



00550

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS**

**DESARROLLO DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS
DE RESIDUOS DE GLIFOSATO Y SU PRODUCTO DE DEGRADACIÓN (AMPA) EN
JITOMATE**

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.F.B. LIZTLI GÓMEZ ALMARAZ



TUTOR: Dra. Martha Patricia García Camacho AÑO: 2005

m. 341152



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos:

A la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM por la beca otorgada para realizar estudios de maestría durante el ciclo 2001-2003.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM por la beca y recursos otorgados al proyecto PAPIIT IN203302: Extracción de contaminantes orgánicos en adsorbentes con matrices biológicas dispersas.

Al Seminario Académico José F. Herrán Arellano por los recursos otorgados.

El trabajo de tesis se realizó en el:

Laboratorio 301

Conjunto E

Facultad de Química, UNAM

ÍNDICE GENERAL

Lista de abreviaturas	III
Resumen	
1 INTRODUCCIÓN	1
2 OBJETIVO	5
3 GENERALIDADES	6
3.1 Definiciones	6
3.2 Usos de plaguicidas en México	6
3.3 Normatividad	7
3.4 Características del glifosato	9
3.4.1 Propiedades fisicoquímicas	9
3.4.2 Modo de acción	10
3.4.3 Toxicología	11
3.5 Generalidades sobre el pretratamiento de muestras con fases sólidas	12
3.5.1 Extracción en fase sólida	13
3.5.1.1 Extracción por intercambio iónico	15
3.5.2 Dispersión de la matriz en fase sólida	18
3.6 Métodos analíticos para la determinación de glifosato y AMPA en muestras agrícolas	23
3.6.1 Análisis cromatográfico	24
3.6.1.1 Cromatografía de gases	24
3.6.1.2 Cromatografía de líquidos	25
3.6.2 Preparación de muestras	29
4 DESARROLLO EXPERIMENTAL	34
4.1 Instrumentos, equipos y accesorios	34
4.2 Reactivos	34
4.3 Metodología	36
5 RESULTADOS Y ANÁLISIS	57
5.1 Análisis de glifosato y AMPA por CLAE	57
5.1.1 Derivación precolumna con el reactivo FMOC-Cl y detección por fluorescencia	57
5.1.2 Optimización de la separación analítica en una columna con sílice C ₁₈	57

5.1.2.1	Variación de la retención de los derivados de glifosato y AMPA con diferentes mezclas de agua / ACN	58
5.1.2.2	Efecto del porcentaje de ACN presente en la mezcla de la reacción de derivación en la forma del pico cromatográfico del derivado de AMPA	60
5.1.2.3	Elución cromatográfica del reactivo derivatizante FMOC-Cl	62
5.1.3	Condiciones cromatográficas seleccionadas para realizar el análisis de extractos	65
5.1.4	Evaluación del sistema cromatográfico	65
5.2	Desarrollo de la metodología para la preparación de muestras	66
5.2.1	Ensayos por extracción en fase sólida	66
5.2.1.1	Ensayo en C ₁₈	66
5.2.1.2	Ensayos en NH ₂	66
5.2.1.3	Ensayos en SCX-Na	70
5.2.1.4	Ensayos en SAX	71
5.2.2	Efecto de la matriz en la extracción de glifosato con el adsorbente amino	76
5.2.3	Ensayos por dispersión de la matriz en fase sólida	79
5.2.3.1	Extracción de glifosato	79
5.2.3.2	Extracción de AMPA	86
5.2.4	Limpieza de los extractos obtenidos por DMFS	90
5.2.4.1	Limpieza del extracto de glifosato	90
5.2.4.2	Limpieza del extracto de AMPA	92
5.2.5	Optimización del método de preparación de la muestra	93
5.2.5.1	Estudio de reproducibilidad, recobro y límite de detección	96
6	CONCLUSIONES	101
7	REFERENCIAS Y BIBLIOGRAFÍA	103
	Anexo I: Condiciones analíticas para la reacción de derivación precolumna con el reactivo FMOC-Cl	111
	Índices	112
	Índice de tablas	112
	Índice de diagramas	113
	Índice de figuras	114

Lista de abreviaturas

ACN	Acetonitrilo
AMPA	Acido aminometilfosfónico
CFR	Código Federal de Regulaciones de los EUA, por sus siglas en inglés
CG	Cromatografía de gases
CIA	Cromatografía de intercambio aniónico
CIC	Cromatografía de intercambio catiónico
CICOPLAFEST	Comisión Intersecretarrial para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas y Sustancias Tóxicas
CIL	Cromatografía de intercambio de ligantes
CLAE	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia
CPG	Cromatografía de permeación en gel
C.V.	Coefficiente de variación
DCM	Diclorometano
DMFS	Dispersión de la matriz en fase sólida
d.e.	Desviación estándar
ELL	Extracción líquido-líquido
EM	Espectrometría de masas
EPA	Agencia de Protección del Medio Ambiente de los EUA, por sus siglas en inglés
EFS	Extracción en fase sólida
EUA	Estados Unidos de América
FAO	Organización de alimentos y agricultura de las Naciones Unidas, por sus siglas en inglés
FMOC-Cl	9-fluoroenilmetilcloroformato
Ha	Hectárea
HFB	Heptafluorobutanol
IPSC	Programa internacional sobre seguridad química, por sus siglas en inglés
IsoPCF	Isopropilcloroformato
k'	Factor de capacidad
K	Constante de reparto
K _{ow}	Coefficiente de reparto octanol/agua
LCM	Límite de cuantificación del método
LDM	Límite de detección del método
LNH	Linfoma no Hodgkin
LMC	Límite de contaminación máximo permitido
LMR	Límite máximo de residuo permitido
MeOH	Metanol
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPA	o-ftaldehído
ppb	Partes por billón
ppm	Partes por millón
SAGARPA	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
SAX	Intercambiador de aniones fuerte, por sus siglas en inglés
SCX	Intercambiador de cationes fuerte, por sus siglas en inglés
SIM	Monitoreo selectivo de iones, por sus siglas en inglés
TFAA	Acido Trifluoroacético anhidro
TLCAN	Tratado de Libre Comercio de América del Norte
t _m	Tiempo muerto
Ton	Toneladas
tr	Tiempo de retención
UV/Vis	Ultravioleta/Visible

Resumen

El glifosato, herbicida que afecta la reproducción y aumenta el riesgo de padecer cáncer en mamíferos, se aplica en una amplia variedad de cultivos en México, siendo el jitomate uno de los vegetales con mayor probabilidad de encontrarse contaminado por este plaguicida.

La necesidad de controlar los niveles de este contaminante en muestras vegetales es prioritaria. Sin embargo, la determinación analítica del glifosato y la de su producto de degradación, el ácido aminometilfosfónico (AMPA), es complicada debido a que estos compuestos no absorben en el espectro UV/Vis y tampoco fluorescen; además, su carácter extremadamente polar no permite su extracción con los disolventes convencionales ni su retención en fases estacionarias apolares, tan comúnmente utilizadas como las C_{18} . En la actualidad, el análisis de muestras de agua para la determinación de ambos compuestos se realiza mediante cromatografía de líquidos de alta eficiencia empleando una columna de intercambio iónico para la separación analítica, aprovechando sus propiedades zwitteriónicas, y una derivación post-columna con o-ftaldehído para la detección fluorimétrica (US EPA No. 86-63-1). El modo de detección tiene sensibilidad y selectividad elevadas, lo que permite realizar el análisis directo de las muestras. Este método es muy robusto y reproducible pero para aplicarlo a muestras más complejas, como frutos y vegetales, se requiere obligatoriamente de un pretratamiento con una metodología que permita la extracción y purificación de ambos compuestos. Hasta el momento existen pocos métodos aplicados a muestras vegetales y, por lo general, se basan en extracciones con disolventes, lo que conlleva un tiempo de tratamiento extenso y el uso de volúmenes grandes de disolventes y de muestra.

Por lo tanto, para contribuir en el mejoramiento de los métodos analíticos para la determinación de microcontaminantes en muestras complejas, en el presente trabajo se desarrolló un método más simple para la extracción y el análisis de glifosato y AMPA en el jitomate. La extracción se basó en la técnica de dispersión de la matriz en fase sólida (DMFS) con un grupo amino enlazado; realizando la limpieza del extracto en un intercambiador de aniones fuerte. La DMFS es una técnica de extracción reciente, que se aplica por primera vez al glifosato y AMPA, que presenta las ventajas de disminuir la cantidad de muestra requerida, así como los volúmenes de disolventes utilizados. El análisis de los extractos se efectuó por cromatografía de líquidos en fase inversa con detección del derivado fluorescente, obtenido de la reacción precolumna con el 9-fluoroenilmetilcloroformato. El recobro promedio obtenido con el método fue de 85 % (± 11.97) para glifosato y de 76 % (± 19.11) para AMPA. Los límites de detección fueron de $1.44 \mu\text{g g}^{-1}$ para glifosato y de $2.75 \mu\text{g g}^{-1}$ para AMPA, pudiendo disminuirse hasta 20 veces al duplicar la cantidad de muestra y de adsorbente, así como por medio de la evaporación de los extractos purificados.

1. INTRODUCCIÓN

La disminución en las expectativas de producción, debida a la incidencia de plagas y enfermedades, provocó que el aumento de la capacidad agrícola moderna haya ocurrido conforme se incrementó la aplicación de plaguicidas. En la actualidad, existen más de 865 ingredientes activos registrados como tales, de los cuales alrededor de 380 se podrían encontrar en frutos y vegetales frescos (www.epa.gov).

En México, en 1995, el volumen de plaguicidas utilizados ascendió a 54, 678 ton, de las cuales el 29% correspondió a herbicidas (Bernal, 2000). De ahí, la probabilidad de que sus residuos estén presentes dentro o en la superficie de los frutos de las plantas que se cultivan.

Uno de los herbicidas más utilizados a nivel mundial es el glifosato; tan solo en el año de 1998 se usaron 112,000 ton (Hardell, 1998). La importancia de su control en los alimentos radica en que, aunque en 1993 la Agencia de Protección del Medio Ambiente de los Estados Unidos (EPA) lo reclasificó como de baja toxicidad para los mamíferos (categoría III¹), en años recientes se ha reportado la existencia de efectos carcinogénicos y efectos adversos en la reproducción (Hardell 1998; Yousef, 1995).

Los estudios anteriores indican que la exposición al glifosato, a través del consumo de alimentos, incrementa el riesgo de padecer diversas enfermedades. De hecho, la EPA estableció el límite máximo de contaminación (LMC) en agua en 0.7 mg L⁻¹ y los límites máximos de residuos permitidos (LMR's) en cultivos agrícolas, que varían entre 0.1 y 5 µg g⁻¹, para su comercio y consumo (US CFR 40, 180.364).

¹ La categoría I indica el mayor grado de toxicidad aguda y la categoría IV la menor.

Por otra parte, México es un importante productor de hortalizas destacando el cultivo de jitomate, cuya producción creció 56.2 % entre 1994 y el 2001. En la actualidad, México ocupa el tercer lugar a nivel mundial en exportación de jitomate y, desde que se firmó el Tratado de Libre Comercio de América del Norte (TLCAN), se ha logrado con este vegetal el mayor nivel de crecimiento en exportaciones a Estados Unidos de América (EUA). De acuerdo con datos oficiales, de 1994 al 2001, las exportaciones a EUA se incrementaron en 80.6 %, con un promedio de exportación anual de 621, 576 ton hasta noviembre del 2002. (Ceballos, 2003)

Esta producción significativa conlleva a la aplicación de grandes cantidades de glifosato, herbicida que se utiliza ampliamente en México (Catálogo Oficial de Plaguicidas, 1997). La presencia de residuos de glifosato en los jitomates se puede inferir porque se trata de un herbicida sistémico no selectivo, propiedades que le permiten ser absorbido por la planta y concentrarse en las partes que se usan como alimento. Por tanto, para prevenir el consumo de jitomates contaminados se requiere monitorear los niveles de residuos de este herbicida y de su producto de degradación, el ácido aminometilfosfónico (AMPA).

La literatura analítica para la determinación del glifosato y del AMPA en muestras agrícolas es escasa y particularmente nula para el jitomate. La mayoría de las metodologías que se han reportado para su determinación en este tipo de muestras sufren de dificultades técnicas, tales como lentitud, uso de volúmenes de disolventes grandes y equipos costosos (Moye, 1983; Cowell, 1986; Alferness, 1994; Kataoka, 1996; Hogendoorn, 1999; Royer, 2000). El método EPA, que es el mejor descrito, solo se enfoca al agua y no cuenta con un procedimiento para el pretratamiento de muestras más complejas, como vegetales y frutos.

Además, entre los trabajos reportados no se presenta un método reproducible para determinar los residuos de glifosato y del AMPA en un amplio espectro de vegetales debido a que este tipo de muestras son muy variadas y complejas, por lo que cada una representa un problema de análisis particular.

Los analitos polares y muy solubles en agua, como el glifosato y el AMPA, pueden ser fácilmente absorbidos por frutos y vegetales ricos en agua y concentrarse en la parte interna de los mismos. Este hecho dificulta su extracción, así como el poseer grupos amino y fosfato, que interaccionan fuertemente con componentes de la matriz. Por lo anterior, el análisis de muestras biológicas para su determinación es complicado. Además, su detección es difícil ya que no presentan absorptividad en el espectro UV/Vis y tampoco fluorescen. La obtención de derivados cromóforos o fluorescentes para su detección requiere realizar reacciones de derivación.

Así, para poder monitorear los niveles de estos compuestos es necesario el desarrollo de una metodología analítica confiable, rápida y lo menos costosa posible, que permita la obtención de datos fiables con tiempo suficiente y de manera rutinaria. En particular, se deben implementar métodos nuevos cuya preparación de muestra sea simplificada.

La técnica de dispersión de la matriz en fase sólida (DMFS), de aparición reciente, puede ser útil para realizar lo anterior ya que consiste simplemente en mezclar homogéneamente en un mortero la muestra con un adsorbente y posteriormente empacar ésta mezcla en un cartucho o columna. Con este procedimiento se crea un material nuevo, con el que se obtiene una columna con características cromatográficas únicas porque la muestra se vuelve parte del sistema. El fraccionamiento de los componentes de la muestra se realiza por la adición de pequeños volúmenes de disolventes o mezclas de los mismos a la columna. La purificación de las fracciones se puede efectuar por extracción en fase sólida (EFS) tradicional.

La extracción por la técnica de DMFS permite homogeneizar la muestra y extraer los analitos en un solo paso, ventaja sobre la EFS, obteniéndose un extracto líquido que fácilmente se puede purificar, en caso necesario, para su posterior análisis cromatográfico o por cualquier otra técnica analítica.

En la literatura se encuentran reportados métodos reproducibles y con buenos porcentajes de recobro para la extracción de analitos apolares o medianamente polares en muestras biológicas (cítricos, alcachofas, habas, lechuga, jitomate, manzana, pera, pimiento, cebolla, leche, músculo e hígado de pescado) que emplean la DMFS (Torres et al., 1996; Viana et al., 1996; Torres et al., 1997; Valenzuela et al., 1999; Fernández et al., 2000; Gaunt y Barker, 2000; Kristenson et al., 2000; Yagüe et al., 2001), lo que indica que la técnica se ha aplicado con éxito. Sin embargo, no existen aún reportes del empleo de esta técnica para compuestos tan polares, como glifosato y AMPA.

2. OBJETIVO

Desarrollar un método analítico simplificado para la determinación de residuos de glifosato y su producto de degradación (ácido aminometilfosfónico, AMPA) en jitomate, utilizando las técnicas de dispersión de la matriz en fase sólida, extracción en fase sólida y cromatografía de líquidos de alta eficiencia con detección de fluorescencia.

Objetivos particulares

Desarrollar un método para la extracción selectiva y cuantitativa de residuos de glifosato y AMPA, en jitomate, aplicando la técnica de dispersión de la matriz en fase sólida y la extracción en fase sólida para la limpieza de interferentes.

Optimizar un método de análisis por cromatografía de líquidos de alta eficiencia en fase inversa con formación precolumna de derivado fluorescente para el glifosato y su producto de degradación en extractos provenientes de jitomate.

3. GENERALIDADES

3.1. Definiciones

Con base en la NOM-050-FITO-1995 se define como:

Plaguicida: insumo fitosanitario destinado a prevenir, repeler, combatir y destruir a los organismos biológicos nocivos a los vegetales, tales como: insecticidas, fungicidas, herbicidas, acaricidas, molusquicidas, nematocidas y rodenticidas.

Residuo: cualquier sustancia específica presente en los alimentos, productos agrícolas o alimentos para animales, como consecuencia del uso de un plaguicida. El término incluye cualquier derivado de un plaguicida, como productos de conversión, metabolitos y productos de reacción y las impurezas consideradas de importancia toxicológica.

Límites máximos de residuos: la concentración máxima de residuos de plaguicidas permitido en o sobre vegetales previo a su cosecha, determinada en base a la norma oficial correspondiente.

3.2. Usos de plaguicidas en México

Los Datos Básicos del Sistema Nacional de Información Agropecuaria de la SAGARPA (ver tabla 1) muestran que, con base en la producción y en el rendimiento, el cultivo de vegetales más importante en México es el jitomate. Esta producción requiere obligatoriamente del uso de plaguicidas y, por tanto, la necesidad de un control de los mismos.

Tabla 1. Producción y rendimiento de los principales cultivos cíclicos en México

Cultivo cíclico ¹	1990	1995	1998
Producción total (ton)	30 889 309	32 319 643	35 059 559
Tomate rojo	1 885 277	1 935 470	2 251 909
Chile	850 943	1 187 434	1 366 736
Rendimiento (kg ha ⁻¹)			
Tomate rojo	23 119	25 633	27 640
Chile	8 751	10 493	11 661

¹ Los años agrícolas comprenden los ciclos otoño/invierno y primavera/verano.
 Fuente: Sagarpa, Datos Básicos del Sistema Nacional de Información Agropecuaria, Avance al cuarto trimestre de 1998 y Anuario Agropecuario 1998, México, 1999.

El volumen y el valor de plaguicidas preparados para uso agrícola se presentan en la tabla 2. Se observa que el uso de estos productos se ha incrementado con el tiempo, por lo que se debe considerar su posible presencia en alimentos cosechados con éstos.

Tabla 2. Volumen y valor de plaguicidas preparados para uso agrícola

Año	Volumen (ton)			Valor (miles de pesos)		
	Líquido	En polvo	Total	Líquido	En polvo	Total
1995	6 578	9 800	16 378	345 860	121 274	467 134
1997	9 173	10 280	19 453	711 634	232 596	944 230
1999	9 051	14 310	23 361	1 048 817	236 212	1 285 029

3.3. Normatividad

El aumento en el uso de plaguicidas ocasionó que fuese necesario establecer lineamientos legales para controlar sus niveles en alimentos a través de los **límites máximos de residuos permitidos (LMR)**.

Los LMR's para el glifosato se han implementado en varios cultivos en la legislación de los EUA. En los vegetales, éstos varían entre 0.1 y 5 $\mu\text{g g}^{-1}$ del compuesto dependiendo del producto; el LMR para glifosato en jitomate es 0.1 $\mu\text{g g}^{-1}$ (US CFR 40, 180.364). También se estableció el límite máximo de ingesta diaria en 2 $\text{mg Kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ (US EPA, RED:Glyphosate, 1993). La legislación canadiense también ha implementado límites, que fluctúan entre 2 y 15 $\mu\text{g g}^{-1}$ del total de glifosato y su producto de degradación (Sen, 1996).

En México, la SAGARPA, por medio de la Comisión intersecretarial para el control del proceso y uso de plaguicidas y sustancias tóxicas (CICOPLAFEST), es la encargada de la regulación de éstos compuestos en alimentos. Debido a que, de manera tradicional, en México se han adoptado los LMR's de otros países, esta comisión ha elaborado procedimientos para adoptar estos niveles (CICOPLAFEST, Informe sexenal, 1994 - 2000).

Dentro del marco del TLCAN, los LMR's tienden a igualarse con los de los países miembros. En marzo de 1996, se estableció el Grupo Técnico de Trabajo sobre Plaguicidas, con la finalidad de reducir las diferencias en las regulaciones sobre plaguicidas en los países signatarios del tratado. En el informe sexenal 1994-2000 de la CICOPLAFEST se cita que se "busca la armonización en la forma de regular plaguicidas, criterios aplicados en las evaluaciones y límites máximos de residuos y tolerancias para la resolución de problemas de comercio derivados de las diferencias, ...". Sin embargo, el LMR para estos compuestos no se encuentra registrado en ninguna norma oficial mexicana.

3.4. Características del glifosato

El glifosato (N-(fosfonometil)glicina) es un herbicida sistémico, no selectivo de amplio espectro, introducido al mercado comercial en la década de los 70's. Se degrada a ácido aminometilfosfónico (AMPA), principal producto de degradación en agua, plantas y suelos (Moye, 1983). El glifosato también se adsorbe a los suelos y la degradación microbiológica es la causa principal de su pérdida con la liberación de dióxido de carbono.

3.4.1. Propiedades fisicoquímicas

Las propiedades fisicoquímicas del glifosato y su producto de degradación se resumen en las tablas 3 y 4. Se observa que ambos compuestos son extremadamente polares, ya que el logaritmo de su coeficiente de reparto octanol/agua (K_{ow}) es negativo. También, son muy solubles en agua, poseen propiedades ácido – base y en toda la escala de pH presentan diferentes cargas debido a que se trata de compuestos zwitteriónicos, como se representa en las figuras 1 y 2.

Tabla 3. Propiedades fisicoquímicas del glifosato (Pesticide Manual, 1995)

Fórmula molecular	$C_3H_8NO_5P$
Tipo de compuesto	Zwitterión
Peso molecular	169.1 g mol^{-1}
Forma	Cristales incoloros
Punto de fusión	$200 \text{ }^\circ\text{C}$
Densidad	0.5 g cm^{-3}
Log K_{ow}	-3.2 a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ (FAO, 2000)
Solubilidad	12 g L^{-1} en agua ($25 \text{ }^\circ\text{C}$)
Estabilidad	Se mantiene estable hasta $60 \text{ }^\circ\text{C}$. Es estable a la luz.
pKa's	0.78, 2.29, 5.96, 10.98 (Hogendoorn, 1999)

Tabla 4. Propiedades fisicoquímicas del AMPA (Traas, 2003)

Fórmula molecular	CH ₆ NO ₃ P
Tipo de compuesto	Zwiterión
Peso molecular	111.04 g mol ⁻¹
Log K _{ow}	-2.36
pKa's	0.9, 5.6, 10.2

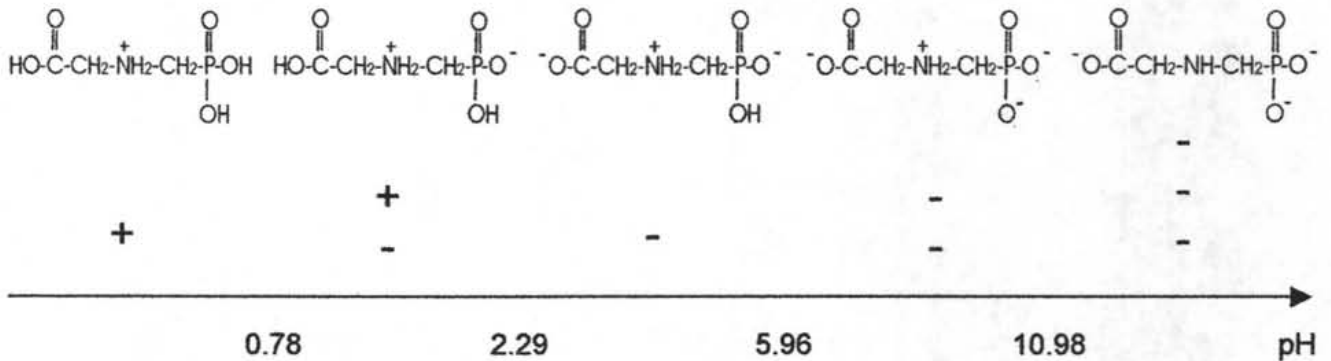


Fig. 1. Estructura y cargas del glifosato con base en el pH del medio

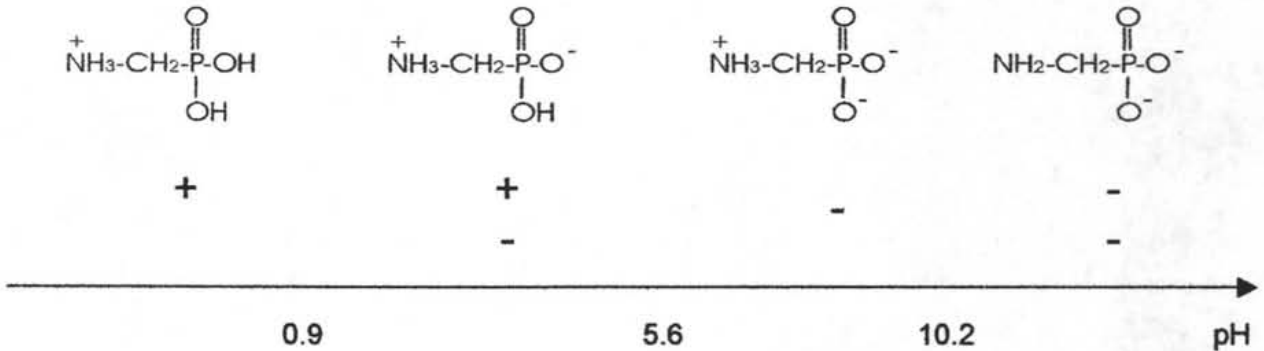


Fig. 2. Estructura y cargas del AMPA con base en el pH del medio

3.4.2. Modo de acción

El glifosato actúa en sistemas enzimáticos interrumpiendo la biosíntesis de aminoácidos aromáticos por medio de la inhibición de las enzimas 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintetasa y la 3-deoxi-D-arabino-heptulosonata-7-fosfato sintetasa (Kataoka, 1996).

3.4.3. Toxicología

La toxicología del glifosato, con base en la cual se ha establecido que no es tóxico para los mamíferos, se resume en la tabla 5. Sin embargo, investigaciones más recientes indican la existencia de efectos nocivos. Además, la toxicología del AMPA no se encuentra reportada, por lo que no se conoce el riesgo que represente para la salud.

Tabla 5. Propiedades toxicológicas del glifosato (Pesticide Manual, 1995)

DL ₅₀ oral aguda igual a 56, 000 mg Kg ⁻¹ en ratas y 11, 300 mg Kg ⁻¹ en ratones
DL ₅₀ percutánea aguda en piel y ojos mayor a 5, 000 mg Kg ⁻¹
Irritación moderada en ojos, no irritante para la piel (en conejos)
CL ₅₀ de inhalación mayor a 12.2 mg L ⁻¹ de aire (4 h)

A continuación se describen los estudios que muestran el riesgo potencial para la salud de este herbicida:

- En estudios de toxicidad subcrónica en ratas se encontró disminución de peso y aumento de niveles sanguíneos de potasio y fósforo. En estudios de toxicidad crónica en ratas, con dosis elevadas (900-1200 mg kg⁻¹ día⁻¹), se produjeron cataratas, degeneración del cristalino y mayor peso del hígado; mientras que con dosis bajas (400 mg kg⁻¹ día⁻¹) ocurrió inflamación de la membrana mucosa estomacal (Kaczewer en www.ecoportat.net).
- Los estudios de carcinogénesis en ratas con dosis de 30 mg kg⁻¹ día⁻¹ revelaron incremento de tumores en testículos, tiroides, páncreas e hígado (Kaczewer en www.ecoportat.net).
- En estudios de reproducción en tres generaciones de ratas con dosis de 10 mg Kg⁻¹ día⁻¹ se presentó dilatación del tubo renal (IPCS EHC 159, 1994) y en pruebas de laboratorio con conejos, el glifosato disminuyó la cantidad de espermatozoides (Yousef, 1995).
- En humanos la exposición al herbicida incrementó los riesgos de contraer el linfoma no Hodgkin (LNH), que es una forma de cáncer (Hardell, 1998).

3.5. Generalidades sobre el pretratamiento de muestras con fases sólidas

Las etapas generales para un pretratamiento de muestra sólida se presentan en el diagrama 1, en el cual se observa que consiste de tres etapas principales. La primera corresponde a una extracción o desprendimiento del analito de la matriz original; etapa crítica debido a que la cantidad de analito que se logre extraer determinará el porcentaje de recobro y el límite de detección del método. La segunda etapa, la extracción selectiva y la eliminación de interferentes, permite el aislamiento del analito de interés y la purificación del extracto; esto último comúnmente se realiza por la técnica de EFS. Finalmente, la última etapa es la concentración de los analitos, la cual puede ser opcional dependiendo de la cantidad de analito que se pretenda determinar en la muestra.

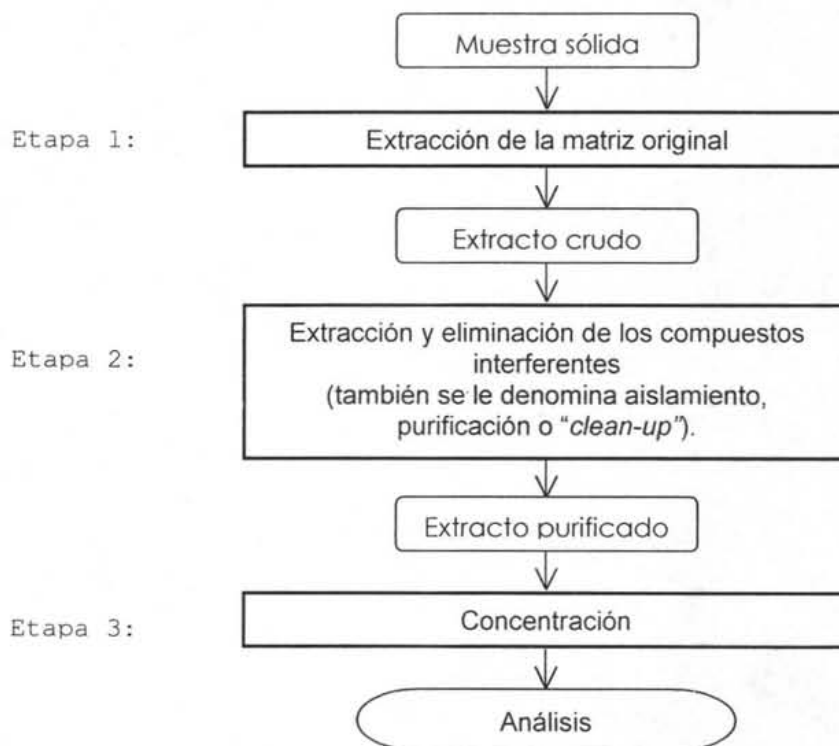


Diagrama 1. Protocolo de un pretratamiento general de muestra sólida

A continuación se describen las características generales de las técnicas para la extracción de compuestos orgánicos utilizadas en el presente trabajo:

3.5.1. Extracción en fase sólida

La EFS es una técnica de preparación de muestras que se basa en los mecanismos de separación de la cromatografía de líquidos. Consiste en la transferencia del analito de una fase líquida a los sitios activos de una fase sólida (material adsorbente), la cual puede estar empacada en columnas, cartuchos o discos de extracción (Hennion, 1994).

El uso de la EFS en un protocolo analítico requiere que la muestra se encuentre en estado líquido y homogéneo; además, las muestras deben estar libres de partículas y ser fluidas.

Las etapas típicas en EFS se muestran en el siguiente diagrama:

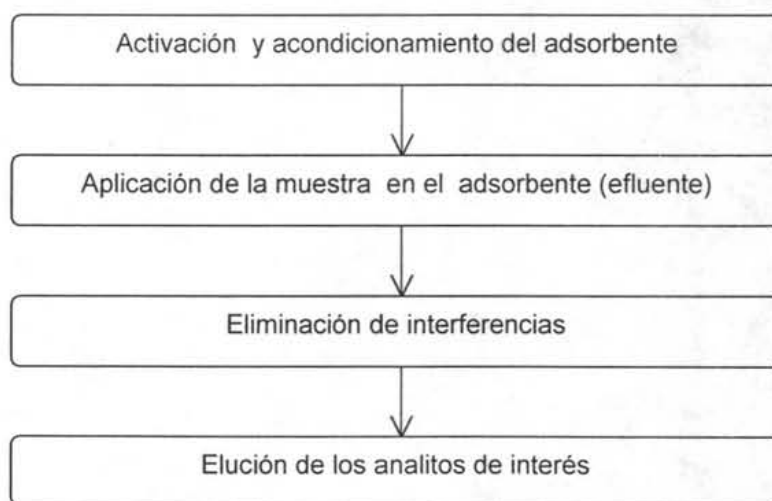


Diagrama 2. Etapas de la EFS

Los adsorbentes más utilizados, los mecanismos de retención involucrados y los disolventes de elución típicos se presentan en la tabla 6.

Tabla 6. Mecanismos de retención en EFS (Hennion, 1994)

Adsorbente	Mecanismo de retención	Compuestos orgánicos retenidos en el adsorbente	Disolvente de elución
Sílices con grupo alquilo químicamente unido	Fase inversa	Neutros. De no polares a débilmente polares	Disolventes orgánicos (MeOH, ACN)
Copolímeros de estireno-divinilbenceno	Fase inversa	Neutros. De no polares a moderadamente polares	Disolventes orgánicos (MeOH, ACN)
Carbones grafitizados	Fase inversa	Neutros. De no polares a polares	Disolventes orgánicos (MeOH, ACN)
Intercambiadores de iones	Intercambio iónico	Catiónicos o aniónicos	Agua (pH ajustado para que los compuestos se encuentren en su forma neutra)

Los parámetros fundamentales de la EFS (Hennion, 1994) se describen a continuación:

- Volumen de fuga. Volumen en el cual el analito ya no se retiene cuantitativamente en el adsorbente y comienza a ser eluido por el disolvente de elución. También, se presenta cuando los analitos no se retienen en el adsorbente o si la capacidad de éste se sobrepasa.
- Recobro. Se define como el cociente entre la cantidad extraída y la cantidad aplicada. Este es teóricamente del 100 % únicamente para una muestra cuyo volumen sea igual o menor al volumen de fuga. Depende del volumen de la muestra, la cantidad y naturaleza del adsorbente y el disolvente de elución.

La selección del adsorbente en EFS se realiza con base en la polaridad de los analitos (ver tabla 6, p.14). El K_{ow} es un parámetro que caracteriza la hidrofobicidad y refleja la polaridad de un compuesto. La clasificación de analitos con base en este parámetro se presenta en la tabla 7.

Tabla 7. Clasificación de compuestos con base en su K_{ow} (Hennion, 1994)

log K_{ow}	Compuesto
> 3	Apolar
1 - 3	Moderadamente polar
< 1	Polar

La selección del disolvente de desorción o de elución depende del adsorbente y del mecanismo de separación involucrado, así como de las propiedades fisicoquímicas de los compuestos de interés (ver tabla 6, p. 14).

3.5.1.1. Extracción por intercambio iónico (Harris, 2001, p. 733-740)

El mecanismo de intercambio iónico se basa en la atracción electrostática entre iones del analito y grupos cargados que existen en el adsorbente. Los intercambiadores catiónicos poseen grupos cargados negativamente, unidos por enlace covalente al soporte sólido del adsorbente, que atraen analitos catiónicos. En el caso de intercambiadores aniónicos, los grupos cargados positivamente atraen analitos aniónicos.

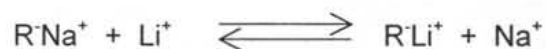
Los intercambiadores iónicos se clasifican en ácidos o básicos, fuertes o débiles, con base en el grupo cargado que posean, como se muestra en la tabla 8.

Tabla 8. Grupos comúnmente utilizados para intercambio iónico

Tipo	Ejemplo	Estructura
Intercambiadores catiónicos		
Acido fuerte	Sulfopropil	- OCH ₂ CH ₂ CH ₂ SO ₃ H
Acido intermedio	Fosfato	- OPO ₃ H ₂
Acido débil	Carboximetil	- OCH ₂ CO ₂ H
Intercambiadores aniónicos		
Base fuerte	Dietil(2-hidroxiopropil)	- OCH ₂ CH ₂ N(CH ₂ CH ₃) ₂ CH ₂ CHOHCH ₃
Base intermedia	Dietilaminoetil	- OCH ₂ CH ₂ N(CH ₂ CH ₃) ₂
Base débil	p-aminobencil	- O-CH ₂ -Benceno-NH ₂

Los intercambiadores siempre contienen el mismo número de cargas positivas y negativas, por lo tanto son eléctricamente neutros. Los iones que se encuentran unidos a los grupos cargados se les llama contraiones.

La constante de intercambio del analito entre la fase líquida y el adsorbente mide la selectividad relativa del intercambiador con respecto a dos iones (el analito y el contraión) y se llama coeficiente de selectividad. Por ejemplo, si se considera la competencia de Na⁺ (contraión) y Li⁺ (analito) por los sitios activos de una resina de intercambio catiónico R⁻, se tiene el siguiente equilibrio:



La constante de intercambio (K) se define como:

$$K = \frac{|R^-Li^+| |Na^+|}{|R^-Na^+| |Li^+|}$$

En general, los intercambiadores iónicos fijan preferentemente los iones de mayor carga, menor radio hidratado y mayor polarizabilidad.

El soporte sólido de los intercambiadores de iones puede ser a base de resinas o sílice, como se muestra en la tabla 9.

Tabla 9. Tipos de soportes sólidos utilizados en los intercambiadores de iones

Tipo de soporte	Intervalo de pH
Resinas de poliestireno	1 - 12
Sílice	2 - 8

Las resinas se obtienen por copolimerización de estireno y divinilbenceno. El contenido de éste último puede variar desde 1 a 16 % aumentando así el grado de entrecruzamiento y disminuyendo la porosidad.

Las resinas poco entrecruzadas permiten un rápido equilibrio del analito, sin embargo se hinchan con el agua lo que disminuye la densidad de los sitios de intercambio iónico y su selectividad. En cambio, las resinas mas entrecruzadas se hinchan poco y tienen mayor capacidad de intercambio y selectividad, pero requieren mas tiempo para alcanzar el equilibrio.

Finalmente, las partículas microporosas esféricas de sílice muy pura, que son permeables al disolvente, también se pueden utilizar para intercambiadores iónicos.

La elución en gradiente en cromatografía de intercambio iónico se realiza con fuerza iónica creciente o mediante cambio de pH. Este tipo de gradiente se ha utilizado principalmente para el análisis de iones inorgánicos, como por ejemplo los de la familia de los lantánidos (Harris, 2001).

3.5.2. Dispersión de la matriz en fase sólida

En 1989 se introdujo una nueva técnica para la extracción de residuos denominada dispersión de la matriz en fase sólida, la cual permite llevar a cabo en una sola etapa la homogeneización de la muestra, el rompimiento celular, la extracción exhaustiva, el fraccionamiento y la purificación (Barker, 2000).

La DMFS consiste en mezclar una muestra viscosa, sólida o semisólida con un material adsorbente, previamente lavado y acondicionado. La fuerza manual, que se aplica con un mortero y un pistilo, permite el rompimiento completo de la arquitectura de la muestra y la presencia del adsorbente permite que los componentes de la muestra se dispersen y se disuelvan sobre toda su superficie, con base en su polaridad relativa e interacciones hidrofóbicas e hidrofílicas. La mezcla resultante se empaca en una columna (columna de dispersión), con la ayuda de dos "frits" en los extremos, de la cual se pueden eluir los componentes de la muestra (Barker, 1993, 2000).

La obtención de la mezcla crea una fase estacionaria con características cromatográficas únicas, dado que la muestra se vuelve parte del sistema. Así, la DMFS se considera una forma de cromatografía, cuyo mecanismo de separación involucra las interacciones entre el analito y el adsorbente, la fase móvil o el disolvente de elución, y todos los componentes de la matriz.

Para obtener mayor grado de fraccionamiento o de limpieza, en muchos procedimientos por DMFS se utiliza un material empacado en el fondo de la columna. Se les conoce como co-columnas.

Las interacciones que ocurren durante la formación del material empacable para formar una columna de dispersión y en la elución de la misma no han sido estudiadas. No obstante, a continuación se describen los factores que se ha observado que influyen en una extracción por DMFS (Barker, 2000):

- Soporte sólido

El empacado y la elución en DMFS pueden resultar difíciles si la mezcla es demasiado húmeda; por esta razón, se utilizan soportes a base de sílice. Estos permiten obtener mezclas secas y fácilmente empacables debido a la presencia de silanoles tanto en su superficie como en los poros. Los grupos silanol forman puentes de hidrógeno con las moléculas de agua que contiene la muestra, por lo tanto materiales con grupos silanoles libres son adecuados.

El tamaño de las partículas del soporte sólido también es importante. El uso de partículas de 3 a 20 μm de diámetro provocan flujos bajos o nulos. En cambio, partículas con 40 μm ó mezclas de partículas cuyos diámetros sean de 40 a 100 μm son adecuadas.

- Grupos funcionales químicamente unidos al soporte sólido

El rompimiento de la estructura de la muestra durante el mezclado con el uso de soportes sólidos de sílice con grupos alquilo enlazados se debe a que estas partículas poseen esquinas filosas y superficies rugosas. Sin embargo, en la actualidad no se sabe con certeza si la presencia y naturaleza (apolar o polar) del grupo unido juega un papel significativo en el porcentaje de rompimiento y dispersión de la muestra.

Las sílices con grupos alquilo C_8 ó C_{18} han sido los adsorbentes más utilizados porque la DMFS se ha aplicado principalmente para la extracción de analitos lipofílicos. Así, las observaciones, que a continuación se describen, corresponden a materiales para fase inversa.

La presencia de los grupos funcionales permite que los componentes de la muestra se distribuyan, con base en su polaridad, de la siguiente manera:

- Apolares. Las moléculas apolares se dispersan en la fase orgánica apolar (grupos n-alquilo).
- Polares. Las moléculas polares y de tamaño molecular pequeño, como el agua, se asocian con los grupos silanol presentes en la superficie y dentro de los poros del soporte sólido de sílice, así como con componentes de la matriz capaces de formar puentes de hidrógeno.
- Medianamente polares. Las moléculas medianamente polares y de tamaño molecular grande se distribuyen a través de la superficie de esta estructura bifásica: fase apolar / fase polar.

Se considera que la estructura bifásica de la nueva fase estacionaria imita a una membrana celular, lo que le da características cromatográficas únicas al material obtenido por DMFS.

- Componentes de la muestra (matriz)

El contenido de lípidos, proteínas, carbohidratos y otros componentes de la muestra, así como su distribución, influye en el comportamiento de elución de un analito dado.

Mientras que los grupos orgánicos apolares unidos al soporte sólido son inmóviles, los componentes de la matriz no lo son; por esta razón, los resultados y el recobro pueden cambiar de una muestra a otra.

Los componentes de la matriz pueden ser eluidos, en ciertas fracciones, dependiendo de las interacciones de la matriz dispersa, los componentes fijos y el disolvente de elución. Por esto, ciertos analitos tienden a ser eluidos en fracciones que no son fácilmente predecibles por sus distribuciones relativas entre el adsorbente y el disolvente de elución utilizado, como es el caso de la EFS.

- **Modificación de la matriz**

El estado de ionización de los componentes de la matriz biológica se puede alterar para garantizar que ocurran ciertas interacciones con el adsorbente y/o con el disolvente de elución. Esto se puede lograr añadiendo ácidos, bases, sales, agentes quelantes o desquelantes y antioxidantes, ya sea en el momento de mezclar la muestra o como aditivos en el disolvente de elución.

- **Disolvente de elución y la secuencia de aplicación**

La polaridad relativa del disolvente de elución con respecto a la del adsorbente juega un papel significativo en la retención o elución de los componentes de la matriz, como en EFS. Sin embargo, la elución por polaridad de los analitos no siempre se cumple. El diseño del patrón de elución deberá retener en la mayor cantidad posible a los interferentes en la columna y remover los analitos de interés con un alto grado de especificidad. La apropiada elección del disolvente de elución permite realizar eluciones múltiples secuenciales y el aislamiento de compuestos de una sola clase o de varias clases presentes en la matriz.

Las referencias encontradas en la literatura que reportan el uso de la técnica de DMFS para la extracción de plaguicidas de muestras agrícolas se presentan en la tabla 10. Se observa que se han desarrollado métodos con buenos porcentajes de recobro y reproducibilidad, por lo que se deduce que la técnica ha sido aplicada exitosamente.

Tabla 10. Preparación de muestras por dispersión de la matriz en fase sólida

Plaguicida	Muestra	Adsorbente	Limpieza	LDM (ng g ⁻¹)	% R	C.V. (%)	Análisis	Ref
Organoclorados y organofosforados	Naranjas (0.5 g)	C ₁₈	Co-columna con sílice	2 - 171	67 - 102	2 - 10	CG-DCE	Torres et al., (1996)
Organofosforados, fenarimol, irpodion, procimidon, azoles, tetradifon, triamefon y vinclozolin	Alcachofas, habas, lechuga y jitomate (5 g)	Florisil - arena (10:8)	EFS con C ₈	No se reportó	80 - 104	4 - 16	CG-DCE CG - EM	Viana et al., (1996)
Organofosforados	Naranja, limón y uvas (0.5 g)	C ₁₈	Co - columna con sílice	No se reportó	60 - 108	2 - 14	CG-EM	Torres et al., (1997)
Heterociclos con nitrógeno, organofosforados, organohalogenados y piretroides	Manzana, naranja, pera, jitomate, lechuga y pimiento (0.5 g)	C ₁₈	Co-columna con sílice	20 - 200 (DCE) 10 - 50 (EM)	70 - 105	2 - 9	CG-DCE CG-EM	Torres et al., (1997)
Carbamatos y ureas	Naranja (0.5 g)	C ₁₈	No requiere	150 - 250	74 - 84	2 - 4	CLAE - UV	Valenzuela et al., (1999)
Carbamatos	Naranja, uva, cebolla y jitomate (0.5 g)	C ₈	Co-columna con sílice	1 - 10	62 - 103	5 - 15	CLAE-EM	Fernández et al., (2000)
Organofosforados y piretroides	Naranja, pera, uva, manzana (0.1 g)	C ₈	No requiere	4 - 90	83 - 118	10 - 13	CG - EM	Kristenson et al., (2001)

Los plaguicidas en los que se ha aplicado la técnica de DMFS, con base en las referencias de la tabla 10, poseen $\log K_{ow}$ positivos y su promedio se presenta en la tabla 11. En esta se puede notar que los plaguicidas que se han extraído son apolares y medianamente polares, con base en la clasificación de la tabla 7 (p. 15).

Los plaguicidas con valores de $\log K_{ow}$ negativos, pertenecientes a las familias de los organofosforados y carbamatos, no han sido reportados en ninguna publicación. Por tanto, es importante asentar que tampoco existe en la literatura una aplicación de esta técnica para compuestos muy polares como el glifosato y AMPA, cuyos $\log K_{ow}$ son negativos.

Tabla 11. $\log K_{ow}$ de plaguicidas extraídos de muestras agrícolas por DMFS (Pesticide Manual, 1995)

Grupo de plaguicida	$\log K_{ow}$ promedio
Organoclorados	4.296
Organofosforados	3.061
Azoles	3.344
Carbamatos	1.904
Ureas	2.351

3.6. Métodos analíticos para la determinación del glifosato y AMPA en muestras agrícolas

A continuación se describen los métodos analíticos reportados hasta la fecha para la determinación de glifosato y AMPA en muestras agrícolas. Primeramente se describirán los diferentes métodos para el análisis cromatográfico de los extractos y, posteriormente, los métodos para la preparación de la muestra (pretratamiento).

3.6.1. Análisis cromatográfico

Para el análisis de los extractos se ha utilizado tanto la cromatografía de gases (CG) como la cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE).

3.6.1.1. Cromatografía de gases

El análisis por CG requiere obligatoriamente de reacciones de derivación para la preparación de derivados volátiles y estables, que se puedan detectar con sensibilidad y selectividad elevadas. Las mezclas de reactivos que más se utilizan para la derivación son las siguientes: heptafluorobutírico anhídrido y BCl_3 -2-cloroetanol (Guinivan et al., 1982); trifluoroacético anhídrido y diazometano (Seiber et al., 1984), trifluoroacético anhídrido y trifluoroetanol (Konar y Roy, 1990), trifluoroacético anhídrido y heptafluorobutanol (Alferness e Iwata, 1994; Royer et al., 2000), isopropilcloroformato y diazometano (Kataoka et al., 1996).

Los procedimientos de derivación con anhídridos tienen el inconveniente de que la reacción es exotérmica y, por tanto, peligrosa. La adición del reactivo se lleva a cabo a temperaturas de $-50\text{ }^\circ\text{C}$ a $-60\text{ }^\circ\text{C}$, que se logran con corrientes de N_2 ó con hielo seco. Por otra parte, los tiempos requeridos para realizar estas reacciones son muy extensos ya que, también, se debe considerar el tiempo necesario para que la mezcla de reacción alcance la temperatura ambiente. Por ejemplo, Seiber (1984) indicó que la obtención del derivado requirió de nueve horas de preparación.

Las condiciones para el análisis por CG para glifosato y AMPA se presentan en la tabla 12.

Tabla 12. Condiciones para el análisis por CG

Autor	Columna	Temperatura	Detector
Guinivan et al., (1982)	DC-200 327 cm X 4 mm	De 130 °C (15 min) a 210 °C (7 min) y 220 °C (13 min) a 30 °C min ⁻¹	captura de electrones
Seiber et al., (1984)	SP-2250 1 m X 3 mm	De 110 °C a 175 °C a 10 °C min ⁻¹	fotométrico de flama
Konar y Roy (1990)	20SE 1.8 m X 3 mm	146 °C	nitrógeno-fosforo
Alferness e lwata (1994)	No se reporta	De 90 °C (2 min) a 290 °C (3 min) a 30 °C min ⁻¹	masas modo SIM
Kataoka et al., (1996)	DB-17 15 m X 0.53 mm	De 170 °C a 270 °C a 10 °C min ⁻¹	fotométrico de flama
Royer et al., (2000)	VA-5MS 30 X 0.25 mm	De 80 °C (1.5 min) a 260 °C (1 min) y 300 °C a 30 °C min ⁻¹	masas/masas

3.6.1.2. Cromatografía de líquidos

La naturaleza zwitteriónica y polar de estos compuestos hace de la CLAE por intercambio iónico una técnica de análisis adecuada. Como ninguno de estos compuestos exhibe absorbancia significativa en la región del ultravioleta/visible y tampoco presentan fluorescencia, es necesario llevar a cabo reacciones de derivación con compuestos cromóforos como la nihidrina (Thompson, 1989) o fluoróforos para su detección. Comúnmente, se utilizan dos procedimientos de derivación para la detección del glifosato en muestras agrícolas por CLAE:

- Derivación post - columna con o-ftaldehído (OPA) y detección fluorescente.
- Derivación precolumna con 9-fluoroenilmetilcloroformato (FMOC-Cl) y detección fluorescente.

La derivación post-columna presenta ciertas desventajas que se discuten a continuación:

- Requiere de la oxidación previa del glifosato a glicina, lo que implica realizar dos reacciones para lograr la determinación por fluorescencia. La solución de hipoclorito se puede utilizar por varios días, pero su concentración decrece lentamente con el tiempo. Además, el reactivo OPA-tiofluor se oxida con el aire degradándose rápidamente y puede reaccionar con vapores de amonio y aminas primarias. La solución a estos inconvenientes involucra mantener a los reactivos en una atmósfera de gas inerte, lo cual incrementa el costo del análisis.
- El equipo que se requiere es complejo; se compone de una bomba binaria, dos reactores, y dos termostatos (para la columna analítica y el reactor de oxidación). Además, se tiene que lavar exhaustivamente para que las sales no precipiten en el reactor y en la celda de detección, ya que el diluyente para el reactivo de derivación es borato de sodio 0.4 M (US EPA, Método No. 86-63-1).

Debido a los inconvenientes del método post-columna, el método precolumna resulta una alternativa debido a que es simple y menos costoso. En este, la derivación se realiza con un reactivo tanto para aminas primarias y secundarias, el FMOC-Cl. Debido a que el glifosato y el AMPA son moléculas zwitteriónicas, la formación de los respectivos derivados, por reacción del grupo amino (analito) y el ácido cloruro (FMOC-Cl), conlleva a la formación de derivados fluorescentes aniónicos (figura 5), que fácilmente se separan por CLAE en columnas empacadas con sílice y grupos amino enlazados a temperatura controlada (30 °C).

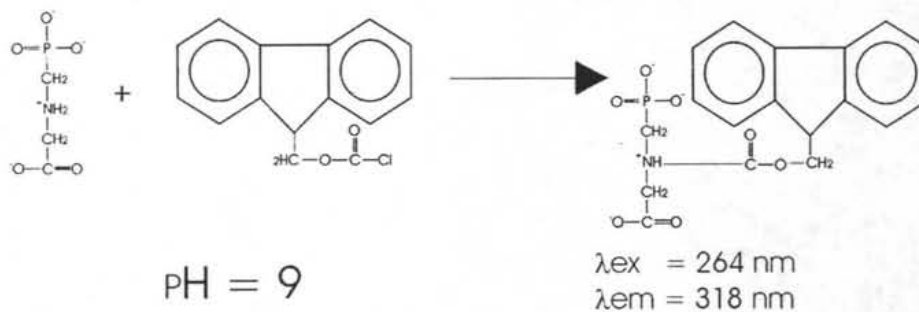


Fig. 5. Reacción de derivación precolumna con Fmoc-Cl

En la actualidad, se presenta una tendencia a utilizar el método de acoplamiento en línea de columnas, que se basa en la inyección de un volumen grande de muestra (400 – 2000 μL) en una columna con grupos C_{18} (30 mm) seguida de una transferencia de un volumen pequeño, que contiene a los derivados, a una segunda columna con grupos amino (250 mm), en la que se lleva a cabo la separación analítica.

En general, se utiliza como fase móvil una mezcla de acetonitrilo (ACN) y de solución acuosa de fosfatos $\text{pH} = 5.5$ (35:65), por lo que los derivados se encuentran ionizados lo que resulta en una mínima retención en la columna con grupos C_{18} y una adecuada retención en la columna con grupos amino. La limpieza es eficiente porque los compuestos polares se transfieren a la columna con grupos amino, mientras que las interferencias con mayor retención, como el Fmoc-Cl, se retienen en la columna C_{18} .

El límite de detección en esta metodología se disminuye inyectando volúmenes grandes, de hasta 2 mL (Hernández et al., 2000); sin embargo, la mezcla de reacción posee fuerza eluotrópica, lo que puede hacer que, durante la inyección, los picos se ensanchen. Por lo anterior, se tiene que disminuir el porcentaje de ACN, en el extracto derivado, diluyendo con boratos. Por ejemplo, Hogendoorn et al., (1999), diluyó en un factor 1:16 el extracto derivado con una solución de boratos 0.025 M e inyectó 400 μL en el sistema CL-CL.

No obstante la simplicidad de la derivación, el costo del análisis se incrementa por que se requieren de dos columnas analíticas y de una válvula para el acoplamiento en línea de las columnas.

3.6.2. Preparación de muestras

La comparación de los procedimientos para preparación de muestra desarrollados hasta la fecha se presenta en las tablas 13 y 14. En éstas se observa que la extracción del glifosato y su producto de degradación de muestras sólidas, en este caso frutos y vegetales es complicada, independientemente de la técnica de análisis de extracto que se utilice (CG ó CLAE). Esto se explica porque los frutos y vegetales son muestras complejas de carácter heterogéneo que poseen paredes celulares rígidas difíciles de romper.

Tabla 13. Preparación de muestras agrícolas y análisis por CG previa derivación

Muestra	Extracción de la matriz original	Extracción selectiva y eliminación de interferentes	LDM glifosato ($\mu\text{g g}^{-1}$)	LDM AMPA ($\mu\text{g g}^{-1}$)	% R glifosato	% R AMPA	C.V. (%) Glifosato	C.V. (%) AMPA	Ref.
Arándanos (25 g)	Sonicar con 100 mL de agua 5 min. Centrifugar 10 min. Filtrar.	ELL con acetato de etilo; CPG; CIC.	NP (LCM = 0.01)	NP (LCM = 0.05)	68.25	106	1	9	Gunivan et al., (1982)
Kiwi y aspárgagos (20 g)	Mezclar con 130 mL de agua-cloroformo (10:3) 1 min. Centrifugar 10 min. Filtrar.	CIA; CPG; Cromatografía de adsorción (silice).	0.05	-	88	88	No se reportó	No se reportó	Seiber et al., (1984)
Tallos de arándanos y frambuesas (5 g)	Mezclar con 150 mL de agua-cloroformo (3:1). Filtrar.	ELL con hexano; ELL con acetato de etilo; Carbón activado; CIC.	0.03	0.01	76.18	62.64	7.1	7.1	Konar y Roy (1990)
Maíz, soya, trigo, nueces, manzanas, ciruelas (25 – 50 g)	Mezclar con 150 mL de agua 3 min. Centrifugar 10 min.	ELL con cloroformo; CIC.	NP (LCM = 0.05)	NP (LCM = 0.05)	96	95	No se reportó	No se reportó	Alferness e Iwata (1994)
Zanahorias (0.5 g)	Mezclar con 3 mL de agua. Centrifugar 5 min.	ELL con éter dietílico; ELL con una mezcla de éter dietílico-t-butanol (8:2).	NP (LCM = 0.012)	NP (LCM = 0.008)	93	98	7	7	Kataoka et al., (1996)
Grosellas, avellanas (15 g)	Mezclar con 100 mL de HCl 0.01 N – DCM (4:1) 1 min. Centrifugar 20 min. Filtrar.	CIL; CIA.	NP (LCM = 0.02)	-	81	-	12	-	Royer et al., (2000)

DCM = diclorometano; ELL = extracción líquido-líquido; CPG = cromatografía de permeación en gel; CIC = cromatografía de intercambio catiónico; CIA = cromatografía de intercambio aniónico; CIL = cromatografía de intercambio de ligantes; NP = no publicado; LDM = límite de detección del método; LCM = límite de cuantificación del método

Tabla 14. Preparación de muestras agrícolas y análisis por CLAE

Muestra	Extracción de la matriz original	Extracción selectiva y eliminación de interferentes	LDM glifosato ($\mu\text{g g}^{-1}$)	LDM AMPA ($\mu\text{g g}^{-1}$)	% R glifosato	% R AMPA	C.V. (%) Glifosato	C.V. (%) AMPA	Técnica de derivación	Ref.
Melón, arándano, pepino, chile, calabaza (25 g)	Mezclar con 75 mL de agua- CHCl_3 (1:3) 30 s. Centrifugar 20 min. Filtrar.	CIC.	NP (LCM = 0.05)	NP (LCM = 0.05)	86	61	No se reportó	No se reportó	Post – columna	Moye et al., (1983)
Zarzamoras (15 g)	Reflujo con 45 mL de HCl 0.25 N 15 min. Filtrar.	CIC; CIA.	NP (LCM = 0.05)	-	85	-	17	-	Post – columna	Archer y Stokes (1984)
Alfalfa, col, uvas, soya (30 g)	Mezclar con 250 mL de HCl 0.1 M - CHCl_3 (4:1). Centrifugar 20 min.	CIL; CIA.	NP (LCM = 0.05)	NP (LCM = 0.05)	80.9	79.2	17	17	Post-columna	Cowell et al., (1986)
Paja (15 g)	Mezclar con 150 mL de agua- CHCl_3 (3:1). Centrifugar. Filtrar.	CIC.	0.1	0.1	75	79	No se reportó	No se reportó	Pre-columna	Roseboom y Berkhoff (1982)
Granos de trigo, centeno, cebada, avena; setas, semillas de nabo, soya (1 g)	Reposar con agua 1 noche. Centrifugar 10 min.	EFS-fase inversa fuera de línea; EFS-fase inversa en línea.	NP (LCM = 0.5)	-	86.3	-	7	-	Pre-columna	Hogendoorn et al., (1999)
Aceitunas, plantas de jitomate, fresa y pera (5 g)	Mezclar con 10 mL de agua 60 min. Centrifugar 15 min.	EFS-fase inversa en línea.	0.01	-	87	-	6	-	Pre-columna	Hernández et al., (2000)

CIC = cromatografía de intercambio catiónico; CIA = cromatografía de intercambio aniónico; CIL = cromatografía de intercambio de ligantes; NP = no publicado; LDM = límite de detección del método; LCM = límite de cuantificación del método

Con base en las tablas 13 y 14, las operaciones que en general se han aplicado para la extracción de la matriz original y la obtención de un extracto homogéneo y enriquecido en glifosato y AMPA, son las siguientes :

1. Lixiviado de la muestra con algún disolvente o mezclas de disolventes
2. Centrifugación del extracto crudo
3. Filtración

El lixiviado se realiza utilizando agua pura o una mezcla de agua y de disolvente orgánico aplicando procedimientos físicos, como mezclado mecánico o sonicación, o químicos como la adición de ácidos y bases. Las metodologías que requieren como disolvente orgánico el cloroformo (Roseboom y Berkhoff, 1982; Seiber et al., 1984; Cowell et al., 1986; Konar y Roy, 1990) son cuestionables, ya que en la actualidad se requiere que las metodologías sean limpias y no generen desechos tóxicos.

Por otra parte, se observa que la operación del mezclado consume un tiempo considerable del procedimiento, ya que puede requerir hasta de 60 min (Hernández et al., 2000). Además, generalmente las operaciones para la extracción de los compuestos de interés se repiten mínimo dos veces, para obtener recobros aceptables, reemplazando cada vez el disolvente. Esto incrementa los volúmenes totales de disolventes utilizados, con la subsecuente necesidad de evaporar o disponer de los mismos, lo que implica un inconveniente real para las metodologías propuestas hasta la fecha, además de que se prolonga el tiempo del análisis.

Resumiendo, las principales desventajas de los métodos reportados hasta la fecha son el tiempo de tratamiento, el cual es muy extenso, y el volumen grande de disolventes requerido.

Una vez que se obtiene el extracto crudo se procede a la etapa de extracción selectiva y limpieza. En la literatura se encontró que esta etapa también es complicada, ya que se realiza combinando dos o más técnicas: ELL, EFS, CPG, CIA, CIC y CIL, o bien diferentes fases sólidas. El intercambio iónico es la técnica más utilizada debido a la naturaleza zwitteriónica de los analitos, lo que permite su retención selectiva en este tipo de adsorbentes.

Los detectores que se utilizan en CG poseen una selectividad elevada; sin embargo, siempre se requieren procedimientos de eliminación de interferencias extensos y laboriosos. Estas metodologías emplean hasta tres técnicas diferentes para lograr la purificación de los extractos. Cabe señalar que las metodologías para analizar los extractos por CG también emplean la ELL para la eliminación de interferentes (ver tabla 13, p. 30), lo que en algunos casos conlleva el uso de disolventes tóxicos y mayores volúmenes de desechos.

Finalmente, es importante destacar que no existen trabajos reportados donde se determine glifosato y AMPA en muestras de jitomate.

4. DESARROLLO EXPERIMENTAL

4.1. Instrumentos, equipos y accesorios

- Cromatógrafo de líquidos con bomba ternaria *Varian* modelo 9012
- Columna analítica de acero inoxidable (*Varian Res Elut*) con sílice C_{18} , de 150 x 4.6 mm, 5 μm de diámetro de partícula
- Precolumna de acero inoxidable con sílice C_{18} (*Varian Res Elut*), 20 X 2 mm
- Detector de fluorescencia *Varian* modelo 9000
- *Software* de control y procesamiento de datos *Varian Workstation 4.5* 1989-1990
- Potenciómetro *Orion* modelo 720 A
- Rotavapor *Buchi* modelo R-205 con controlador de vacío *Buchi* modelo V-805 y bomba *Buchi* modelo V-500
- Balanza analítica *Mettler Toledo* modelo AG245
- Microbalanza *Mettler Toledo* modelo AT21
- Purificador y desionizador de agua *Modulab Analytical (U.S. Filter, USA)*
- Micropipeta *Eppendorf Reference* 100 – 1000 μL
- Jeringa *Hamilton* 100 μL
- Mortero y pistilo de vidrio de 25 mL
- Mortero y pistilo de ágata 25 mL
- Caja para extracción con vacío
- Baño ultrasónico *Branson* modelo 1210

4.2. Reactivos

- Agua desionizada y purificada (18 $\text{m}\Omega$)
- Fosfato de sodio monobásico, NaH_2PO_4 , *J.T. Baker* 99 %
- Tetraborato disódico decahidratado, *J.T. Baker* 101.5 %
- Acetonitrilo *OmniSolv EMSCIENCE* 99.92 %
- Metanol *OmniSolv EMSCIENCE* 99.96%
- Eter dietílico *J.T. Baker* 99 %
- Hidróxido de sodio, NaOH , *J.T. Baker* 87.7 %
- Ácido nítrico, HNO_3 66%

- Glifosato *Chem Service* 99 %
- Acido aminometilfosfónico, AMPA, *Sigma* 99%
- 9-fluoroenilmetilcloroformato, FMOC-Cl, *Merck* 99 %
- Cartuchos *Spe-ed* NH₂ 100 mg y 200 mg
- Cartuchos *Spe-ed* SAX 100 mg
- Fase *Bondesil* NH₂ 40 um *Varian*
- Fase *Bondesil* SAX 40 um *Varian*
- Filtro de nitrato de celulosa de 0.45 um *Sartorius*
- Discos de nylon de 0.45 um *Acrodisc* 13
- Frits de ½ " , 20 um *Varian*

Soluciones (se prepararon con agua desionizada a excepción del FMOC-Cl que se preparó en ACN)

- Solución amortiguadora de fosfatos, NaH₂PO₄ 2 mM, pH = 6.37. El pH se ajustó con NaOH 2 M.
- Solución amortiguadora de fosfatos, NaH₂PO₄ 5 mM, pH = 7. El pH se ajusto con NaOH 2 M.
- Solución amortiguadora de boratos 0.025 M pH = 9
- NaOH 2 M
- HNO₃ 1 M
- HNO₃ 0.01 M
- FMOC-Cl 1 mg mL⁻¹
- Glifosato 50 µg mL⁻¹
- AMPA 200 µg mL⁻¹

4.3. Metodología

Las dos etapas generales en las que se basó el desarrollo del método global para la determinación analítica de glifosato y del AMPA se representan en los diagramas 3 y 4. Posteriormente se describe detalladamente cada etapa.

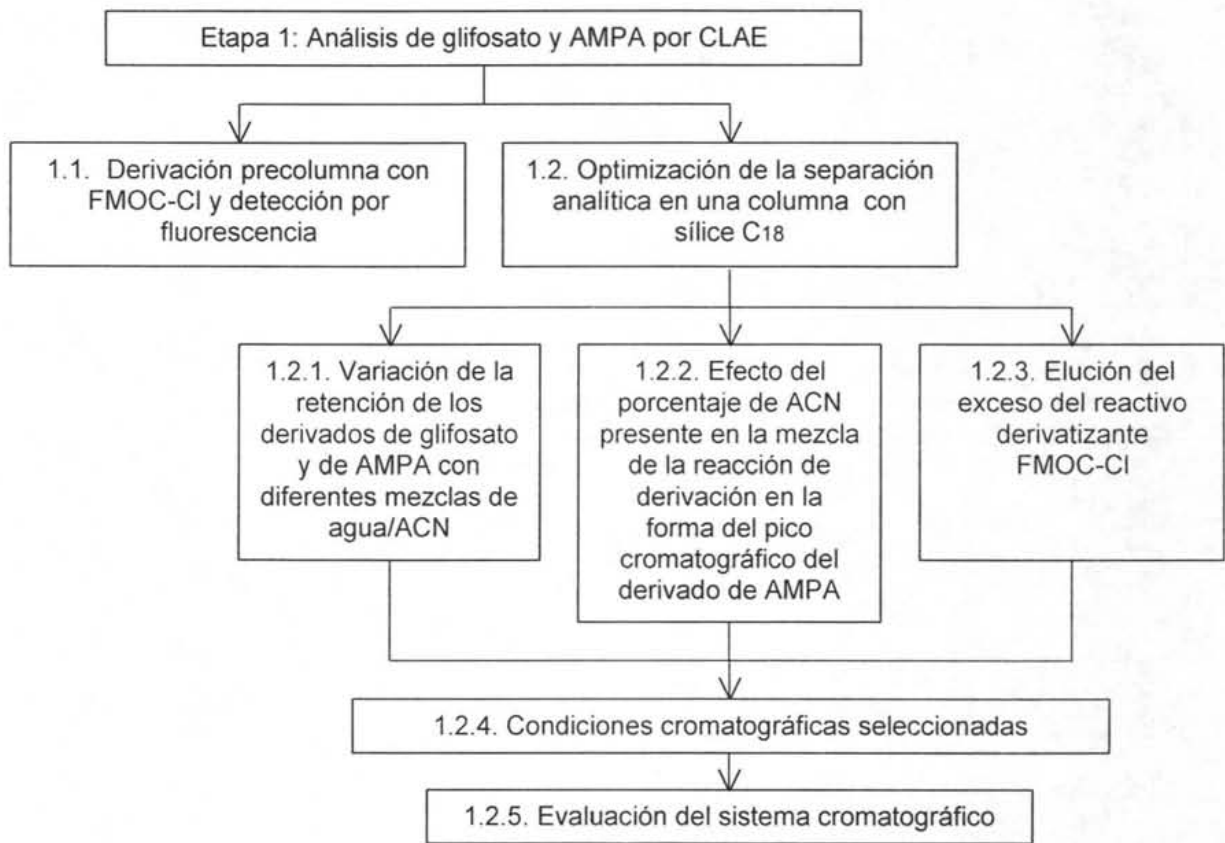


Diagrama 3. Optimización del método de análisis para glifosato y AMPA

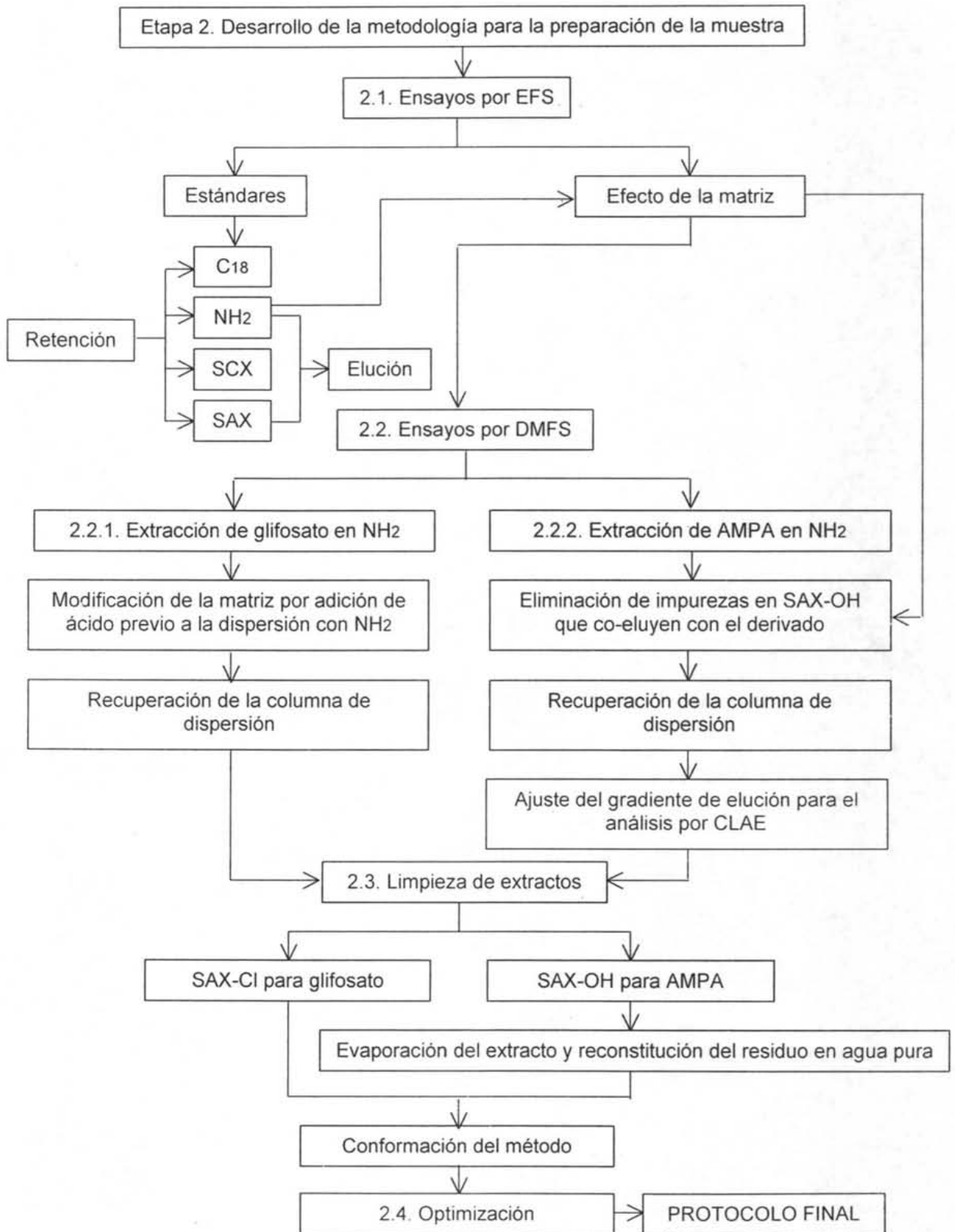


Diagrama 4. Desarrollo de la metodología para la preparación de la muestra

1. Análisis de glifosato y del AMPA por CLAE

1.1. Derivación precolumna con el reactivo FMOC-Cl y detección por fluorescencia

La reacción de derivación se realizó con base en el procedimiento de Sancho et al., (1996). Las condiciones utilizadas para realizar la reacción de derivación en los extractos y la detección de los derivados fluorescentes, durante el desarrollo del método de preparación de muestra, se indican en la tabla 15.

Tabla 15. Condiciones para la reacción de derivación con FMOC-Cl y la detección por fluorescencia

Reactivos	
Concentración de boratos (M) pH = 9	0.025
Concentración de FMOC-Cl (mg mL^{-1})	1
Reacción	
Volumen de extracto (mL)	1
Volumen de boratos (mL)	0.5
Volumen de FMOC-Cl (mL) en ACN	1
Tiempo de reacción (min)	30
Remoción del exceso de FMOC-Cl	2 ELL sucesivas con 2.5 mL de éter etílico c/una
Detección	
Longitud de onda para la excitación (nm)	264
Longitud de onda para la emisión (nm)	318

1.2. Optimización de la separación analítica en una columna con sílice C_{18}

Las condiciones de la separación analítica se establecieron con base en los siguientes estudios:

1.2.1. Variación de la retención de los derivados de glifosato y del AMPA con diferentes mezclas de agua/ACN

El objetivo de este estudio fue conocer y comparar la retención de los derivados de glifosato y AMPA. La variación del factor de capacidad (k') en función del porcentaje de ACN en la fase móvil se estudio inyectando mezclas de la reacción de derivación correspondientes a glifosato y AMPA 1 ppm por separado, con diferentes porcentajes de ACN en la fase móvil como se muestra en la tabla 16. La composición acuosa de la fase móvil correspondió a una solución amortiguadora de fosfato diácido 2 mM pH = 6.37.

El tiempo de retención de los derivados en cada composición de fase móvil se midió en los cromatogramas correspondientes, se calculó el k' y se construyeron las curvas de k' en función del porcentaje de ACN. El tiempo muerto (t_m) de la columna fue de 1.59 min y se midió en la perturbación de la línea base correspondiente al frente del disolvente.

Tabla 16. Porcentajes de ACN y solución de fosfatos utilizados para el estudio de la variación de k'

Ensayo	Composición de la fase móvil			
	Glifosato		AMPA	
	% ACN	% NaH ₂ PO ₄ 2 mM pH = 6.3	% ACN	% NaH ₂ PO ₄ 2 mM pH = 6.3
1	8	92	16	84
2	14	86	17	83
3	17	83	18	82
4	18	82	20	80
5	20	80	24	76

1.2.2. Efecto del porcentaje de ACN presente en la mezcla de la reacción de derivación en la forma del pico cromatográfico del derivado de AMPA

El objetivo de este estudio fue obtener las condiciones para que el pico cromatográfico del derivado del AMPA fuera más fino y simétrico. Se prepararon tres mezclas de reacción a partir de una solución de AMPA 2 ppm. Se tomó una alícuota de 100 μ L de cada una y se les añadió diferentes volúmenes de la solución de boratos 0.025 M: 100, 300 y 700 μ L, respectivamente, para obtener los siguientes factores de dilución: 1:2, 1:4 y 1:8. Las diluciones se inyectaron por separado y se les realizó una corrida cromatográfica con el siguiente gradiente: 18% ACN durante 10 min, después llegar hasta 40% ACN en 2 min, manteniendo esta composición constante 20 min.

1.2.3. Elución cromatográfica del reactivo derivatizante FMOC-Cl

El objetivo de este estudio fue obtener las condiciones para la separación del reactivo derivatizante de los compuestos de interés. Para esto, se inyectó al cromatógrafo la fase acuosa obtenida de la mezcla de reacción después de efectuar las ELL con éter etílico. El análisis se realizó con las corridas isocráticas de 75 min con los diferentes porcentajes de ACN en la fase móvil que se muestran en la tabla 17.

Tabla 17. Porcentajes de ACN en la fase móvil para la elución de FMOC-Cl

Ensayo	Composición de la fase móvil	
	% ACN	% NaH ₂ PO ₄ 2 mM pH = 6.3
1	8	92
2	20	80
3	24	76

La fase acuosa también se analizó con el siguiente gradiente: 8% ACN durante 10 min, después llegar hasta 40% ACN en 2 min, manteniendo esta composición constante 20 min.

1.2.4. Condiciones cromatográficas seleccionadas para realizar el análisis de extractos

De los resultados obtenidos en los estudios anteriores se derivaron dos gradientes a temperatura de la columna ambiente, flujo de 1 mL min^{-1} y un volumen de inyección de $20 \mu\text{L}$.

Los extractos con glifosato se analizaron con el gradiente 1:

isocrático de 0 a 5 min con 8% ACN y 92% NaH_2PO_4 2 mM pH = 6.37,

gradiente de 5 a 7 min de 8% ACN a 40% ACN y

isocrático de 7 a 27 min con 40% ACN y 60% NaH_2PO_4 2 mM pH = 6.37

Mientras que los extractos con AMPA se analizaron con el gradiente 2:

isocrático de 0 a 7 min con 16% ACN y 84% NaH_2PO_4 2 mM pH = 6.37,

gradiente de 7 a 9 min de 16% ACN a 40% ACN y

isocrático de 9 a 29 min con 40% ACN y 60% NaH_2PO_4 2 mM pH = 6.37

1.2.5. Evaluación del sistema cromatográfico

La linealidad y la precisión del sistema cromatográfico se evaluaron inyectando mínimo 3 mezclas de la reacción de derivación formadas a partir de soluciones estándar de glifosato y AMPA con las concentraciones que se indican en la tabla 18. Con estos puntos se construyeron las curvas de calibración y se obtuvieron los coeficientes de variación para cada concentración y el coeficiente de correlación para cada curva.

Tabla 18. Concentraciones para evaluar la linealidad del sistema cromatográfico

Glifosato (ppb)	AMPA (ppb)
10	82.5
15	125
50	156
150	500
500	1000
1000	-

El límite de detección del sistema se determinó inyectando mezclas de reacción correspondientes a concentraciones de 5 y 3 ppb para glifosato y diluciones de la mezcla de la reacción correspondientes a 62.5, 31.2 y 16.2 ppb para AMPA. La concentración límite se consideró aquella en la que el pico del derivado aparecía pero no se podía integrar.

2. Desarrollo de la metodología para la preparación de muestra

2.1. Ensayos por extracción en fase sólida

La selección de los adsorbentes con las mejores características para la extracción por DMFS y la limpieza de los extractos se basó en un estudio previo sobre el comportamiento de retención de los compuestos por la técnica de EFS en diferentes adsorbentes a base de sílice: C₁₈, NH₂, SCX, SAX, los cuales fueron empacados en cartuchos.

Los ensayos se realizaron por separado para cada compuesto con soluciones estándar. El volumen de carga de las soluciones fue de 5 mL con concentraciones de 0.5 a 10 ppm. Las corridas cromatográficas para ambos compuestos se realizaron con el gradiente 1.

La carga de las soluciones y la elución de los analitos, así como el lavado y acondicionamiento de los adsorbentes, se realizó con aplicación de vacío. El lavado de los adsorbentes, previo a su acondicionamiento con agua desionizada y purificada, se realizó con volúmenes variables de metanol (MeOH) con base en la cantidad utilizada: 5 mL para cartuchos hasta con 0.5 g y 10 mL para cartuchos con cantidades mayores.

Evaluación de la fuga y la retención de los analitos en los adsorbentes

La fuga de los analitos se evaluó inyectando en el cromatografo el efluente de las soluciones de carga. El porcentaje de fuga (% fuga) se calculó con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ fuga} = (A_E / A_{SC}) \times 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

donde A_E = área del compuesto en el efluente y A_{SC} = área del compuesto en la solución de carga.

El porcentaje de compuesto retenido (% retenido) en el adsorbente se obtuvo con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ retenido} = 100 - \% \text{ fuga} \quad \text{Ecuación 2}$$

Así, se consideró que el compuesto se retenía en un 100% si en el efluente no aparecía el pico correspondiente.

Evaluación de la elución de los analitos de los adsorbentes

La elución de los analitos se evaluó inyectando las fracciones obtenidas al aplicar volúmenes conocidos de disolventes puros o mezclas de los mismos en los cartuchos de extracción.

El volumen requerido para eluir la totalidad de la cantidad de compuesto retenido correspondió a la suma de los volúmenes de las fracciones en las que se encontró el pico correspondiente. Se consideró que el compuesto se eluía cuantitativamente si su porcentaje de recobro (% recobro) era mayor al 90%.

El recobro para analitos provenientes de soluciones estándar se basó en la siguiente relación:

$$\text{Recobro} = \frac{(\text{cantidad recuperada en la fracción de elución})}{(\text{cantidad total aplicada al cartucho})} \times 100$$

El cálculo se realizó con la ecuación 3:

$$\% \text{ recobro} = (A_F / A_{TS}) \times 100 \quad \text{Ecuación 3}$$

donde A_F corresponde al área del compuesto en la fracción de elución y A_{TS} al área del compuesto en una solución cuya concentración C_{TS} equivale a los microgramos (μg) totales aplicados en el volumen de la fracción de elución correspondiente. Por ejemplo, si el volumen y la concentración de la solución de carga fue de 5 mL $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, los μg totales aplicados (y también retenidos) serían 5 μg ; si el volumen de la fracción de elución fuera de 10 mL, $C_{TS} = 5 \mu\text{g} / 10 \text{ mL} = 0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$.

El recobro para analitos en las muestras fortificadas se basó en la siguiente relación:

$$\text{Recobro} = \frac{(\text{cantidad recuperada en la fracción de elución})}{(\text{cantidad total fortificada en la muestra})} \times 100$$

El cálculo se realizó con la ecuación 4:

$$\% \text{ recobro} = (A_F / A_{TM}) \times 100 \quad \text{Ecuación 4}$$

donde A_{TM} corresponde al área del compuesto en una solución estándar cuya concentración C_{TM} equivale a los μg totales fortificados en la muestra entre el volumen de la fracción de elución correspondiente. Por ejemplo: si 0.5 g de muestra se fortificó a un nivel de $1 \mu\text{g g}^{-1}$, los μg totales fortificados fueron $0.5 \mu\text{g}$ y, suponiendo que el volumen de la fracción de elución fuera de 5 mL, $C_{TM} = 0.5 \mu\text{g} / 5 \text{ mL} = 0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$.

2.1.1. Ensayo en C_{18}

La evaluación de la retención se realizó aplicando 5 mL de una solución acuosa de 10 ppm para cada analito, previo acondicionamiento de los 0.5 g de adsorbente con 5 mL de agua pura. Dado que no se retuvieron los analitos en este adsorbente no se realizaron los estudios para la elución.

2.1.2. Ensayos en NH_2

Se realizaron diferentes ensayos con el adsorbente amino para obtener las condiciones adecuadas para la retención y elución de ambos analitos. Se inyectaron los efluentes y todas las fracciones de elución indicadas a continuación.

2.1.2.1. Retención de glifosato en agua pura y elución con diferentes soluciones acuosas

La retención de glifosato se evaluó aplicando 5 mL de una solución del analito en agua pura, previo acondicionamiento del adsorbente con 5 mL del mismo disolvente. Posteriormente, se procedió al análisis de los efluentes.

Las concentraciones, cantidades de adsorbente y condiciones para el estudio del patrón de elución se indican en la tabla 19.

Tabla 19. Ensayos con glifosato en adsorbente NH₂ por EFS

Ensayo	Concentración del analito (ppm)	Cantidad de adsorbente (g)	Solución de elución	Fracciones de elución sucesivas de 5 mL
1	10	0.1	Agua pura	3
2	10	0.1	NaH ₂ PO ₄ 2 mM pH = 7	2
3	10	0.1	NaH ₂ PO ₄ 5 mM pH = 7	2
4	1	0.2	NaH ₂ PO ₄ 5 mM pH = 7	2
5	1	0.5	NaH ₂ PO ₄ 5 mM pH = 7	2

2.1.2.2. Efecto del pH en la retención de glifosato y AMPA

Se realizaron estudios sobre la retención de los compuestos aplicados en 5 mL de soluciones acuosas de HNO₃ pH = 4, en 0.5 g de adsorbente amino. Los cartuchos fueron previamente acondicionados con 20 mL de una solución acuosa de HNO₃ pH = 4. Posteriormente, se analizaron cromatográficamente los efluentes, que fueron ajustados con NaOH 7.5 mM entre pH 6 y 9 para su derivación.

La elución de ambos cartuchos se realizó con dos fracciones sucesivas de 5 mL c/una de una solución de NaH₂PO₄ 5 mM pH = 7.

2.1.3. Ensayos en SCX-Na

Los estudios en SCX-Na se llevaron a cabo únicamente para evaluar la retención. El patrón de elución no se estudió dado que ninguno de los analitos se retuvo en este adsorbente.

2.1.3.1. Retención de glifosato a pH = 2

La retención de glifosato se evaluó en una solución acuosa de HNO₃ 0.01 M pH = 2 y con volúmenes crecientes de esta misma solución para acondicionar 1 g de adsorbente, como se indica en la tabla 20. La concentración del analito fue de 10 ppm en un volumen de carga de 5 mL en todos los ensayos. El pH de los percolados se ajustó con NaOH 2 M entre 6 y 9, previo a su derivación.

Tabla 20. Volúmenes de acondicionamiento para la retención de glifosato en SCX-Na

Ensayo	Volumen de HNO ₃ 0.01 M (mL) para el acondicionamiento
1	10
2	20
3	50
4	100

2.1.3.2. Retención del AMPA a pH = 2

La retención del AMPA se evaluó con la aplicación de 5 mL de una solución del analito de 10 ppm en HNO₃ 0.01 M pH = 2 y acondicionando 1 g de adsorbente con 100 mL de la misma solución ácida. El pH del percolado se ajustó con NaOH 2 M entre 6 y 9, previo a su derivación.

2.1.4. Ensayos en SAX

Se realizaron diferentes ensayos que permitieron obtener las condiciones adecuadas para la retención y la elución de los analitos. Se inyectaron los efluentes y todas las fracciones de elución indicadas a continuación.

2.1.4.1. Retención de glifosato en SAX-OH y elución con HNO₃ 7.5 mM pH = 2.1

La retención se evaluó en cartuchos con 0.1 g de adsorbente, previamente acondicionados con 20 mL de NaOH pH = 8, aplicando el analito en 5 mL de las soluciones acuosas que se indican en la tabla 21.

La elución, en ambos ensayos, se realizó con la adición de 2 volúmenes sucesivos de 5 mL c/u de HNO₃ 7.5 mM pH = 2.1. El pH de las fracciones de elución se ajustó con NaOH 2 M entre 6 y 9, previo a su derivación.

Tabla 21. Condiciones para los ensayos de retención de glifosato en 0.1 g de SAX-OH

Ensayo	Concentración de glifosato (ppm)	Solución de carga
1	10	NaOH pH = 8
2	1	NaH ₂ PO ₄ 5 mM pH = 7

2.1.4.2. Retención de AMPA en SAX y elución con HNO₃ 0.01 M

La tabla 22 muestra las condiciones con las que se verificó la retención del AMPA en el adsorbente SAX con el análisis de los efluentes. La concentración del AMPA fue de 0.5 ppm en 5 mL de solución de carga para todos los ensayos.

El patrón de elución únicamente se estudió para los cartuchos con 0.5 g de adsorbente (ensayos 6 y 7) y se realizó con HNO₃ 0.01 M pH = 2 con la adición de 2 volúmenes sucesivos de 20 mL, c/u. El pH de las fracciones de elución se ajustó con NaOH 2 M entre 6 y 9, previo a su derivación.

Tabla 22. Condiciones para los ensayos de retención de AMPA en SAX

Ensayo	Cantidad de adsorbente (g)	Acondicionamiento del adsorbente	Solución de carga
1	0.2	5 mL NaH ₂ PO ₄ 5 mM pH = 7	NaH ₂ PO ₄ 5 mM pH = 7
2	0.2	5 mL agua pura	agua pura
3	0.2	25 mL NaOH pH = 8	NaOH pH = 8
4	0.2	35 mL NaOH pH = 8	NaOH pH = 8
5	0.2	25 mL NaOH pH = 8 y 5 mL NaH ₂ PO ₄ 5 mM pH = 7	NaH ₂ PO ₄ 5 mM pH = 7
6	0.5	50 mL NaOH pH = 9	NaH ₂ PO ₄ 5 mM pH = 7
7	0.5	50 mL NaOH pH = 9	agua pura

2.1.5. Efecto de la matriz en la extracción de glifosato con el adsorbente amino

El objetivo de los estudios sobre el efecto de la matriz fue conocer las diferencias o similitudes existentes con las condiciones de extracción establecidas anteriormente con las soluciones estándar.

Primeramente se obtuvieron los extractos crudos que se aplicaron en los cartuchos para EFS. Para esto se picó finamente un jitomate sin cáscara y sin semillas y se homogeneizó en un mortero de vidrio. Se fortificaron 3 muestras de jitomate de 1 g c/una con las condiciones que se muestran en la tabla 23. Después se extrajeron con 5 mL de agua pura mezclando mecánicamente durante 5 min y sonicando durante 10 min. Los extractos crudos se filtraron por gravedad utilizando papel filtro *Whatman*. Posteriormente, estos extractos se percolaron en los cartuchos con adsorbente amino de diferentes cantidades y se eluyeron con una solución de NaH₂PO₄ 5 mM pH = 7 como se detalla en la tabla 23. Se inyectaron los efluentes para verificar la retención y las fracciones de elución indicadas para el cálculo de los recobros.

Tabla 23. Condiciones para la extracción de glifosato con el adsorbente NH₂ por EFS

Ensayo	Nivel de fortificación (µg g ⁻¹)	Cantidad de adsorbente (g)	Volumen de acondicionamiento con agua pura (mL)	Fraciones de elución sucesivas de 5 mL
1	50	0.1	5	1
2	50	0.2	5	2
3	5	0.5	20	2

El ensayo 3 se repitió con una muestra blanco. En todos los ensayos realizados para el desarrollo de la metodología, las muestras blanco corresponden a muestras de jitomate no fortificado con los analitos.

2.2. Ensayos por dispersión de la matriz en fase sólida

Los ensayos se realizaron con muestras de 0.5 g fortificadas a niveles del orden de µg g⁻¹, añadiendo un volumen constante de 100 µL de la solución fortificadora con 1 hora de reposo. El adsorbente amino sin acondicionar se utilizó para la extracción en una relación muestra:adsorbente 1:1 y la dispersión se realizó en un mortero de vidrio. Los ensayos se efectuaron por separado para glifosato y AMPA.

La elución se evaluó de la misma manera que en los ensayos por EFS obteniendo el porcentaje de recobro con la ecuación 4 (p. 45).

2.2.1. Extracción de glifosato

La tabla 24 muestra las diferentes modificaciones realizadas a la muestra, previo a la dispersión, así como las soluciones con las que se realizó la elución y el número de fracciones que se aplicaron a la columna.

También, se indican los niveles de fortificación en el jitomate utilizados. En los ensayos 3 y 4 se prepararon muestras blanco. Se inyectaron al cromatógrafo todas las fracciones de elución indicadas.

Tabla 24. Elución de glifosato de la columna de dispersión

Ensayo	Nivel de fortificación ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Modificación de la matriz previa a la dispersión	Solución de elución (4 fracciones sucesivas de 5 mL, c/una)
1	10	NO	NaH_2PO_4 5mM pH = 7
2	10	NO	HNO_3 7.5 mM, previo lavado de la columna con 5 mL de NaH_2PO_4 5 mM pH = 7
3	10	1 gota de HNO_3 1 M	NaH_2PO_4 5mM pH = 7
4	10	120 μL HNO_3 1 M	NaH_2PO_4 5mM pH = 7
5	5	120 μL HNO_3 1 M	NaH_2PO_4 5mM pH = 7

2.2.2. Extracción de AMPA

Los ensayos para extraer el AMPA de la columna de dispersión se realizaron inicialmente con las mismas condiciones del glifosato (ver tabla 24). Sin embargo, la presencia o ausencia del AMPA no se pudo observar en el análisis de las fracciones eluidas dado que numerosas impurezas salían al mismo tiempo de retención que el derivado del AMPA. Por lo tanto, para conocer el comportamiento del analito fue necesario realizar varias pruebas preliminares con el fin de eliminar las interferencias de los extractos provenientes de la columna de dispersión.

Así, estos extractos se limpiaron con las siguientes combinaciones de adsorbentes empacados c/u en cartuchos por separado:

- SAX-OH (0.2 y 0.5 g)
- SAX-OH (0.5 g) + C₁₈ (0.2 g)
- SAX-OH (0.5 g) + sílice vírgen (0.5 g)
- SAX-OH (0.5 g) + CN (0.5 g)
- SAX-OH (0.5 g) + NH₂ (0.5 g)

Estas pruebas se realizaron acidificando la matriz con 120 μ L de HNO₃ 1M previamente a la dispersión con el adsorbente amino y se empleó como disolvente de elución agua pura para la obtención del extracto. La elución de los cartuchos con SAX-OH se realizó con HNO₃ 0.01 M pH = 2 y el eluato se aplicó a los cartuchos respectivos para la segunda limpieza. De éstos últimos se analizó únicamente el efluente.

Desafortunadamente, con ninguna de estas combinaciones se lograron eliminar completamente los interferentes en el cromatograma, ni realizando lavados intermedios a la columna de dispersión con 5 mL de MeOH, MeOH-agua (1:1) y agua pura, respectivamente.

Por lo anterior, se decidió modificar las condiciones del análisis cromatográfico (gradiente 1) para separar el pico del derivado del AMPA de los interferentes y, además, obtener un tiempo de retención menor. Así, las condiciones para el análisis cromatográfico de los extractos con AMPA fueron las correspondientes al gradiente 2. También, para evitar el ensanchamiento de este pico en la zona isocrática del gradiente 2 fue necesario diluir la mezcla de la reacción de derivación de los extractos 4 veces con la solución de boratos 0.025 M, previo a su inyección en el cromatógrafo.

Con estas nuevas condiciones se realizaron los ensayos de elución de la columna de dispersión que se indican en la tabla 25. El nivel de fortificación fue de 40 μ g g⁻¹. Se prepararon muestras blanco para los ensayos 1 y 2.

Tabla 25. Condiciones de elución del AMPA de la columna de dispersión

Ensayo	Solución acuosa para la elución de la columna de dispersión	Fracciones de elución sucesivas de 5 mL c/una
1	Agua pura	1
2	Agua pura	4
3	NaOH pH = 9	4
4	HNO ₃ 0.01 M	4
5	Agua pura-ACN 9:1	4

La limpieza del extracto con SAX-OH (1 g) y NH₂ (0.5 g) se realizó únicamente para el ensayo 1, eluyendo con 30 mL de HNO₃ 0.01 M pH = 2 del primer cartucho y se inyectó el efluente del cartucho con NH₂. En los ensayos restantes se inyectaron directamente las fracciones de elución de la columna de dispersión correspondientes.

2.3. Limpieza de los extractos obtenidos por DMFS

La obtención de los extractos fue a partir de muestras de jitomate de 0.5 g, modificando la muestra con 120 µL de HNO₃ 1M previo a la dispersión en un mortero de vidrio, con una relación muestra:adsorbente 1:1. Las ecuaciones 1, 2 y 4 (p. 43 y 45) se utilizaron para evaluar la fuga, la retención y el recobro, respectivamente.

2.3.1. Limpieza del extracto de glifosato

La tabla 26 muestra las diferentes condiciones que se utilizaron para la limpieza de extractos de glifosato, obtenidos a partir de muestras fortificadas con 10 µg g⁻¹. El tiempo de reposo después de la fortificación para los ensayos 1 y 2 fue de 1 h, mientras que para los ensayos 3 y 4 fue de 3 h. La elución de la columna de dispersión fue con 10 mL de NaH₂PO₄ 5 mM pH = 7, excepto para el ensayo 4 que fue de 20 mL.

Se midió el pH de los extractos y siempre fue de 8 no siendo necesario ajustarlo para su limpieza en el adsorbente SAX-Cl, cuyo acondicionamiento se hizo con agua pura.

La retención se evaluó en los cuatro ensayos inyectando los efluentes del cartucho con el adsorbente SAX-Cl. El patrón de elución únicamente se estudió para los ensayos 3 y 4. El pH de las fracciones de elución del intercambiador se ajustó con NaOH 2 M entre 6 y 9, previo a su derivación.

Tabla 26. Condiciones para la limpieza de extractos de glifosato con SAX-Cl por EFS

Ensayo	Cantidad de adsorbente (g)	Solución de elución	Volumen de elución (mL)
1	0.1	-	-
2	0.2	-	-
3	0.5	HNO ₃ 0.01 M	20
4	0.5	HNO ₃ 0.01 M	15

2.3.2. Limpieza del extracto de AMPA

La limpieza de los extractos del AMPA obtenidos de la columna de dispersión (fortificación de la muestra con 40 µg g⁻¹, tiempo de reposo 1 h y elución con 30 mL agua pura) se basó en los estudios presentados en la sección 2.1.4.2. Se probaron 1 y 2 g de intercambiador, que se acondicionaron con una solución de NaOH pH = 9. La tabla 27 muestra los volúmenes de acondicionamiento y la cantidad de adsorbente de tres ensayos para esta limpieza. El extracto del ensayo 3 se evaporó y el residuo se reconstituyó en 10 mL de agua pura, se le midió el pH y se determinó que no era necesario ajustarlo para su aplicación en el intercambiador.

La elución de los cartuchos SAX-OH se realizó con 2 fracciones sucesivas de 20 mL c/una de HNO₃ 0.01 M pH = 2, para todos los ensayos. Se inyectó el efluente y las fracciones de elución del cartucho de limpieza. El pH de las fracciones de elución se ajustó con NaOH 2 M entre 6 y 9, previo a su derivación.

Tabla 27. Condiciones para la limpieza de extractos del AMPA con SAX-OH por EFS

Ensayo	Cantidad de adsorbente (g)	Acondicionamiento del adsorbente con NaOH pH = 9 (mL)
1	1	100
2	2	200
3	2	200

2.4. Optimización del método de preparación de la muestra

La conformación del método global para la preparación de la muestra se basó en todos los resultados de los ensayos anteriores. Sin embargo, fue necesario realizar ajustes para completar la optimización. Los criterios para considerar que el método era reproducible y cuantitativo fueron el coeficiente de variación, que debería ser menor al 20%, y el porcentaje de recobro, que debería ser mayor al 70%.

2.4.1. Ajustes al método

Las variables que se ajustaron, antes de evaluar la reproducibilidad y la recuperación del método al aplicarlo a las muestras de jitomate, se enlistan a continuación:

- Tiempo de reposo posterior a la fortificación
- Material del mortero empleado para la dispersión
- Acondicionamiento del adsorbente (NH₂) para la dispersión
- Proporción muestra - adsorbente

- Tiempo de evaporación del extracto proveniente de la columna de dispersión del AMPA ($F_{1\text{AMPA}}$)

El tiempo de reposo posterior a la fortificación se aumentó a 3 h y la dispersión se realizó en un mortero de ágata. Con respecto a la proporción muestra/adsorbente, se probaron estas dos relaciones 1:1 y 1:2. Para esto, se pesaron 0.5 g y 1 g de adsorbente amino, se lavaron con 5 mL de MeOH y se acondicionaron con 10 mL de agua pura, por separado. Se secaron con aplicación de vacío y se mezclaron con 0.5 g de muestra acidificada con 120 μL de HNO_3 1 M y a la que se le había añadido 100 μL de agua pura, simulando la fortificación, y se verificó si era posible empacar la mezcla en cartuchos. Por otra parte, se evitó que se llegara hasta la sequedad durante la evaporación del extracto proveniente de la columna de dispersión del AMPA.

Con estas modificaciones, el método se aplicó a 7 muestras fortificadas con 100 μL de una solución que contenía ambos compuestos (glifosato 22.5 ppm y AMPA 30 ppm) para obtener 4.5 $\mu\text{g g}^{-1}$ de glifosato y 6 $\mu\text{g g}^{-1}$ de AMPA.

Se obtuvieron las concentraciones en los extractos purificados, el porcentaje de recobro, la desviación estándar, el coeficiente de variación y el límite de detección para un nivel de confianza del 99%. Este último se estableció con base en el método oficial de la EPA (US CFR 40, parte 136, Apéndice B) y que establece la siguiente ecuación:

$$\text{LDM} = t_{(n-1, 1-\alpha=0.99)} * S \quad \text{Ecuación 5}$$

donde LDM = límite de detección del método, t = t de student, S = desviación estándar, n = número de muestras.

5. RESULTADOS Y ANÁLISIS

5.1. Análisis de glifosato y AMPA por CLAE

5.1.1. Derivación precolumna con el reactivo FMOC-Cl y detección por fluorescencia

El procedimiento de Sancho et al., (1996), tiene las ventajas siguientes, con respecto a otros reportados en la literatura (ver anexo I): 1) requiere una concentración de FMOC-Cl cinco veces menor, por lo que durante el desarrollo del método de preparación de muestra se consideró conveniente para evitar el gasto excesivo del reactivo; 2) el número de reactivos requeridos es menor, ya que no se añade acetona a la mezcla de reacción; 3) establece un tiempo de 30 min para que ocurra la reacción, lo cual garantiza que la reacción se lleve a cabo cuantitativamente. Por estas razones fue el método que se utilizó en el presente trabajo además de que permitió obtener resultados reproducibles como se muestra en el sección 5.1.4.

Sin embargo, la derivación precolumna tiene el inconveniente de la presencia de exceso de reactivo fluorescente. La concentración del FMOC-Cl en la mezcla de reacción es tan elevada que el detector se satura si ésta se inyecta directamente. Por lo anterior, fue necesario realizar dos ELL para remover el reactivo sobrante de la mezcla de la reacción e inyectar la fase acuosa final durante el desarrollo del método de preparación de muestra.

5.1.2. Optimización de la separación analítica en una columna con sílice C₁₈

Los ensayos que se realizaron en esta etapa correspondieron al estudio del comportamiento de retención de los derivados de glifosato y del AMPA en fase inversa, así como del efecto de la proporción de ACN en la mezcla de reacción en la forma del pico cromatográfico del derivado de AMPA.

También, dado que el reactivo derivatizante FMOC-Cl se añadió en exceso y, aunque este se eliminó en gran parte por ELL, en esta etapa se buscó cómo evitar lo más posible su co-elución junto con los compuestos de interés.

A continuación se describen los resultados obtenidos con soluciones estándar de los derivados que permitieron posteriormente establecer las condiciones para el análisis cromatográfico de los extractos de jitomate.

5.1.2.1. Variación de la retención de los derivados de glifosato y del AMPA con diferentes mezclas de agua/ACN

Los logaritmos del K_{ow} del glifosato y del AMPA son negativos, como se muestra en las tablas 3 y 4 sobre las propiedades fisicoquímicas de los analitos, por lo tanto se infiere que son compuestos muy polares que no se retienen en adsorbentes apolares, como la sílice C_{18} . No obstante, la formación de los derivados disminuye el carácter polar de los compuestos originales por lo que se estudio si era posible la retención y la separación de los derivados fluorescentes en una fase inversa. Esto se realizó con el estudio de la variación de k' de cada derivado en función del porcentaje de modificador orgánico (ACN) en la fase móvil.

El comportamiento de retención del derivado de glifosato en función del porcentaje de ACN se presenta en la figura 6. Se observa claramente que la retención en la sílice C_{18} es limitada a porcentajes superiores al 10% de ACN. Esto se debe a que el derivado fluorescente, aunque menos polar que el glifosato, también es un compuesto iónico que difícilmente interacciona con la fase estacionaria. No obstante, la retención aumenta exponencialmente con porcentajes menores a 10%.

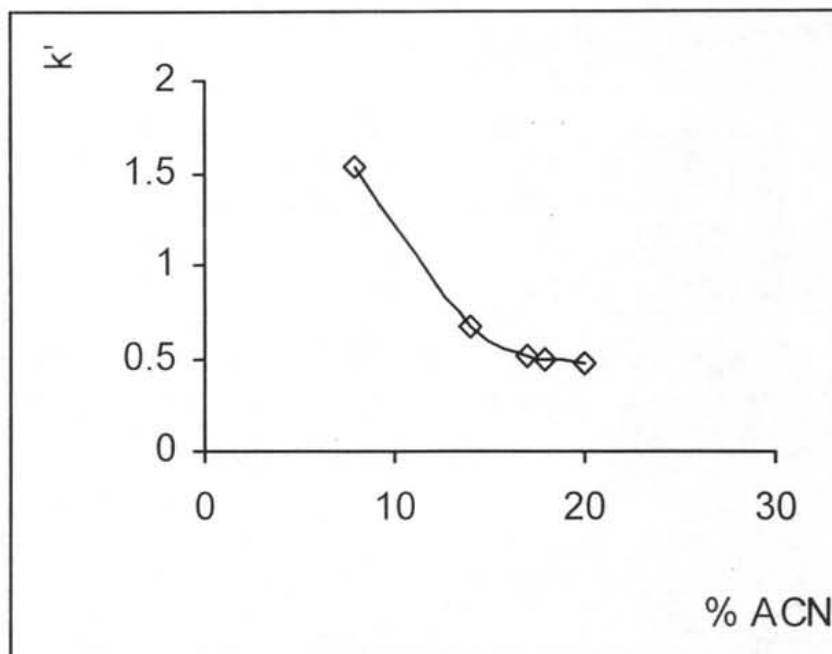


Fig. 6. Comportamiento de retención del derivado de glifosato en sílice C₁₈

El derivado del AMPA si presentó una retención notable desde porcentajes inferiores al 20%, aumentando drásticamente a porcentajes menores a 18%, como se observa en la figura 7. El compuesto original es un ácido más débil, lo que se reflejó en el comportamiento de su derivado en fase inversa asemejándose al de una molécula neutra.

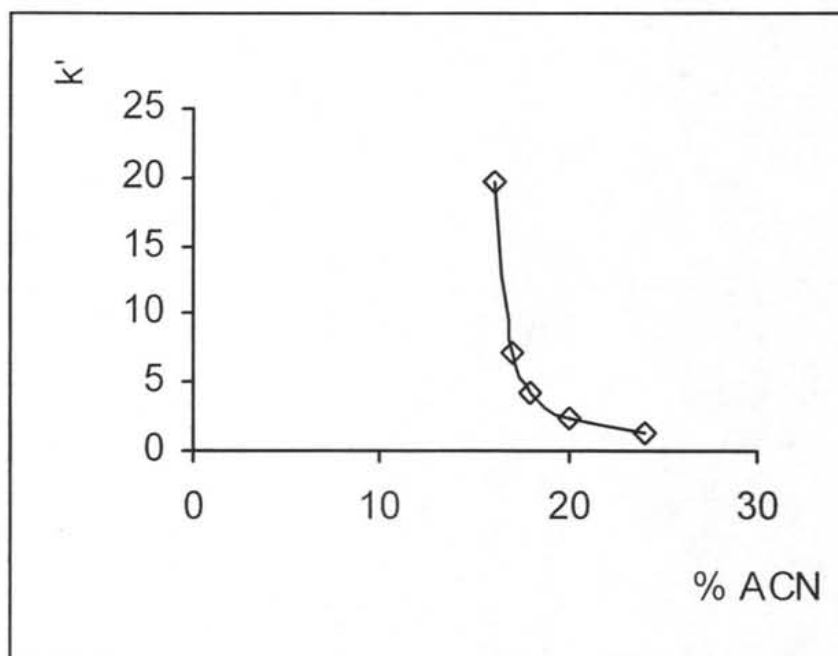


Fig. 7. Comportamiento de retención del derivado de AMPA en sílice C₁₈

La comparación de las figuras 6 y 7 permitió observar que el comportamiento de retención de cada derivado es marcadamente diferente y, por lo tanto, su separación era factible.

5.1.2.2. Efecto del porcentaje de ACN presente en la mezcla de la reacción de derivación en la forma del pico cromatográfico del derivado del AMPA

La proporción de ACN en la mezcla de la reacción de derivación (40%) no fue compatible con la elución del derivado del AMPA dado que los picos de éste se ensanchan en modo isocrático. Este problema no se presentó para el derivado de glifosato, cuya forma del pico siempre fue fina, como se muestra en la figura 8.

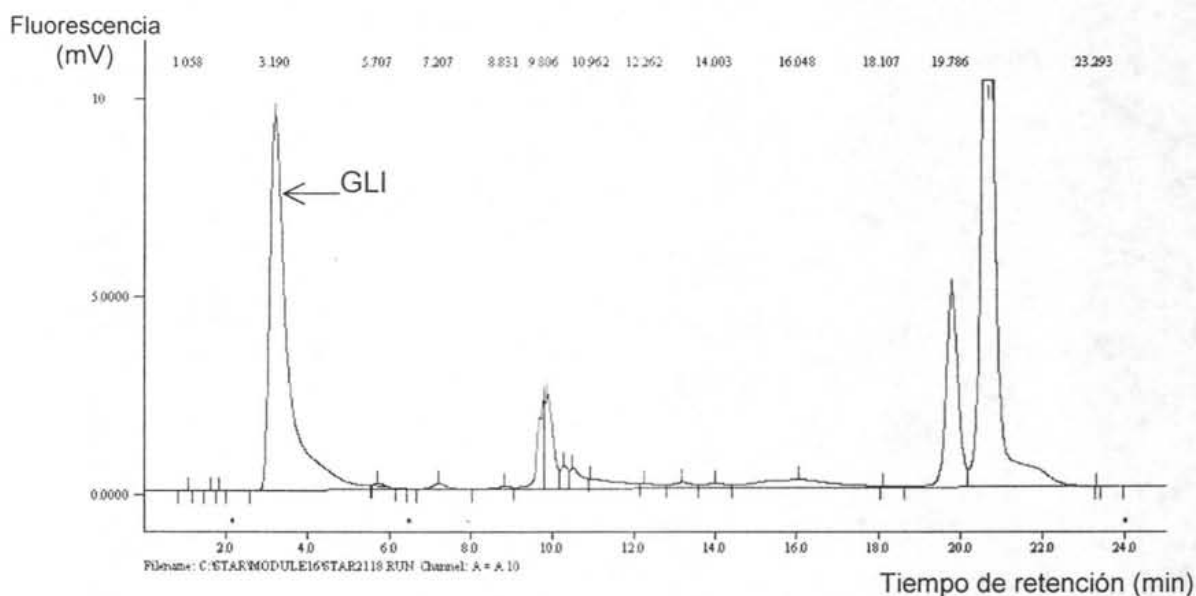


Fig. 8. Cromatograma de la inyección directa de una mezcla de reacción preparada a partir de una solución estándar de glifosato 0.5 ppm. Análisis con el gradiente 1

Este inconveniente se solucionó diluyendo la mezcla de la reacción de derivación con diferentes proporciones de la solución amortiguadora de boratos 0.025 M, una vez preparado el derivado del AMPA. Se encontró que con la dilución en una proporción 1:4 se obtenían los mejores picos, como se observa en la figura 9 que corresponde a una mezcla de reacción con 10% de ACN.

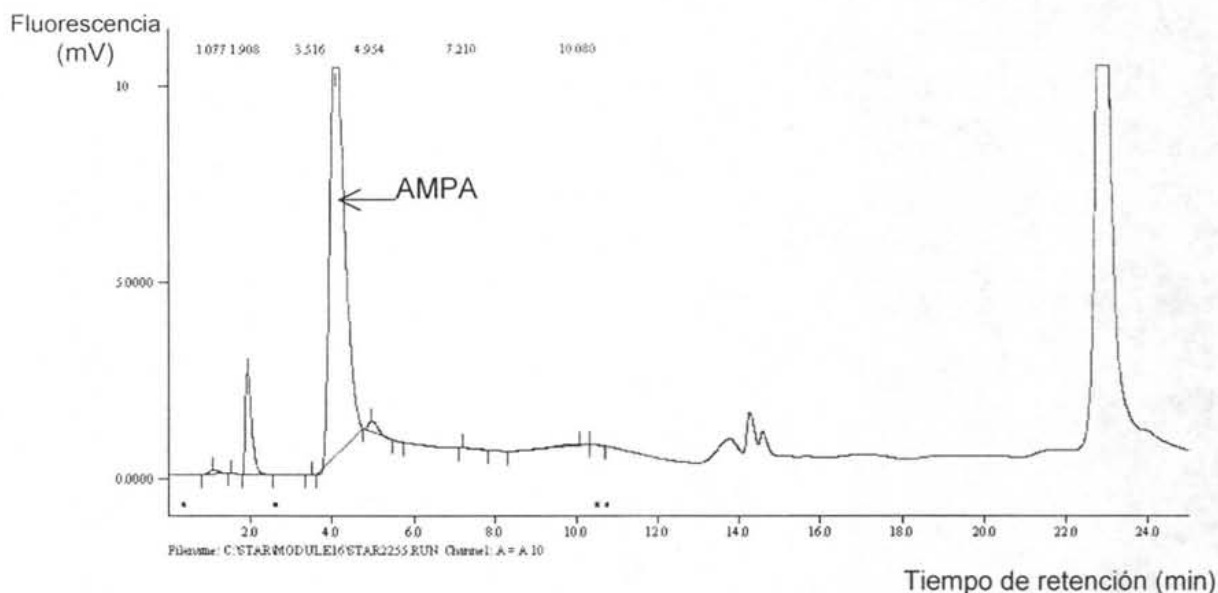


Fig. 9. Cromatograma de la inyección directa de la dilución 1:4 de una mezcla de reacción preparada a partir de una solución estándar de AMPA 2 ppm con boratos 0.025 M. Análisis en gradiente: 18% ACN durante 10 min, después en 2 min hasta 40% ACN manteniendo esta composición constante durante 20 min

La reducción del porcentaje de ACN en la mezcla de reacción indicó que la interacción del derivado del AMPA con la fase estacionaria es muy sensible al porcentaje de ACN presente en la mezcla de la reacción.

Los resultados de los estudios anteriores permitieron confirmar que los derivados sí presentan una retención suficiente en sílice C_{18} empleando fases móviles compuestas por ACN y una solución amortiguadora de fosfato diácido a $\text{pH} = 6.37$ y además que se podían separar. Por lo tanto, es evidente que el análisis de los derivados sí se puede realizar por CLAE en fase inversa, a pesar de su carácter iónico, característica que reduce la retención en adsorbentes con grupos C_{18} .

5.1.2.3. Elución cromatográfica del reactivo derivatizante FMOC-Cl

El FMOC-Cl es un compuesto apolar que fácilmente se retiene en la sílice C_{18} . Por lo anterior, se realizaron dos ELL para remover el exceso de reactivo sobrante de la mezcla de la reacción y se inyectó la fase acuosa final, con el fin de seleccionar las condiciones para la elución del reactivo sobrante en un tiempo de retención diferente al de los compuestos de interés.

El comportamiento cromatográfico del FMOC-Cl presente en la fase acuosa después de las ELL, que se analizó con porcentajes de ACN menores a 24% en la fase móvil no permitió la elución del compuesto en un tiempo menor a 1 h. Por lo tanto, se decidió iniciar la corrida cromatográfica isocráticamente con 8% de ACN durante 10 min, etapa que permitiría la retención y la elución del derivado de glifosato en un tiempo adecuado ($t_r = 4$ min, ver figura 8), posteriormente realizar un gradiente en 2 min hasta 40% ACN y finalmente mantener esta composición constante 20 min. El gradiente se impuso para que el cambio de la composición de la fase móvil no fuera brusco ya que para la elución del FMOC-Cl fue necesario utilizar 40% de ACN en la fase móvil.

El FMOC-Cl se eluyó en un tiempo de retención de 24 min, que es mucho más extenso que el correspondiente al derivado de glifosato, como se puede observar en la figura 10 que corresponde a la inyección de la fase acuosa. Así, se consideró adecuado utilizar apenas un 8% de ACN para la separación analítica del derivado de glifosato ($t_r = 4$ min), siendo la retención y la elución adecuadas sin co-eluir el exceso de reactivo derivatizante.

Por otra parte, la presencia del FMOC-Cl en el cromatograma anterior indicó que con 2 extracciones no se removi6 completamente el reactivo. La remoci6n del exceso de FMOC-Cl con un n6mero mayor de ELL no se consider6 pr6ctica por el hecho de implicar un tiempo global muy extenso para este procedimiento.

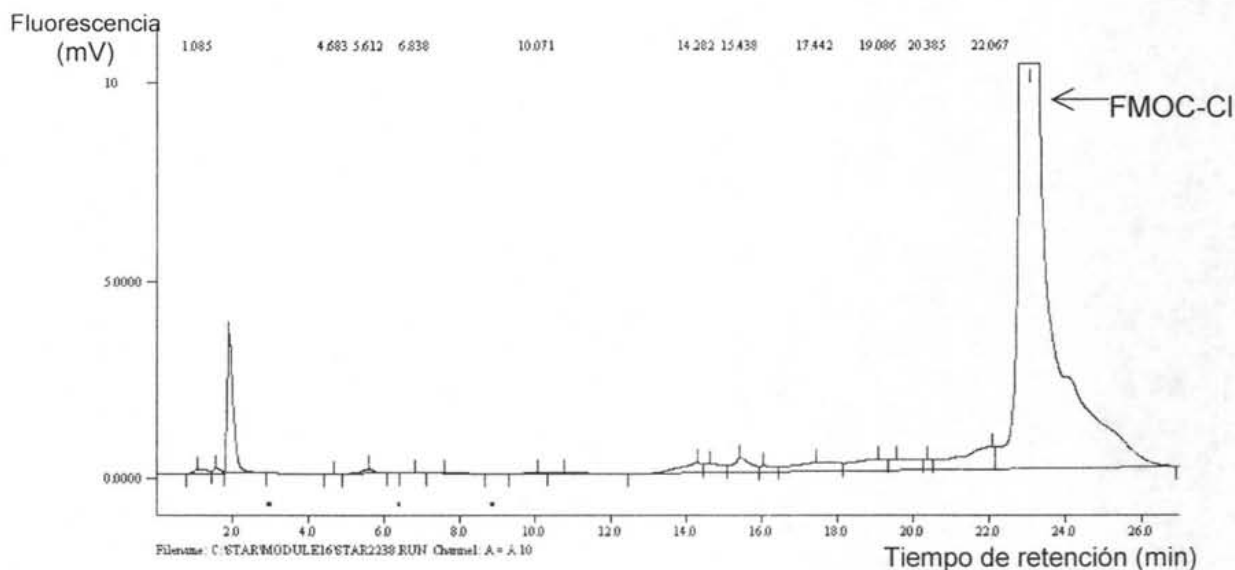


Fig. 10. Cromatograma de la eluci6n del reactivo derivatizante FMOC-Cl. An6lisis isocr6tico con 8% ACN 10 min, gradiente hasta 40% ACN en 2 min y composici6n constante 20 min

La corrida cromatogr6fica descrita se modific6 a 8% ACN durante 5 min en la primera parte isocr6tica para permitir una eluci6n m6s r6pida del FMOC-Cl ($t_r=20$ min), estableci6ndose as6 el gradiente 1. Adem6s, este gradiente contribuy6 al afinamiento del pico del derivado del AMPA en un tiempo de retenci6n conveniente ($t_r = 10$ min), con respecto al tiempo de retenci6n del derivado de glifosato ($t_r = 4$ min), como se observa en la figura 11.

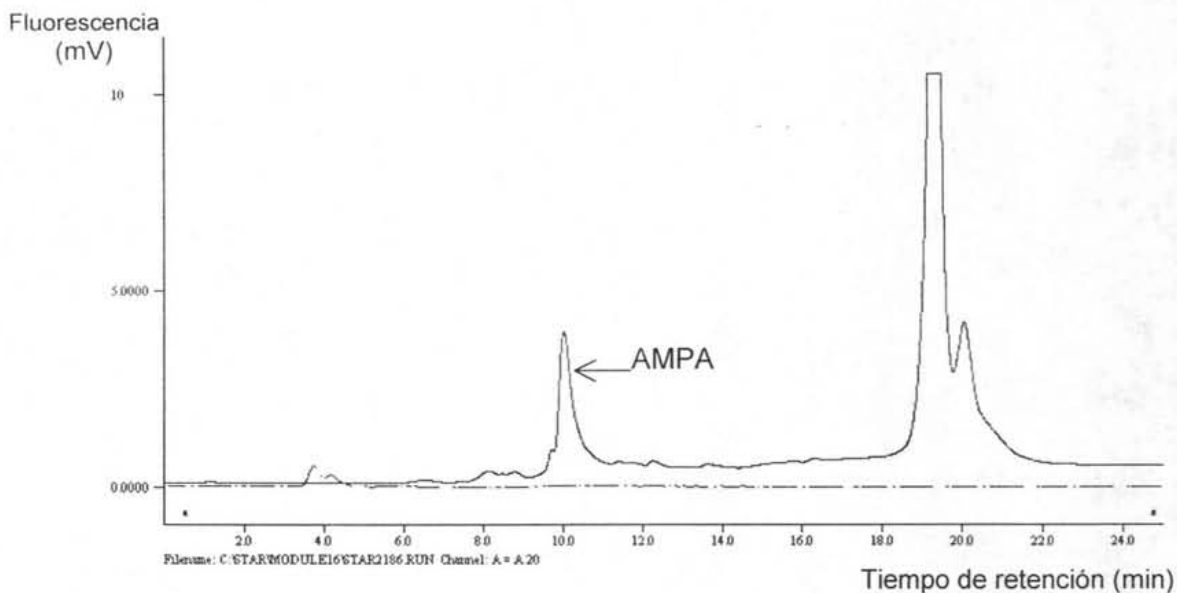


Fig. 11. Cromatograma de la inyección directa de una mezcla de reacción preparada a partir de una solución estándar de AMPA 0.67 ppm. Análisis con el gradiente 1

El gradiente 1 permitía la separación del glifosato, del AMPA y del FMOC-Cl en una sola corrida cromatográfica. Sin embargo, el análisis de muestras de jitomate fortificadas con AMPA no fue posible debido al efecto de la matriz, como se explicará más adelante. Así, con base en el estudio de retención del derivado de AMPA (ver figura 7) se decidió que la corrida cromatográfica para los extractos con este compuesto iniciara con 16% de ACN durante 7 min, posteriormente realizar un gradiente en 2 min hasta 40% ACN y finalmente mantener esta composición constante 20 min, estableciéndose el gradiente 2. La primera etapa isocrática de esta corrida se estableció en 16% de ACN porque la retención y la elución de este derivado se consideraron adecuadas en un tiempo de retención de 4.5 min sin co-eluir el exceso de reactivo derivatizante.

5.1.3. Condiciones cromatográficas seleccionadas para realizar el análisis de extractos

El gradiente 1 se seleccionó para realizar el análisis de las soluciones estándar de glifosato y del AMPA en los ensayos por EFS y de los extractos de jitomate fortificados con glifosato. Debido a la presencia de impurezas en la zona de elución del derivado de AMPA provenientes de las muestras de jitomate, el análisis de los extractos de jitomate fortificados con AMPA se realizó con el gradiente 2.

5.1.4. Evaluación del sistema cromatográfico

El comportamiento del derivado de glifosato fue lineal ($r^2= 0.9988$) y reproducible en el intervalo de 4 a 400 ppb, siendo el límite de detección del sistema cromatográfico de 3 ppb para el glifosato. Mientras que para el derivado del AMPA, el comportamiento fue lineal ($r^2= 0.9937$) en el intervalo de 33 a 400 ppb y el límite de detección fue de 16.25 para el AMPA.

Los coeficientes de variación que se obtuvieron para varias mezclas de reacción estándar de glifosato y del AMPA con diferentes concentraciones se presentan en la tabla 28. Se observa que el sistema cromatográfico, probado con estándares, permitió obtener resultados reproducibles.

Tabla 28. Reproducibilidad del sistema cromatográfico empleando soluciones estándar

Glifosato			AMPA		
Concentración (ppb)	n	C.V. (%)	Concentración (ppb)	n	C.V. (%)
10	5	11.6	150	3	10.2
150	5	4.3	500	3	2.4
1000	5	2.4	1000	3	6.8

5.2. Desarrollo de la metodología para la preparación de muestras

El desarrollo de la metodología comprendió dos tipos de estudios. El primero correspondió a los ensayos por EFS, mientras que el segundo fueron los ensayos por DMFS.

5.2.1. Ensayos por extracción en fase sólida

Los ensayos por EFS utilizando soluciones estándar fue necesario que se realizaran preliminarmente para conocer el comportamiento de retención y elución de los compuestos de interés en diferentes adsorbentes y con diferentes soluciones eluentes. El efecto de la matriz del jitomate también fue evaluado. Así, los ensayos por EFS constituyeron la base para los ensayos con DMFS posteriores.

5.2.1.1. Ensayo en C₁₈

Al aplicar soluciones estándar de los compuestos de interés en cartuchos empacados con el adsorbente C₁₈ y efectuar el análisis de los efluentes se confirmó que tanto el glifosato como el AMPA no se retienen en fase inversa, ya que se encontraron los picos de los derivados con una magnitud correspondiente al 100% de fuga.

5.2.1.2. Ensayos en NH₂

La utilización de un adsorbente con grupos polares enlazados fue consecuencia de los resultados obtenidos en el ensayo anterior.

5.2.1.2.1. Retención de glifosato en agua pura y elución con diferentes soluciones acuosas

El análisis de los efluentes, correspondientes a soluciones de glifosato en agua pura, provenientes de cartuchos con diferentes cantidades de adsorbente (0.1, 0.2 y 0.5 g) no mostró el pico del derivado. Esto permitió conocer que en este adsorbente el glifosato se retuvo completamente.

Los recobros de la elución con los tres tipos de soluciones acuosas utilizadas se presentan en la tabla 29. En esta tabla se observa que el agua pura no eluyó al glifosato en ninguna de las 3 fracciones de 5 mL con 0.1 g de adsorbente, lo que indicó que su volumen de fuga es mayor a 15 mL. Por esta razón, no se intentó la elución de una cantidad mayor de adsorbente, ya que el volumen de fuga sería aún más grande.

Tabla 29. Elución de glifosato retenido en adsorbente amino

Cantidad de adsorbente (g)	Fracción de elución de 5 mL	Recobro (%)		
		Agua pura	NaH ₂ PO ₄ 2 mM pH = 7	NaH ₂ PO ₄ 5 mM pH = 7
0.1	1°	0	46.3	93.5
0.1	2°	0	42.5	0
0.1	3°	0	NR	NR
0.2	1°	NR	NR	81.6
0.2	2°	NR	NR	NR
0.2	3°	NR	NR	NR
0.5	1°	NR	NR	91.4
0.5	2°	NR	NR	12.7
0.5	3°	NR	NR	NR

NR = No se realizó

Al utilizar una solución de NaH_2PO_4 2 mM a $\text{pH} = 7$ en el cartucho de 0.1 g se observó que el compuesto eluía en las dos primeras fracciones de 5 mL (10 mL totales). La elución de cartuchos con cantidades mayores de adsorbente no se realizó porque el objetivo era encontrar condiciones de elución en volúmenes pequeños. Por lo tanto, se aumentó la concentración de la solución de elución de fosfatos.

Los estudios para eluir el glifosato del cartucho con una solución amortiguadora de NaH_2PO_4 5 mM $\text{pH} = 7$ de 0.1 g de adsorbente amino, mostraron que se recuperaba prácticamente la totalidad de la cantidad retenida en los primeros 5 mL adicionados (1° fracción), mientras que en la segunda fracción no se encontró el pico del derivado. Los estudios de elución de cartuchos con 0.2 y 0.5 g de adsorbente amino permitieron observar que el mayor porcentaje del compuesto se eluye en la primera fracción, independientemente de la cantidad, si se utiliza la solución de fosfatos 5 mM $\text{pH} = 7$ como solución de elución.

En el ensayo con 0.5 g se observa que en la segunda fracción aun se recuperó el 12.7% del compuesto, por lo que se seleccionó un volumen de 10 mL para eluirlo cuantitativamente de cartuchos con esta cantidad.

Estos resultados mostraron que al aumentar la concentración de la solución de fosfatos la elución del glifosato se realiza más rápido (volúmenes menores). Por lo tanto, se infirió que el intercambio de aniones participa como mecanismo de retención, siendo el glifosato desplazado con mayor facilidad de los grupos amino por la mayor cantidad de aniones fosfato presentes, los cuales generaron una competencia por los sitios de intercambio.

5.2.1.2.2. Efecto del pH en la retención de glifosato y AMPA

El posible mecanismo de intercambio iónico involucrado en la retención del glifosato en el adsorbente amino se verificó preparando la solución de carga en HNO_3 pH = 4. El análisis del efluente del glifosato confirmó que no se presentaba fuga del compuesto. Sin embargo, la fuga del AMPA fue de 31%.

La elución cuantitativa de glifosato también se logró con 10 mL de la solución amortiguadora de fosfato diácido, mientras que la elución del AMPA se logró con 5 mL de la misma solución con un porcentaje de recobro de 68.7%.

Estos resultados confirmaron el mecanismo por intercambio aniónico, ya que mientras a pH = 4 el glifosato posee dos cargas negativas, el AMPA posee solo una carga negativa; además, también tiene una carga positiva que repele al grupo amino (ver figura 2). Por otra parte, los grupos amino del adsorbente se encuentran protonados (NH_4^+) en mayor proporción a pH = 4 que al pH del agua pura (pH = 6 - 7).

Por lo tanto, con base en los estudios realizados y a que en esta etapa del desarrollo se pretendía aplicar el mismo procedimiento para ambos compuestos se seleccionó el adsorbente amino a pH neutro para realizar la extracción por DMFS con una elución con 10 mL de NaH_2PO_4 5 mM a pH neutro. La elución de AMPA de la columna de dispersión se tendría que modificar como se explicará más adelante.

5.2.1.3. Ensayos en SCX-Na

5.2.1.3.1. Retención del glifosato

El análisis de los efluentes mostró que el glifosato no fue retenido en el intercambiador de cationes, aunque se utilizaron cartuchos con 1 g de adsorbente. Se infiere que la nula retención se debió a que, aunque el glifosato se aplicó a $\text{pH} = 2$ para que poseyera carga positiva (ver figura 1), el intercambiador tenía mayor afinidad por el contraión Na^+ (forma original en la que se encuentra el adsorbente). Por esta razón, se intentó cambiar a la forma H^+ con volúmenes crecientes de acondicionamiento con una solución de HNO_3 0.01 M. De esta manera se pensó que este contraión sería fácilmente desplazado por el glifosato. Desafortunadamente, no se logró cambiar a la forma H^+ ya que, para esto, se requería utilizar soluciones ácidas muy concentradas ($\text{pH} < 2$), que el soporte del intercambiador no resistiría por ser a base de sílice. No se intentó cambiar la forma empleando volúmenes mayores (> 100 mL) de soluciones ácidas $\text{pH} = 2$ porque el tiempo requerido para la etapa de limpieza se hubiese incrementado considerablemente.

5.2.1.3.2. Retención del AMPA

El AMPA tampoco fue retenido en la fase intercambiadora de cationes; se infiere que por las mismas razones que el glifosato.

También, es importante considerar que ambos compuestos a $\text{pH} = 2$ se encuentran como zwitteriones con una carga positiva y una negativa, lo que resulta en una forma global neutra. La presencia de una carga neta positiva se garantizaría a pH 's menores a 1. Sin embargo, para disminuir el pH hasta estos valores se tendrían que utilizar intercambiadores con soportes de polímeros.

5.2.1.4. Ensayos en SAX

5.2.1.4.1. Retención de glifosato en SAX-OH y elución con HNO₃ 7.5 mM pH = 2.1

La retención de glifosato en el intercambiador de aniones (SAX-OH) se confirmó porque en los efluentes de diferentes soluciones acuosas no se observó el pico del derivado. No obstante que se empleó una cantidad pequeña de adsorbente, la retención de este compuesto fue total, independientemente de la solución de carga utilizada.

Este compuesto posee dos cargas negativas netas (ver figura 1) en los valores de pH utilizados para la retención (pH = 8), lo que favoreció el desplazamiento del contraión (OH⁻) por el glifosato en el intercambiador, aun en el caso en que la solución de carga estaba constituida por fosfatos, cuyos aniones podrían haber competido por los sitios de intercambio.

La elución del glifosato del intercambiador SAX-OH fue cuantitativa, como se observa en la tabla 30, con 10 mL de HNO₃ 7.5 mM pH = 2.1 con las dos soluciones de carga aplicadas. En este pH la carga neta negativa del glifosato se pierde, lo que ocasiona que no interaccione con el intercambiador y los aniones nitrato de la solución de elución lo desplacen fácilmente. También, se observa que la elución del cartucho cuya aplicación del analito se realizó en una solución de NaOH fue más rápida.

Tabla 30. Elución de glifosato, de 0.1 g de SAX-OH, con HNO₃ 7.5 mM pH = 2.1

Ensayo	1	2
Solución de carga	NaOH pH = 8	NaH ₂ PO ₄ 5 mM pH = 7
Fracción de elución de 5 mL	Recobro (%)	Recobro (%)
1°	97.7	82.8
2°	2.2	19.8

5.2.1.4.2. Retención del AMPA en SAX y elución con HNO₃ 0.01 M

Los resultados que se muestran en la tabla 31 sobre la retención del AMPA, aplicado en soluciones con diferente fuerza iónica, permitieron conocer que este compuesto no se retiene en SAX en su forma Cl⁻. El AMPA se fugó casi completamente al ser aplicado en la solución de carga de fosfato diácido pH = 7. La retención fue mejor en agua pura, pero el porcentaje de recobro en el protocolo final de extracción de residuos no hubiese sido aceptable, ya que se considera que la cantidad retenida en este caso solamente fue de 37%.

Tabla 31. Retención de AMPA en SAX-Cl con dos diferentes soluciones de carga

Ensayo	Solución de carga	Cantidad de SAX-Cl ⁻ (g)	Fuga (%)	Retención (%)
1	NaH ₂ PO ₄ 5 mM pH = 7	0.2	92.3	7.7
2	Agua pura	0.2	63.3	36.7

El AMPA posee una masa molecular 1.5 veces menor que la del glifosato y se trata de una molécula menos polar (debido a que no posee el grupo ácido carboxílico del glifosato); dado que los intercambiadores de iones fijan preferentemente los iones de mayor carga se infiere que los aniones fosfato compitieron con el AMPA por los sitios activos y este último, que posee una carga neta negativa en el intervalo de pH del agua pura (6 - 7), fue desplazado por éstos. En estas mismas condiciones, el glifosato posee dos cargas negativas netas y por lo tanto fue capaz de desplazar a los aniones de la solución de fosfatos y retenerse. A pH = 6, la especie fosfato que predomina es H₂PO₄⁻ con una carga negativa, por lo que se infiere fácilmente impidió que el AMPA se retuviera.

Con estos resultados se confirmó que el AMPA interacciona en menor grado y su retención en intercambiadores fuertes de aniones se encuentra muy limitada, lo cual concuerda con los resultados obtenidos por Miles et al., (1986), quienes probaron diferentes intercambiadores de aniones para la separación analítica del derivado del AMPA por CLAE.

La máxima retención del derivado se obtuvo con grupos $N(CH_3)_2^+$ ($k' = 1.38$) y la mínima retención en SAX ($k' = 0.70$). También, Lundgren (1986) reportó recobros de SAX-Cl del 54% y Wigfield (1990) reportó que no logró retener AMPA en aguas naturales de pH 8.75, 8.4 y 7.7 tanto en SAX-Cl como en SAX-acetato, por lo que utilizó SAX-OH.

Con base en este último reporte, se decidió transformar el intercambiador a la forma ^-OH utilizando volúmenes diferentes de una solución de NaOH pH = 8 y aplicar los analitos también en esta solución a pH básico. En la tabla 32 se presentan los resultados que se obtuvieron empleando cartuchos con 0.2 g de adsorbente.

Tabla 32. Retención de AMPA en 0.2 g de SAX-OH

Ensayo	Volumen de acondicionamiento con NaOH pH = 8 (mL)	Fuga (%)	Retención (%)
3	25	21.4	78.6
4	35	26.9	74.0

Los resultados mostraron que al acondicionar el intercambiador con una solución de NaOH pH = 8, la retención aumentaba con respecto a la retención de la tabla 31 (p. 72). Esto evidenció que el intercambiador sí se cambió a la forma ^-OH porque ya se había demostrado que la forma original del adsorbente no retenía a este compuesto. Sin embargo, el hecho de aumentar el volumen de acondicionamiento no permitió aumentar la retención lo suficiente para obtener porcentajes de retención cercanos al 100%.

Además, se presentaba otro problema a resolver: la etapa del protocolo de pretratamiento correspondiente a la limpieza de extractos con la ayuda del intercambiador SAX se pretendía aplicar simultáneamente a ambos compuestos, lo que significaba que los dos compuestos estarían presentes junto con el fosfato diácido. Por esta razón se tuvo que evaluar la retención de AMPA en presencia de éste usando SAX-OH.

Así, al intercambiador se le adicionaron 5 mL de NaH_2PO_4 5 mM pH = 7 durante la etapa de acondicionamiento y, posteriormente, se aplicó el AMPA también en la misma solución de fosfatos (ensayo 5).

Desafortunadamente, en este caso el porcentaje de fuga fue de 83% (ver tabla 33), lo que confirmó que el AMPA en presencia de aniones fosfatos tampoco se retiene en el intercambiador SAX-OH, a diferencia del glifosato, incluso si el contraión de éste es fácilmente desplazado por el AMPA en ausencia de fosfatos. La retención no mejoró significativamente, con respecto a la fuga del ensayo 1 (ver tabla 31, p. 72). Aun cuando se duplicó la cantidad de adsorbente, con respecto al ensayo de glifosato, el AMPA no se retuvo apropiadamente.

Por tanto, para retener el AMPA en SAX con la presencia de fosfatos se modificaron las condiciones de acondicionamiento y se aumentó la cantidad de intercambiador de 0.2 a 0.5 g. Los resultados, que aparecen en la tabla 33 (ensayo 6), muestran la presencia de más sitios activos para la retención del AMPA porque el porcentaje de fuga disminuyó, pero no lo suficiente. Aun cuando en estas condiciones la retención correspondería a 61%, no se consideraron convenientes porque aumentaría el límite de detección del método global.

Tabla 33. Comparación de la retención del AMPA en SAX-OH

Ensayo	Cantidad de adsorbente (g)	Acondicionamiento	Solución de carga	Fuga (%)
5	0.2	25 mL NaOH pH = 8 y 5 mL NaH_2PO_4 5 mM pH = 7	NaH_2PO_4 5 mM pH = 7	83.1
6	0.5	50 mL NaOH pH = 9	NaH_2PO_4 5 mM pH = 7	39.1
7	0.5	50 mL NaOH pH = 9	Agua pura	0

Así que, finalmente el AMPA se aplicó en agua pura en el intercambiador acondicionado de la misma manera y se observó que no se presentó fuga, por lo que la retención se consideró del 100% (tabla 33, ensayo 7).

El acondicionamiento de los cartuchos con 0.5 g de intercambiador con volúmenes mayores (> 50 mL) de la solución de NaOH se descartó debido a que no sería práctico. Por tanto, como ya no se podía aumentar más el pH de la solución de acondicionamiento, a causa de la estabilidad del intercambiador a base de sílice para retener el AMPA cuantitativamente, en este adsorbente se evitó el uso de sales de fosfatos. Esto último se consideró en los ensayos de DMFS y se estableció que el intercambiador SAX-Cl se tendría que acondicionar con soluciones de NaOH pH = 9 para retener al AMPA en ensayos posteriores.

Una vez que se obtuvieron las condiciones de retención del AMPA en el intercambiador, se realizó su elución cuantitativa de los cartuchos con 0.5 g de SAX-OH con una solución acuosa de HNO₃ 0.01 M pH = 2. En la tabla 34 se presentan los recobros obtenidos con fracciones de 20 mL c/una y se observa que el 100% se eluyó en la primera fracción. A pH = 2 el compuesto presenta una carga negativa y una carga positiva (ver figura 2), lo que facilita que los aniones nitrato de la solución de elución lo desplacen fácilmente, al igual que con el glifosato.

Tabla 34. Elución del AMPA retenido en 0.5 g de SAX-OH

Fracción de elución con HNO ₃ 0.01 M pH = 2 (20 mL, c/u)	Recobro (%)
1°	100
2°	0

Con base en los resultados de los estudios con el intercambiador de aniones se decidió realizar con éste la etapa de limpieza de los extractos que se obtendrían de la columna de dispersión.

Este adsorbente permitiría un aislamiento selectivo de los analitos por el mecanismo de intercambio iónico debido a su carácter aniónico, lo que favorecería la purificación de los extractos y la detección adecuada de los mismos.

5.2.2. Efecto de la matriz en la extracción de glifosato con el adsorbente amino

Los ensayos por EFS-NH₂ con muestras de jitomate fortificadas con glifosato se realizaron con el fin de conocer las impurezas que podrían presentarse en la muestra a pesar de la detección selectiva por fluorescencia. Por otra parte, también se conocería el comportamiento de retención del compuesto en este adsorbente en presencia de las impurezas de la matriz.

La extracción del glifosato de la matriz original se realizó con agua pura gracias a que: el analito presenta una elevada solubilidad en este disolvente (12 g L⁻¹) y la naturaleza de la matriz es acuosa.

Los porcentajes de fuga del analito en los efluentes, correspondientes a los extractos crudos aplicados en cartuchos con adsorbente amino, se presentan en la tabla 35. Se observa que el porcentaje de fuga fue disminuyendo al aumentar la cantidad de adsorbente, obteniéndose la mejor retención con 0.5 g de adsorbente.

Tabla 35. Extracción de glifosato por EFS-NH₂ a partir de muestras fortificadas

Ensayo	Cantidad de adsorbente (g)	Fuga (%)	Retención (%)
1	0.1	55.0	45.0
2	0.2	19.1	80.9
3	0.5	0	100

Los recobros globales de estos cartuchos, obtenidos de la elución con la solución de fosfato diácido 5 mM a pH neutro, también aumentaron con la cantidad de adsorbente como se observa en la tabla 35 bis.

Sin embargo, la recuperación del compuesto fue incompleta en todos los casos. Así, en el ensayo 3, aun cuando en el efluente no se encontró evidencia de fuga, el recobro global después de la elución fue de sólo 56.4%, el resto no fue recuperado. Se infiere que el glifosato no se extrajo completamente a partir de la muestra sólida. Este problema se resolvería más adelante al aplicar la técnica de DMFS.

Tabla 35 bis. Elución de glifosato de cartuchos NH₂ a partir de muestras fortificadas

Ensayo	Cantidad de adsorbente (g)	Fracción de elución de 5 mL		Recobro global (%)
		1°	2°	
1	0.1	16.6	NR	16.6
2	0.2	39.9	NR	39.9
3	0.5	52.8	3.6	56.4

NR = No se realizó

La figura 12, correspondiente a la primera fracción de elución del ensayo 3, permite observar la adecuada separación del pico correspondiente al derivado de glifosato de otros compuestos co-extraídos. Sin embargo, las impurezas presentes que eluyen posteriormente se encontraban en concentraciones muy altas que saturaban el detector. Por esta razón, se evidenció la necesidad de implementar una etapa de limpieza.

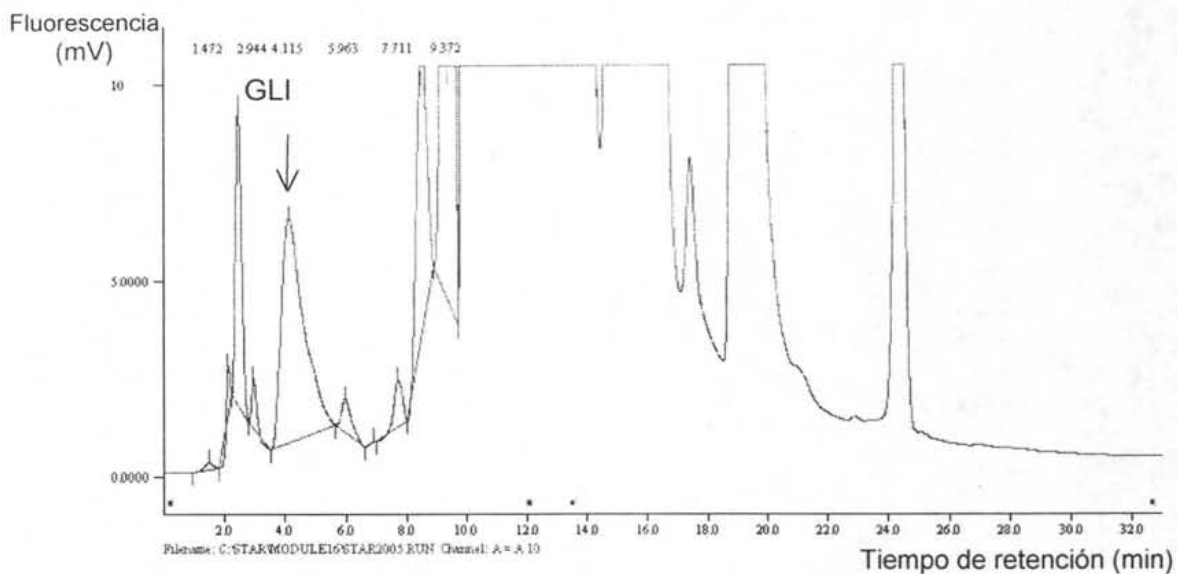


Fig. 12. Cromatograma de la elución con 5 mL de NaH_2PO_4 5 mM pH = 7 de un cartucho NH_2 (0.5 g) para una carga de 5 mL de extracto de jitomate fortificado con $5\mu\text{g g}^{-1}$ de glifosato. Análisis con el gradiente 1

La figura 13 muestra que no se presentan interferencias en la zona correspondiente al tiempo de retención del derivado de glifosato (4 a 6 min).

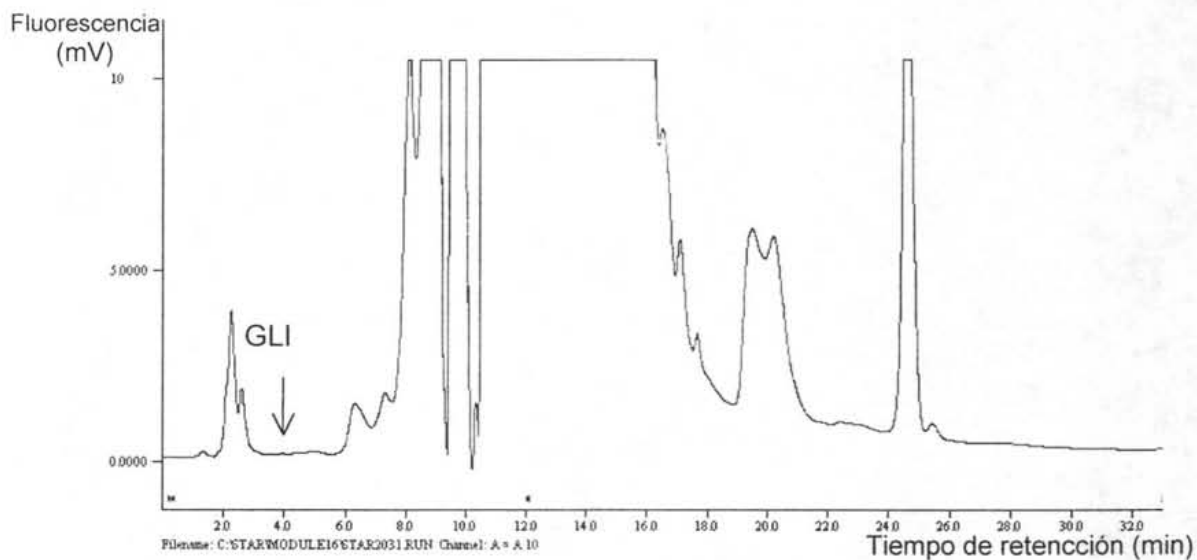


Fig. 13. Cromatograma de la elución con 5 mL de NaH_2PO_4 5 mM pH = 7 de un cartucho NH_2 (0.5 g) para una carga de 5 mL de extracto de jitomate NO fortificado. Análisis con el gradiente 1

Sin embargo, en ambos casos se observaron interferentes remarcables en el tiempo de retención del AMPA (10 min) por lo que no se fortificaron muestras con éste. En los ensayos de dispersión se realizaron los estudios para resolver este problema.

5.2.3. Ensayos por dispersión de la matriz en fase sólida

Los resultados de los ensayos con EFS fueron considerados para establecer las condiciones de los ensayos con DMFS. La mayoría de los reportes por DMFS para muestras vegetales utilizan 0.5 g de muestra (ver tabla 10, p. 22). Por esta razón, la cantidad de muestra para el desarrollo del método se fijó en este valor.

Además, el glifosato se podía retener en 0.5 g de adsorbente amino, a pesar de la presencia de impurezas provenientes de 1 g de muestra, como se observó en el ensayo 3 de la sección 5.2.2. Por lo tanto, se consideró adecuado trabajar con ensayos cuya relación muestra:adsorbente fuese 1:1 durante el desarrollo del método. Se seleccionó el adsorbente amino para realizar la dispersión y la solución de fosfato diácido 5 mM a pH neutro para la elución de glifosato y agua pura para la elución de AMPA de la columna de dispersión.

5.2.3.1. Extracción de glifosato

El análisis de las fracciones de elución con las dos primeras soluciones acuosas estudiadas (ensayos 1-2, tabla 24, p.51) indicó que el glifosato no se eluía de la columna de dispersión ya que no contenían al compuesto. Esto hizo suponer que el glifosato se retenía muy fuertemente en la columna de dispersión a diferencia de lo que ocurrió en EFS, en la que la solución de fosfato diácido eluía rápido y cuantitativamente al compuesto.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

La elución con ácido tampoco permitió la extracción aun cuando a este valor de pH se reduce la carga neta negativa del compuesto, por lo que se infería que interaccionaría en menor grado con la matriz.

Las cuatro fracciones de elución con la solución amortiguadora de fosfatos, en las que no aparece el pico del derivado al tiempo de retención de 4 min, se presentan en las figuras 14 y 15. El cromatograma de la figura 16 corresponde a las fracciones de elución con la solución de HNO_3 7.5 mM pH = 2.1 y tampoco se observa el pico del derivado.

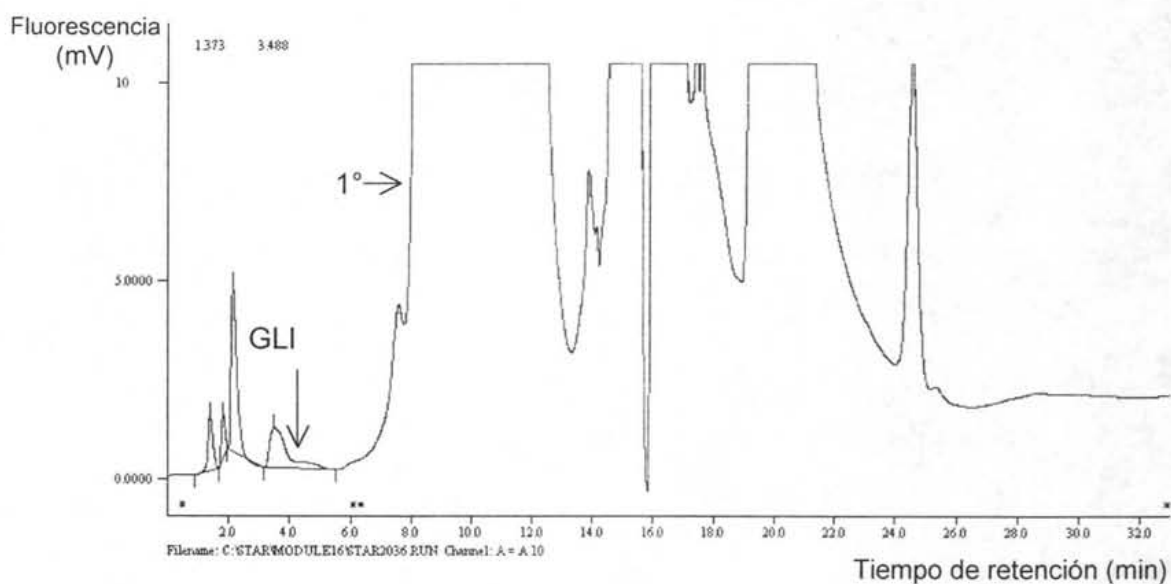


Fig. 14. Cromatograma de la elución con 5 mL X 1 de NaH_2PO_4 5 mM pH = 7 de DMFS- NH_2 (1:1) para una muestra fortificada con $10 \mu\text{g g}^{-1}$ de glifosato. Análisis con el gradiente 1

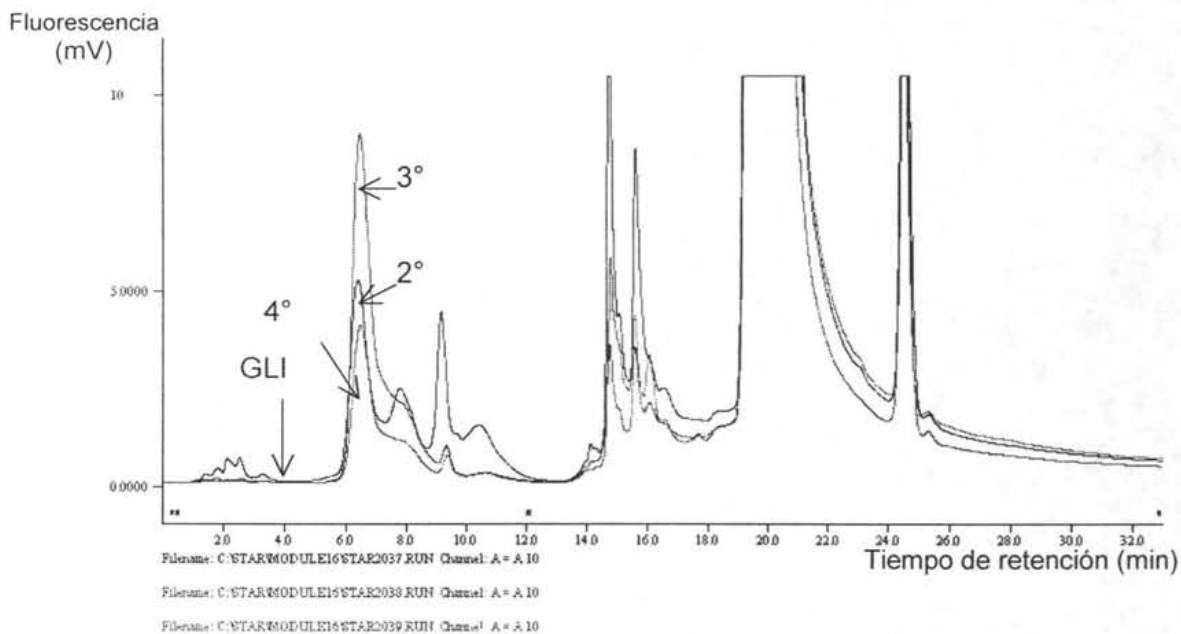


Fig. 15. Cromatograma de la elución con 5 mL X 3 de NaH_2PO_4 5 mM pH = 7 de DMFS- NH_2 (1:1) para una muestra fortificada con $10 \mu\text{g g}^{-1}$ de glifosato. Análisis con el gradiente 1

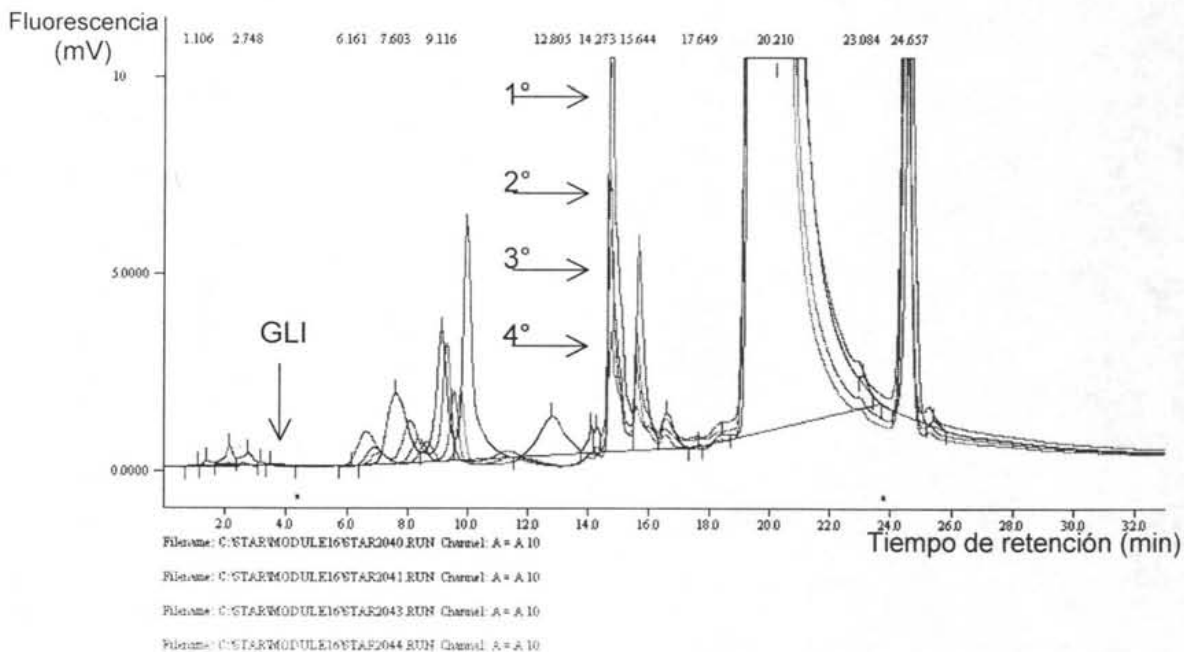


Fig. 16. Cromatograma de la elución con 5 mL X 4 de HNO_3 7.5 mM de DMFS- NH_2 (1:1) para una muestra fortificada con $10 \mu\text{g g}^{-1}$ de glifosato. Análisis con el gradiente 1

Estos resultados demostraron que el comportamiento del glifosato por DMFS no es el mismo que el que tiene en EFS, utilizando el mismo adsorbente. En este caso, es evidente que la matriz juega un papel fundamental al formar parte de la columna de extracción. De ahí, la importancia de estudiar en detalle los parámetros cromatográficos para la DMFS, aún no establecidos con precisión.

El problema de la elución de la columna de dispersión se abordó alterando el estado original de la matriz, con el fin de garantizar que se disminuyeran las interacciones matriz-glifosato. La modificación de la matriz previa a la dispersión consistió en la adición de ácido a la misma.

Los resultados del ensayo 3, correspondiente a la adición de 1 gota de HNO₃ 1 M, mostraron que en las tres primeras fracciones de elución de 5 mL con la solución amortiguadora de fosfatos se extraía al glifosato con una recuperación global de 30.5% (tabla 36). El análisis de la segunda fracción, en la cual se recuperó la mayor cantidad de glifosato, se presenta en el cromatograma de la figura 17. La presencia del glifosato en esta fracción no se encontró en el análisis de una muestra blanco (ver figura 18). Así, se confirmó que el glifosato se eluía en los primeros 15 mL de elución con la solución amortiguadora de fosfatos, aunque con una cuantitatividad baja.

Tabla 36. Recobro de glifosato acidificando la matriz y elución con NaH₂PO₄ 5 mM pH = 7

Ensayo	Volumen de HNO ₃ 1 M	Recobro (%)				
		1° fracción (5 mL)	2° fracción (5 mL)	3° fracción (5 mL)	4° fracción (5 mL)	Global
1	nada	0	0	0	0	0
3	1 gota	3.8	25.4	1.3	0	30.5
4	120 µL	0	78.9	0	0	78.9

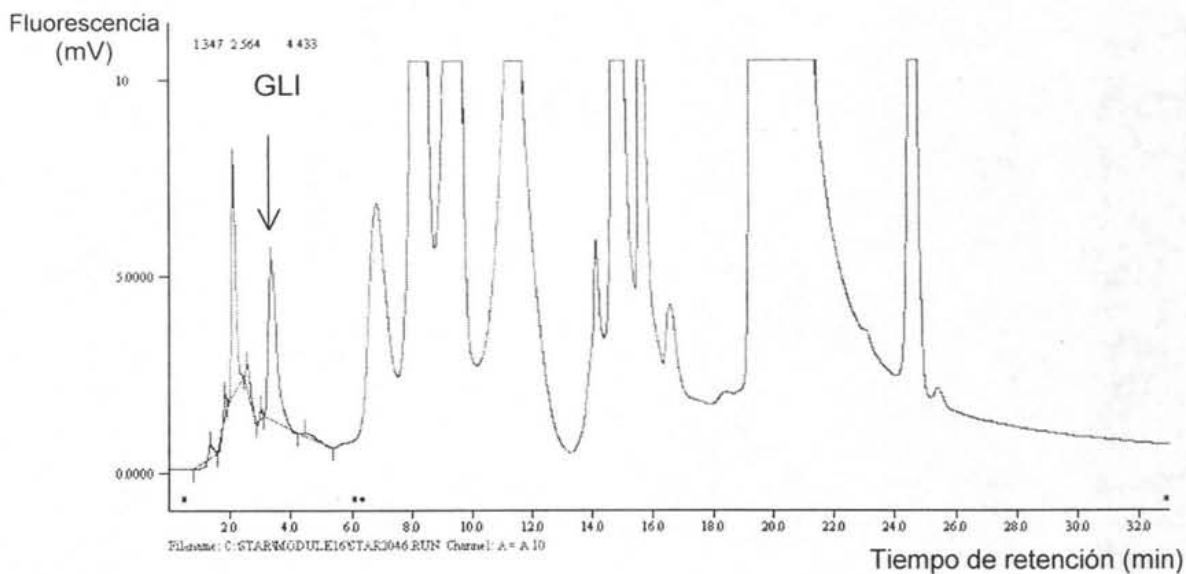


Fig. 17. Cromatograma de la elución con 5 mL de NaH_2PO_4 5 mM pH = 7 (2° fracción) de DMFS-NH_2 (1:1) para una muestra fortificada con $10 \mu\text{g g}^{-1}$ de glifosato y acidificada con 1 gota de HNO_3 1 M. Análisis con el gradiente 1

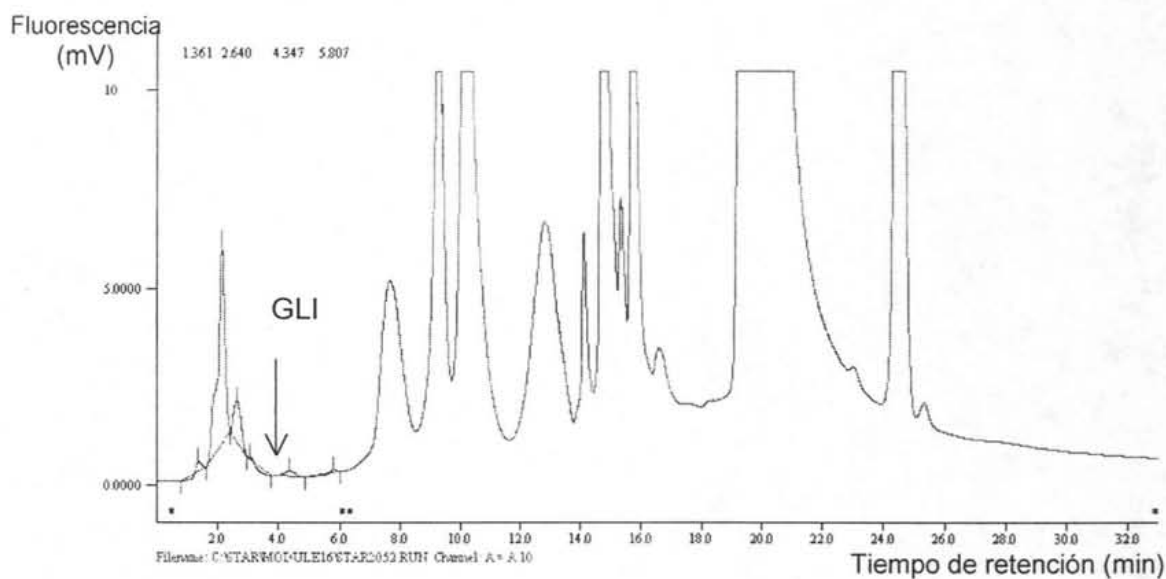


Fig. 18. Cromatograma de la elución con 5 mL de NaH_2PO_4 5 mM pH = 7 (2° fracción) de DMFS-NH_2 (1:1) para una muestra NO fortificada y acidificada con 1 gota de HNO_3 1 M. Análisis con el gradiente 1

Posteriormente, en el ensayo 4 se acidificó la matriz con 120 μL de HNO_3 1 M y se encontró que al aumentar la cantidad de ácido añadida, el glifosato se eluía de la columna de dispersión en la segunda fracción de 5 mL de la solución de fosfatos con un porcentaje de recobro del 79%. El análisis de fracciones posteriores permitió verificar que el volumen total de elución fuese de 10 mL, ya que en éstas no se observó el pico correspondiente.

Con base en estos resultados, se infirió que a mayor cantidad de ácido se hidrolizaban mejor los posibles conjugados del glifosato con algún componente de la matriz y, por lo tanto, la elución se lograba con un volumen menor. Asimismo, al triplicar la cantidad de ácido (3 gotas equivalen aproximadamente a 120 μL), con respecto al ensayo anterior, el porcentaje de recobro aumentó considerablemente.

Los resultados del análisis de una muestra fortificada con una concentración menor (5 $\mu\text{g g}^{-1}$, ensayo 5) presentó un recobro global del 60.8% (figura 19). Una muestra blanco permitió confirmar la presencia del glifosato, como se muestra en la figura 20 correspondiente a la segunda fracción eluída con la solución de fosfato diácido. El pico del derivado claramente se observa en la muestra fortificada, mientras que en la muestra blanco no se observa su presencia.

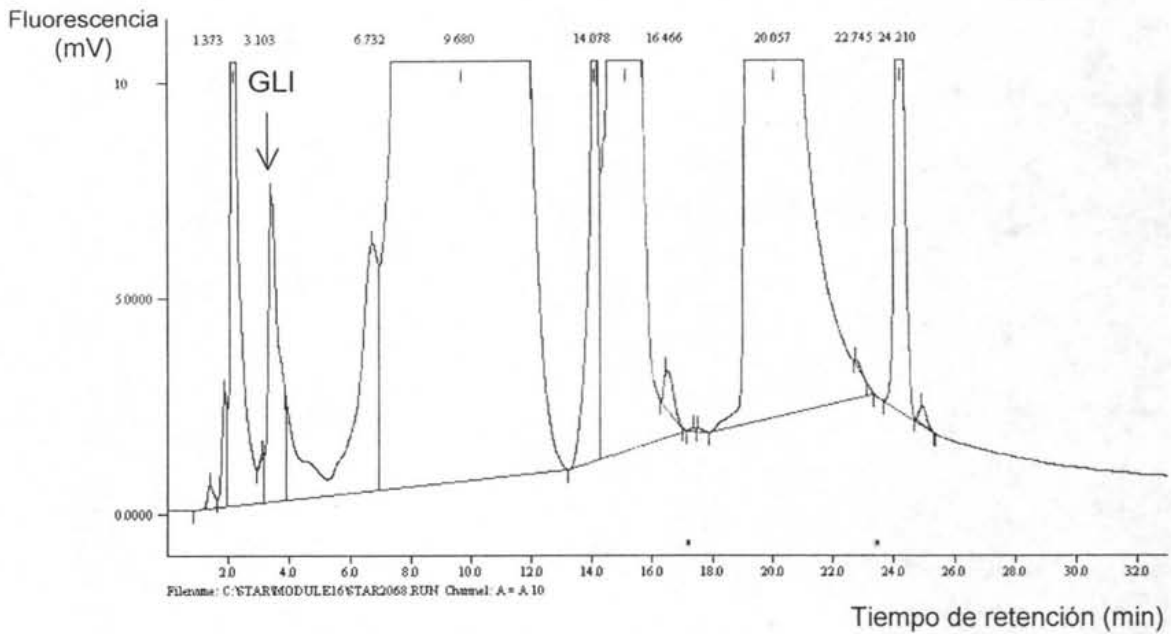


Fig. 19. Cromatograma de la elución con 5 mL de NaH_2PO_4 5 mM pH = 7 (2° fracción) de DMFS-NH_2 (1:1) para una muestra fortificada con $5 \mu\text{g g}^{-1}$ de glifosato y acidificada con $120 \mu\text{L HNO}_3$ 1 M. Análisis con el gradiente 1

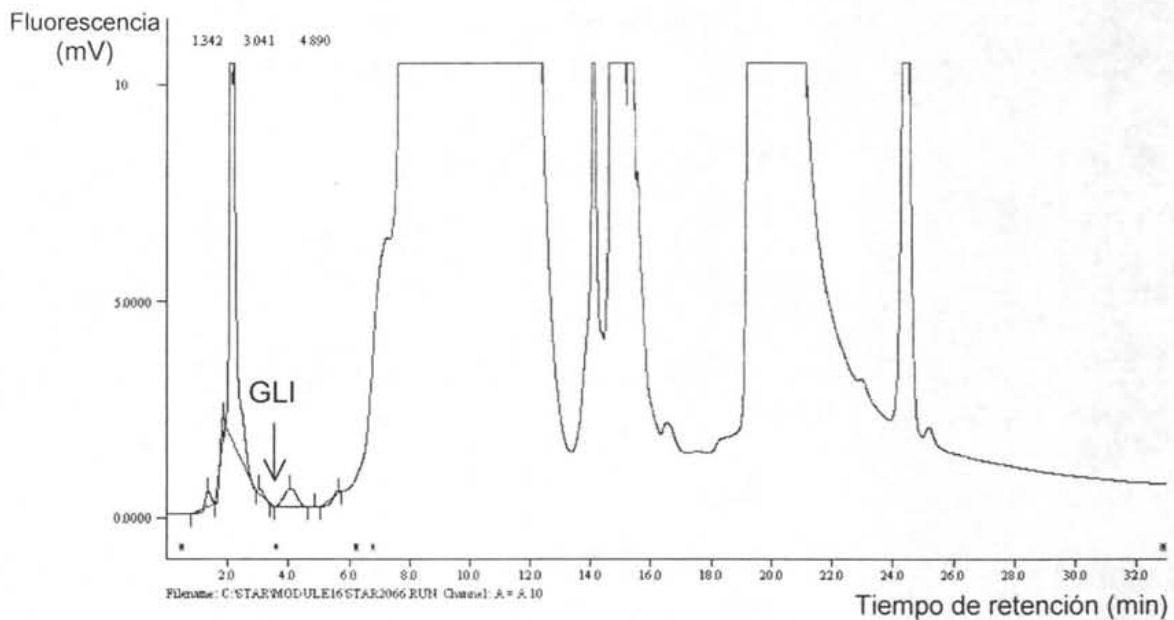


Fig. 20. Cromatograma de la elución con 5 mL de NaH_2PO_4 5 mM pH = 7 (2° fracción) de DMFS-NH_2 (1:1) para una muestra NO fortificada y acidificada con $120 \mu\text{L HNO}_3$ 1 M. Análisis con el gradiente 1

Los porcentajes de recobro obtenidos fueron menores al 79%; esto permitió inferir que los extractos contenían gran cantidad de impurezas, que pudieron disminuir el rendimiento de la reacción de derivación. Además, estos ensayos se realizaron con mortero y pistilo de vidrio, material en el cual el glifosato se adsorbe fácilmente, lo que probablemente también contribuyó a disminuir el recobro.

Así, se estableció que la elución del glifosato de la columna de dispersión se realizaría con las condiciones del ensayo 4 analizando los primeros 10 mL de elución con la solución amortiguadora de fosfatos. También, se decidió implementar la etapa de limpieza, antes de efectuar la derivación, por la gran cantidad de impurezas presentes.

5.2.3.2. Extracción del AMPA

Las condiciones para la modificación de la matriz se extrapolaron de los resultados obtenidos con glifosato. Así, las muestras de 0.5 g se acidificaron con 120 μ L de HNO_3 1 M previo a la dispersión con 0.5 g adsorbente amino. Sin embargo, a causa de la nula retención del AMPA en el intercambiador de aniones con la presencia de fosfatos (etapa de limpieza), la elución de la columna de dispersión se tuvo que realizar con agua pura.

El análisis de los extractos obtenidos de la columna de dispersión se tuvo que realizar previa limpieza debido a la presencia de impurezas en el tiempo de retención de este compuesto. Para esto, se utilizaron dos cartuchos acoplados, el primero con 1 g de intercambiador SAX-OH, con el fin de minimizar la posible fuga del AMPA debida a la saturación del adsorbente por parte de las impurezas, y el segundo con 0.5 g de adsorbente amino.

El análisis del extracto de la columna de dispersión con el gradiente 2, correspondiente a la primera fracción de 5 mL de agua pura, purificado en dos tipos de adsorbentes (SAX-OH y NH₂), permitió observar el pico del derivado del AMPA en un tr de 4.5 min, como se observa en la figura 21. El área del pico en este cromatograma correspondió apenas a una recuperación del 9.8% (tabla 37) por lo que se supuso que el volumen necesario para la extracción del AMPA de la columna de dispersión era mucho mayor. No obstante, para descartar que el compuesto se hubiese fugado del cartucho con SAX-OH, se analizó el efluente de éste y no se observó el pico del derivado del AMPA, lo que indicaba que no se fugaba.

El análisis de las fracciones subsecuentes de la columna de dispersión, cuyos recobros también se presentan en la tabla 37, permitió precisar el volumen necesario para la elución de una cantidad mayor de AMPA.

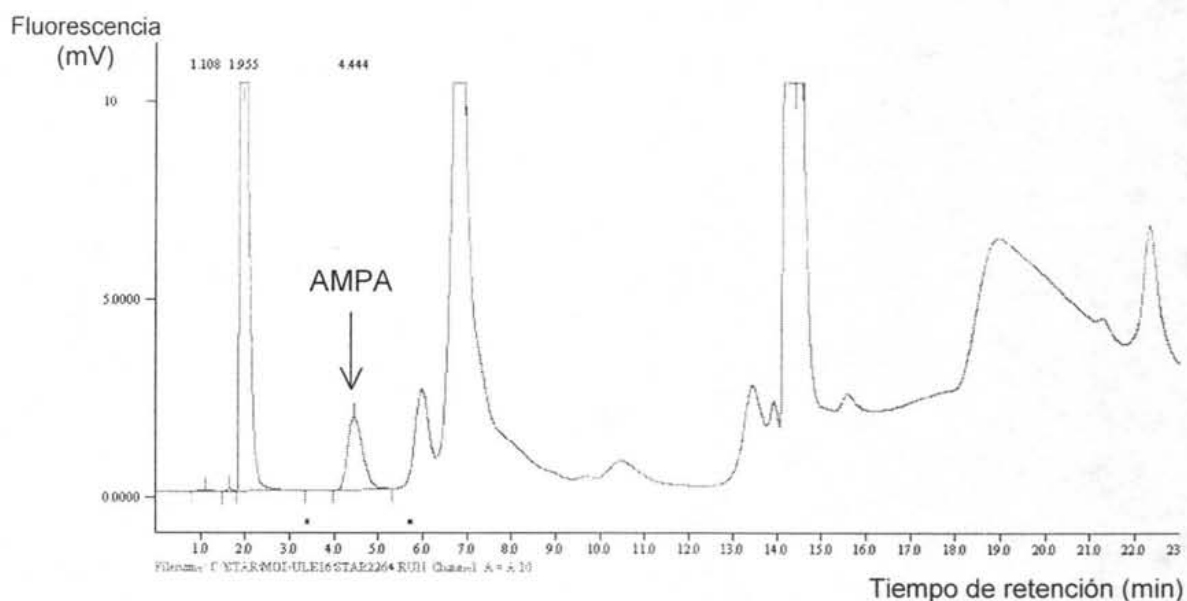


Fig. 21. Cromatograma de la dilución 1:4 del efluente de un cartucho NH₂ (0.5 g) proveniente de la 1^o fracción (5 mL agua pura) de DMFS-NH₂ (1:1) para una muestra fortificada con 40 µg g⁻¹ de AMPA. Análisis con el gradiente 2

Tabla 37. Recobro del AMPA en diferentes fracciones de elución de la columna de dispersión

Fracción	Volumen de elución con agua pura (mL)	Recobro (%)
1° purificada	5	9.8
2°	5	17.9
3°	10	9.5
4°	10	7.7
Recobro global (%)		45.1

En la tabla 37 se observa que el porcentaje de recobro global fue bajo (45%) aun cuando el volumen de elución total fue relativamente grande: 30 mL, ya que en la literatura se reportan volúmenes de elución menores a 10 mL para los analitos extraídos por esta técnica. Se infiere que esto se debió a la gran cantidad de impurezas presentes en las fracciones subsecuentes, que no fueron eliminadas y disminuyeron el rendimiento de la reacción de derivación. Sin embargo, la extracción del AMPA fue completa, con un volumen de 30 mL, porque el porcentaje de recobro de éste comenzó a disminuir, a partir de la segunda fracción, a medida que se incrementaba el volumen de extracción.

La limpieza de la primera fracción con ambos adsorbentes fue efectiva porque permitió la detección del derivado del AMPA y la eliminación de impurezas lo suficiente para que el detector no se saturara. El análisis directo de la primera fracción sin limpiar no fue posible debido a la saturación del detector.

El análisis de una muestra blanco, aplicando el mismo procedimiento del ensayo 1, permitió confirmar la ausencia del pico correspondiente en el extracto (ver figura 22). La corroboración también se apoyó por el análisis de la segunda fracción de elución de una muestra blanco. Efectivamente, en ésta no se observó el pico del derivado del AMPA a diferencia de la segunda fracción obtenida de la muestra fortificada (ver figura 23).

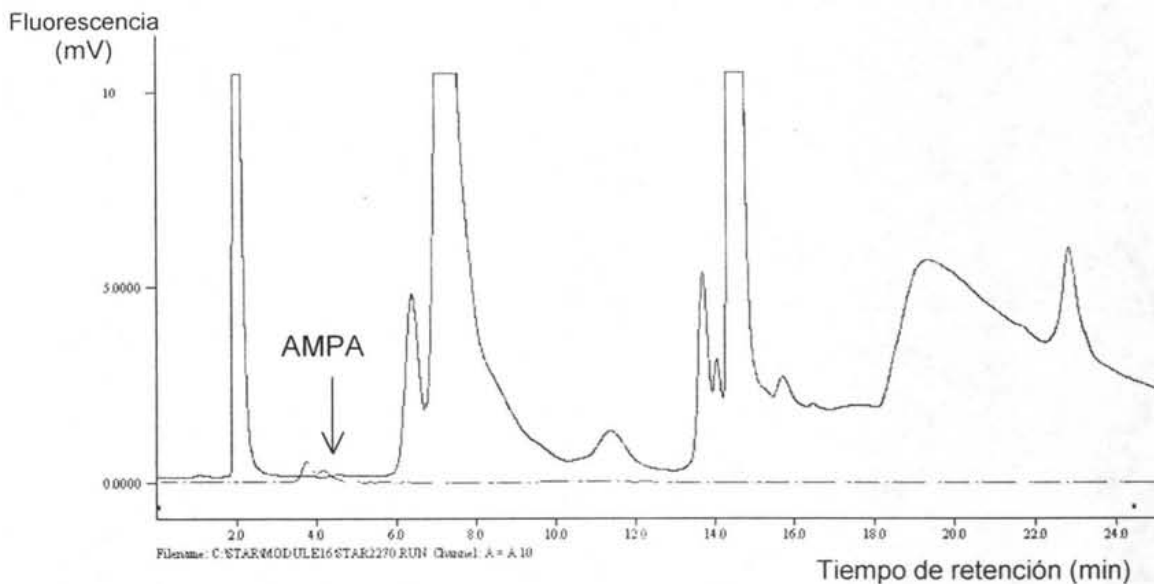


Fig. 22. Cromatograma de la dilución 1:4 del efluente de un cartucho NH_2 (0.5 g) proveniente de la 1ª fracción (5 mL agua pura) de DMFS-NH_2 (1:1) para una muestra NO fortificada. Análisis con el gradiente 2

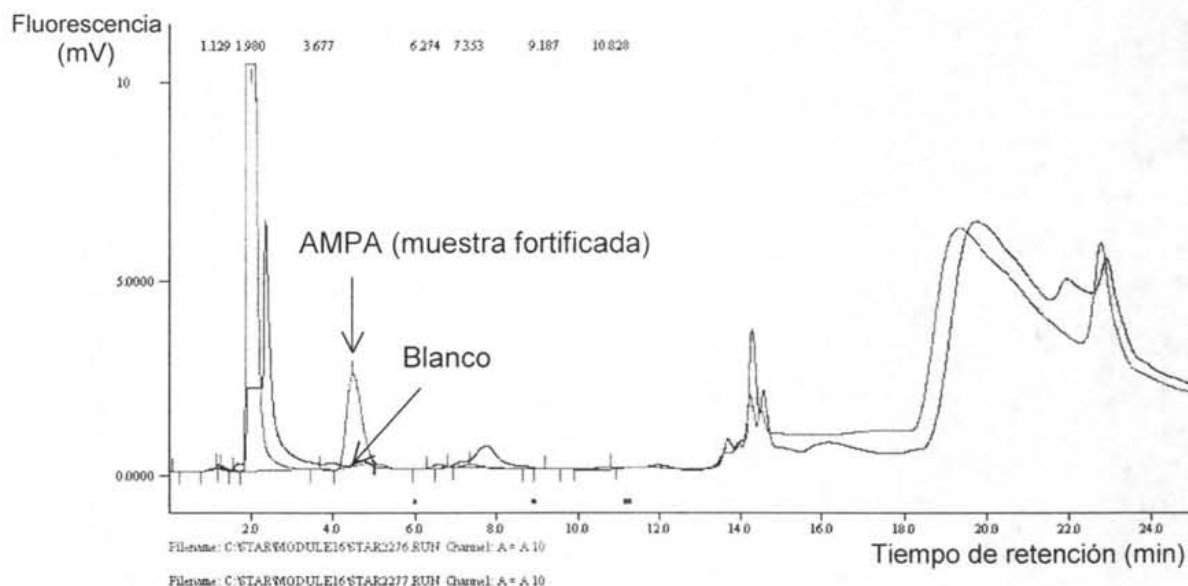


Fig. 23. Cromatograma de la dilución 1:4 de la elución con 5 mL de agua pura (2ª fracción) de DMFS-NH_2 (1:1) para una muestra fortificada con $40 \mu\text{g g}^{-1}$ y acidificada con $120 \mu\text{L}$ de HNO_3 1 M. Análisis con el gradiente 2

5.2.4. Limpieza de los extractos obtenidos por DMFS

La implementación de la etapa de limpieza fue indispensable, para ambos extractos, ya que las impurezas se encontraban muy concentradas y saturaban el detector, además de que podrían disminuir el rendimiento de la reacción de derivación y la vida útil de la columna analítica. La limpieza se realizó con el intercambiador de aniones con base en los resultados de la sección 5.2.1.4 y fue por separado para cada compuesto, cuyos extractos provenían de fracciones diferentes obtenidas de la columna de dispersión.

5.2.4.1. Limpieza del extracto de glifosato

La retención de glifosato en el intercambiador de aniones se da a $\text{pH} > 6$, por lo que fue necesario medir el pH del extracto proveniente de la columna de dispersión. Afortunadamente, no fue necesario ajustarlo porque éste siempre fue 8, lo que contribuyó a la simplificación del procedimiento.

El análisis de los efluentes provenientes de cartuchos con 0.1 y 0.2 g permitieron conocer que el glifosato se fugaba de éstos, muy probablemente debido a la presencia de las impurezas ya que con estándares el glifosato si se retiene en 0.1 g de este adsorbente. Sin embargo, en el efluente del cartucho con 0.5 g de SAX-Cl no se observó la presencia del pico correspondiente por lo que su retención fue total y no fue necesario cambiar a la forma OH^- .

La elución del glifosato retenido en 0.5 g de intercambiador se obtuvo al adicionar 20 mL de HNO_3 0.01 M al cartucho con un porcentaje de recobro de 33%, como se observa en la tabla 38. Sin embargo, el mayor porcentaje de recobro se obtuvo en los primeros 10 mL (ver figura 24), por lo que se decidió establecer como volumen de elución 15 mL.

Tabla 38. Elución de glifosato retenido en 0.5 g de SAX-Cl previa aplicación de extracto de jitomate

Fracción de elución (10 mL, c/una) con HNO ₃ 0.01 M	Recobro (%)
1°	29.0
2°	4.1

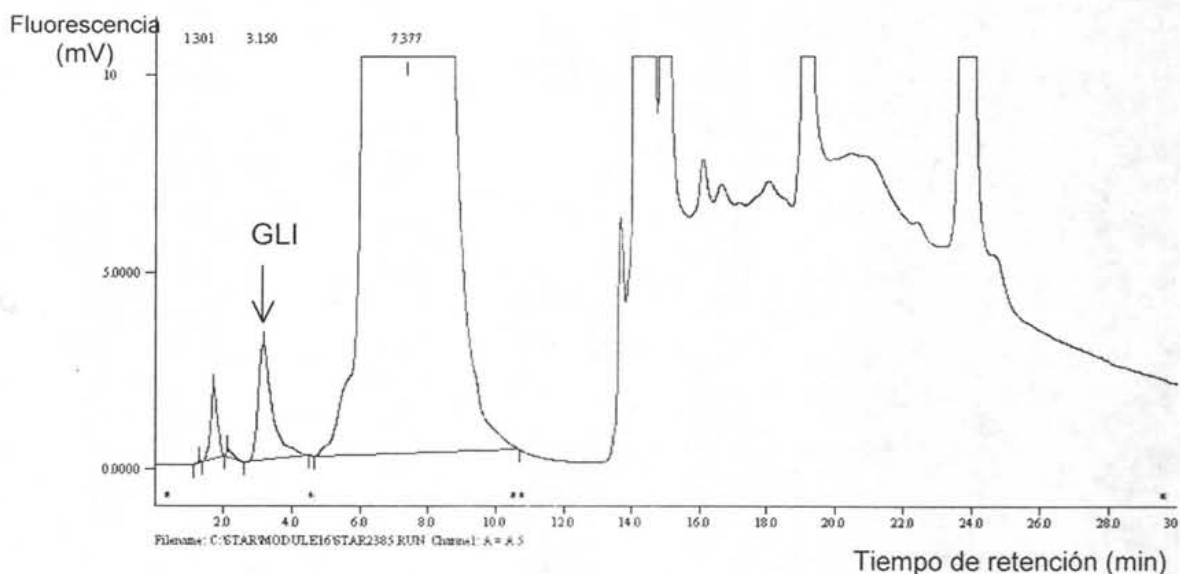


Fig. 24. Cromatograma de la elución con 10 mL de HNO₃ 0.01 M (1° fracción) de SAX-Cl (0.5 g) para una muestra fortificada con 10 µg g⁻¹ de glifosato. Análisis con el gradiente 1

El bajo porcentaje de recobro obtenido, con respecto al logrado sin limpieza (ver tabla 36, p. 82), se debió al aumento en el tiempo de reposo posterior a la fortificación de la muestra, el cual se triplicó. La mejora del porcentaje de recuperación se solucionó con el análisis de un volumen mayor de la columna de dispersión. Esto permitió conocer que el bajo porcentaje de recobro del glifosato se debió a que, en estas condiciones de fortificación, el volumen de elución era de 20 mL de NaH₂PO₄ 5 mM pH = 7 (tabla 39).

Tabla 39. Elución de la columna de dispersión con NaH₂PO₄ 5 mM pH = 7 dejando reposar la muestra 3 h

Fracción de elución de la columna de dispersión	Recobro (%) en el extracto purificado
1° (20 mL)	91.7

También, fue necesario verificar que con este nuevo volumen de carga el glifosato no se fugara del cartucho de limpieza con 0.5 g de intercambiador (SAX-Cl). El derivado no se observó en el cromatograma del efluente por lo que el compuesto no se fugaba del cartucho y esta etapa no requirió de modificación.

5.2.4.2. Limpieza del extracto del AMPA

El pH de los extractos del AMPA obtenidos de la columna de dispersión también fue 8, por lo que no fue necesario su ajuste para ser aplicado a los cartuchos con el intercambiador. Al aplicar los 30 mL del extracto de la columna de dispersión al cartucho con SAX-OH y eluir con HNO_3 0.01 M, se observó que el porcentaje de recobro fue muy bajo independientemente de la cantidad de intercambiador utilizada, como se indica en la tabla 40, con respecto al porcentaje global obtenido previamente en las fracciones de elución de las columnas de dispersión (ver tabla 37, p.88).

Se infirió que esto pudo haberse debido a que se sobrepasó el volumen de fuga del compuesto en el intercambiador o bien debido a la presencia de impurezas que saturaron el adsorbente.

Tabla 40. Recobro del AMPA retenido en cartuchos con diferentes cantidades de SAX-OH previa aplicación de extracto de jitomate

Ensayo	Cantidad de adsorbente (g)	Volumen de carga (mL)	Volumen de elución con HNO_3 0.01 M (mL)	Recobro global (%)
1	1	30	40	12.8
2	2	30	40	14.9
3	2	10	40	40.0

Los ensayos que se realizaron para intentar eluir el AMPA de la columna de dispersión con un volumen menor (empleando soluciones ácidas, básicas y con ACN) no funcionaron, ya que el compuesto eluía con el mismo patrón que con agua pura, por lo que se descartaron estas opciones. Finalmente se decidió evaporar el extracto de 30 mL, obtenido de la columna de dispersión, hasta sequedad y reconstituir con 10 mL de agua pura, volumen que permitió la retención del compuesto al aplicarse en 2 g de intercambiador SAX-OH, ya que en el efluente no se observó fuga del derivado (ver figura 25) y en la elución se recuperó el 40% (tabla 40). Este porcentaje de recobro se mejoró durante la optimización del método. Además, la limpieza con 2 g de SAX-OH también fue efectiva porque durante el análisis del extracto purificado no se saturó el detector.

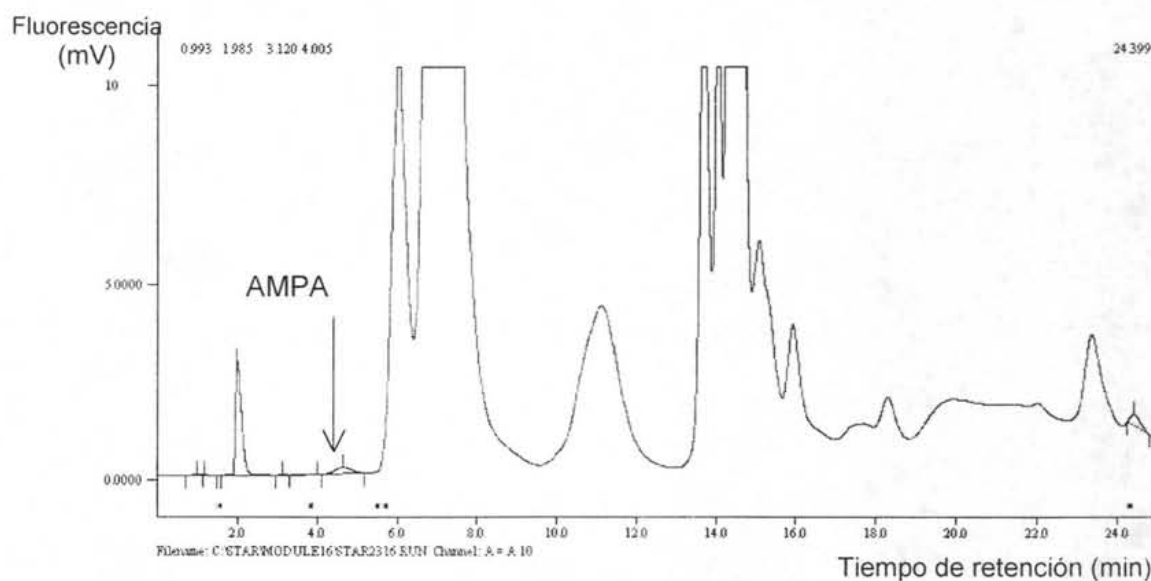


Fig. 25. Cromatograma de la dilución 1:4 del efluente, proveniente de DMFS-NH₂ (1:1) evaporado y reconstituido en 10 mL de agua pura fortificada con 40 µg g⁻¹, acidificada con 120 µL HNO₃ 1 M, en un cartucho SAX-OH (2 g). Análisis con el gradiente 2

5.2.5. Optimización del método de preparación de la muestra

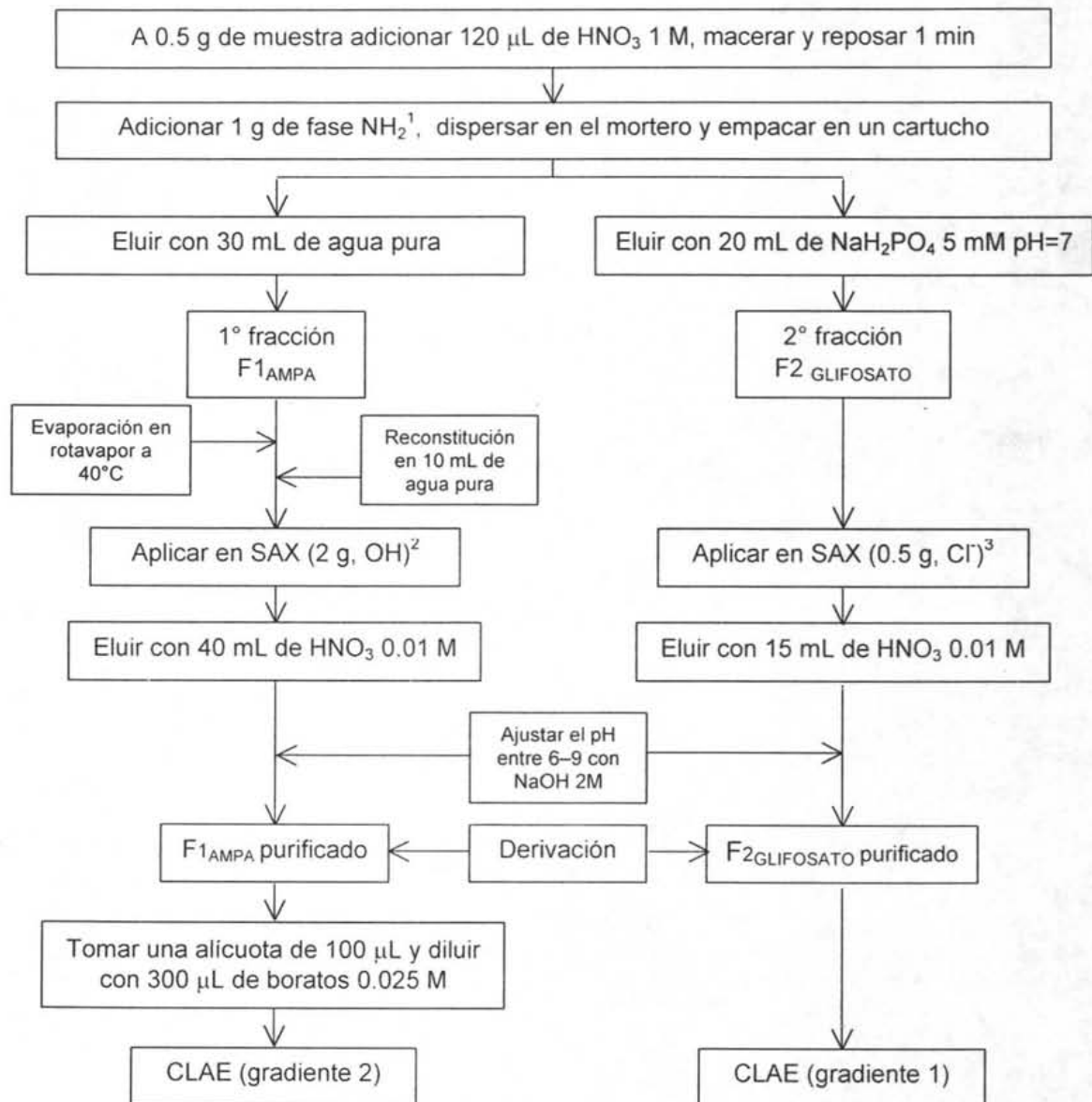
Los resultados de todos los ensayos anteriores permitieron conformar el método global de preparación de muestra.

Sin embargo, aun fue necesario realizar los ajustes que se presentan a continuación para mejorar los recobros y la reproducibilidad. El tiempo de reposo, posterior a la fortificación, para estos estudios se aumentó a 3 h para permitir que los compuestos se impregnaran mejor dentro de la muestra y se asemejara mejor las condiciones reales de aplicación. También, se utilizó un mortero de ágata para evitar las pérdidas debidas a la adsorción de los analitos en el vidrio y mejorar la reproducibilidad. Los resultados de la optimización del acondicionamiento del adsorbente amino, para la extracción de la columna de dispersión, mostraron que se requería 1 g de adsorbente para obtener un empacado adecuado. Por tanto, se aplicó esta nueva cantidad para formar las columnas de dispersión.

Por otra parte, la primera fracción de la columna de dispersión, correspondiente al AMPA, se analizó con el gradiente 1 para verificar que el glifosato no se eluyera durante la elución con los 30 mL de agua pura. En efecto, al aplicar 30 mL de agua pura a la columna de dispersión, el glifosato no se eluyó. Este comportamiento concuerda con el comportamiento por EFS con adsorbente amino y confirmó que el glifosato únicamente se eluye de este tipo de columna en presencia de fosfato diácido. Asimismo, el hecho de que el AMPA se eluyera de la columna de dispersión con agua pura mientras que el glifosato no, indicaba que la retención del primer compuesto era menor. Siendo la única diferencia en la estructura de ambos compuestos un grupo ácido carboxílico, que no posee la molécula del AMPA, se infirió que las cargas negativas (el carácter aniónico) eran las que intervenían en la fuerte retención de glifosato en la columna de dispersión.

Con respecto al bajo porcentaje de recobro del AMPA (ver tabla 40, p.92), era factible que las pérdidas se debieran a la adsorción del AMPA en el vidrio del matraz de evaporación. Por esto, se decidió no evaporar hasta sequedad.

Con estas modificaciones finalmente se obtuvo el protocolo completo para el pretratamiento de jitomate por DMFS con adsorbente amino, que se presenta en el diagrama 5.



¹ y ³ ⇒ Se acondiciona con 5 mL de MeOH y 10 mL de agua pura.

² ⇒ Se acondiciona con 10 mL de MeOH, 200 mL de NaOH pH = 9 y 6 mL de agua pura.

Diagrama 5. Protocolo desarrollado para la extracción selectiva de residuos de glifosato y de AMPA en el jitomate

5.2.5.1. Estudio de reproducibilidad, recobro y límite de detección

Los resultados, que se muestran en la tabla 41, confirmaron que el método del diagrama 5 fue reproducible y permitió obtener buenos porcentajes de recobro.

Tabla 41. Recobro y coeficientes de variación del método desarrollado

Compuesto	Número de muestras (n)	Nivel de fortificación ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Recobro promedio (%)	C.V. (%)
Glifosato	7	4.5	85.0	11.9
AMPA	7	6.0	76.4	19.1

Los cromatogramas de las figuras 26 y 28 corresponden a extractos provenientes de muestras tratadas con el método del diagrama 5. Se observan los picos correspondientes a los derivados de glifosato y del AMPA, en comparación con estándares de éstos a la concentración esperada (figuras 27 y 29, respectivamente).

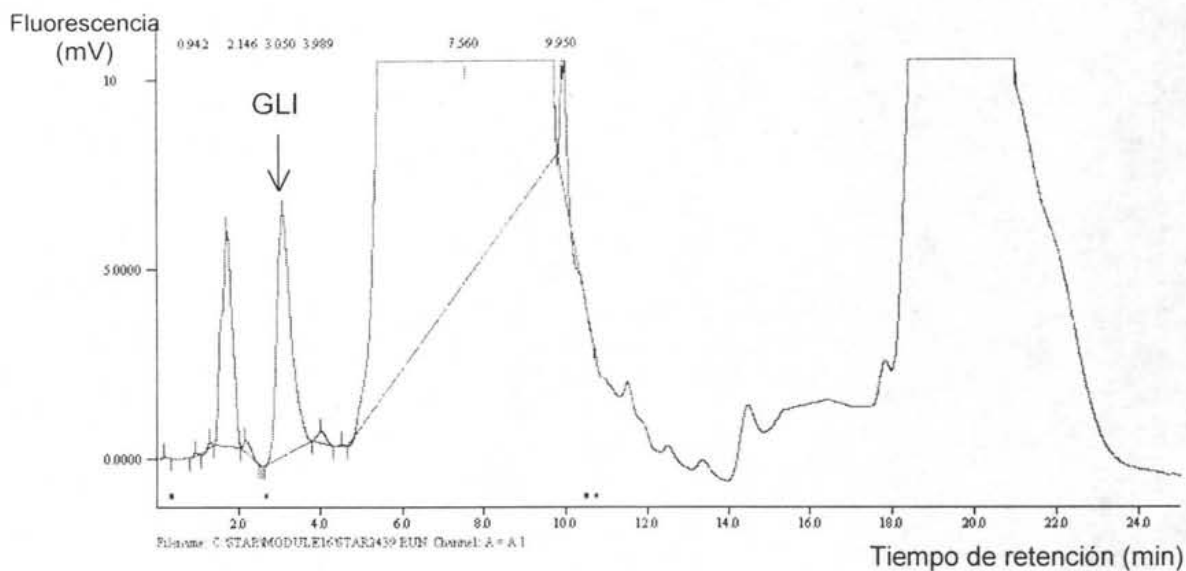


Fig. 26. Cromatograma de la elución con 15 mL de HNO_3 0.01 M de un cartucho SAX-Cl (0.5 g) para una carga de 20 mL de NaH_2PO_4 5 mM pH = 7 proveniente de una muestra fortificada con $4.5 \mu\text{g g}^{-1}$ de glifosato. Análisis con el gradiente 1

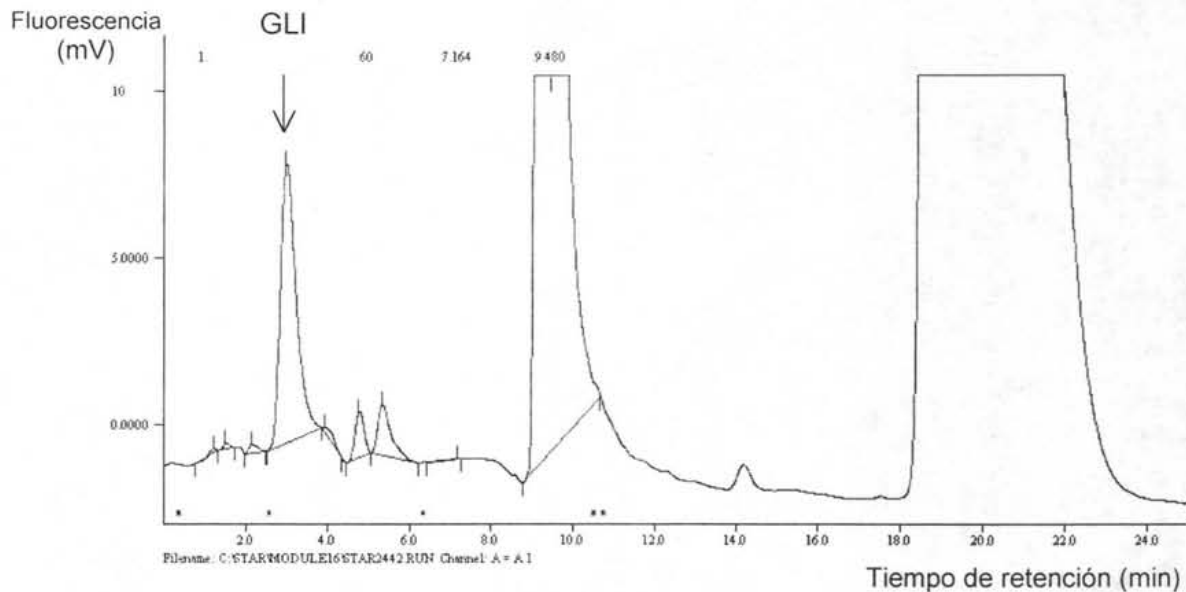


Fig. 27. Cromatograma de la inyección directa de una mezcla de reacción preparada a partir de una solución estándar de glifosato 150 ppb. Análisis con el gradiente 1

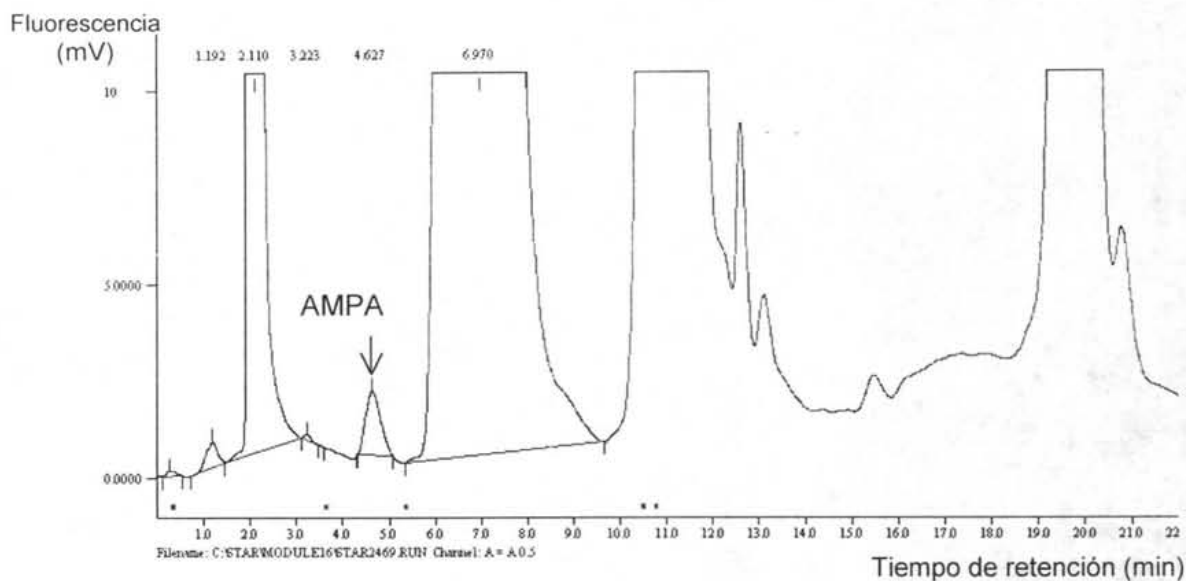


Fig. 28. Cromatograma de la dilución 1:4 de la elución con 40 mL de HNO_3 0.01 M de un cartucho SAX-OH (2 g) para una carga de 10 mL de agua proveniente de una muestra fortificada con $6 \mu\text{g g}^{-1}$ de AMPA. Análisis con el gradiente 2

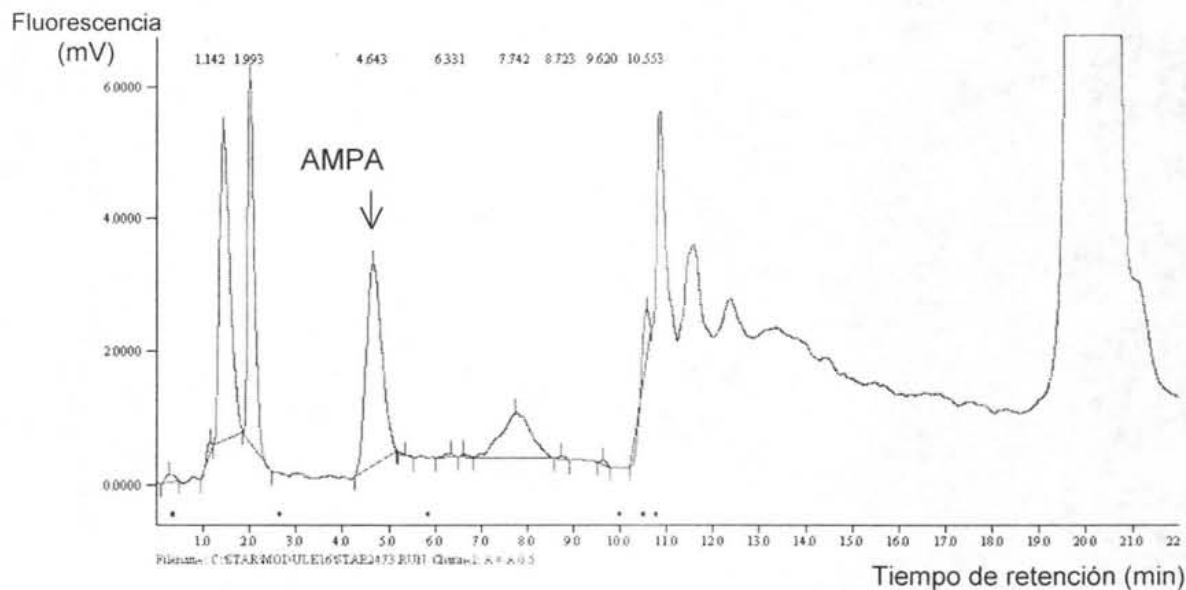


Fig. 29. Cromatograma de la inyección directa de la dilución 1:4 de una mezcla de reacción preparada a partir de una solución estándar de AMPA 75 ppb. Análisis con el gradiente 2

Los límites de detección estadísticos para el método desarrollado se muestran en la tabla

42.

Tabla 42. Obtención de los límites de detección en jitomate

Muestra	Concentración en el extracto purificado (ppb)	
	Glifosato (La concentración al 100 % correspondía a 150 ppb)	AMPA (La concentración al 100 % correspondía a 75 ppb)
1	137.59	57.75
2	108.60	60.95
3	129.13	35.96
4	149.28	56.15
5	119.56	53.99
6	138.56	67.02
7	110.74	69.31
n	7	7
$t_{6, 0.99}$	3.143	3.143
S (ng mL ⁻¹)	15.2871	10.95
Concentración límite en el extracto (ng mL ⁻¹)	48.02	34.42
Concentración límite en el jitomate (μg g ⁻¹)	1.44	2.75

Los límites de detección se obtuvieron sin concentrar los extractos. Sin embargo, debido a que la limpieza por intercambio de aniones permitió una adecuada purificación de los extractos, los límites de detección podrían disminuir por medio de la evaporación de los mismos hasta un mL, volumen que es necesario para la derivación, concentrando en un factor de 1:15 el glifosato y de 1:40 el AMPA (los volúmenes finales de los extractos purificados son 15 y 40 mL para glifosato y AMPA, respectivamente).

También, para este propósito se puede aumentar la cantidad de muestra y el volumen de inyección en el cromatógrafo (por ejemplo, Cowell (1986) utilizó un "loop" de 60 μ L) lo que permitiría disminuir el LDM por debajo del LMR para glifosato establecido por la EPA.

Asimismo, el método presenta ciertas ventajas con respecto al método que recomienda la EPA para la extracción de glifosato de muestras agrícolas. Como se observa en la tabla 43, los volúmenes de disolventes utilizados y las cantidades de adsorbentes se disminuyeron considerablemente, lo que evidencia una disminución en el costo del análisis (incluyendo el tratamiento de residuos). Asimismo, el tiempo total de análisis por muestra también se redujo considerablemente.

Tabla 43. Comparación de métodos con respecto al glifosato

Parámetro	DMFS-NH ₂	Cowell (1986)
Cantidad de muestra	0.5 g	30 g
Tiempo de obtención del extracto crudo	11 min	21 min
Tiempo total de análisis	85.5 min	119.75 min
Volumen total de disolventes utilizados para la obtención del extracto crudo	20 mL	475 mL
Cantidad total de adsorbentes utilizados	1.5 g	> 900 g
Volumen total de disolventes utilizados para la elución de cartuchos de limpieza	15 mL	22 mL

6. CONCLUSIONES

Se desarrolló un método para el pretratamiento de muestras de jitomate para la determinación de residuos de glifosato y del AMPA empleando la técnica de dispersión de la matriz en fase sólida con adsorbente amino, con una purificación efectiva por extracción en fase sólida por intercambio de aniones fuerte.

El método desarrollado fue reproducible y con buenos porcentajes de recobro; permite determinar glifosato y AMPA en jitomate a niveles de residuos hasta de 1.44 y 2.75 $\mu\text{g g}^{-1}$ respectivamente, utilizando un tamaño pequeño de muestra y sin necesidad de concentrar el extracto purificado.

El método permite un rápido manejo de la muestra, reduciendo el tiempo requerido para ser procesada, lo que le da la característica de eficiente, ya que hace posible el monitoreo de una mayor cantidad de éstas. Por otra parte, la cantidad de disolventes utilizados disminuyó considerablemente, decreciendo así la contaminación ambiental y aumentando la seguridad del analista.

Asimismo el protocolo desarrollado en el presente trabajo no requiere de equipo costoso o dispositivos especiales, como es el caso del método que recomienda la EPA (método no. 86-63-1).

La técnica de Dispersión de la Matriz en Fase Sólida permitió llevar a cabo la homogeneización de la muestra y la extracción de glifosato y del AMPA en una sola etapa, por lo que se presenta como una opción adecuada para el inicio del tratamiento de este tipo de muestras. En particular, la extracción de glifosato a partir de la matriz es una etapa crítica en el procedimiento, ya que al tratarse de un herbicida sistémico fácilmente se puede introducir en los frutos de las plantas.

Las interacciones de la matriz con el adsorbente y la fase móvil tuvieron un efecto pronunciado en la elución del glifosato, cuyo comportamiento de elución por DMFS fue diferente al que se observó por EFS. Esto pone en evidencia la importancia de realizar estudios para comprender mejor los principios y parámetros de esta técnica.

7. REFERENCIAS Y BIBLIOGRAFÍA

Alferness P. e Iwata Y. (1994). Determination of glyphosate and (aminomethyl)phosphonic acid in soil, plant and animal matrices, and water by capillary gas chromatography with mass-selective detection. *J. Agric. Food Chem.* 42, 2751-2759.

Alferness P., Wiebe L., Anderson L., Bennett O., Bosch M., Clark D., Claussen F., Colin T., Cook C., Davis H., Ely V., Graham D., Grazzini R., Hickey H., Holland P., Hom W., Ingram R., Ling Y., Markley B., Peoples G., Pitz G., Robert G., Robinson C., Sen L., Sensue A., South N., Steginsky C., Summer S., Trower T., Wiczorek P. y Zheng S. (2001). Determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in crops by capillary gas chromatography with mass-selective detection: collaborative study. *J. AOAC Int.* 84, 823-846. (Únicamente se consultó el *abstract*)

Anuario Agropecuario. (1998). México en www.sagarpa.gob.mx

Archer T.E. y Stokes J.D. (1984). Residue analysis of glyphosate in blackberries by high-performance liquid chromatography and postcolumn reaction detection. *J. Agric. Food Chem.* 32, 586-588.

Barker S.A., Long A.R. y Hines M.E. (1993). Disruption and fractionation of biological materials by matrix solid-phase dispersion. *J. Chromatog. A.* 629, 23 - 34.

Barker S. A. (2000). Matrix solid phase dispersion. *J. Chromatog. A.* 885, 115-127.

Bernal G.M. (2000). Determinación simultánea de plaguicidas carbamatos en muestras acuíferas provenientes de una zona agrícola. Tesis de maestría, Facultad de Química, UNAM, 80 p.

Catálogo Oficial de Plaguicidas. (1997). CICOPLAFEST, México.

Ceballos Y. y Carrillo L. (2003). Gana jitomate jugoso mercado en EU. Periódico *Reforma* (México, D.F.) 9 de Feb.

CICOPLAFEST, Informe sexenal (1994-2000), México.

Cowell J.E., Kunstman J.L., Nord P.J., Steinmetz J.R. y Wilson G.R. (1986). Validation of an analytical residue method for analysis of glyphosate and metabolite: an interlaboratory study. *J. Agric. Food Chem.* 34, 955-960.

Datos Básicos del Sistema Nacional de Información Agropecuaria. (1998). Avance al cuarto trimestre en www.sagarpa.gob.mx

Fernández M., Picó Y. y Mañes J. (2000). Determination of carbamate residues in fruits and vegetables by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatog. A.* 871, 43-56.

Food and Agricultural Organization. (2000). Specifications and evaluations for plant protection products: Glyphosate, p. 29.

Gaunt P. y Barker S.A. (2000). Matrix solid phase dispersion extraction of triazines from catfish tissues; examination of the effects of temperature and dissolved oxygen on the toxicity of atrazine. *Int. J. Environ. Pollut.* 13, 284-312.

Glass R.L. (1983). Liquid chromatographic determination of glyphosate in fortified soil and water samples. *J. Agric. Food Chem.* 31, 280-282.

Guinivan R.A., Thompson N.P. y Wheeler W.B. (1982). Derivatization and clean-up improvements in determination of residues of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in blueberries. *J. AOAC Int.* 65, 35 - 39.

Hardell L. y Eriksson M. (1998). A case-control study of Non-Hodgkin lymphoma and exposure to pesticides. *Organohalogen Compd.* 38, 257-258. (Únicamente se consultó el *abstract*)

Harris D. (2001). Análisis Químico Cuantitativo, 2ª ed., Reverté, España, 959 p.

Hennion M.C. y Scribe P. (1993). Sample handling strategies for the analysis of organic compounds from environmental water samples, En *Environmental Analysis: Techniques, Applications and Quality Assurance*, capítulo 2, Elsevier Science Publishers, Netherlands, 23-77.

Hennion M.C. y Pichon V. (1994). Solid-phase extraction of polar organic pollutants from water. *Environ. Sci. Technol.* 28, 576 - 583.

Hernández F., Hidalgo C. y Sancho J.V. (2000). Determination of glyphosate residues in plants by precolumn derivatization and coupled-column liquid chromatography with fluorescence detection. *J. AOAC Int.* 83, 728 - 734.

Hogendoorn E.A., Ossendrijver F.M., Dijkman E. y Baumann R.A. (1999). Rapid determination of glyphosate in cereal samples by means of pre-column derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate and coupled-column liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatog. A.* 833, 67-73.

IPCS Environmental Health Criteria 159. (1994). OMS, Geneva.

Kataoka H., Ryu S., Sakiyama N. y Makita M. (1996). Simple and rapid determination of the herbicides glyphosate and glufosinate in river water, soil and carrot samples by gas chromatography with flame photometric detection. *J. Chromatog. A.* 726, 253-258.

Kaczewer J., "Toxicología del Glifosato: Riesgos para la salud humana" en www.ecoportel.net

Konar S.K. y Roy D.N. (1990). Method for the determination of residues of the herbicide glyphosate and its principal metabolite, aminomethylphosphonic acid, in plant materials by nitrogen-selective gas chromatography. *Anal. Chim. Acta.* 229, 277 - 280.

Kristenson E.M., Haverkate E.G.J., Slooten C.J., Ramos L., Vreuls R.J.J. y Brinkman U. (2001). Miniaturized automated matrix solid-phase dispersion extraction of pesticides in fruit followed by gas chromatographic-mass spectrometric analysis. *J. Chromatog. A.* 917, 277-286.

Lundgren L. (1986). A new method for the determination of glyphosate and (aminomethyl)phosphonic acid residues in soils. *J. Agric. Food Chem.* 34, 535-538.

Mallat, E., y Barceló D. (1998). Analysis and degradation study of glyphosate and of aminomethylphosphonic acid in natural waters by means of polymeric and ion-exchange solid-phase extraction columns followed by ion chromatography-post-column derivatization with fluorescence detection. *J. Chromatog. A.* 823, 129-136.

Merck Index. (1996). Merck&Co., USA, p. 4520.

Miles C.J., Wallace L.R. y Moye H.A. (1986). Determination of glyphosate herbicide and (aminomethyl)phosphonic acid in natural waters by liquid chromatography using pre-column fluorogenic labeling with 9-fluorenylmethylchloroformate. *J. AOAC International.* 69, 458 - 461.

Miles C.J. y Moye H.A. (1988). Extraction of glyphosate herbicide from soil and clay minerals and determination of residues in soils. *J. Agric. Food Chem.* 36, 486 - 491.

Moye H. A., Miles C.J. y Scherer S.J. (1983). A simplified high-performance liquid chromatography residue procedure for the determination of glyphosate herbicide and (aminomethyl)phosphonic acid in fruits and vegetables employing postcolumn fluorogenic labeling. *J. Agric. Food Chem.* 31, 69-72.

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

NORMA Oficial Mexicana NOM-050-FITO-1995, Por la que se establecen los requisitos y especificaciones fitosanitarias para efectuar ensayos de campo para el establecimiento de límites máximos de residuos de plaguicidas en productos agrícolas.

Pesticide Manual. (1995). Crop Protection Publications, 10 ed., UK, 542-545.

Roseboom, H. y Berkhoff C.J. (1982). Determination of the herbicide glyphosate and its major metabolite aminomethylphosphonic acid by high-performance liquid chromatography after fluorescence labelling. *Anal. Chim. Acta.* 135, 373-377.

Royer A., Beguin S., Tabet J.C., Hulot S., Reding M.A. y Communal P.Y. (2000). Determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid residues in water by gas chromatography with tandem mass spectrometry after exchange ion resin purification and derivatization. Application on vegetable matrixes. *Anal. Chem.* 72, 3826-3832.

Sancho J.V., López F.J., Hernández F., Hogendoorn E.A. y van Zoonen P. (1994). Rapid determination of glufosinate in environmental water samples using 9-fluorenylmethoxycarbonyl precolumn derivatization, large volume injection and coupled – column liquid chromatography. *J. Chromatog. A.* 678, 59 - 67.

Sancho J.V., Hidalgo C., Hernández F. y López F.J. (1996). Rapid determination of glyphosate residues and its main metabolite AMPA in soil samples by liquid chromatography. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 62, 53-63.

Seiber J., McChesney M.M., Kon R. Y Leavitt R.A. (1984). Analysis of glyphosate residues in kiwi fruit and asparagus using high-performance liquid chromatography of derivatized glyphosate as a clean-up step. *J. Agric. Food Chem.* 32, 678-681.

Sen N.P. y Baddoo P.A. (1996). Determination of glyphosate as N-nitroso derivative by high performance liquid chromatography with chemiluminescence detection", *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 63, 107 - 117.

Tadeo J.L., Sánchez-Brunete C., Pérez R.A. y Fernández M.D. (2000). Analysis of herbicide residues in cereals, fruits and vegetables. *J. Chromatog. A.* 882, 175-191.

Takano, I., Nagayama T., Kobayashi M., Ito M., Tamura Y., Takada C., Kimura N., Kitayama K. y Yasuda K. (2000). A simplified procedure for the determination of glyphosate in soybeans employing postcolumn fluorescence labeling. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi.* 41(4), 242-245.
(Únicamente se consultó el *abstract*)

Thompson D.G., Cowell J.E., Daniels R.J., Staznik B. y MacDonald L.M. (1989). Liquid chromatographic method for quantitation of glyphosate and metabolite residues in organic and mineral soils, stream sediments, and hardwood foliage. *J. AOAC Int.* 72, 355-360.

Torres C.M., Picó Y. y Mañes J. (1996). Determination of pesticide residues in fruit and vegetables. *J. Chromatog. A.* 754, 301-331.

Torres C.M., Picó Y., Redondo M.J. y Mañes J. (1996). Matrix solid-phase dispersion extraction procedure for multiresidue pesticide analysis in oranges. *J. Chromatog. A.* 719, 95-103.

Torres C.M., Picó Y., Marín R. y Mañes J. (1997). Evaluation of organophosphorus pesticides residues in citrus fruits from the Valencian Community (Spain). *J. AOAC Int.* 80, 1122-1128.

Torres C.M., Picó Y. y Mañes J. (1997). Comparison of octadecylsilica and graphitized carbon black as materials for solid-phase extraction of fungicide and insecticide residues from fruit and vegetables. *J. Chromatog. A.* 778, 127-137.

Traas T.P. y Smit C.E. (2003). Environmental risk limits for aminomethylphosphonic acid (AMPA), En el informe del proyecto *Setting Integrated Environmental Quality Standards* del Instituto Nacional de Salud Pública y Medio Ambiente de Holanda, p. 23.

U.S. Code of Federal Regulations 40. (2004). Apéndice B de la parte 136: Definition and procedure for the determination of the method detection limit.

U.S. Code of Federal Regulations 40. (2004). 180.364: Glyphosate; tolerance for residues.

U.S. Environmental Protection Agency. (1993). Reregistration Eligibility Decision (RED): Glyphosate. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, Washington, D.C.

U.S. Environmental Protection Agency. (2002). Método No. 86-63-1: Analytical Residue Method for N-Phosphonomethyl Glycine and Aminomethylphosphonic Acid in Environmental Water.

Valenzuela A.I., Lorenzini R., Redondo M.J. y Font G. (1999). Matriz solid-phase dispersion microextraction and determination by high-performance liquid chromatography with UV detection of pesticides residues in citrus fruit. *J. Chromatog. A.* 839, 101-107.

Viana E., Moltó J.C. y Font G. (1996). Optimization of a matrix solid-phase dispersion method for the analysis of pesticides residues in vegetables. *J. Chromatog. A.* 754, 437-444.

Vreeken R.J., Speksnijder P., Bobeldijk-Pastorova I. y Noij Th.H.M. (1998). Selective analysis of the herbicides glyphosate and aminomethylphosphonic acid in water by on-line solid-phase extraction-high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromatog. A.* 794, 187-199.

Wigfield Y. y Lanouette M. (1990). Simplified liquid chromatographic determination of glyphosate and metabolite residues in environmental water using post-column fluorogenic labelling. *Anal. Chim. Acta.* 233, 311-314.

Yagüe C., Bayarri S., Lázaro R., Conchello P., Ariño A. y Herrera A. (2001). Multiresidue determination of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in milk by gas chromatography with electron-capture detection after extraction by matrix solid-phase dispersion. *J. AOAC Int.* 84, 1561-1568.

Yousef M.I., Salem M.H., Ibrahim H.Z., Helmi S., Seehy M.A. y Bertheussen K. (1995). Toxic effects of carbofuran and glyphosate on semen characteristics in rabbits. *J. Environ. Sci. Health B.* 30, 513-534. (Únicamente se consultó el *abstract*)

ANEXO I

Condiciones analíticas para la reacción de derivación precolumna con el reactivo

FMOC-CL

Referencia	Glass (1983)	Miles y Moye (1988)	Sancho et al. (1996)	Hogendoorn et al. (1999)	Hernández et al. (2000)
Concentración de reactivos					
FMOC-Cl (mg mL^{-1})	2.6	2.6	1	2	1 y 5
Boratos (M)	0.025	0.025	0.025	0.125	0.125
Volumen a añadir					
Muestra (mL)	2 - 5	0.1	1	1.5	1
Boratos (mL)	2	0.9	0.5	0.2	0.5
Acetona (mL)	4	0.9	0	0	0
FMOC-Cl (mL)	1.5	0.1	1	1	1
Tiempo de reacción (min)	15	20	30	15	30

Índice de tablas

No.	Título	Pag
1	Producción y rendimiento de los principales cultivos cíclicos en México	7
2	Volumen y valor de plaguicidas preparados para uso agrícola	7
3	Propiedades fisicoquímicas del glifosato	9
4	Propiedades fisicoquímicas del AMPA	10
5	Propiedades toxicológicas del glifosato	11
6	Mecanismos de retención en EFS	14
7	Clasificación de compuestos con base en su K_{ow}	15
8	Grupos comúnmente utilizados para intercambio iónico	16
9	Tipos de soportes sólidos utilizados en los intercambiadores de iones	17
10	Preparación de muestras por dispersión de la matriz en fase sólida	22
11	$\log K_{ow}$ de plaguicidas extraídos de muestras agrícolas por DMFS	23
12	Condiciones para el análisis por CG	25
13	Preparación de muestras agrícolas y análisis por CG previa derivación	30
14	Preparación de muestras agrícolas y análisis por CLAE	31
15	Condiciones para la reacción de derivación con FMOC-Cl y la detección por fluorescencia	38
16	Porcentajes de ACN y solución de fosfatos utilizados para el estudio de la variación de k'	39
17	Porcentajes de ACN en la fase móvil para la elución de FMOC-Cl	40
18	Concentraciones para evaluar la linealidad del sistema cromatográfico	42
19	Ensayos con glifosato en adsorbente NH_2 por EFS	46
20	Volúmenes de acondicionamiento para la retención de glifosato en SCX-Na	47
21	Condiciones para los ensayos de retención de glifosato en 0.1 g de SAX-OH	48
22	Condiciones para los ensayos de retención de AMPA en SAX	49
23	Condiciones para la extracción de glifosato con el adsorbente NH_2 por EFS	50
24	Elución de glifosato de la columna de dispersión	51
25	Condiciones de elución de AMPA de la columna de dispersión	53
26	Condiciones para la limpieza de extractos de glifosato con SAX-Cl por EFS	54
27	Condiciones para la limpieza de extractos de AMPA con SAX-OH por EFS	55
28	Reproducibilidad del sistema cromatográfico empleando soluciones estándar	65
29	Elución de glifosato retenido en adsorbente amino	67

No.	Título	Pag
30	Elución de glifosato, de 0.1 g de SAX-OH, con HNO ₃ 7.5 mM pH = 2.1	71
31	Retención de AMPA en SAX-Cl con dos diferentes soluciones de carga	72
32	Retención de AMPA en 0.2 g de SAX-OH	73
33	Comparación de la retención de AMPA en SAX-OH	74
34	Elución de AMPA retenido en 0.5 g de SAX-OH	75
35	Extracción de glifosato por EFS-NH ₂ a partir de muestras fortificadas	76
35b	Elución de glifosato de cartuchos NH ₂ a partir de muestras fortificadas	77
36	Recobro de glifosato acidificando la matriz y elución con NaH ₂ PO ₄ 5 mM pH = 7	82
37	Recobro de AMPA en diferentes fracciones de elución de la columna de dispersión	88
38	Elución de glifosato retenido en 0.5 g de SAX-Cl previa aplicación de extracto de jitomate	91
39	Elución de la columna de dispersión con NaH ₂ PO ₄ 5 mM pH = 7 dejando reposar la muestra 3 h	91
40	Recobro de AMPA retenido en cartuchos con diferentes cantidades de SAX-OH previa aplicación de extracto de jitomate	92
41	Recobro y coeficientes de variación del método desarrollado	96
42	Obtención de los límites de detección en jitomate	99
43	Comparación de métodos con respecto al glifosato	100

Índice de diagramas

No.	Título	Pag
1	Protocolo de un pretratamiento general de muestra sólida	12
2	Etapas de la EFS	13
3	Optimización del método de análisis para glifosato y AMPA	36
4	Desarrollo de la metodología para la preparación de la muestra	37
5	Protocolo desarrollado para la extracción selectiva de residuos de glifosato y AMPA en el jitomate	95

Índice de figuras

No.	Título	Pag
1	Estructura y cargas del glifosato con base en el pH del medio	10
2	Estructura y cargas del AMPA con base en el pH del medio	10
3	Reacción de oxidación del glifosato	26
4	Reacción de derivación del glifosato y del AMPA con OPA-tiofluor	26
5	Reacción de derivación precolumna con FMOCCl	28
6	Comportamiento de retención del derivado de glifosato en sílice C ₁₈	59
7	Comportamiento de retención del derivado de AMPA en sílice C ₁₈	59
8	Cromatograma de la inyección directa de una mezcla de reacción preparada a partir de una solución estándar de glifosato 0.5 ppm. Análisis con el gradiente 1	60
9	Cromatograma de la inyección directa de la dilución 1:4 de una mezcla de reacción preparada a partir de una solución estándar de AMPA 2 ppm con boratos 0.025 M. Análisis en gradiente: 18 % ACN durante 10 min, después en 2 min hasta 40 % ACN manteniendo esta composición constante durante 20 min	61
10	Cromatograma de la elución del reactivo derivatizante FMOCCl. Análisis isocrático con 8 % ACN 10 min, gradiente hasta 40 % ACN en 2 min y composición constante 20 min	63
11	Cromatograma de la inyección directa de una mezcla de reacción preparada a partir de una solución estándar de AMPA 0.67 ppm. Análisis con el gradiente 1	64
12	Cromatograma de la elución con 5 mL de NaH ₂ PO ₄ 5 mM pH = 7 de un cartucho NH ₂ (0.5 g) para una carga de 5 mL de extracto de jitomate fortificado con 5 µg g ⁻¹ de glifosato. Análisis con el gradiente 1	78
13	Cromatograma de la elución con 5 mL de NaH ₂ PO ₄ 5 mM pH = 7 de un cartucho NH ₂ (0.5 g) para una carga de 5 mL de extracto de jitomate NO fortificado. Análisis con el gradiente 1	78
14	Cromatograma de la elución con 5 mL X 1 de NaH ₂ PO ₄ 5 mM pH = 7 de DMFS-NH ₂ (1:1) para una muestra fortificada con 10 µg g ⁻¹ de glifosato. Análisis con el gradiente 1	80
15	Cromatograma de la elución con 5 mL X 3 de NaH ₂ PO ₄ 5 mM pH = 7 de DMFS-NH ₂ (1:1) para una muestra fortificada con 10 µg g ⁻¹ de glifosato. Análisis con el gradiente 1	81
16	Cromatograma de la elución con 5 mL X 4 de HNO ₃ 7.5 mM de DMFS-NH ₂ (1:1) para una muestra fortificada con 10 µg g ⁻¹ de glifosato. Análisis con el gradiente 1	81

No.	Título	Pag
17	Cromatograma de la elución con 5 mL de NaH_2PO_4 5 mM pH = 7 (2° fracción) de DMFS- NH_2 (1:1) para una muestra fortificada con $10 \mu\text{g g}^{-1}$ de glifosato y acidificada con 1 gota de HNO_3 1 M. Análisis con el gradiente 1	83
18	Cromatograma de la elución con 5 mL de NaH_2PO_4 5 mM pH = 7 (2° fracción) de DMFS- NH_2 (1:1) para una muestra NO fortificada y acidificada con 1 gota de HNO_3 . Análisis con el gradiente 1	83
19	Cromatograma de la elución con 5 mL de NaH_2PO_4 5 mM pH = 7 (2° fracción) de DMFS- NH_2 (1:1) para una muestra fortificada con $5 \mu\text{g g}^{-1}$ de glifosato y acidificada con $120 \mu\text{L HNO}_3$ 1 M. Análisis con el gradiente 1	85
20	Cromatograma de la elución con 5 mL de NaH_2PO_4 5 mM pH = 7 (2° fracción) de DMFS- NH_2 (1:1) para una muestra NO fortificada y acidificada con $120 \mu\text{L HNO}_3$ 1 M. Análisis con el gradiente 1	85
21	Cromatograma de la dilución 1:4 del efluente de un cartucho NH_2 (0.5 g) proveniente de la 1° fracción de DMFS- NH_2 (1:1) para una muestra fortificada con $40 \mu\text{g g}^{-1}$ de AMPA. Análisis con el gradiente 2	87
22	Cromatograma de la dilución 1:4 del efluente de un cartucho NH_2 (0.5 g) proveniente de la 1° fracción de DMFS- NH_2 (1:1) para una muestra NO fortificada. Análisis con el gradiente 2	89
23	Cromatograma de la dilución 1:4 de la elución con 5 mL de agua pura (2° fracción) de DMFS- NH_2 (1:1) para una muestra NO fortificada y acidificada con $120 \mu\text{L HNO}_3$ 1 M. Análisis con el gradiente 2	89
24	Cromatograma de la elución con 10 mL de HNO_3 0.01 M (1° fracción) de un cartucho SAX-Cl (0.5 g) para una muestra fortificada con $10 \mu\text{g g}^{-1}$ de glifosato. Análisis con el gradiente 1	91
25	Cromatograma de la dilución 1:4 del efluente, proveniente de DMFS- NH_2 (1:1) evaporado y reconstituido en 10 mL de agua pura fortificada con $40 \mu\text{g g}^{-1}$, acidificada con $120 \mu\text{L HNO}_3$ 1M, en un cartucho SAX-OH (2 g). Análisis con el gradiente 2	93
26	Cromatograma de la elución con 15 mL de HNO_3 0.01 M de un cartucho SAX-Cl (0.5 g) para una carga de 20 mL de NaH_2PO_4 5 mM pH = 7 proveniente de una muestra fortificada con $4.5 \mu\text{g g}^{-1}$ de glifosato. Análisis con el gradiente 1	97
27	Cromatograma de la inyección directa de una mezcla de reacción preparada a partir de una solución estándar de glifosato 150 ppb. Análisis con el gradiente 1	97

No.	Título	Pag
28	Cromatograma de la dilución 1:4 de la elución con 40 mL de HNO ₃ 0.01 M de un cartucho SAX-OH (2 g) para una carga de 10 mL de agua proveniente de una muestra fortificada con 6 µg g ⁻¹ de AMPA. Análisis con el gradiente 2	98
29	Cromatograma de la inyección directa de la dilución 1:4 de una mezcla de reacción preparada a partir de una solución estándar de AMPA 75 ppb. Análisis con el gradiente 2	98