundo, el 23% de ellas son atribuibles al medio ambiente. Se calcula que una cuarta parte de todas

las muertes podría prevenirse si se eliminan los riesgos ambientales por exposición a contaminantes químicos (A Prüss-Ustün, J Wolf, C Corvalán, 2016).

Respecto a los daños a la salud por el uso y consumo de residuos de glifosato se sabe que la exposición ocupacional del herbicida provoca irritación, hinchazón, hormigueo, ardor y erupciones cutáneas, así como hinchazón en los ojos, lesión de la córnea y visión borrosa, además de malestar oral como; sabor desagradable, hormigueo, irritación y dolor de garganta; dificultad para respirar, tos, inflamación de los pulmones; náuseas, vómitos, dolor de cabeza, fiebre y diarrea (IPCS, 1994; Sally M. Bradberry, Alex T. Proudfoot, 2004).

En un estudio realizado en los Estados Unidos a una comunidad agrícola, el 60% de los agricultores que habían aplicado y/o mezclado el herbicida tenían niveles detectables de glifosato en la orina ( $3- 233 \mu\text{g.L}^{-1}$ ), además, el 4% de los cónyuges que no participaron en la mezcla ni en la aplicación, también presentaron niveles detectables en la orina (máx.  $3 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) (Acquavella et al., 2004). Así mismo el riesgo a la exposición del herbicida en la población femenina en etapa reproductiva se ha asociado a abortos espontáneos y fertilidad reducida (David A. Savitz, Tye Arbuckle, Diane Kaczor, 1997). Además, el uso de glifosato por mujeres en los tres meses previos a la concepción se asoció con un mayor riesgo de abortos tardíos; sin embargo, el riesgo fue 3 veces mayor para mujeres mayores ( $> 34$  años) que para las mujeres más jóvenes (Arbuckle, Lin, & Mery, 2001).

Respecto a la toxicidad hepática por uso de glifosato, se ha demostrado que el herbicida y sus formulaciones comerciales pueden causar estrés oxidativo, debido al aumento de fosfatasa alcalina (AP) o aspartato aminotransferasa (ASAT) y alanina aminotransferasa (ALT) indicadores de daño hepático (J. Yamada et al., 2006). Otro estudio vinculó la frecuencia de la enfermedad renal crónica entre los agricultores con el uso del glifosato (Jayasumana et al., 2015).

Respecto a estudios que relacionan efectos a la salud de animales por la ingesta de residuos del glifosato, se encuentra el realizado con peces, los cuales presentaron una fuerte inhibición en la enzima acetilcolinesterasa del cerebro cuando se les administró  $1 \text{ mg.kg}^{-1}$  del herbicida durante 90 días; la inhibición de esta enzima se encuentra relacionada con la enfermedad de Alzheimer (Salbego et al., 2010).

Por lo que refiere a la carcinogenicidad del glifosato, existe un reporte que vincula el consumo del herbicida con el linfoma no Hodgkin (LNH) o cáncer que comienza en las células linfocitos (Schinasi & Leon, 2014), así como daño al ADN en varias especies tales como ratas, ranas, *Carassius auratus*, bovinos, drosophila, caimanes, anguilas y seres humanos (Çavaş & Könen, 2007; Clements, Ralph, & Petras, 1997; Gasnier et al., 2009; Guilherme, Gaivão, Santos, & Pacheco, 2010; Kaya, Creus, Yanikoğlu, Cabré, & Marcos, 2000; Lioi et al., 1998; Peluso, Munnia, Bolognesi, & Parodi, 1998; Poletta, Larriera, Kleinsorge, & Mudry, 2009).

Así mismo, se encuentra reportado que el consumo de maíz modificado genéticamente para tolerar al Roundup administrando en dosis de  $400 \text{ mg.kg}^{-1} - 2.25 \text{ g.L}^{-1}$  en ratas durante 2 años, provoca deficiencias renales crónicas muy significativas, las ratas hembras mostraron un aumento en la mortalidad de dos a tres veces y desarrollaron grandes tumores mamarios (Séralini et al., 2014).

#### **4.1.9 Residuos de glifosato en alimentos**

La presencia de residuos del herbicida glifosato, pone en riesgo la inocuidad de los alimentos. Debido a que el glifosato es un compuesto sistémico que ingresa fácilmente por el follaje y se distribuye en toda la planta, es posible hallar en las partes comestibles de vegetales, cereales y frutas, trazas del herbicida, el cual no es eliminado fácilmente con procesos tales como horneado, lavado y pelado. La presencia de glifosato en alimentos procesados y sin procesar, ha sido expuesta en una serie de reportes oficiales y extraoficiales. Respecto a su presencia en productos agrícolas, destacan las matrices de soya, trigo y maíz; mientras que para los alimentos procesados se encuentran una gran variedad de cereales para el desayuno, botanas, galletas y pan (Project, 2016).

#### **4.1.10 Monitoreo de glifosato**

Actualmente el monitoreo de residuos de glifosato en alimentos no es considerado como un monitoreo regular o prioritario. No obstante, a partir del 2009 la Comisión de Regulación Europea (EC), ha establecido un programa multianual (cada tres años) de cuantificación de residuos de plaguicidas para productos destinados al consumo humano. El programa incluye el monitoreo obligatorio de glifosato en cereales como avena, trigo y arroz y es voluntario para los demás tipos como el

maíz y el sorgo (PRiF, 2017). Por otra parte, en febrero del 2016, la Administración de Drogas y Alimentos de Estados Unidos (FDA) autorizó el primer monitoreo de este herbicida en su programa anual, el cual incluyó a los granos de maíz. No obstante, por la poca sensibilidad que presentaron las técnicas utilizadas, no se logró el establecimiento de una metodología y el monitoreo se suspendió sin fecha de reinicio.

#### 4.1.11 Límites máximos residuales (LMR) de glifosato en maíz

Según el CODEX alimentariux, una de las principales instancias internacionales quien trabaja en conjunto con la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la agricultura (FAO), el límite máximo residual (LMR) de glifosato en granos de maíz es de 5 mg.Kg<sup>-1</sup>, mientras que la Comisión Europea (CE) establece una concentración de 1.0 mg.Kg<sup>-1</sup>. Respecto a la EPA el LMR de glifosato en granos de maíz, es de 5 mg.Kg<sup>-1</sup>. En el marco regulatorio mexicano la COFEPRIS establece tolerancia máxima de 0.1 mg.Kg<sup>-1</sup> para la misma muestra. En la tabla 1 se muestra el índice de LMR en maíz de glifosato (CODEX alimentariux, 2011; COFEPRIS, 2009; EC, 2005; EPA, 2010).

**Tabla 1.** Valores de LMR de glifosato en maíz (Elaboración propia, 2017)

ORGANISMO	CONCENTRACIÓN DE GLIFOSATO EN MAÍZ
CODEX alimentariux	5 mg.Kg <sup>-1</sup>
Comisión europea (CE)	1.0 mg.Kg <sup>-1</sup>
Agencia de Protección Ambiental (EPA)	5 mg.Kg <sup>-1</sup>
Comisión federal para la protección contra riesgos sanitarios (COFEPRIS)	0.1 mg.Kg <sup>-1</sup>

#### 4.1.12 Retos en la cuantificación del glifosato

Debido a que el glifosato se considera un aminoácido sintético, uno de los mayores obstáculos para su cuantificación residual en muestras biológicas como los cereales es su enmascaramiento con otros aminoácidos y proteínas propios del alimento, propiciando la cuantificación de contenidos falsos del herbicida. Por otra parte, su naturaleza switteriónica la hace ser una molécula con elevada solubilidad en agua e insoluble en la mayoría de solventes orgánicos. Por tal motivo su extracción en alimentos es realizada mediante agua/cloroformo generalmente a pH ácido (Tadeo, Sánchez, Pérez, & Fernández, 2000). Aunado a esto, el glifosato no contiene grupos cromóforos o fluoróforos en su estructura molecular, por lo que su cuantificación

mediante técnicas espectrofotométricas comunes (absorción UV-VIS y fluorescencia) necesita ser complementada por procesos tales como derivatización o formación de complejos.

#### **4.1.13 Métodos analíticos para la determinación de glifosato en cereales**

##### **4.1.13.1 Métodos convencionales**

Publicaciones acerca del análisis de glifosato en muestras de alimentos, incluyendo cereales, son limitadas. Los reportes disponibles incluyen mayoritariamente el uso de cromatografía de gases (GC) y de líquidos (CL) para el proceso de separación presentando o no procesos de derivatización precolumna (Juan et al., 2003). Para la cuantificación de glifosato la técnica más empleada corresponde a Espectrometría de Masas Tándem (MS/MS) sin y con procesos de derivatización post-columna (Granby et al., 2003). Las mejoras en la combinación de los métodos antes mencionados de separación y detección, incluyen la obtención de recuperaciones aparentes de glifosato elevadas, aproximadamente del 97% y límite de cuantificación (LQ) de  $0.00011 \mu\text{M}$  (Gosciny, Unterluggauer, Aldrian, Hanot, & Masselter, 2012).

Sin embargo, los costos por análisis son elevados, por lo general se presenta poca reproducibilidad en los tiempos de retención, las columnas que se utilizan presentan corta vida útil y se presentan efectos de matriz en el límite de detección para muestras reales.

##### **4.1.13.2 Métodos alternos**

La detección de glifosato en muestras de cereales ha sido abordada mediante otras tecnologías que incluyen el uso de puntos cuánticos fluorescentes de carbono (QDs) sintetizados por un proceso de pirolisis asistido por microondas utilizando lana (biomasa) como precursor. El principio de cuantificación se basó en la recuperación de la fluorescencia que experimentan los puntos cuánticos en presencia de nanopartículas de plata cuando el glifosato está presente. La intensidad de la fluorescencia del sistema CDs/AgNps fue proporcional a la concentración del glifosato en un rango de  $0.00014 - 0.0147 \mu\text{M}$ , con un límite de detección (LD) de  $0.00007 \mu\text{M}$ , y fue evaluado en la cuantificación de glifosato en muestras de cereales artificialmente contaminadas (arroz, trigo y sorgo) (Wang et al., 2016). Sin

embargo, el rango de cuantificación que presenta el anterior sistema corresponde a concentraciones muy por arriba de lo comúnmente encontrado en muestras de cereales (EPA, 2010), lo que complica su cuantificación en muestras reales.

Así mismo, Everlyne A. Songa y Col., desarrollaron un biosensor basado en la inhibición amperométrica de la actividad de la enzima peroxidasa de rábano picante en contacto con su substrato  $H_2O_2$ , que se produce cuando el glifosato se encuentra presente en solución. El estudio presenta un rango lineal de detección de 0.00147 a 0.082  $\mu M$  con un límite de detección de 0.01  $\mu M$ . No obstante, el rango de cuantificación es estrecho y presenta la desventaja de la complejidad de emplear un mediador (PDMA-PSS) (Songa, et al., 2009).

Por lo anteriormente expuesto, puede concluirse que la problemática ambiental asociada a glifosato representa un fenómeno complejo dada las diferentes esferas políticas, culturales, tecnológicas, y sociales que interactúan y contribuyen a acrecentar la complejidad. Para contribuir a su solución y comprensión en México, diferentes acciones deberán implementarse para determinar el tamaño del problema, sus principales fuentes, así como los sumideros, el impacto en la salud y la biodiversidad. Un primer paso importante es la implementación de su trazabilidad en el ambiente, y las matrices de alimentos para conocer su perfil espacio temporal, su persistencia y efectos en el ambiente. Por lo anterior, lo pertinente y relevante de este trabajo consiste en el desarrollo de un método de detección novedoso, sensible, rápido y exacto para la detección de residuos de glifosato en granos de maíz, como un primer acercamiento al desarrollo de un dispositivo confiable de detección. El presente trabajo se centra en el desarrollo de materiales a partir de nanomateriales (nanotubos de carbono y nanopartículas de plata) para incrementar el nivel de detección de glifosato hasta ahora reportado en la literatura científica.

## **V. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Cómo afecta al electrodo grafito-epoxi (GE) la modificación con nanomateriales (nanotubos de carbono, nanopartículas de plata) la cuantificación residual de glifosato en matrices de alimentos como el maíz?

## **VI. HIPOTESIS**

### **6.1 Hipótesis general**

La modificación de electrodos de grafito con materiales nanoestructurados y la enzima peroxidasa afines a la molécula de glifosato permitirá una detección electroquímica sensible del herbicida en muestras de maíz.

La pertinencia de esta hipótesis se fundamenta en la afinidad entre los grupos funcionales del glifosato hacia la plata y la capacidad para formar complejos con sus iones. Así mismo, la biocompatibilidad que presentan los nanotubos de carbono permitirá el desarrollo de un biosensor enzimático que conjugue la especificidad del elemento biológico (enzima) con las características únicas del material carbonáceo como lo son su elevada estabilidad química y física.

## **CAPÍTULO 1.**

**Detección de glifosato utilizando electrodos grafito-epoxi modificados con nanopartículas de plata (GE/Agnps)**



## 1.1 INTRODUCCIÓN

Un sensor químico, es un transductor que detecta y responde a algún tipo de señal proveniente de su medioambiente físico. Se clasifican y nombran de acuerdo a la propiedad que detectan; de tal manera que si el transductor responde a cambios específicos en el potencial o en la corriente eléctrica como consecuencia de la presencia de una especie química que interactúa con él, se trata de un sensor electroquímico (Bakker, Diaz, 2002). Los sensores electroquímicos han sido ampliamente desarrollados debido a su bajo costo, posibilidad de miniaturización y remarcable sensibilidad y especificidad al analito que puede ser obtenida. Tal sensibilidad está directamente relacionada al desempeño del transductor o electrodo utilizado (Kimmel et al., 2012). Para esto, se ha utilizado una gran variedad de materiales electródicos (oro, plata, platino y materiales carbonáceos), con el fin de incrementar la selectividad de los sistemas. De la misma manera, el empleo de nanopartículas metálicas como elementos de modificación ha sido abordado ampliamente (Chien-Jung Huang, Pin-Hsiang Chiu, Yeong-Her Wang, Kan-Lin Chen, 2006; Fang Wang, 2009; Luo, Morrin, Killard, & Smyth, 2006). Dentro de estas, las nanopartículas de plata (AgNPs) se encuentran entre las más utilizadas debido a que su producción resulta económicamente más viable en comparación con otros metales como el oro; además de esto, posee excelente velocidad de transferencia electrónica, y disminuye considerablemente el sobrepotencial de agentes oxidantes o reductores (Jinjie Yin, Xiang Qi, Liwen Yang, Guolin Hao, Jun Li, 2011; Kang Cui, Yonghai Song, Yong Yao, Zhenzhong Huang, 2008; Xiaoyan Li, Yuanxiang Liu, Lichun Zheng, Mingjun Dong, Zhonghua Xue, Xiaoquan Lu, 2013) lo que puede resultar conveniente en la detección de analitos de interés ambiental. A continuación, se muestran los resultados de la elaboración de electrodos GE modificados con nanopartículas de plata (GE/AgNPs) enfocado a la detección de glifosato en medio acuoso.

## **1.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **1.2.1 Elaboración de electrodos GE**

La elaboración de los electrodos GE y su caracterización electroquímica antes de su modificación con las Agnps fue realizada siguiendo la metodología previamente establecida en el laboratorio (Ramos, 2005), la cual se describe en el anexo I

### **1.2.2 Síntesis de nanopartículas de plata (Agnps)**

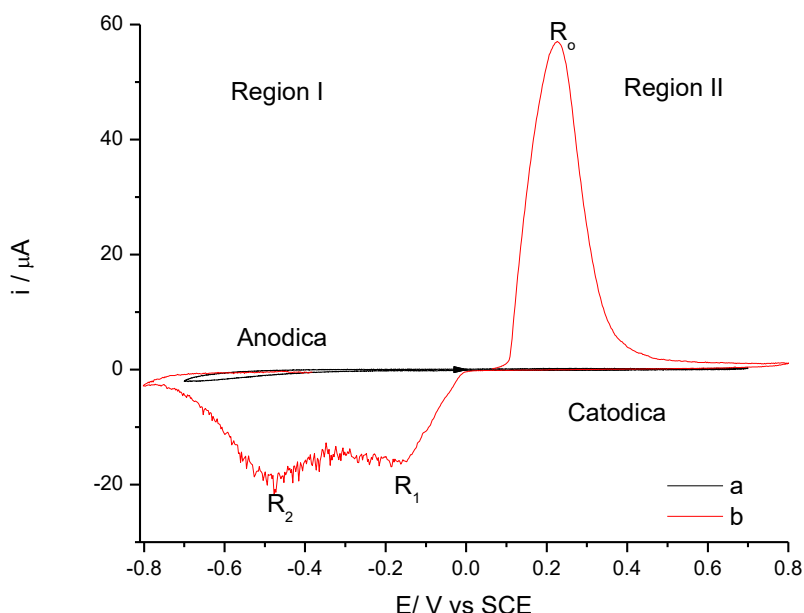
Las nanopartículas de plata utilizadas en esta tesis poseen geometría esférica y tamaño promedio de 100 nm, las cuales fueron donadas por la Dra. Alma Durán de la FES-Cuautitlán (UNAM) y sintetizadas de manera química a partir una disolución de nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) como precursor metálico, mezclada con citrato de sodio ( $\text{Na}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)$ ) y borohidruro de sodio ( $\text{NaBH}_4$ ) 10 mM como agentes de reducción.

### **1.2.3 Depósito de nanopartículas de plata sobre electrodo de GE (GE/Agnps) mediante electroforesis.**

Las nanopartículas de plata se depositaron sobre los electrodos de GE a partir de la técnica electroforética (ver anexo II). La suspensión electroforética se preparó de la siguiente manera: Se tomaron 3 mL de una solución stock 0.001 M Agnps con un exceso del surfactante bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) y se aforó en 25 mL de agua y posteriormente se sonicó durante 15 minutos. Las condiciones utilizadas fueron las siguientes: como cátodo se usó el electrodo de trabajo GE y como ánodo una placa de acero inoxidable 300 de 6 cm x 1.8 cm x 1 mm. La distancia entre electrodos fue de 1 cm y se aplicó un valor de potencial 7 V durante 15 minutos.

### **1.2.4 Caracterización voltamperométrica de los electrodos GE/ Agnps mediante voltametría cíclica**

Los electrodos GE/Aunps fueron evaluados mediante la técnica de voltamperometría cíclica (VC) (ver anexo III). Los experimentos fueron realizados utilizando como electrolito soporte amortiguador de amplio espectro a pH 4 (ver anexo IV); como contraelectrodo un electrodo de platino, como electrodo de referencia uno de calomel ( $\text{Hg}/\text{HgCl}/\text{KCl}$  sat), y como electrodo de trabajo GE/Agnps.



**Figura 3.** VC de los electrodos a) GE, b) GE/AgNps en amortiguador de amplio espectro pH 4 a 100  $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$  comenzando el ciclado a potencial de circuito abierto (ocp). (Elaboración propia ,2017).

De la figura 3, en la región I, en el barrido de potencial en dirección positiva, se observa que la corriente es independiente del potencial aplicado, por lo que en esta región el electrodo se comporta como uno idealmente polarizado. En la región II en la misma dirección de barrido, se observa un pico de oxidación  $R_0$  correspondiente a la oxidación de Ag bajo el siguiente mecanismo de reacción (Wenbo Lu, Guohui Chang, Yonglan Luo, Fang Liao, 2011).

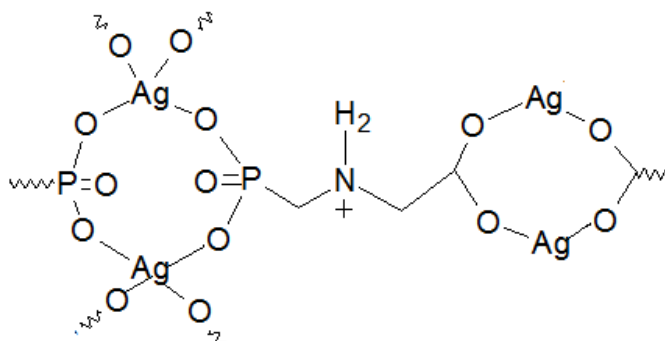


Por su parte en la región I, durante el barrido en dirección negativa (catódica) se observan los picos  $R_1$  y  $R_2$  correspondientes a la reducción de Ag depositada en diferentes sitios energéticos. El perfil voltamperométrico observado en la figura 3 para los electrodos GE/AgNps permitió confirmar el depósito electroforético de la Ag y evaluar la reproducibilidad de los experimentos para la detección de glifosato. De la caracterización electroquímica de los electrodos GE/AgNps fue posible concluir que el depósito coloidal de las nanopartículas de Ag sobre los electrodos de GE carece de reproducibilidad respecto a la cantidad depositada, la cual fue determinada a partir de la integración del pico de oxidación  $R_0$ , considerando que

una molécula de oxígeno monoatómico se adsorbe sobre un átomo de Ag (S.Trasatti, 1992). La carencia de reproducibilidad puede estar asociada a los procesos de electrodisolución de la plata que se lleva a cabo en el proceso  $R_0$ , o bien al crecimiento de una capa pasiva de óxidos sobre la superficie de la plata (Marcus, 2017), no obstante la respuesta electroquímica que exhibieron los electrodos fue estable por lo que se procedió a la detección de glifosato.

### 1.2.5 Detección de glifosato sobre electrodos de grafito epoxi y nanopartículas de plata (GE/Agnp)

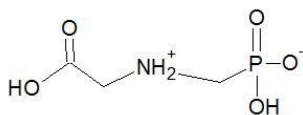
La molécula de glifosato la conforman tres grupos funcionales (la amina, el carboxilato y el fosfato) con fuerte afinidad a la superficie de la plata. De la misma forma es una molécula susceptible a formar complejos con este metal. Al respecto, se encuentra reportado en literatura que la formación de complejos entre la plata en su estado catiónico y el glifosato, se da de acuerdo a la estructura mostrada en la figura 4.



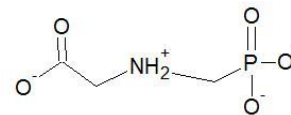
**Figura 4.** Complejo de la molécula de glifosato con Ag. (Elaboración propia, 2017)

Por otra parte, el glifosato es un tipo de ácido el cual es fuertemente ionizable, que presenta cuatro constantes de disociación  $pK_{a1} = 0.78$ ,  $pK_{a2} = 2.29$ ,  $pK_{a3} = 5.96$  y  $pK_{a4} = 10.98$  (Wauchope, 1976). Las especies resultantes para cada valor de  $pK_a$  se muestran a continuación:

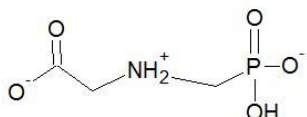
Especie 1



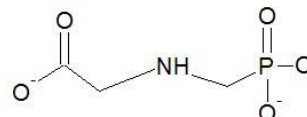
Especie 3



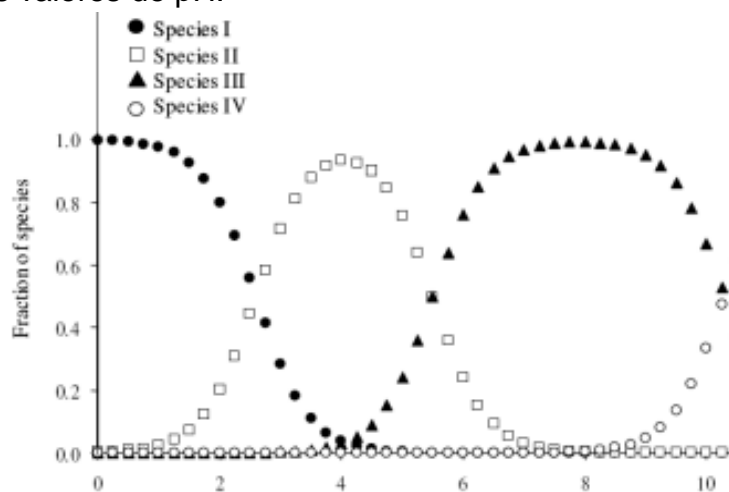
Especie 2



Especie 4

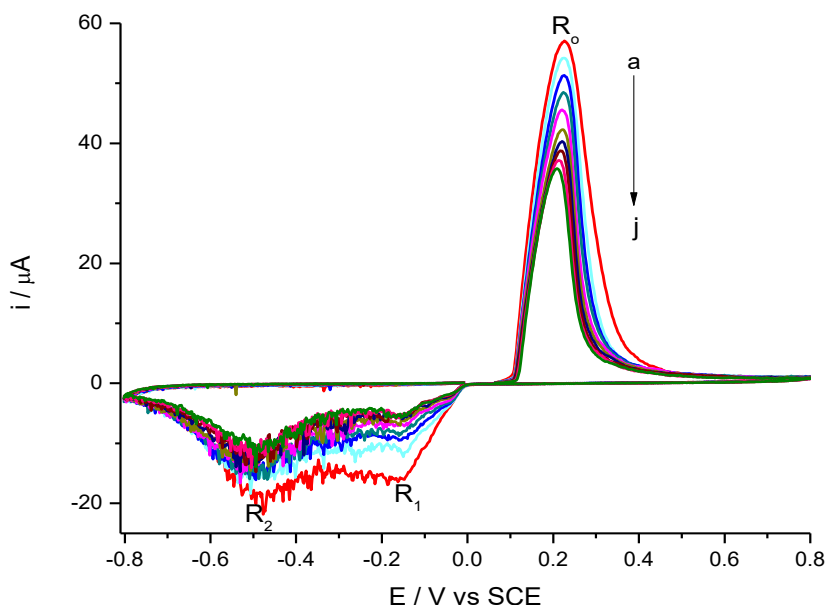


De esta manera en la figura 5 se muestra la curva de especiación del glifosato en agua según sus valores de pH.



**Figura 5.** Curva de especiación de la molécula de glifosato respecto al pH.

De la figura anterior se seleccionó el valor de pH 4, debido a la presencia de prácticamente una sola especie de glifosato en solución, ya que a ese valor el grupo fosfonato y carboxilato se encuentran deprotonados (especie 4). De esta forma, una vez obtenido el perfil característico de la plata, se adicionaron en la celda electroquímica concentraciones sucesivas de glifosato (1, 3, 6, 7, 9, 20, 40, 60, 90  $\mu\text{M}$ ) y se dejó interactuar con la superficie del electrodo durante 15 minutos por cada adición. Para cada concentración de glifosato se realizó la VC comenzando en dirección positiva desde el potencial de circuito abierto (0.06 V). La figura 6 muestra los voltamperogramas obtenidos en presencia y en ausencia del herbicida.



**Figura 6.**VCs obtenidos usando el electrodo GE/AgNps en amortiguador pH 4 a diferentes concentraciones de glifosato: 0, 1, 3, 6, 7, 9, 20, 40, 60, 90  $\mu\text{M}$  (a-j), a 100  $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ . (Elaboración propia, 2017)

Como se observa en la figura anterior, a medida que la concentración de glifosato aumenta en la celda electroquímica se observa una disminución en la corriente asociada al proceso de oxidación  $R_0$  adjudicada al proceso de oxidación de la Ag, este comportamiento puede ser asociado a la formación de un complejo entre el glifosato adsorbido en la superficie de las nanopartículas de plata y la  $\text{Ag}^{2+}$  producido a este valor de potencial (Ec. 1) o bien a que el glifosato adsorbido sobre la superficie de las nanopartículas de plata impide el proceso de oxidación del metal. A continuación, se construyó el gráfico de concentración vs porcentaje de cambio relativo (PCR) que experimenta la corriente asociada al proceso de oxidación ( $I_{pa}$ ) de la plata. El PCR se expresa de la siguiente forma:

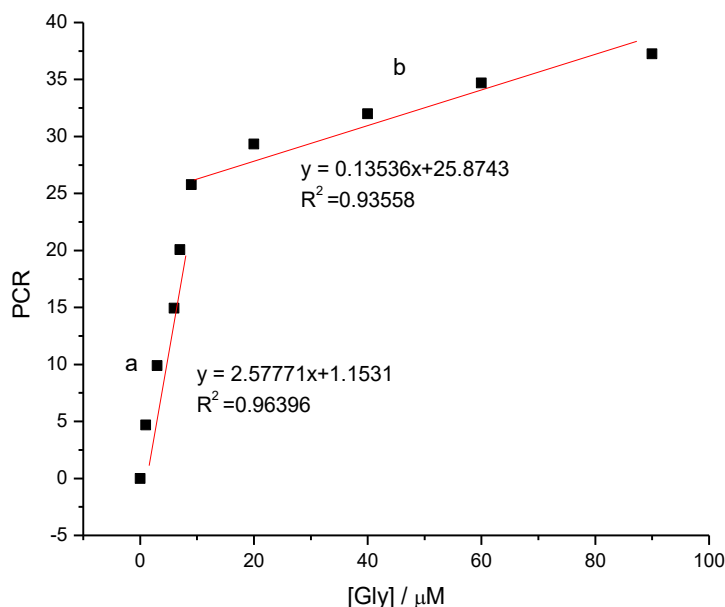
$$\text{PCR} = \frac{\text{Nuevo valor} - \text{valor de referencia}}{\text{valor de referencia}} \times 100 \quad (\text{Ec. 2})$$

dónde:

*valor de referencia* =  $I_{pa}$  del perfil de Ag

*valor nuevo* =  $I_{pa}$  de Ag con glifosato

Es importante resaltar que se eligió utilizar el PCR como parámetro para la obtención de la curva de calibración debido a que como se mencionó en el apartado 1.2.4 la obtención del perfil de la Ag en el electrolito es poco repetible; de esta forma la selección de este parámetro permite calcular para cada perfil el porcentaje de disminución de la corriente anódica por la presencia del glifosato, en comparación con aquella obtenida sin el herbicida.



**Figura 7.** Curvas analíticas de glifosato. Porcentaje de cambio relativo en  $I_{pa}$  vs concentración de glifosato. (Elaboración propia, 2017)

El intervalo lineal (IL) de los gráficos de la figura 7 lo comprende dos regiones; entre 1 a 9  $\mu\text{M}$  de glifosato (curva a) y de 20 a 90  $\mu\text{M}$  (curva b). De estos valores se obtuvieron los límites de detección (LD) y de cuantificación (LQ) para cada región, siendo: LD = 0.45  $\mu\text{M}$  y LQ= 2.56  $\mu\text{M}$  para la curva a y LD= 21.8  $\mu\text{M}$  y LQ= 40  $\mu\text{M}$  para la curva b. El LD y el LQ fueron calculados usando las siguientes ecuaciones:

$$LD = 3s/m \quad ; \quad LQ = 10\sigma/m \quad (\text{Ec. 3})$$

Donde  $\sigma$  es la desviación estándar de la corriente de pico del blanco y  $m$  es la pendiente de la curva de calibración.

El límite de detección obtenido con el electrodo GE/AgNps es similar a los obtenidos con los sistemas más sensibles que se han reportado mediante otro tipo de principio

de detección (Tabla 2). No obstante, la desventaja del sistema radica en la poca reproducibilidad que presenta la respuesta electroquímica de los electrodos GE/AgNps y que tendría que ser resuelta con estudios adicionales, por lo que no se consideró lo suficientemente optimizado para la construcción de un sensor en el monitoreo de residuos de glifosato en muestras reales.

**Tabla 2.** Resumen de trabajos realizados en la detección de glifosato (Elaboración propia 2017).

REFERENCIAS	ELECTRODO DE TRABAJO	PRINCIPIO DE DETECCIÓN	LÍMITE DE DETECCIÓN
<b>Sierra, Méndez, Sarria, &amp; Cortés, 2008</b>	Electrodo de cobre	Formación de complejo de coordinación Cobre-Glifosato	30 $\mu\text{M}$
	Electrodo de níquel	Formación de complejo de coordinación níquel-Glifosato	30 $\mu\text{M}$
<b>Andresa Fabiana Garcia, 2007</b>	Electrodo de cobre	Formación de complejo de coordinación níquel-Glifosato	0.35 $\mu\text{M}$
<b>Méndez, Suárez &amp; Cortés, 2007</b>	Electrodo de disco de platino/ $\text{Ag}_2\text{CO}_3$	Oxidación de glifosato	40 $\mu\text{M}$
<b>Este trabajo, 2017</b>	Electrodo GE/AgNps	Inhibición de la oxidación plata	0.45 $\mu\text{M}$

### 1.3. CONCLUSIONES

- La técnica electroforética fue adecuada para la modificación de electrodos GE con nanopartículas de plata.
- Mediante la inhibición del proceso de oxidación de la plata en presencia de glifosato fue posible su cuantificación amperométrica.
- La curva de calibración de disminución de la señal anódica de la plata por la presencia del glifosato mostró dos segmentos lineales, el primero en el rango de concentración de 1- 9  $\mu\text{M}$  y el segundo de 20 - 90  $\mu\text{M}$ .
- El LD y el LC fueron de 0.45  $\mu\text{M}$  y 2.56  $\mu\text{M}$  para el primer rango lineal y de 21.8  $\mu\text{M}$  y 40  $\mu\text{M}$  para el rango lineal.
- A través de la modificación del electrodo fue posible desarrollar una metodología de detección del herbicida, no obstante, el sistema presentó poca reproducibilidad debido a la formación intrínseca de capas pasivas de óxido sobre la superficie de la Ag o bien a su electrodisolución producida en ese valor de potencial; por lo que se considera aún no óptimo para trasladarse a la cuantificación de glifosato en muestras reales.

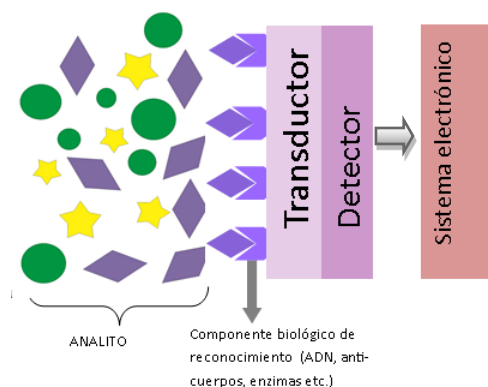
## **CAPÍTULO 2.**

### **Elaboración de biosensor para la detección de glifosato en grano de maíz utilizando electrodos GE/MWCNTs-HRP**



## 2.1 INTRODUCCIÓN

Un biosensor es un dispositivo que proporciona información cualitativa o cuantitativa sobre una muestra a partir de reacciones bioquímicas específicas. Se conforma de un bioreceptor constituido de enzimas, anticuerpos, ácidos nucleicos, células o tejidos contacto con un transductor que se y que transforma la señal proveniente de la interacción entre el analito y el bioreceptor que puede ser óptica, eléctrica, termométrica, acústica o electroquímica, a una fácilmente medible por el procesador (Torres & Méndez, 2014) (figura 8).



**Figura 8.** Representación de un biosensor. (Elaboración propia, 2017)

Los biosensores basados en transductores electroquímicos convierten la señal resultante del proceso de reconocimiento biológico en una señal eléctrica que será posteriormente cuantificada por el procesador. La señal eléctrica resultante está relacionada al proceso de reconocimiento y es proporcional a la concentración del analito (Jiménez & León, 2009).

A la fecha, los biosensores basados en transductores electroquímicos son los más populares (Thévenot, 2001) ya que combinan la sensibilidad de las técnicas electroquímicas con la selectividad de los procesos de reconocimiento biológico, dando lugar a dispositivos de bajo costo, robustos y con tiempos de respuesta cortos. Su clasificación está en función de la técnica electroquímica que se utilice como transductor: potenciométricos o amperométricos.

Las medidas potenciométricas consisten en la determinación de la diferencia de potencial entre un electrodo de trabajo y uno de referencia, mientras que los amperométricos se basan en el monitoreo de la corriente registrada al oxidarse o reducirse una especie electroactiva sobre un electrodo.

Por otra parte, la versión más popular de un biosensor electroquímico es aquel cuyo elemento de reconocimiento biológico está constituido por una enzima. En este arreglo, el analito a ser detectado puede ser tanto la molécula sobre la cual actúa la enzima (sustrato) o bien su inhibidor catalítico (Jian-Lung Huang, 2009; José M. Pingarrón, Paloma Yáñez Sedeño, 2008; Yuanhong Xu, 2012). El principio de detección de compuestos con biosensores basados en inhibición, es la cuantificación de la actividad enzimática en ausencia y en presencia del analito, la cual puede realizarse utilizando diversos métodos como electroquímicos, ópticos o electroacústicos (Amine A, Mohammadi H, Bourais I, 2006). En esta sección se presentan los resultados obtenidos para la determinación de glifosato a partir de la construcción de un biosensor electroquímico basado en la inhibición enzimática de la peroxidasa de rábano picante (HRP, por sus siglas en inglés) inmovilizada en electrodos de grafito epoxi modificados con nanotubos de carbono (GE/MWCNTs).

## **2.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **2.2.1 Elaboración de electrodos GE**

La elaboración de los electrodos GE y su caracterización electroquímica antes de su modificación con los nanotubos de carbono fue realizada siguiendo la metodología previamente establecida en el laboratorio (Ramos, 2005), la cual describe en el anexo I.

### **2.2.2 Elaboración de una suspensión acuosa de nanotubos de carbono**

El depósito de los nanotubos de carbono (MWCNTs) sobre los electrodos de GE se llevó a cabo utilizando la técnica electroforética, de esta manera, fue necesario dispersar de manera homogénea los nanotubos de carbono en algún tipo de disolvente neutro en este caso fue agua. Debido a la tendencia intrínseca de los MWCNTs a formar grumos o conglomerados, como resultado de las grandes fuerzas electrostáticas y de Vander Walls que actúan sobre ellos (Shin, Premkumar, & Geckeler, 2008), su dispersión en la disolución se logró mediante la aplicación de un tratamiento que consistió en la modificación superficial del material carbonáceo y el empleo del surfactante bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB).

En la literatura, se encuentran reportados dos mecanismos para la dispersión de los nanotubos: El físico que abarca el uso de métodos mecánicos como ultrasonificación

y mezclado de alto cizallamiento (centrifugación) y el químico que consiste en alterar la energía superficial del material y de este modo mejorar su compatibilidad con el disolvente, reduciendo en gran medida su tendencia a formar conglomerados. Lo anterior mediante la funcionalización superficial de los nanotubos de carbono, ligando de manera física o química ciertas moléculas o grupos funcionales en su superficie o bien mediante la adsorción de moléculas surfactantes (Rausch, Zhuang, & Mäder, 2010).

Los métodos de dispersión mecánicos tienen la capacidad de separar los nanotubos, pero es necesario aplicarlos por largos periodos y con relativa frecuencia para evitar nuevamente su conglomeración; lo que conlleva a procesos de fragmentación, disminuyendo la homogeneidad del material. Por su parte, el método de funcionalización y el uso de surfactantes resultan en muchos casos ineficientes, y la estabilidad de las suspensiones obtenidas es baja (In-Yup Jeon, Dong Wook Chang, Baek, 2011).

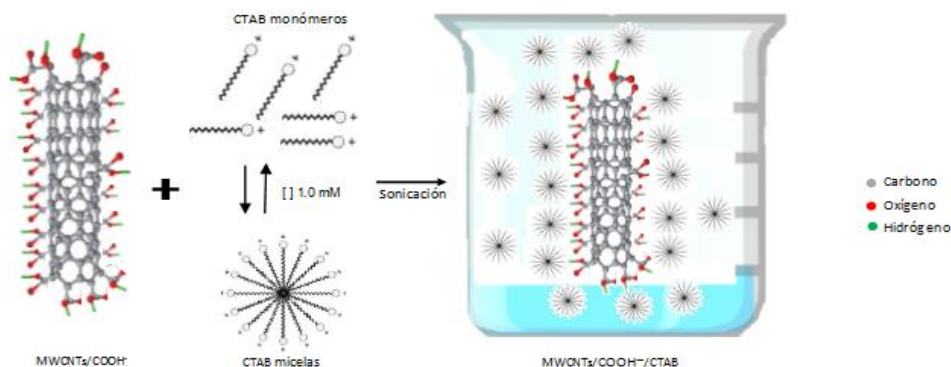
En esta tesis, se empleó la funcionalización superficial y el uso de un surfactante para la dispersión estable de los nanotubos de carbono en agua:

La funcionalización superficial consistió en adicionar grupos carboxílicos (-COOH) a la estructura de los nanotubos de carbono a partir del empleo del método de oxidación (In-Yup Jeon, Dong Wook Chang, Baek, 2011); que consistió en poner en contacto directo 2 gr de nanotubos de carbono, con una disolución de ácido sulfúrico y ácido nítrico en relación 3:1 durante 48 horas. Posterior a esto, los nanotubos se lavaron y filtraron repetidamente hasta obtener un pH neutro en el líquido de enjuague. El producto obtenido se dejó secar durante 4 horas a temperatura ambiente.

La suspensión electroforética se formó agregando 0.01 gr de los nanotubos de carbono funcionalizados en 100 mL de agua bidestilada y finalmente se agregó 0.04 gr del surfactante CTAB como medio dispersor, y se sonicó la mezcla durante 15 minutos.

La incorporación de grupos ácidos (-COOH) a la estructura de los nanotubos de carbono le confirió a su superficie homogénea de carga negativa. Por otra parte, la adición del surfactante CTAB fue realizada directamente en la disolución

electroforética en su valor de concentración micelar crítica (1.0 mM) (Shin, 2008), lo que permite la encapsulación de los grupos metileno del surfactante (parte hidrofóbica) y la interacción de la parte polar catiónica del CTAB con la superficie de los nanotubos de carbono y con el disolvente (figura 9), incrementando considerablemente la estabilidad de la suspensión.

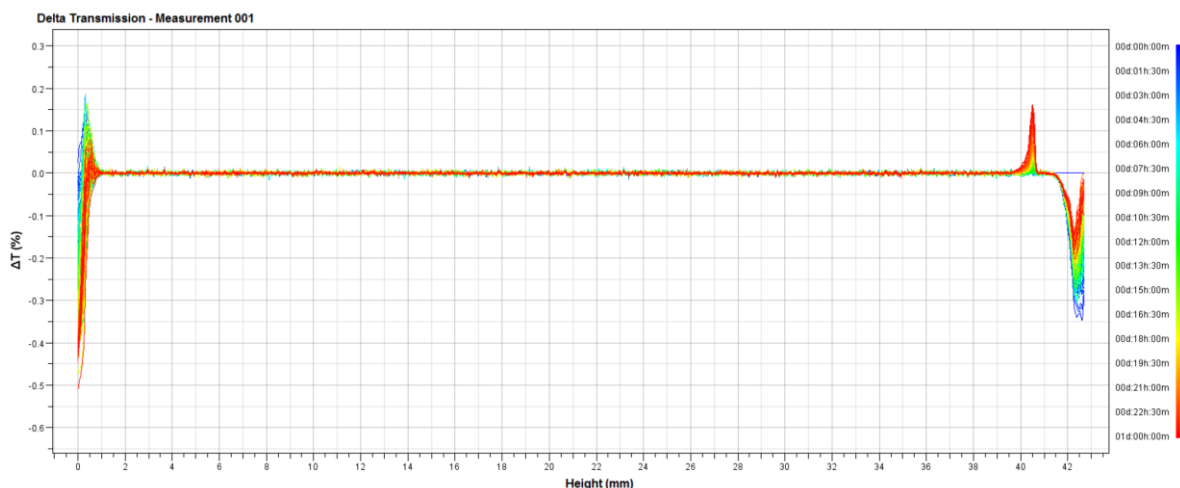


**Figura 9.** Representación esquemática de posibles interacciones entre MWCNTs y CTAB en solución (Elaboración propia, 2017)

La unión de estas metodologías no se encuentra reportada en literatura, y da como resultado la formación de suspensiones estables, como fue demostrado por mediciones de turbidimetría, lo cual se aborda en la siguiente sección.

### 2.2.3 Estudio de la estabilidad de la suspensión acuosa de nanotubos de carbono

La estabilidad de la suspensión de los nanotubos de carbono fue analizada utilizando la técnica de turbidimetría (ver anexo V), basada en la medición de la luz transmitida a través de la suspensión. Las pruebas fueron realizadas usando el equipo Turbiscan a 25 °C utilizando tubos de vidrio cilíndricos con una altura de muestra de 53 mm. Los barridos fueron realizados durante 24 horas, usando un total de 145 escaneos a intervalos de 10 minutos. La figura 10 muestra los perfiles del cambio en el porcentaje de la luz transmitida (% $\Delta T$ ) obtenidos a estas condiciones:



**Figura 10.** Perfil de transmitancia de la suspensión de MWCNTs en presencia de CTAB en función del tiempo (0-24 h) y altura de la muestra (0-53 mm). (Elaboración propia, 2017)

Dentro del primer milímetro del vial, se observa una variación en los valores de %  $\Delta T$  respecto al tiempo, la cual puede ser adjudicada al efecto óptico del borde del vial. Por otro lado, en la parte central del gráfico, en el rango del 1 al 39 mm, los perfiles presentan valores nulos de % $\Delta T$  y resultan invariables respecto al tiempo, indicando que en este rango la solución es uniforme y la concentración de las partículas es lo suficientemente grande para no permitir que la luz sea transmitida en algún porcentaje (solución opaca), lo que es característico de la formación de suspensiones estables. Finalmente, en la parte superior del vial se observa una variación de los perfiles de transmitancia respecto al tiempo, asociado a un fenómeno de clarificación por la disminución en la concentración de partículas en esa zona, o bien a la disminución paulatina del menisco de la muestra. En un estudio similar por esta técnica de la dispersión de nanotubos de carbono en agua utilizando CTAB como surfactante, Hu y col. obtuvieron valores de transmitancia de aproximadamente 15 unidades de % $\Delta T$  utilizando el 0.3 wt% del surfactante y el 0.02 wt% de MWCNTs (Hu, 1999).

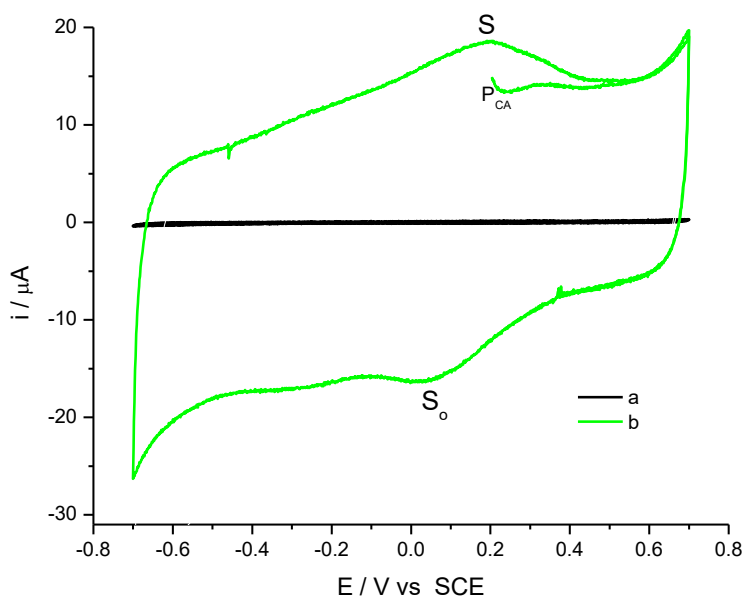
En esta tesis se obtuvieron valores nulos de % $\Delta T$  con una menor cantidad de nanotubos (0.01 wt%) y de surfactante (0.04 wt%), por lo que resulta evidente la eficiencia de utilizar la funcionalización y uso de surfactantes para la estabilidad de la dispersión estable de los nanotubos en medio acuosa.

### 2.2.4 Depósito electroforético de los nanotubos de carbono sobre electrodos GE

La suspensión acuosa de nanotubos de carbono fue utilizada como el medio líquido de migración para el depósito del material carbonáceo mediante la técnica de electroforesis. Las condiciones utilizadas fueron las siguientes: como cátodo se usó el electrodo de trabajo GE y como ánodo una placa de acero inoxidable 300 de 6 cm x 1.8 cm x 1 mm. La distancia entre electrodos fue de 1 cm y se aplicó valor de potencial 7 V durante 7 minutos de deposición.

### 2.2.5 Caracterización electroquímica de los electrodos GE/MWCNTs

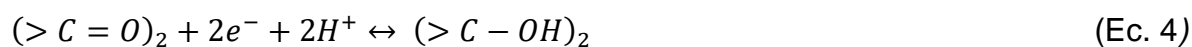
Los electrodos GE/MWCNTs fueron caracterizados mediante la técnica de voltamperometría cíclica en amortiguador de amplio espectro a pH 4 y  $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ . Los resultados obtenidos se muestran en la figura 11. Para efecto de comparación se ha adicionado el perfil voltamperométrico del electrodo GE en el mismo medio (curva a).



**Figura 11.** VCs de los electrodos a) GE, b) GE/MWCNTs tratado con EtOH/HCl, en amortiguador de amplio espectro pH 4 a  $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$  comenzando el ciclado a potencial de circuito abierto.

(Elaboración propia, 2017)

Cuando los nanotubos de carbono están presentes sobre la superficie de GE (curva b), se observa un incremento significativo en la corriente obtenida, y la formación de los picos S y S<sub>o</sub>. La presencia de estos picos sobre los nanotubos de carbono y su reversibilidad química sobre los nanotubos de carbono, ha sido reportada previamente y se ha relacionado con la existencia de grupos oxigenados sobre la superficie de los nanotubos de carbono. La respuesta redox del par quinona-hidroquinona, que ha sido reportada anteriormente a este pH y en esta región de potencial bajo (Ec. 4) (Śliwak, Grzyb, Ćwikła, & Gryglewicz, 2013). Estos grupos son usualmente formados bajo procesos de oxidación prolongada, lo que ocasiona un incremento en la cantidad de carbono sp<sup>3</sup> que posee este tipo de grupos (Morallón, 2011). Lo anterior concuerda con los procesos de oxidación a los cuales han sido sometidos los nanotubos de carbono en esta tesis (sección 2.3.1).



De los datos en corriente (i) obtenidos de los voltamperogramas de la figura 11, se calcularon los valores del área electroactiva o área real (A<sub>e</sub>) y área geométrica (A<sub>ge</sub>) para cada electrodo, los cuales se reportan en la tabla 3, así como los valores de área geométrica.

**Tabla 3.** Valores de área geométrica (A<sub>ge</sub>) y electroactiva (A<sub>e</sub>) de los electrodos GE y GE/MWCNTs. (Elaboración propia, 2017).

ELECTRODO	A <sub>ge</sub> / cm <sup>2</sup>	A <sub>e</sub> / cm <sup>2</sup>
GE	0.0078 cm <sup>2</sup>	0.0094 cm <sup>2</sup>
GE/MWCNTs	0.0078 cm <sup>2</sup>	0.1231cm <sup>2</sup>

Los valores del área electroactiva (A<sub>e</sub>) fueron calculados mediante experimentos independientes, a través de la respuesta electroquímica de la molécula sonda K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> sobre cada electrodo en 0.1 M KCl a diferentes velocidades de barrido (20, 30, 40... 130 mV.s<sup>-1</sup>) considerando un sistema cuasi-reversible, cuya corriente de pico se define por la fórmula corregida de Randles-Sevcik para este tipo de procesos (Wang J. , 2006):

$$I_{pa} = (2.99 \times 10^5) n(\alpha n_a)^{1/2} A C D^{1/2} V^{1/2} \quad (\text{Ec. 5})$$

Donde I<sub>pa</sub> se refiere a la corriente de pico anódica, n es el número de electrones transferidos para el par redox Fe<sup>2+</sup>/Fe<sup>3+</sup>, A es el área electroactiva del electrodo, D

es el coeficiente de difusión,  $v$  la velocidad de barrido, y  $C$  la concentración de la molécula sonda. Para este cálculo se emplearon los siguientes valores: 1.0 mM  $K_3Fe(CN)_6$  en 0.1 M KCl,  $T= 298$  K,  $R= 8.314$  J.K<sup>-1</sup>.mol<sup>-1</sup>,  $F= 96,480$  C.mol<sup>-1</sup>,  $n= 1$ ,  $D= 7.6 \times 10^{-6}$  cm<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup>.

Como se observa en la tabla 3, el área electroactiva de cada uno de los electrodos es mayor a su área geométrica, debido a que la rugosidad de los electrodos es intrínseca de los valores de  $A_e$ . Cuando los nanotubos de carbono están presentes en la superficie del GE, el área electroactiva se incrementa considerablemente ( $\cong 10$  veces) respecto a la obtenida para el electrodo GE, sugiriendo las propiedades de un supercapacitor. Lo anterior, como resultado de la gran área superficial por unidad de volumen que presentan las nanoestructuras de MWCNTs.

### **2.2.6 Inmovilización de la enzima peroxidasa de rábano (HRP) sobre la superficie de electrodos GE/MWCNTs**

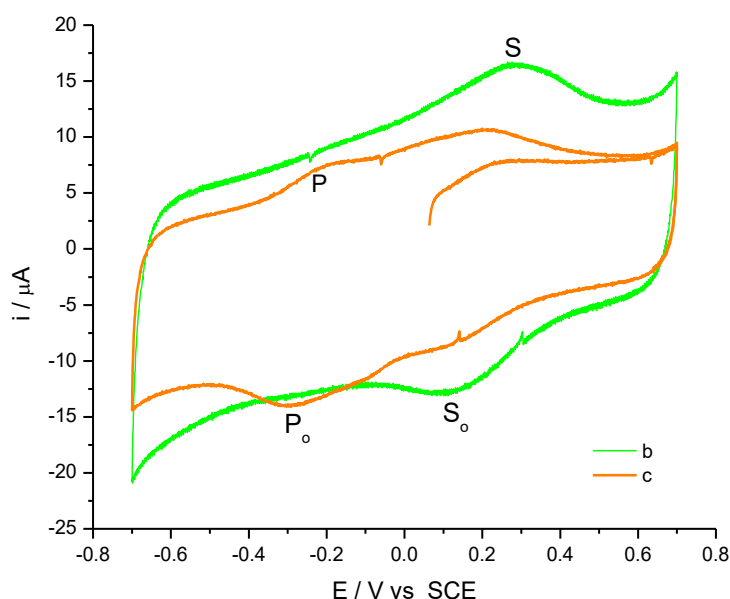
La adsorción de la enzima peroxidasa de rábano (HRP) sobre la superficie de los electrodos GE/MWCNTs se realizó mediante el método físico bajo el siguiente procedimiento:

Primeramente, 0.2 mg de la enzima fueron disueltas en amortiguador de amplio espectro a pH 4, para obtener una concentración de 5  $\mu$ M. El valor de la concentración fue corroborada midiendo la absorbancia de la HRP a 403 nm por espectrofotometría de UV-vis, la cual arrojó valores de  $4.8 \pm 0.3$   $\mu$ M. Posteriormente, se sumergió el electrodo GE/MWCNTs en dicha disolución durante 18 horas bajo agitación constante a 4°C. Finalmente, el electrodo resultante (GE/MWCNTs-HRP) fue enjuagado exhaustivamente con amortiguador de amplio espectro a pH 4 y guardado a 4°C mientras no estuviera en uso.

### **2.2.7 Caracterización electroquímica de los electrodos GE/MWCNTs-HRP**

La caracterización electroquímica de los electrodos GE/MWCNTs-HRP fue realizada mediante la técnica de voltamperometría cíclica. Los experimentos fueron realizados empleando una celda de tres electrodos, como contraelectrodo un alambre de platino, como electrodo de referencia uno de calomel saturado (SCE) y el electrodo GE/MWCNTs-HRP como electrodo de trabajo. El electrolito soporte fue un amortiguador de amplio espectro a pH 4. La figura 12 muestra los

voltamperogramas del electrodo GE/MWCNTs antes y después de su modificación con la enzima HRP. Cuando la enzima se encuentra fisisorbida sobre la superficie de los nanotubos de carbono (curva c), se observa la presencia de un par de picos redox (P y P<sub>o</sub>) en el rango de potencial de 0.01 a -0.55 V vs SCE y una separación de picos de 99 mV. Los picos P y P<sub>o</sub> no se encuentran presentes en ausencia de la enzima (curva b), por lo que pueden ser adjudicados a la transferencia de electrones entre el centro activo Fe<sup>III</sup>/Fe<sup>II</sup> de la HRP y la superficie del electrodo, lo que representa una transferencia electrónica directa (TED).



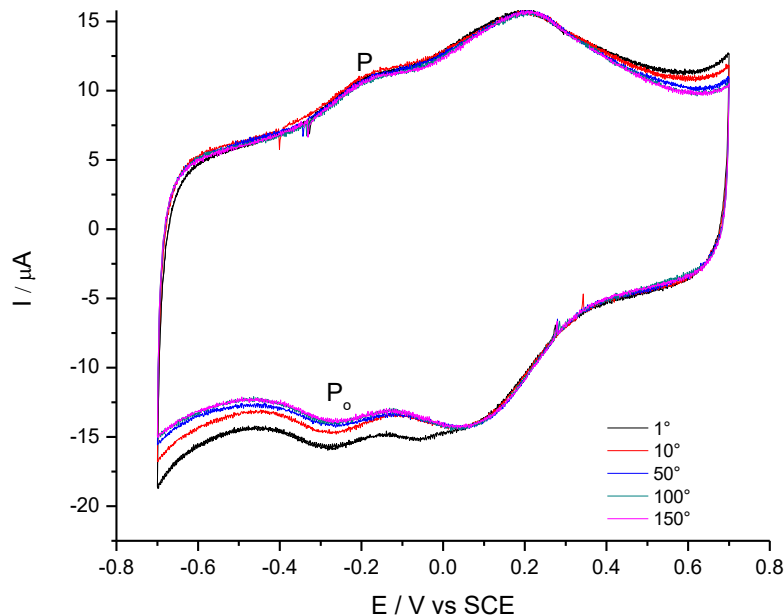
**Figura 12.** VCs de los electrodos GE/MWCNTs antes (b) y después de la adsorción física de la enzima HRP (c), en amortiguador de amplio espectro a pH 4 a  $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ . (Elaboración propia, 2017).

Así mismo, se observa un perfil voltamperométrico más angosto (con respecto a la corriente) que el obtenido en ausencia de la enzima, lo que puede estar relacionado con una disminución en la rugosidad del electrodo debido a la adsorción de las macromoléculas sobre la superficie de los MWCNTs. Se observa una disminución en la corriente asociada a los picos S y  $S_o$  lo cual indica un bloqueo parcial de los grupos carboxilos de los nanotubos de carbono debido a la presencia de la enzima (sección 2.2.4). El recubrimiento superficial ( $\rho$ ) de la HRP electroquímicamente activa fue de  $2.18 \times 10^{-10} \text{ mol}\cdot\text{cm}^{-2}$ , estimado mediante el uso de la ecuación  $\rho =$

$Q/nFA_e$ ; donde  $Q$  es la carga obtenida por integración del pico catódico, y  $A_e$  el área electroactiva obtenida antes de la adsorción de la enzima. Es importante mencionar que el valor de recubrimiento obtenido en este trabajo es satisfactoriamente comparable con el reportado a partir de otras metodologías de inmovilización (Chen, 2009).

### 2.2.8 Estabilidad de los electrodos GE/MWCNTs-HRP

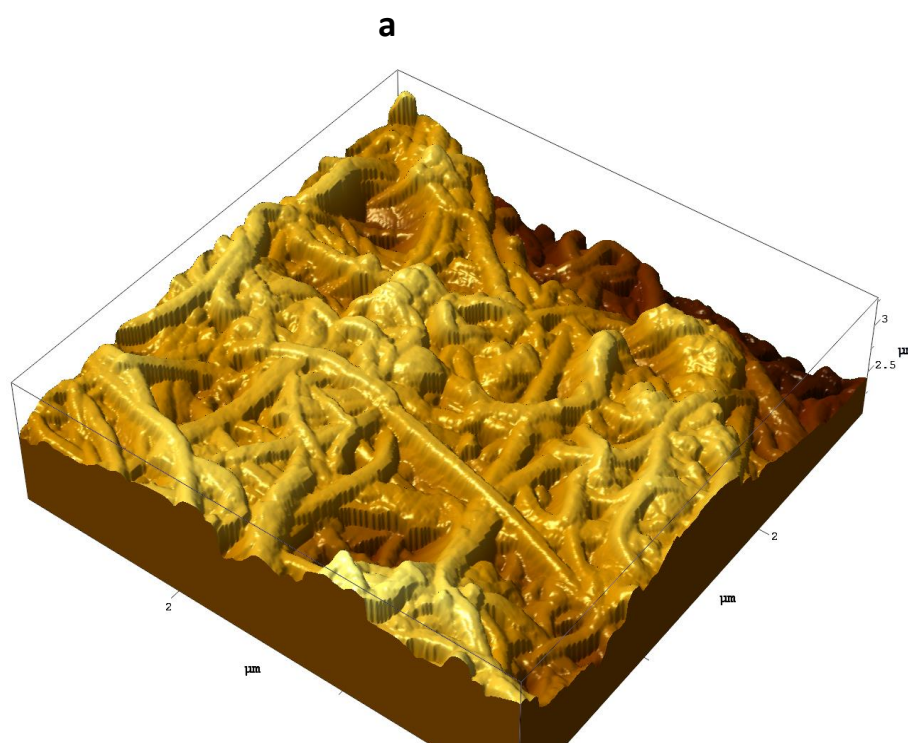
La estabilidad de la HRP inmovilizada sobre la superficie de los electrodos GE/MWCNTs fue confirmada mediante ciclado por VC (figura 13). Se observa una disminución en la intensidad de corriente del pico de reducción  $P_o$  hasta el 50° ciclo, a partir del cual se mantiene constante incluso después de 200 ciclos. Se calculó el recubrimiento superficial de la enzima después de 150 ciclos, el cual fue de  $1.96 \times 10^{-11} \text{ mol.cm}^{-2}$ , correspondiente a una desorción del 9 %. La desorción parcial de la enzima obtenida al inicio del ciclado, puede ser debida a la remoción de la enzima que no se encuentra en contacto directo con la superficie de los MWCNTs.

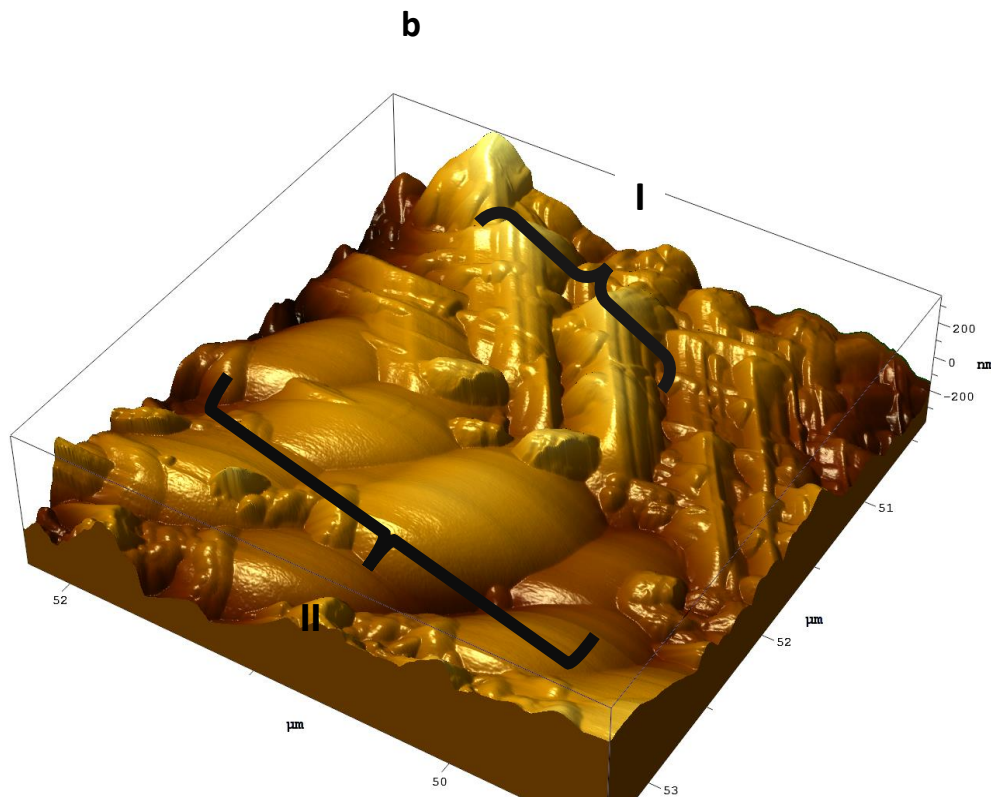


**Figura 13.** Efecto del ciclado de potencial en el electrodo GE/MWCNTs-HRP en amortiguador de amplio espectro a pH 4 a  $100 \text{ mV.s}^{-1}$ . (Elaboración propia. 2017)

### 2.2.9 Caracterización morfológica de los electrodos GE/MWCNTs-HRP

La adsorción de la enzima HRP sobre los electrodos GE/MWCNTs fue analizada mediante microscopía de fuerza atómica (AFM) usando un equipo SmartSPMTM-1000 de AIST-NT Inc. (Novato, CA). Se obtuvieron imágenes del electrodo GE/MWCNTs antes y después de su modificación con la enzima HRP utilizando el modo “*on top*” y puntas de nitruro de silicio de 52 nm de ancho,  $0.8 - 8.9 \text{ Nm}^{-1}$  de constante de restitución y 36-98 kHz de frecuencia natural de resonancia en aire. La velocidad de barrido fue de 1.0 Hz, la ganancia de alimentación (FB) de 158.6 y una resolución de 450 x 450 (figura 14).





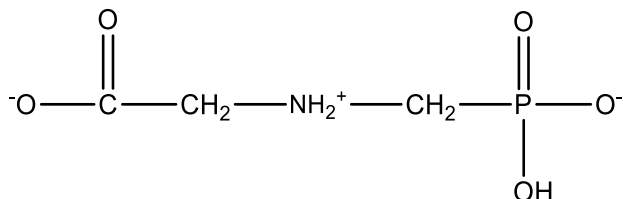
**Figura 14.** Imágenes AFM de a) electrodo GE/MWCNTs y b) GE/MWCNTs-HRP. (Elaboración propia, 2017)

En la figura 14a se observa que el depósito de los nanotubos de carbono recubre completamente la superficie de los electrodos GE, mostrando la configuración típica de interconexión entre las estructuras nanométricas (madeja). El valor de rugosidad cuadrática promedio (r.m.s) calculado fue de  $0.18 \mu\text{M}$ . En presencia de la enzima (figura 14b), desaparecen las características distintivas de los nanotubos de carbono (figura 14a) y se identifica una superficie recubierta con la enzima. Considerando que la HRP es una molécula elongada con  $64 \text{ \AA}$  en su eje más largo (Takahashi, 2000) en la región I de la figura 14b se observa la superficie de los nanotubos de carbono cubiertos con nudos de enzima colapsada con tamaño de partícula promedio de  $0.09 \mu\text{m}$ , mientras que en la región II, se presenta un recubrimiento globular mayor de tamaño promedio de  $0.78 \mu\text{m}$ , conformados por el colapso de los glóbulos más pequeños. El valor de r.m.s obtenido fue de  $78 \text{ nm}$  y

refleja la disminución de la rugosidad de los electrodos GE/MWCNTs debido a que la enzima se encuentra recubriendo masivamente los defectos estructurales del electrodo.

### 2.2.10 Detección de glifosato sobre electrodos de GE/MWCNTs-HRP

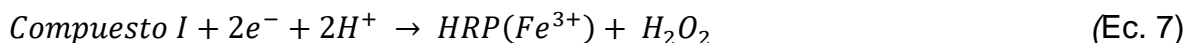
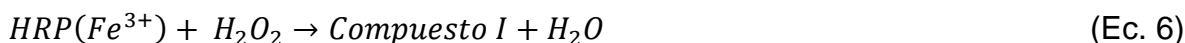
Según la curva de distribución de especies iónicas, a pH 4 se tiene la presencia del glifosato prácticamente como una sola especie, tal como se muestra en la figura 15.



**Figura 15.** Estructura química de la especie de glifosato (Elaboración propia, 2017).

Así mismo, el glifosato puede formar complejos bidentados y tridentados por interacción de un ión metálico de transición ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$ ) con cualquiera de sus grupos funcionales constituyentes (grupo carboxilo ( $\text{COOH}^-$ ), amino ( $\text{C}_2\text{NH}$ ) o ácido fosfónico ( $(\text{C-PO}(\text{OH})_2$ )).

Por su parte, la enzima HRP pertenece a las enzimas oxidativas o peroxidasas, las cuales contienen al grupo hemo (un ion de hierro contenido en el centro de un anillo heterocíclico orgánico) en su estructura, siendo el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) su principal sustrato. Respecto a la construcción de biosensores enzimáticos del tipo electroquímico, la peroxidasa de rábano (HRP) ha sido satisfactoriamente inmovilizada en una gran variedad de materiales electródicos (Moyo, 2014; Ryu, 2006; Gholami, 2012) y utilizada ampliamente en la detección de peróxidos de hidrógeno bajo la siguiente reacción global:



Donde HRP ( $\text{Fe}^{3+}$ ) representa el estado inicial de la HRP inmovilizada sobre el electrodo y compuesto I es la enzima en su estado de oxidación +5 ( $\text{Por}^+-\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ ), una especie oxiferril que genera un catión radical proteico. La detección del sustrato ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) se obtiene amperométricamente a partir de la corriente de reducción producida por la reacción presentada en la ecuación 7. Así mismo, se han podido cuantificar diversos compuestos que exhiben la capacidad de inhibir la reacción de

la enzima (biosensores basados en inhibición) (Wang X. , 2016; Okawa, 2015). De esta manera, la cuantificación del analito se realiza a partir de la diferencia en la corriente obtenida en ausencia y en presencia del mismo.

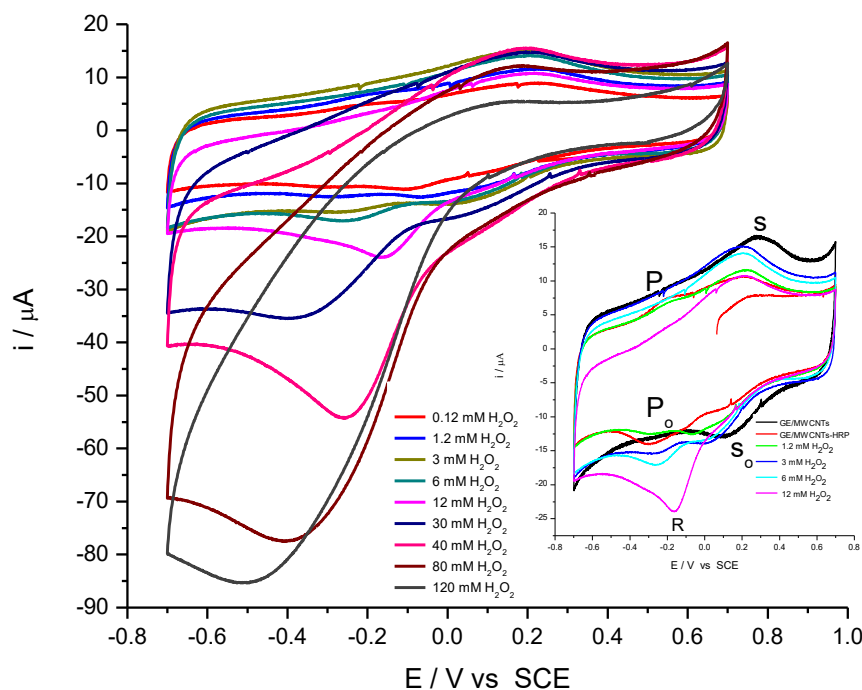
Respecto a la determinación del glifosato a partir de biosensores, se han reportado dos estudios que se basan en la inmovilización de la enzima HRP sobre electrodos de oro modificados con películas poliméricas de PDMA-PSS (2,5-dimetoxianilina dopado con 4-ácido sulfónico de estireno); ambos biosensores funcionaron bajo el principio de inhibición y fueron operados amperométricamente a las mismas condiciones; la diferencia entre estos dos reportes fue únicamente la técnica electroquímica de cuantificación empleada, uno uso voltamperometría (Songa, et al., 2009), mientras que el otro se basó en la técnica de disco rotatorio (Songa, Somerset, et al., 2009). El estudio por VC presentó un rango lineal de detección de 0.00147 a 0.082  $\mu\text{M}$  con un límite de detección (LD) de 0.01  $\mu\text{M}$ , mientras que en el de disco rotatorio permitió un rango lineal de 0.0118 a 0.461  $\mu\text{M}$  con un LD de 0.0005  $\mu\text{M}$ . Adicionalmente a la complejidad de estos sistemas por el uso de un mediador (PDMA-PSS ) y a los angostos rangos de cuantificación obtenidos, en ambos sistemas se trabajó a pH 6.1, en donde según la curva de distribución de especies iónicas coexisten al menos dos especies de glifosato deprotonadas, lo que le resta especificidad al sistema

El principio del funcionamiento del biosensor electroquímico planteado en esta tesis, es la inhibición de la oxidación centro redox de la HRP por peróxido de hidrógeno inmovilizada sobre electrodos de grafito epoxi modificado con nanotubos de carbono multicapa (GE-MWCNTs) en presencia del glifosato presente en estado acuoso a pH 4. La elección de este sistema permitió: a) El incremento en la sensibilidad y especificidad por la cuantificación de glifosato como una sola especie, b) La eliminación del uso de mediadores que repercute en diseños de biosensores más simples y c) El uso de materiales más asequibles para su producción a escala como es el empleo de materiales carbonáceos.

### **2.2.11 Análisis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre electrodos GE/MWCNTs-HRP**

La reactividad de la enzima HRP inmovilizada sobre electrodos GE/MWCNTs al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fue evaluada por VC (figura 16). Para esto, se adicionaron al sistema descrito en la sección 2.2.7, diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno. La celda

se mantuvo bajo agitación constante y atmósfera de nitrógeno durante 5 minutos antes de realizar el barrido de potencial.



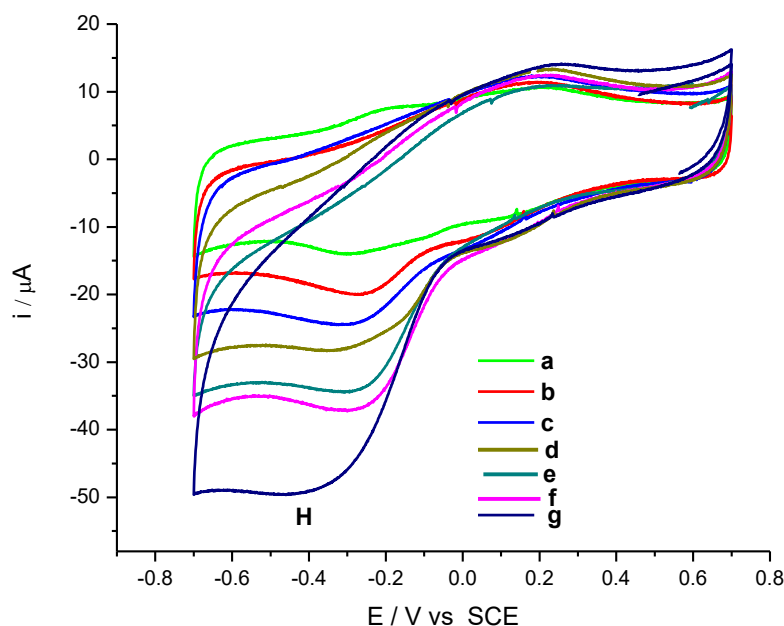
**Figura 16.** Respuesta de los electrodos GE-MWCNTs-HRP en presencia de diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno (0.12-120 mM) en una disolución de amortiguador de amplio espectro a pH 4. Inserto: Respuesta de los electrodos a concentraciones bajas de peróxido (1.2-12 mM), bajo las mismas condiciones. (Elaboración propia, 2017).

Como se observa se observa en el inserto de la figura 16, en presencia de peróxido de hidrógeno el pico  $S_0$  correspondiente a la reducción de los grupos superficiales carbonilos sobre los nanotubos de carbono (interconversión tipo quinona-hidroquinona), comienza a un potencial más positivo, lo que indica que antes de efectuarse este proceso, ocurre una reacción química acoplada que hace que la transferencia de electrones en este punto sea termodinámicamente más favorable. Lo anterior es congruente con la oxidación química que experimenta la enzima expuesta al peróxido de hidrógeno a potencial a circuito abierto. El pico H corresponde a la reacción heterogénea de la enzima previamente oxidada por el  $H_2O_2$  a potencial a circuito abierto (ecuación 6). Respecto al pico  $P_0$ , este es observable a concentraciones por debajo de los 6  $\mu M$  de peróxido de hidrógeno, lo

que puede estar asociado con que a esas condiciones, la concentración del sustrato no es lo suficientemente alta para difundir dentro de los agregados esféricos de HRP formados sobre la superficie de los nanotubos de carbono; por arriba de los 6  $\mu\text{m}$  de peróxido de hidrógeno el pico R desaparece; lo anterior se debe a que a altas concentraciones de peróxido se garantiza la catálisis de la HRP( $\text{Fe}^{3+}$ ) a HRP( $\text{Fe}^{5+}$ ) haciendo más difícil la prevalencia de la enzima en su estado de oxidación más bajo. Finalmente, en el barrido de potencial en dirección positiva, se aprecian los picos P y S correspondientes a los procesos explicados en los apartados 2.2.5 y 2.2.7

### **2.2.12 Determinación del glifosato utilizando electrodos GE/MWCNTs-HRP**

La respuesta del biosensor GE/MWCNTs-HRP hacia la determinación de glifosato se realizó de la siguiente manera: Se adicionaron las cantidades requeridas de una disolución estándar de glifosato al medio amortiguador de amplio espectro a pH 4, para obtener distintas concentraciones (0.08, 0.8, 8, 80, 800, 8000  $\mu\text{M}$ ). Los electrodos se dejaron incubar por 5 minutos bajo agitación constante y se mantuvo una atmósfera de nitrógeno tanto antes como durante los experimentos. Posteriormente, sin detener la agitación se adicionaron 12 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y después de otros 5 minutos más se detuvo la agitación; y se procedió a realizar un barrido de potencial cíclico (VC). La figura 17 muestra los voltamperogramas cíclicos obtenidos de la adición de diferentes concentraciones de glifosato al sistema 12 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en amortiguador de amplio espectro pH 4.



**Figura 17.** VCs a  $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$  sobre el electrodo GE/MWCNTs-HRP a diferentes concentraciones de glifosato: a) 0, b) 8000, c) 800, d) 80, e) 8, f) 0.8, g)  $0.08 \mu\text{M}$ , en presencia de  $12 \text{ mM}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en amortiguador de amplio espectro a pH 4. (Elaboración propia, 2017).

En el voltamperograma anterior se observa una disminución de las corrientes de pico del proceso de reducción H a medida que aumenta las concentraciones de glifosato en disolución; este fenómeno es adjudicado a que el glifosato, que en este caso desempeña el papel de inhibidor, bloquea el sitio activo de la enzima reduciendo así su actividad y por tanto provocando una disminución en la respuesta del biosensor. Con los resultados obtenidos se calculó el porcentaje de inhibición (%I), de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$I\% = \frac{I_0 - I_i}{I_0} * 100 \quad (\text{Ec. 8})$$

Donde  $I_0$  e  $I_i$  corresponden al valor de corriente antes y después, respectivamente, de la inhibición de la enzima inmovilizada. Con los valores de inhibición calculados, se construyó la curva de calibración %I vs [gly] M (Figura 18). La curva de calibración presenta un comportamiento que se ajusta a la ecuación de Hill para cinética enzimática, con un coeficiente de correlación de  $r^2 = 0.9992$  y un límite de detección (LD) de  $0.08 \mu\text{M}$  calculado a partir de los valores de %I considerando el caso en que

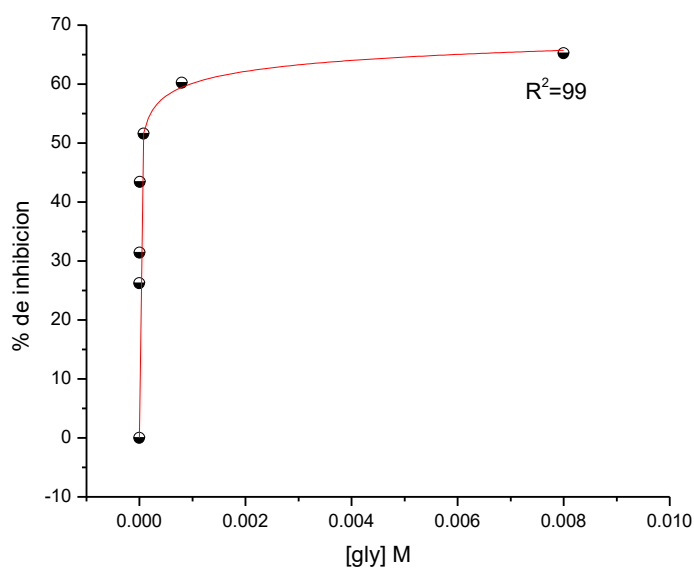
los datos no se ajustan a una regresión lineal en donde el 20% de inhibición puede ser considerado como este valor (Amine, 2015).

Tabla 4

$$\%I = \frac{\%I_{\max}[s]^n}{K_{0.5}^n + [s]^n} \quad (\text{Ec. 9})$$

Donde  $\%I_{\max}$  es el porcentaje máximo de inhibición que es observada a la concentración de saturación de glifosato.  $K_{0.5}$  representa la concentración del glifosato a la cual el porcentaje de inhibición es exactamente la mitad de  $\%I_{\max}$  y  $n$  es el coeficiente de Hill que provee una medición de la cooperatividad del enlace del inhibidor a la enzima.

De los datos proporcionados por el ajuste del gráfico de la figura 18, se obtuvieron los siguientes valores:  $\%I_{\max} = 80$ ,  $K_{0.5} = 4 \mu\text{M}$ ,  $n = 0.20$ .



**Figura 18.** Curva analítica de glifosato, I% de inhibición vs Concentración. (Elaboración propia, 2017).

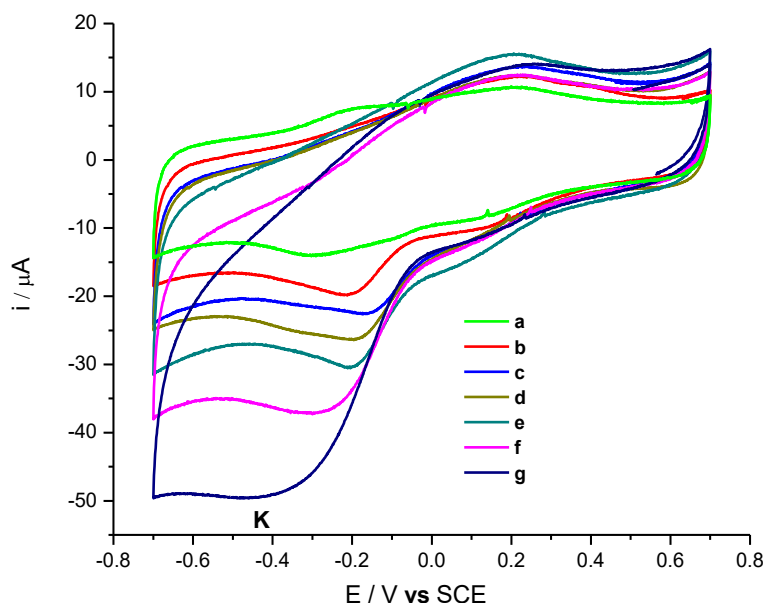
El límite de detección obtenido con el electrodo GE/MWCNTs-HRP es similar a los obtenidos con biosensores usando peroxidasa de rábano como elemento biológico de reconocimiento (Tabla 4).

**Tabla 4.** Resumen de trabajos realizados en la detección de glifosato (Elaboración propia, 2017).

REFERENCIAS	LÍMITE DE DETECCIÓN
Songa, A., <i>et al.</i> , 2009	0.01 $\mu\text{M}$
Songa, A., Somerset, V., <i>et al.</i> , 2009	0.0005 $\mu\text{M}$
Este trabajo, 2017	0.08 $\mu\text{M}$

### 2.2.13 Determinación de glifosato en muestras de maíz

Una vez que se analizó la respuesta de los electrodos desarrollados hacia la determinación de glifosato en muestras sintéticas, se procedió a evaluar el biosensor en muestras de maíz contaminadas artificialmente con glifosato. La preparación de la muestra de maíz se realizó de la siguiente manera: Se pesó 1 g de maíz previamente seco y triturado; posteriormente, la muestra se adicionó a 20 mL de una mezcla acuosa de cloroformo en una relación 5:3 durante una noche. El contenido se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 min para eliminar partículas sólidas. A continuación, se filtró utilizando una membrana de 0.22  $\mu\text{m}$  y se almacenó a 4 °C. Los experimentos electroquímicos fueron realizados como se mencionó en la sección 2.2.7 con la única diferencia de que las disoluciones estándar de glifosato se elaboraron con la disolución de maíz obtenida después del centrifugado.



**Figura 19.** VCs a  $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$  de la adición de glifosato a) 0, b) 8000, c) 800, d) 80, e) 8, f) 0.8, g)  $0.08 \mu\text{M}$  al sistema  $12 \text{ mM}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en amortiguador de amplio espectro pH 4. (Elaboración propia, 2017).

A partir de los voltamperogramas de la figura 19 se obtuvieron los valores de corriente de pico a cada concentración de glifosato y se compararon con los obtenidos mediante la curva de calibración. Estos datos se presentan en la tabla 5.

**Tabla 5.** Comparación de los valores de  $I_{pc}$  obtenidos a partir de la curva de calibración (muestras sintéticas) y muestras de maíz. (Elaboración propia, 2017)

[gly] $\mu\text{M}$	$I_{pc}$ (CURVA DE CALIBRACIÓN) / $\mu\text{A}$	$I_{pc}$ (MUESTRAS DE MAÍZ) / $\mu\text{A}$	Precisión / $\mu\text{A}$	Error absoluto / $\mu\text{A}$	Error relativo
0.08	-38.6666	-37.5628	$-38.6\pm 0.0$	0.0166	0%
0.8	-32.8633	-28.4591	$-32.8\pm 0.0$	2	6%
8	-28.34333	-26.4354	$-28.3\pm 0.0$	1.88	7%
80	-25.6733	-22.6409	$-25.6\pm 0.0$	0.3333	1%
800	-21.2366	-19.8394	$-21.2\pm 0.0$	0.12	1%
8000	-18.4637	-18.7546	$-18.4\pm 0.0$	0.2333	1%

Como puede observarse, existe una gran similitud entre los valores de  $I_{pc}$  obtenidos a partir de la curva de calibración y los provenientes de las muestras de maíz, Por lo tanto es posible afirmar que los electrodos poseen suficiente sensibilidad para la determinación de glifosato en muestras reales de maíz.

### 2.3 CONCLUSIONES

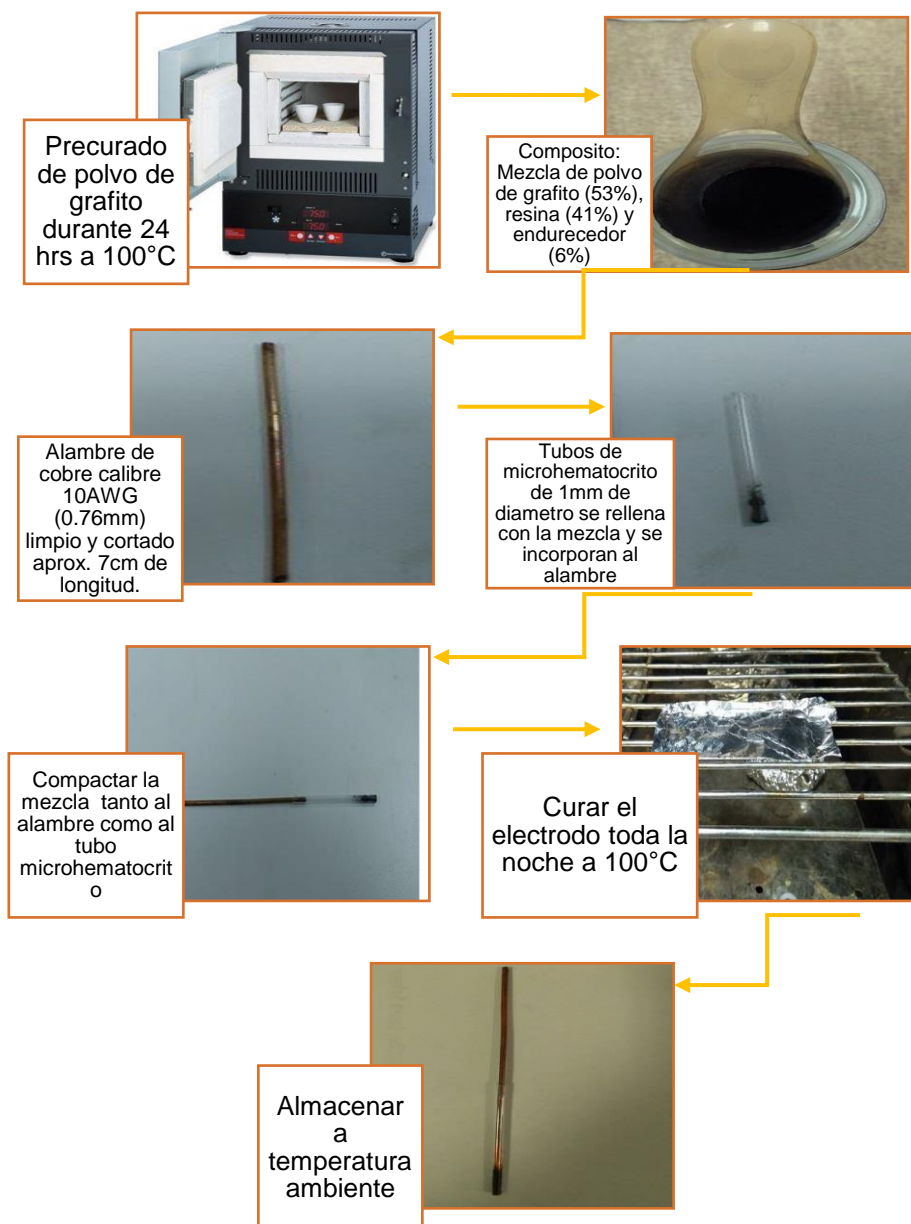
1. Para la modificación de los electrodos GE con MWCNTs, la combinación de la funcionalización superficial con grupos -COOH y el uso del surfactante CTAB permite una dispersión estable de los nanotubos de carbono en agua, tal como se corroboró por los análisis de turbidimetría.
2. A partir de la caracterización electroquímica y morfológica por AFM, fue posible determinar la efectividad de la adsorción física de la enzima HRP sobre los electrodos GE/MWCNTs, y se determinó que dicha enzima adopta configuraciones globulares por la aglomeración de la proteína.
3. Los electrodos GE/MWCNTs-HRP presentaron excelente estabilidad respecto al ciclado por voltamperometría; además de que fue posible la cuantificación de glifosato mediante la inhibición de la actividad enzimática por la presencia del herbicida.
4. Mediante la elaboración de electrodos de GE/MWCNTs-HRP fue posible la detección de glifosato en granos de maíz utilizando un tratamiento de muestra poco complejo.



## ANEXOS

### Anexo I. Elaboración de electrodos de grafito epoxi (GE)

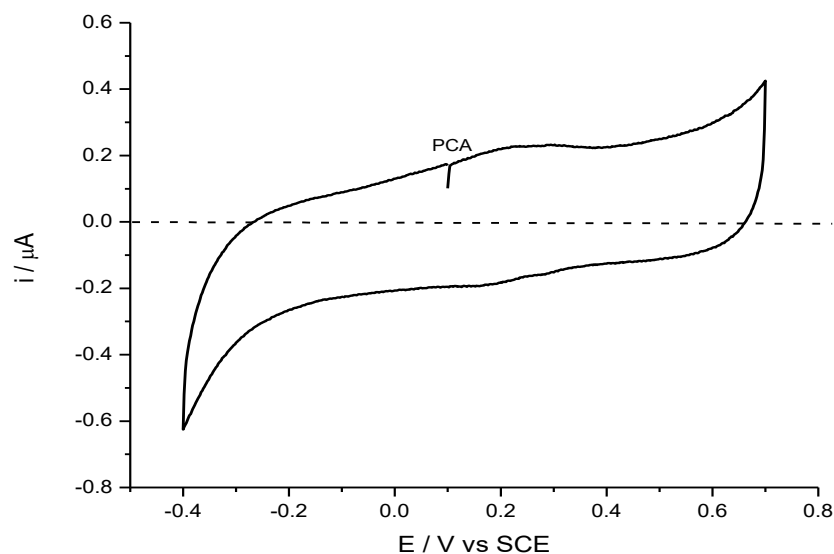
Se elaboraron los electrodos de GE siguiendo la metodología establecida en el laboratorio (Ramos, 2005), la cual se ilustra en el siguiente esquema:



**Anexo II** Diagrama del proceso de elaboración de electrodos GE (Elaboración propia, con información de (Ramos, 2005).

## I.II Caracterización por voltimetría cíclica de los electrodos GE

Los electrodos de GE se caracterizaron mediante la técnica de voltimetría cíclica (VC). Los experimentos fueron realizados utilizando como electrolito soporte soluciones de amortiguador de amplio espectro a pH 4; como contraelectrodo un electrodo de platino, como electrodo de referencia uno de calomel ( $\text{Hg}/\text{HgCl}/\text{KCl}$  sat), y como electrodo de trabajo el de grafito-epoxi (GE). Considerando los límites de potencial debido a la evolución de hidrógeno y oxígeno se seleccionó la ventana de trabajo de -0.4 a 0.7 V, imponiendo un barrido de potencial de  $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$  desde el potencial a circuito abierto 0.1 V ( $O_{cp}$ ). La siguiente figura muestra la curva característica de corriente en función del potencial de un electrodo GE.



**Anexo I II.** Voltamperograma de blanco de GE a potencial de circuito abierto de 0.1 V, dirección anódica, en amortiguador de amplio espectro pH 4. (Elaboración propia, 2017)

Como se observa en el gráfico anterior, en el intervalo de -0.3 a 0.6 V, la corriente que circula en la interfase electrodo de trabajo-disolución, es independiente del potencial aplicado (carga almacenada) por lo que su comportamiento corresponde al de un capacitor idealmente polarizable. A partir de la caracterización electroquímica de los electrodos GE, solo se seleccionaron aquellos que presentaron el mismo perfil voltamperométrico, a fin de garantizar la reproducibilidad y repetibilidad de los experimentos al momento de su modificación superficial.

## Anexo II. Electroforesis

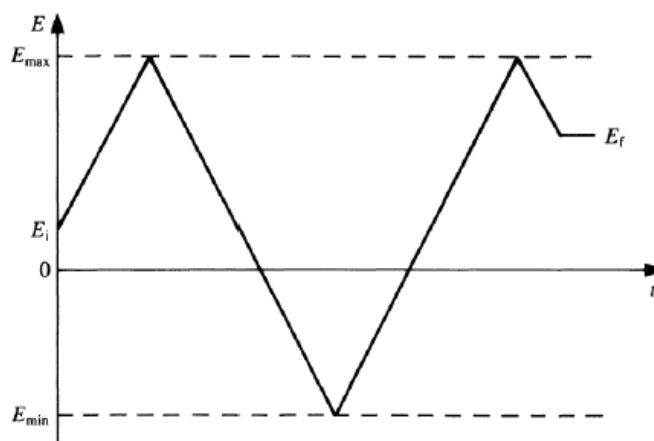
La electroforesis es una técnica que actúa bajo la aplicación de un campo eléctrico en una suspensión permitiendo la migración de partículas o iones hacia un electrodo de trabajo de carga contraria, formando un recubrimiento que va desde monocapas hasta multicapas, es de fácil manipulación por lo que posibilita tener un control de las variables responsables del depósito, además de ser una técnica de bajo costo. La configuración del sistema para el depósito de las moléculas fue el siguiente: la fuente de poder de corriente directa, conectada a su vez al electrodo de GE quien actúa como cátodo y a una lámina delgada de acero previamente pulida actuando como ánodo (Figura II.I)



Figura II.I Sistema electroforético

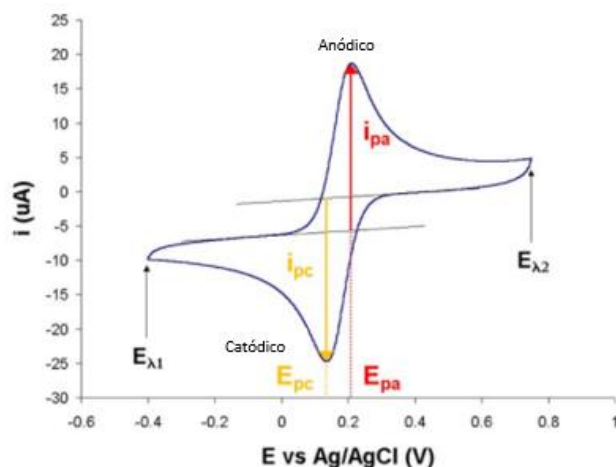
### Anexo III Voltamperometría Cíclica (VC)

La voltamperometría cíclica (VC) es una técnica electroquímica de amplia aplicación para análisis cinéticos y de mecanismos de reacción de sistemas redox, proporciona información sobre la reversibilidad o irreversibilidad de una reacción electroquímica y permite conocer de manera rápida los potenciales redox de compuestos electroactivos. La técnica consiste en aplicar un potencial ( $E$ ) que varía linealmente con el tiempo al electrodo de trabajo (WE) respecto a un electrodo de referencia (RE). Este barrido comienza desde un potencial inicial ( $E_i$ ) hasta un potencial máximo ( $E_{max}$ ) y es entonces cuando el barrido es invertido hasta llegar a un potencial mínimo ( $E_{min}$ ). Esta variación de potencial se ilustra en la Figura III.I. La velocidad de barrido puede variar desde  $10 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$  hasta  $1000 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$  dependiendo del ancho de banda del potenciostato, mientras que los límites de potencial están determinados por el desprendimiento de hidrogeno y oxígeno en medio acuoso. Dichos valores dependen del material de electrodo, electrolito, pH de la disolución y temperatura, entre otras variables.



**Anexo III.I** Perturbación en voltametría cíclica

Esta señal de excitación de potencial triangular de potencial barre el potencial del electrodo de trabajo en dirección de ida y vuelta entre dos valores designados (ventana de potencial). Este proceso se realiza de manera cíclica y permite la visualización de un gráfico llamado voltamperograma cíclico ( $i$  vs  $E$ ) con las formas de las ondas catódica (reducción) y anódica (oxidación) (Figura III.II)

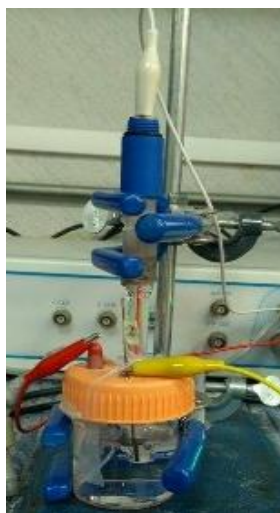


**Anexo III.II** Voltamperograma cíclico

Los parámetros de interés de un voltamperograma cíclico son las magnitudes de la corriente anódica del pico anódico ( $i_{pa}$ ) y pico catódico ( $i_{pc}$ ) el potencial del pico anódico, ( $E_{pa}$ ) y el potencial del pico catódico, ( $E_{pc}$ ) y el potencial de media onda ( $E_{1/2}$ ).

### III.II Instrumentación Electroquímica y celda de trabajo

Todos los experimentos se realizaron en una celda electroquímica convencional de tres electrodos utilizando como electrolito soporte 30 mL de buffer de amplio espectro pH 4, como contraelectrodo un electrodo de platino, como electrodo de referencia uno de calomel (Hg/HgCl/KCl sat) (SCE) y como electrodo de trabajo GE/Agnps o GE/MWCNTs-HRP según sea el caso, cada estudio se realizó en atmosfera de  $N_2$  a  $25^\circ C$  (Figura III.III)



**Anexo III.III** Diseño de la celda electroquímica.

En todos los ensayos se usaron los siguientes parámetros a menos que se especifique lo contrario: una ventana de potencial de -0.7 V a 0.7 V con una velocidad de barrido  $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$  usando como potencial inicial el potencial de reposo o de circuito abierto del sistema (Ocp). La respuesta electroquímica fue registrada por un potenciostato-galvanostato marca PAR, modelo 7.8, acoplado a una PC software Windows 2000.

#### Anexo IV Amortiguador de amplio espectro pH 4

El amortiguador se preparó a partir de dos soluciones stock con las siguientes concentraciones; solución "A": Ácido bórico 0.2 M, Ácido cítrico 0.05 M (solución ácida), solución "B": Fosfato de sodio tribásico 0.1 M (solución básica). La mezcla de ambas soluciones cubre un amplio rango de pH que va desde 2.0 a 12.0 la siguiente tabla muestra el volumen de cada solución stock y el pH obtenido para preparar 200 mL de amortiguador.

**Anexo IV.I Tabla** Volumen de solución ("A") y solución ("B") para preparar amortiguador.

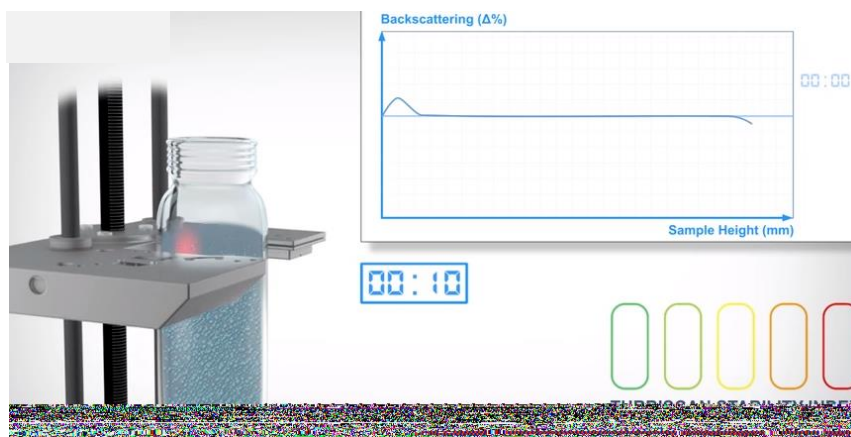
pH	SOLUCIÓN "A" (mL)	SOLUCIÓN "B" (mL)
2.0	195	5
2.5	184	16
3.0	176	24
3.5	166	34
4.0	155	45
4.5	144	56
5.0	134	66
5.5	126	74
6.0	118	82
6.5	109	91
7.0	99	101
7.5	92	108
8.0	85	115
8.5	78	122
9.0	69	131
9.5	60	140
10.0	54	146
10.5	49	151
11.0	44	156
11.5	33	167
12.0	17	183

De esta manera se preparó el amortiguador a pH 4 que se utilizó para todos los ensayos realizados, en todos los casos se evaluó el pH del amortiguador con un potenciómetro marca OAKLON modelo pH 700.

## Anexo V. Turbidimetría

La turbidimetría determina la cantidad de luz retenida por la materia en la suspensión. Cuando la luz incide en forma de fotones en una suspensión, parte de la energía se dispersa (retodifusión) por las partículas en suspensión, otra parte se absorbe y otra se transmite.

En un turbidímetro instrumento utilizado para realizar la medición, se liberan un pulso de fotones que son detectados en modo de transmisión y retrodifusión por sus respectivos sensores. La interpretación de la secuencia que muestra la señal permite determinar si la emulsión es estable o si ésta sigue un mecanismo de desestabilización. En consecuencia, el equipo mide los parámetros de retrodifusión y energía transmitida en función de la longitud de la celda en donde se coloca la muestra (Figura V.I)



Anexo V.I Sistema de Turbidimetría

## REFERENCIAS

- Acquavella, J.**, Alexander, H., Mandel, S., Gustin, C., Baker, B., Chapman, P., Bleeke, M. (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>
- Alfaro, P. R.** (2013). Herbicidas asociados a la caña de azúcar y su potencial contaminación del medio ambiente. Programa Agronomía. Liga Agrícola Industrial de la Caña de Azúcar LAICA Departamento de Investigación y Extensión de la Caña de Azúcar DIECA.
- Amine, A.**, Mohammadi, H., Bourais, I., Palleschi, G. (2006). Enzyme inhibition-based biosensors for food safety and environmental monitoring. *Biosens Bioelectron*, 15(21), 1405–1423. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2005.07.012>
- Andresa, F.**, Carmo, R. (2007). Voltammetric determination of glyphosate in natural waters with a copper electrode. *Química Nova*, 30(7), 1678. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422007000700018>
- Arbuckle, E.**, Lin, Z., & Mery, S. (2001). An exploratory analysis of the effect of pesticide exposure on the risk of spontaneous abortion in an Ontario farm population. *Environmental Health Perspectives*, 109(8), 851–857. <https://doi.org/10.1289/ehp.01109851>
- Bakker, E.**, Telting-Diaz, M. (2002). Electrochemical sensors. *Analytical Chemistry*, 74(12), 2781–2800. <https://doi.org/10.1021/ac0202278>
- Benítez-Cardoza, G.**, & PfeifferPerea, H. (2006). El Maíz: Origen, composición Química y Morfología. *Materiales Avanzados*.
- Brett, A.**, Oliveira-Brett, A. M. (2011). Electrochemical sensing in solution—origins, applications and future perspectives. *Journal of Solid State Electrochemistry*, 15(7–8), 1487–1494. <https://doi.org/10.1007/s10008-011-1447-z>
- Calvo, G.**, Arenillas, A., Menéndez, J. A., González, M., & Viera, J. C. (2009). Propiedades, ventajas e inconvenientes de los materiales utilizados en supercondensadores. *Afinidad*, 66(543), 380–387. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-77953319895&partnerID=40&md5=b81736bcd8f5e94871586666ea454ac3>

- Casabé, N.**, Piola, L., Fuchs, J., Oneto, M. L., Pamparato, L., Basack, S., Kesten, E. (2007). Ecotoxicological assessment of the effects of glyphosate and chlorpyrifos in an Argentine soya field. *Journal of Soils and Sediments*, 7(4), 232–239. <https://doi.org/10.1065/jss2007.04.224>
- 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>
- Chien-Jung, H.**, Pin-Hsiang, C., Yeong-Her, Wang., Kan-Lin, C., Jing-Jenn, L., Cheng-Fu, Y. (2006). Electrochemically Controlling the Size of Gold Nanoparticles. *The Electrochemical Society*, 153(12), 193–198. <https://doi.org/10.1149/1.2358103>
- Clements, C.**, Ralph, S., & Petras, M. (1997). Genotoxicity of select herbicides in *Rana catesbeiana* tadpoles using the alkaline single-cell gel DNA electrophoresis (Comet) assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 29(3), 277–288. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2280\(1997\)29:3<277::AID-EM8>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2280(1997)29:3<277::AID-EM8>3.0.CO;2-9)
- CNPAMM.** (2016). *Maíz producción mundial 2016/2017*. Recuperado de <https://cnpamm.org.mx/2016/09/19/maiz-produccion-mundial-20162017-2/>
- CODEX alimentarius.** (2011). Pesticide Residues in Food and Feed. Recuperado de [http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/standards/pestres/pesticide-detail/en/?p\\_id=158](http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/standards/pestres/pesticide-detail/en/?p_id=158)
- COFEPRIS.** (2009). *Catalogo de plaguicidas*. Recuperado de <http://www.cofepris.gob.mx/AZ/Paginas/Plaguicidas%20y%20Fertilizantes/CatalogoPlaguicidas.aspx>
- CONICET.** (2009). *Evaluación de la Información Científica vinculada al Glifosato en su incidencia sobre la Salud Humana y el Ambiente*. Buenos Aires
- Dave, H.**, Gary, B., Anne, M. (2005). *Glyphosate Residues in Alberta's Atmospheric Deposition, Soils, and Surface Waters*. Water Research Users Group Alberta Environment. Canada.
- Savitz, A.**, Tye, A., Kaczor, D., Kathryn, M. (1997). Male pesticide exposure and pregnancy outcome. *American Journal of Epidemiology*, 146(12), 1025–1036.

- EC.** (2005). EU legislation on MRLs. Recuperado de [https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/max\\_residue\\_levels/eu\\_rules\\_en](https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/max_residue_levels/eu_rules_en)
- EPA.** (2010). Index to Pesticide Chemical Names , Part 180 Tolerance Information , and Food and Feed Commodities ( by Commodity ). Environmental Protection Agency .
- Fang, W.,** Shengshui, H., (2009). Electrochemical sensors based on metal and semiconductor nanoparticles. *Microchimica Acta*, 165(1–2), 1–22. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s00604-009-0136-4>
- FAOSTAT.** (2015). Plaguicidas uso. Recuperado de <http://www.fao.org/statistics/es/>
- Frenken, K.,** & Gillet, V. (2012). Irrigation water requirement and water withdrawal by country. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, 264. Obtenido de [http://www.fao.org/nr/water/aquastat/water\\_use\\_agr/IrrigationWaterUse.pdf%0Ahttp://www.fao.org/nr/water/aquastat/water\\_use\\_agr/index.stm](http://www.fao.org/nr/water/aquastat/water_use_agr/IrrigationWaterUse.pdf%0Ahttp://www.fao.org/nr/water/aquastat/water_use_agr/index.stm)
- Gasnier, C.,** Dumont, C., Benachour, N., Clair, E., Chagnon, M. C., & Séralini, G. E. (2009). Glyphosate-based herbicides are toxic and endocrine disruptors in human cell lines. *Toxicology*, 262(3), 184–191. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2009.06.006>
- Gosciny, S.,** Unterluggauer, H., Aldrian, J., Hanot, V., & Masselter, S. (2012). Determination of Glyphosate and Its Metabolite AMPA (Aminomethylphosphonic Acid) in Cereals After Derivatization by Isotope Dilution and UPLC-MS/MS". *Food Analytical Methods*, 5(5), 1177–1185. <https://doi.org/10.1007/s12161-011-9361-7>
- Granby, K.,** Johannesen, S., Vahl, M. (2003). Analysis of glyphosate residues in cereals using liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS). *Food Additives and Contaminants*, 20(8), 692–698. <https://doi.org/10.1080/0265203031000109477>
- Grossbard, E.** (1985). *The Herbicide Glyphosate*. London.
- Guevara, S. A. G.** (2016). Proposición con punto de acuerdo para que el senado de la república exhorte a diversas entidades estatales a emitir información sobre el herbicida de acción total llamado glifosato.
- Guilherme, S.,** Gaivão, I., Santos, M. A., & Pacheco, M. (2010). European eel (*Anguilla anguilla*) genotoxic and pro-oxidant responses following short-term exposure to Roundup® - A

- glyphosate-based herbicide. *Mutagenesis*, 25(5), 523–530.  
<https://doi.org/10.1093/mutage/geq038>
- Guyton, Z.**, Loomis, D., Grosse, Y., El Ghissassi, F., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Zeise, L. (2015). Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate. *The Lancet Oncology*, 16(5), 490–491. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)70134-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)70134-8)
- Hao, C.**, Morse, D., Morra, F., Zhao, X., Yang, P., & Nunn, B. (2011). Direct aqueous determination of glyphosate and related compounds by liquid chromatography/tandem mass spectrometry using reversed-phase and weak anion-exchange mixed-mode column. *Journal of Chromatography A*, 1218(33), 5638–5643. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.06.070>
- IARC.** (2015). Evaluation of five organophosphate insecticides and herbicides. *Environmental Health*, 112(1), 425–433. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.03.104>
- In-Yup, J.**, Dong, W., Chang, B., Nanjundan, A., Jong, B. (2011). Functionalization of Carbon Nanotubes. <https://doi.org/10.1080/09297040802385400>
- IPCS.** (1994). IPCS Environmental Health Criteria 159: Glyphosate.
- Jayasumana, C.**, Paranagama, P., Agampodi, S., Wijewardane, C., Gunatilake, S., & Siribaddana, S. (2015). Drinking well water and occupational exposure to Herbicides is associated with chronic kidney disease, in Padavi-Sripura, Sri Lanka. *Environmental Health*, 14(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/1476-069X-14-6>
- Jian-Lung, H.**, Yu-Chen, C. (2009). Direct electrochemistry and biosensing of hydrogen peroxide of horseradish peroxidase immobilized at multiwalled carbon nanotube/alumina-coated silica nanocomposite modified glassy carbon electrode. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 140(1), 267–272. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.snb.2009.04.033>
- Jiménez, C.**, & León, D. E. (2009). Biosensors: Implementation and Outlook in the Control and Process Quality and Foodstuffs. *Facultad de Química Farmacéutica*, 16(1), 144–154. Obtenido de <http://aprendeenlinea.udea.edu.co/revistas/index.php/vitae/article/view/1436>
- Jinjie, Y.**, Xiang, Q., Liwen, Y., Guolin, H., Jun, L., Jianxin, Z. (2011). A hydrogen peroxide electrochemical sensor based on silver nanoparticles decorated silicon nanowire arrays. *Electrochimica Acta*, 56(11), 3884–3889. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.electacta.2011.02.033>

- Pingarrón, M.,** Yáñez, S., González, C. (2008). Gold nanoparticle-based electrochemical biosensors. *Electrochimica Acta*, 53(19), 5848–5866. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.electacta.2008.03.005>
- Prüss, U.,** Wolf, J., Corvalán, C., Bos, R., Neira, M. (2016). *Preventing disease through healthy environments A global assessment of the burden of disease from*. OMS
- Juan, A.,** Picó, Y., Font, G. (2003). Revisión de los métodos de determinación de residuos de plaguicidas organofosforados en alimentos. *Revista de Toxicología*, 20(3), 166–175.
- Kang, C.,** Yonghai, S., Yong, Y., Zhenzhong, H., Li, W. (2008). A novel hydrogen peroxide sensor based on Ag nanoparticles electrodeposited on DNA-networks modified glassy carbon electrode. *Electrochemistry Communications*, 10(4), 663–667. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.elecom.2008.02.016>
- Kaya, B.,** Creus, A., Yanikoğlu, A., Cabré, O., & Marcos, R. (2000). Use of the Drosophila wing spot test in the genotoxicity testing of different herbicides. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 36(1), 40–46. [https://doi.org/Doi 10.1002/1098-2280\(2000\)36:1<40::Aid-Em6>3.0.Co;2-K](https://doi.org/Doi 10.1002/1098-2280(2000)36:1<40::Aid-Em6>3.0.Co;2-K)
- Kelly, W.,** Poulin, R., Tompkins, M., & Townsend, 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>
- Kimmel, W.,** Leblanc, G., Meschievitz, E., & Cliffel, E. (2012). Electrochemical sensors and biosensors. *Analytical Chemistry*, 84(2), 685–707. <https://doi.org/10.1021/ac202878q>
- Paliwal, R.** (2001). *El maíz en los trópicos: mejoramiento y producción*. FAO. Roma, Italia. <https://doi.org/Deposito de Documentos de la FAO>
- Lajmanovich, C.,** Sandoval, M. T., & Peltzer, P. M. (2003). Induction of mortality and malformation in *Scinax nasicus* tadpoles exposed to glyphosate formulations. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. <https://doi.org/10.1007/s00128-003-0029-x>
- Ley de Sanidad Fitopecuaria.** (1974). *Diario Oficial de la Federación*. Recuperado de <http://bibliotecasibe.ecosur.mx/sibe/book/000008675>

- Ley federal de sanidad vegetal.** (2011). *Diario Oficial de la Federación*. Recuperado de [http://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=4654906&fecha=05/01/1994](http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4654906&fecha=05/01/1994)
- Lioi, B.,** Scarfi, R., Santoro, A., Barbieri, R., Zeni, O., Di Berardino, D., Ursini, V. (1998). Genotoxicity and oxidative stress induced by pesticide exposure in bovine lymphocyte cultures in vitro. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 403(1–2), 13–20. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(98\)00010-4](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(98)00010-4)
- Luo, X.,** Morrin, A., Killard, A. J., & Smyth, M. R. (2006). Application of Nanoparticles in Electrochemical Sensors and Biosensors. *Electroanalysis*, 18(4), 319–326. <https://doi.org/10.1002/elan.200503415>
- Lupwayi, Z.,** Harker, N., Clayton, W., O'Donovan, T., Blackshaw, E. (2009). Soil microbial response to herbicides applied to glyphosate-resistant canola. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 129(1–3), 171–176. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2008.08.007>
- Malherbología.** (2003). Control químico: herbicidas.
- Méndez, A.,** Suárez, F., Cortés, V.,. (2007). Electrochemical properties and electro-aggregation of silver carbonate sol on polycrystalline platinum electrode and its electrocatalytic activity towards glyphosate oxidation. *Electrochemistry Communications*, 9(10), 2585–2590. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.elecom.2007.08.008>
- Marc, J.,** Bellé, R., Morales, J., Cormier, P., Mulner, O. (2004). Formulated glyphosate activated the DNA-response checkpoint of the cell cycle leading to the prevention of G2/M transition. *Toxicological Sciences*, 82(2), 436–442. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfh281>
- Marcus, P.** (2017). *Corrosion Mechanisms in Theory and Practice* (Third Edit).
- Mesnager, R.,** Defarge, N., Spiroux de Vendômois, J., Séralini, E. (2015). Potential toxic effects of glyphosate and its commercial formulations below regulatory limits. *Food and Chemical Toxicology*, 84, 133–153. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.08.012>
- Méndez, A.,** Torres, R. (2014). Biosensores Enzimáticos. *Revista Digital Universitaria*, 15(12), 1–8.
- Monsanto Co.** (2008). Historia de los Herbicidas a base de Glifosato, 3. Recuperado de <http://www.monsanto.com/global/py/productos/documents/1-herbicidas-glifosato.pdf>

- Obour, K.,** Stahlman, W., Holman, D. (2016). Soil chemical properties as influenced by long-term glyphosate-resistant corn and soybean production in the central Great Plains, USA. *Geoderma*, 277, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2016.04.029>
- PANAP.** (2009). *Glyphosate. Glyphosate*. Recuperado de [www.panap.net](http://www.panap.net)
- Peluso, M.,** Munnia, A., Bolognesi, C., Parodi, S. (1998). 32P-Postlabeling detection of DNA adducts in mice treated with the herbicide Roundup. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 31(1), 55–59. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2280\(1998\)31:1<55::AID-EM8>3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2280(1998)31:1<55::AID-EM8>3.0.CO;2-A)
- Piperno, R.,** Flannery, K. V. (2001). The earliest archaeological maize (*Zea mays* L.) from highland Mexico: new accelerator mass spectrometry dates and their implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(4), 2101–3. <https://doi.org/10.1073/pnas.98.4.2101>
- Piperno, R.,** Ranere, J., Holst, I., Iriarte, J., Dickau, R. (2009). Starch grain and phytolith evidence for early ninth millennium B.P. maize from the Central Balsas River Valley, Mexico. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(13), 5019–5024. <https://doi.org/10.1073/pnas.0812525106>
- Poletta, L.,** Larriera, A., Kleinsorge, E., Mudry, D. (2009). Genotoxicity of the herbicide formulation Roundup® (glyphosate) in broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*) evidenced by the Comet assay and the Micronucleus test. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 672(2), 95–102. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2008.10.007>
- PRiF.** (2017). Report on the Pesticide Residues Monitoring Programme: Quarter 1 2017. *Department for Environment, Food and Rural Affairs*, (November).
- Food Democracy now and Detox Project** (2016). *Glyphosate: Unsafe on Any Plate Alarming levels of Monsanto's glyphosate found in popular American foods*. Retrieved from <http://apps.who.int/iris/>
- Quaghebeur, D.,** De Smet, B., De Wulf, E., & Steurbaut, W. (2004). Pesticides in rainwater in Flanders, Belgium: results from the monitoring program 1997-2001. *Journal of Environmental Monitoring: JEM*, 6(3), 182–90. <https://doi.org/10.1039/b312558k>
- Ramos, R.** (2005). Elaboración de electrodos grafito-epoxi (GE), modificados con nanotubos de carbono (GE/MWCNTs), modificados con nanopartículas de oro (GE/Au-Np), modificados con

nanotubos de carbono-nanopartículas de oro (GE/MWCNTs/Au-Np), para su uso potencial como bios. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Puebla.

- Rausch, J., Zhuang, C., Mäder, E.** (2010). Surfactant assisted dispersion of functionalized multi-walled carbon nanotubes in aqueous media. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*, 41(9), 1038–1046. <https://doi.org/10.1016/j.compositesa.2010.03.007>
- Renobales, Scheifler.,** (2009). Alimentos más sostenibles: las semillas transgénicas en la agricultura ecológica More Sustainable Food: Transgenic Seeds in Ecological Agriculture, 125.
- S.Trasatti., Petrii., A.** (1992). Real surface area measurements in electrochemistry. *Electroanalytical Chemistry*, 327(1), 353–376. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0022-0728\(92\)80162-W](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0022-0728(92)80162-W)
- Salbego, J., Pretto, A., Gioda, R., De Menezes, C., Lazzari, R., Radünz, J., Baldisserotto, B., Lucia, L.** (2010). Herbicide formulation with glyphosate affects growth, acetylcholinesterase activity, and metabolic and hematological parameters in Piava (*Ieporinus obtusidens*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 58(3), 740–745. <https://doi.org/10.1007/s00244-009-9464-y>
- Sally, M., Alex, T., Vale, J.** (2004). Glyphosate poisoning. *Toxicol Rev.*, 23(3), 159–167. <https://doi.org/10.2165/00139709-200423030-00003>
- Schinasi, L., & Leon, E.** (2014). Non-hodgkin lymphoma and occupational exposure to agricultural pesticide chemical groups and active ingredients: A systematic review and meta-analysis. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 11(4), 4449–4527. <https://doi.org/10.3390/ijerph110404449>
- Séralini, E., Clair, E., Mesnage, R., Gress, S., Defarge, N., Malatesta, M., De Vendômois, S.** (2014). Republished study: long-term toxicity of a Roundup herbicide and a Roundup-tolerantgenetically modified maize. *Environmental Sciences Europe*, 26(1), 14. <https://doi.org/10.1186/s12302-014-0014-5>
- Shin, Y., Premkumar, T., Geckeler, E.** (2008). Dispersion of single-walled carbon nanotubes by using surfactants: Are the type and concentration important? *Chemistry - A European Journal*, 14(20), 6044–6048. <https://doi.org/10.1002/chem.200800357>
- Sierra, V., Méndez, A., Sarria, M., Cortés, T.** (2008). Electrooxidación de glifosato sobre electrodos de níquel y cobre. *Química Nova*, 31(2), 220–226. <https://doi.org/10.1590/S0100->

40422008000200006

- Silva, C.**, (2005). *Maiz genéticamente modificado*. *Agro-Bio* (Vol. 1). Recuperado de [www.agrobio.org](http://www.agrobio.org)
- Śliwak, A.**, Grzyb, B., Ćwikła, J., Gryglewicz, G. (2013). Influence of wet oxidation of herringbone carbon nanofibers on the pseudocapacitance effect. *Carbon*, 64, 324–333. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2013.07.082>
- Songa, A.**, Arotiba, A., Owino, J., Jahed, N., Baker, P., Iwuoha, 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>
- Songa, A.**, Somerset, S., Waryo, T., Baker, P. L., Iwuoha, I. (2009). Amperometric nanobiosensor for quantitative determination of glyphosate and glufosinate residues in corn samples. *Pure and Applied Chemistry*, 81(1), 123–139. <https://doi.org/10.1351/PAC-CON-08-01-15>
- Suárez, F.**, Morales, A., Gálvez, A. (2013). Importance of Mexican Maize Landraces in the National Diet . an Essential Review. *Revista Fitotecnica Mexicana*, 36, 275–283.
- Tadeo, L.**, Sánchez, C., Pérez, A., Fernández, D. (2000). Analysis of herbicide residues in cereals, fruits and vegetables. *Journal of Chromatography A*, 882(1–2), 175–191. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00103-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00103-5)
- Tesfamariam, T.**, Bott, S., Cakmak, I., Römheld, V., Neumann, G. (2009). Glyphosate in the rhizosphere-Role of waiting times and different glyphosate binding forms in soils for phytotoxicity to non-target plants. *European Journal of Agronomy*, 31(3), 126–132. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2009.03.007>
- UNAM.** (2009). Centros de origen, pueblos indígenas y diversificación del maíz. *Red de Revistas Científicas de América Latina, El Caribe, España Y Portugal*, 18–28.
- UNL.** (2010). Informe del grado de toxicidad del glifosato UNL. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(9), 1689–1699. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Vera, S.**, Lagomarsino, L., Sylvester, M., Pérez, L., Rodríguez, P., Mugni, H., Pizarro, H. (2010). New evidences of Roundup® (glyphosate formulation) impact on the periphyton community and the water quality of freshwater ecosystems. *Ecotoxicology*, 19(4), 710–721.

<https://doi.org/10.1007/s10646-009-0446-7>

- Wang, L.,** Bi, Y., Hou, J., Li, H., Xu, Y., Wang, B., Ding, L. (2016). Facile, green and clean one-step synthesis of carbon dots from wool: Application as a sensor for glyphosate detection based on the inner filter effect. *Talanta*, 160, 268–275. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.07.020>
- Wauchope, D.** (1976). Acid dissociation constants of arsenic acid, methylarsonic acid (MAA), dimethylarsinic acid (cacodylic acid), and N-(phosphonomethyl)glycine (glyphosate). *Agricultural and Food Chemistry*, 24(4), 717–721. <https://doi.org/10.1021/jf60206a010>
- Wenbo, L.,** Guohui, C., Yonglan, L., Fang, L. (2011). Method for effective immobilization of Ag nanoparticles/graphene oxide composites on single-stranded DNA modified gold electrode for enzymeless H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detection. *Materials Science*, 46(5260). <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s10853-011-5464-1>
- Xiaoyan, L.,** Yuanxiang, L., Lichun, Z., Mingjun, D., Zhonghua, X., Xiaoquan, L. (2013). A novel nonenzymatic hydrogen peroxide sensor based on silver nanoparticles and ionic liquid functionalized multiwalled carbon nanotube composite modified electrode. *Electrochimica Acta*, 113, 170–175. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.electacta.2013.09.049>
- Yamada, J.,** Tomiyama, H., Yambe, M., Koji, Y., Motobe, K., Shiina, K., Yamashina, A. (2006). Elevated serum levels of alanine aminotransferase and gamma glutamyl transferase are markers of inflammation and oxidative stress independent of the metabolic syndrome Atherosclerosis, .
- Yamada, T.,** Kremer, J., De Camargo e Castro, R., Wood, W. (2009). Glyphosate interactions with physiology, nutrition, and diseases of plants: Threat to agricultural sustainability? *European Journal of Agronomy*, 31(3), 111–113. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2009.07.004>
- Yuanhong, X.,** Wang, E. (2012). Electrochemical biosensors based on magnetic micro/nano particles. *Electrochimica Acta*, 84(1), 62–73. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.electacta.2012.03.147>