



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

TESIS

**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE LA DETERMINACIÓN DE
GLIFOSATO, AMPA Y GLUFUSINATO EN SUELOS POR CLAR CON
DERIVATIZACIÓN PRE-COLUMNA**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUIMICA

PRESENTA

KAREN EDITH MARTÍNEZ PAZ

CD MX. 2019





Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: **Profesor: Irma Cruz Gavilán García**

VOCAL: **Profesor: Marcos Francisco Villanueva Hernández**

SECRETARIO: **Profesor: Norma Ruth López Santiago**

1er. SUPLENTE: **Profesor: Minerva Monroy Barreto**

2° SUPLENTE: **Profesor: Claudia Inés Rivera Cárdenas**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO DE BIOGEOQUÍMICA AMBIENTAL, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

ASESOR DEL TEMA:

NORMA RUTH LÓPEZ SANTIAGO

SUSTENTANTE:

KAREN EDITH MARTÍNEZ PAZ

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México debido a que gracias a ella descubrimos todo el mundo de conocimiento y sabiduría dentro de sus aulas y laboratorios, compartimos historia de vida, conocimos fuerzas y debilidades, además nos permitió conocer a muchas personas que nos han marcado el corazón, por darnos cobijo, un temple, una formación y por darnos los conocimientos para afrontar esta vida y vivirla a plenitud

Dra. Margarita Gutiérrez Ruiz por permitirme realizar este trabajo en su laboratorio.

A la Q. Leiny López Hernández, al M. en C. Enrique Morales Zamudio y al Q.A Eduardo Segura Molares por el apoyo en el manejo y mantenimiento del cromatógrafo de líquidos

Al I.Q Guillermo Pérez y M en C. Christiane Pizarro por su tiempo invertido en el muestreo.

Q.F.B Reyna Roldan Armas y M. en Q.A. Zoila Fernández García (apoyo general en el trabajo de laboratorio).

A mi asesora de Tesis M.C. Norma Ruth López Santiago por orientarme y por toda la ayuda que me brindó para la realización de esta tesis, por su apoyo y amistad que me permitieron aprender mucho más que lo estudiando en el proyecto de tesis.

Contenido

Listado de Tablas.....	vii
Listado de Figuras.....	ix
Resumen	xi
Introducción.....	xii
Objetivos.....	xv
I. Marco teórico	1
1. Generalidades de los plaguicidas.....	1
1.1 Clasificación de plaguicidas.....	1
1.2 Degradación y biodegradación	5
1.3 Ventajas y desventajas de uso de plaguicidas.....	6
2. Glifosato.....	7
2.1 Breve historia	7
2.2 Comercialización del glifosato.....	11
2.3 Usos del glifosato en México.....	12
2.4 Química del glifosato	15
2.4.1 Degradación del glifosato.....	17
2.4.2 Modo de acción del glifosato	19
2.4.3 Toxicidad y efectos adversos al ambiente	21
2.5 Glufosinato	24
2.5.1 Breve historia	24
2.5.2 Comercialización del glufosinato	25

2.5.3	Usos del glufosinato en México	26
2.5.4	Química del glufosinato.....	27
2.5.5	Toxicidad y efectos adversos al ambiente del Glufosinato.....	30
3.	Análisis de glifosato, AMPA y glufosinato	32
3.1	Técnicas de análisis de los plaguicidas de estudio	32
3.2	Validación de métodos analítico cromatográfico.....	35
3.2.1	<i>Parámetros a validar en un método cromatográfico.....</i>	35
II.	Parte experimental.....	38
4.	Reactivos, disolventes, materiales y equipos	38
4.1	Reactivos y disolventes.....	38
4.2	Materiales, accesorios y consumibles de equipos.....	39
4.3	Equipos.....	40
4.4	Preparación de disoluciones y reactivos	41
5.	Experimentación.....	42
5.1	Optimización de la derivatización	42
5.2	Optimización de la separación cromatográfica.....	45
5.3	Validación del método analítico	46
5.3.1	Linealidad y sensibilidad analítica	48
5.3.2	Límite de detección y límite de cuantificación	48
5.3.3	Precisión y veracidad.....	49
5.3.4	Confirmación en matriz.....	49

5.4	Aplicación a muestras ambientales	50
III.	Análisis de resultados y discusión	52
6.	Desarrollo del método.....	52
6.1	Optimización de la derivatización	52
6.2	Optimización de la separación	55
7.	Validación del método analítico	56
7.1	Linealidad y sensibilidad analítica	56
7.2	Límites de detección y de cuantificación	58
7.3	Precisión y veracidad.....	60
7.4	Confirmación en matriz.....	62
7.5	Resumen de los parámetros de desempeño	65
8.	Aplicación a muestras ambientales.....	65
IV.	Conclusiones.....	69
V.	Bibliografía.....	70
Anexo A.	Cromatografía de líquidos de alta resolución	80

Listado de Tablas

Tabla 1 Clasificación Toxicológica de los Plaguicidas en función de DL ₅₀ en ratas.....	5
Tabla 2 Color de etiqueta del plaguicida según la categoría toxicológica	5
Tabla 3 Límites máximos de residuos permitidos de glifosato en México	13
Tabla 4 Herbicidas comerciales más empleados de glifosato en México	14
Tabla 5 Propiedades fisicoquímicas de glifosato	16
Tabla 6 Propiedades fisicoquímicas de AMPA	19
Tabla 7 Comparativo de las afirmaciones de Monsato y los hallazgos de investigaciones independientes (continuación).....	23
Tabla 8 LMR de glufosinato de amonio en México	27
Tabla 9 Herbicidas comerciales más empleados de glufosinato en México	27
Tabla 10 Propiedades fisicoquímicas de glufosinato de amonio	28
Tabla 11 Comparativo entre las afirmaciones de Aventis vs Investigaciones.....	30
Tabla 12 Cuadro resumen de la toxicidad de glifosato	31
Tabla 13 Cuadro resumen de la toxicidad del glufosinato.....	31
Tabla 14 Optimización del tiempo de reacción	44
Tabla 15 Optimización de cantidad de la disolución de FMOC-Cl 1000 mg/L.....	44
Tabla 16 Optimización del número de lavados con éter etílico	45
Tabla 17. Plan de validación.....	47
Tabla 18 Preparación de los niveles de la curva de calibración	48
Tabla 19. Muestras analizadas	51
Tabla 20 Condiciones del procedimiento de derivatización optimizado.....	55
Tabla 21 Estadística de regresión	58
Tabla 22 Límites de detección y cuantificación para el glifosato y AMPA	59
Tabla 23 Límite de detección y cuantificación para el glufosinato.....	59

Tabla 24 Límites de detección y límites de cuantificación.....	60
Tabla 25 Precisión y recobro en glifosato	60
Tabla 26 Precisión y recobro en ácido aminometilfosfónico (AMPA)	61
Tabla 27 Precisión y recobro en glufosinato	62
Tabla 28. Estadísticos de Cantidad adicionada vs Cantidad recuperada.....	64
Tabla 29. Resultados de los parámetros de desempeño los compuestos de estudio	65
Tabla 30. Concentración de los analitos en las muestras de suelo.....	67

Listado de Figuras

Figura 1. Uso de plaguicidas, México 2000 – 2014.....	1
Figura 2 Hitos en la historia del descubrimiento, comercialización y regulación del glifosato.....	9
Figura 3 Acontecimientos clave en la historia del uso y los impactos del glifosato....	10
Figura 4 Fórmula estructural del glifosato.....	15
Figura 5 Estructuras y procesos de ionización de glifosato y AMPA.....	17
Figura 6 Vías de degradación de glifosato.....	18
Figura 7 Biosíntesis de aminoácidos aromáticos.....	20
Figura 8 Países donde actualmente está registrado el glufosinato de amonio.....	26
Figura 9 Fórmula estructural del glufosinato (sal de glufosinato de amonio).....	28
Figura 10 Estructura química del glifosato, AMPA, glufosinato, y sus compuestos derivatizados con 9-fluorenilmetil-cloroformato.....	43
Figura 11. Procedimientos de derivatización.....	45
Figura 12. Procedimiento de extracción utilizado.....	49
Figura 13 Gráfico de barras: Tiempo de derivatización.....	53
Figura 14. Gráfico de barras: Cantidad de derivatizante.....	53
Figura 15 Gráfico de barras: Extracciones con éter etílico.....	54
Figura 16. Procedimiento final de derivatización.....	55
Figura 17. Curva de $\log k' = f(\%ACN)$ en la fase móvil (ACN:disolución de fosfatos) 56	56
Figura 18 Curva de calibración promedio de glifosato.....	57
Figura 19 Curva de calibración promedio de AMPA.....	57
Figura 20 Curva de calibración promedio de glufosinato.....	58
Figura 21. Curva Cantidad adicionada vs Cantidad recuperada, glifosato.....	63
Figura 22. Curva Cantidad adicionada vs Cantidad recuperada, AMPA.....	63

Figura 23 Curva Cantidad adicionada vs Cantidad recuperada, glufosinato	64
Figura 24. Cromatograma de la Muestra ambiental 632-16	68
Figura 25. Cromatograma de la Muestra ambiental 632-16 adicionada	68

Resumen

Se desarrolló y validó una metodología por cromatografía de líquidos de alta resolución y derivatización pre-columna, que permitió llevar a cabo la determinación multiresiduos de glifosato, AMPA y glufosinato en muestras de suelo. Los resultados muestran que el método validado es adecuado para los fines previstos ya que cumplen con los criterios de aceptación establecidos.

Se estableció, desarrolló y validó un protocolo de derivatización de los analitos con FMOC-Cl (cloruro de 9-fluoroenilmetil cloroformato) que conjunto las opciones reportadas en la literatura, se optimizó el tiempo de reacción, la cantidad de derivatizante y el número de extracciones con disolventes orgánicos para la limpieza.

El análisis en suelo se realizó previa extracción sólido-líquido asistida con ultrasonido. Durante el análisis cromatográfico no se detectaron interferencias provenientes de la matriz. Al aplicar el método a muestras ambientales se encontró evidencia de la presencia de glufosinato. No se detectó glifosato sin embargo se detectó el AMPA que es uno de los productos degradación del glifosato en concentraciones de hasta 108.26 mg/kg.

Introducción

En la actualidad, la población del mundo supera los 7000 millones de personas, debido a esto se ha incrementado la necesidad de producir mayor cantidad de alimentos en plazos más cortos, los productores se han visto en la necesidad de buscar opciones que aumenten el rendimiento de su producción y permitan evitar pérdidas. Actualmente para satisfacer la demanda de producción, los agricultores requieren implementar métodos de prevención y control contra plagas que pudiesen afectar su rendimiento, una de estas técnicas es el uso de plaguicidas (Salazar López & Aldana Madrid, 2011).

Un plaguicida es cualquier sustancia o mezcla de sustancias que se destina a controlar cualquier plaga, incluidos los vectores que transmiten las enfermedades humanas y de animales, las especies no deseadas que causen perjuicio o que interfieran con la producción agropecuaria y forestal, así como las sustancias defoliantes y las desecantes. (Ley General de Salud, 2003).

El uso y manejo incorrecto de los plaguicidas conlleva a riesgos que pueden manifestarse por intoxicaciones de grado diverso, o efectos a mediano o largo plazo, tales como carcinogénesis, teratogénesis, esterilidad, mutagénesis y otros (COFEPRIS, 2016).

La peligrosidad de los plaguicidas pueden atribuirse a su alta y fácil disponibilidad, la baja comprensión de los usuarios finales de la información sobre sus peligros, las políticas gubernamentales y el mercadeo intenso por parte de los productores, junto con la pobreza y el analfabetismo de los agricultores, así los plaguicidas se convierten en una seria amenaza para la seguridad alimentaria, de salud y del ambiente (COFEPRIS, 2016).

El glifosato [N- (fosfometil) glicina], es un herbicida de amplio espectro, sistémico de acción foliar, post-emergente, no selectivo, es utilizado para la destrucción de malezas de los cultivos de maíz, frijol, trigo, cítricos, tomate, vid, sorgo y papa, entre otros (COFEPRIS, 2016), en contacto con el suelo se

asocia fuertemente a las partículas, haciéndolo no biodisponible para la vegetación, tiene una vida media de 4,2 días en agua corriente y la degradación lenta está asociada con la presencia de microorganismos en fase acuosa (Vera et al., 2001). El glifosato tiene la capacidad de translocarse de la raíz hacia el suelo, su persistencia es de dos a seis veces mayor en los suelos en los que pudiesen existir restos de plantas a los que previamente se aplicó el herbicida (Doublet et al., 2009). La principal vía de degradación de glifosato es a ácido aminometilfosfónico (AMPA), que es más persistente en el suelo que el glifosato (vida media que oscila entre 23 y 958 días) (Islas et al., 2017).

En el marco regulatorio mexicano la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) considera al glifosato como un herbicida de la clasificación fosfometilglicina grado de toxicidad IV, es decir está clasificado como producto que normalmente no ofrece peligro (COFEPRIS, 2016). Sin embargo, existe evidencia de que el glifosato tiene un impacto negativo en los seres vivos, ambiente y organismos acuáticos. Está documentado que en ecosistemas acuáticos tiene afecciones que incluyen retardo en el crecimiento de organismos como algas y peces, inhibición de la eclosión en erizos (Jiraungkoorskul et al, 2002; Lajmanovich et al, 2011).

El glufosinato es un herbicida de amplio espectro, para el control de hojas anchas anuales y perennes, se aplica por vía foliar para el control de la vegetación (Stalikas y Konidar, 2001), actúa inhibiendo la enzima glutamina sintetasa que es la que cataliza la conversión del amoníaco y el ácido glutámico en glutamina provocando así una acumulación rápida de amoníaco en la planta y provocándole fitotoxicidad, es similar al glifosato (Stalikas y Konidar, 2001).

La técnica analítica más usual para el análisis es la cromatografía tanto de líquidos como de gases. Existen herbicidas que dada su alta polaridad es necesaria su derivatización, ya sea para favorecer su volatilización o para mejorar la capacidad de detección (Hiroyuki , Sunhi , Norihisa, & Masami , 1996; Stalikas & Konidari , 2001). La cromatografía de líquidos de alto

rendimiento (CLAR) es la técnica analítica de elección para los compuestos polares, existen varios métodos de CLAR utilizando derivatización pre o post columna con detección ultravioleta o de fluorescencia (Peruzzo, Porta, & Ronco, 2008; Lupi, y otros, 2015). El reactivo de derivatización más comúnmente utilizado para este propósito es el cloroformiato de 9-fluorenilmetilo (FMOC-Cl) (Sancho, y otros, 1996; Baez , Fuentes, Espina, & Espinoza, 2014).

Objetivos

OBJETIVO GENERAL

Desarrollar y validar un método analítico por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR) para la determinación simultánea de glifosato, ácido aminometilfosfónico (AMPA) y glufosinato en muestras ambientales de suelo.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Establecer un protocolo de derivatización y separación de los herbicidas para su análisis por CLAR.
2. Establecer una metodología la extracción de los analitos de muestras de suelo para su determinación por CLAR.
3. Obtener los parámetros de desempeño del método analítico.
4. Aplicar la metodología validada al análisis de muestras de suelo para la determinación de glifosato, AMPA y glufosinato.

I. Marco teórico

1. Generalidades de los plaguicidas

El crecimiento mundial de la población ha estimulado la intensificación de la producción agrícola y el uso de plaguicidas.

El uso de plaguicidas en México carece de estrategias adecuadas de monitoreo y esquemas regulatorios (Arellano & Rendon, 2017). Durante 2014 el uso de plaguicidas se estimó en 98,814 toneladas: de la cuales 32,406 toneladas corresponden a insecticidas, 26,392 toneladas a herbicidas y 40,016 toneladas a bactericidas, estas cifras han disminuido durante los últimos años, Figura 1 (FAOSTAT, 2017).

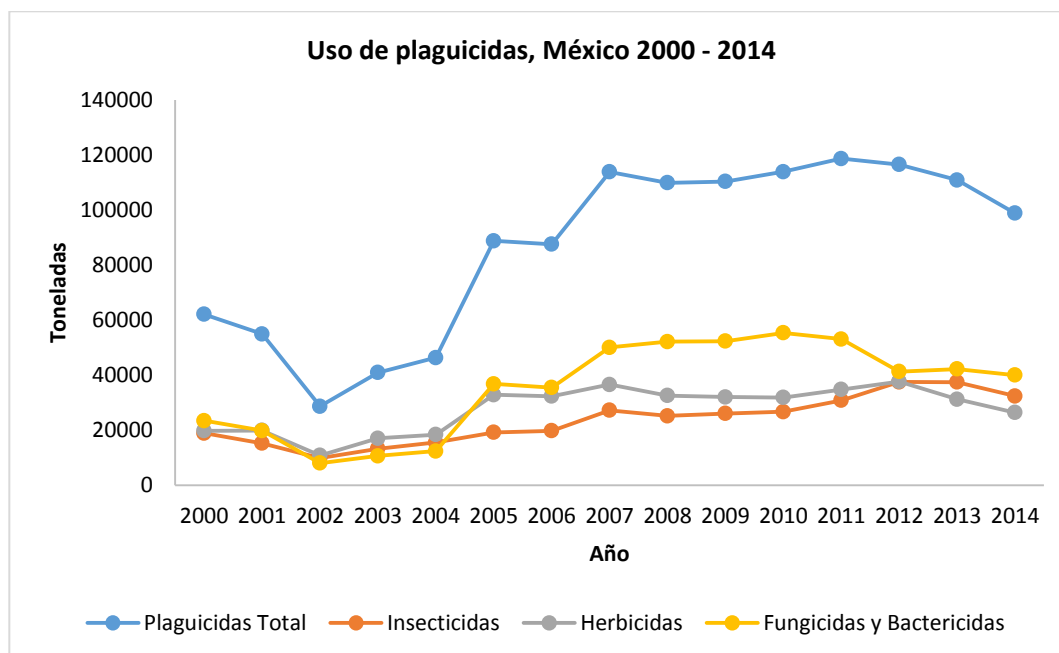


Figura 1. Uso de plaguicidas, México 2000 – 2014

Fuente: Elaboración propia a partir de la información encontrada en **FAOSTAT, 2017**

1.1 Clasificación de plaguicidas

Existen diversas maneras de clasificar a los plaguicidas, en México la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios, COFEPRIS,

en su catálogo de plaguicidas de 2016 presenta varias clasificaciones.

Tipo A. Concentración

- *Plaguicida técnico*, aquél en el cual el ingrediente activo se encuentra a su máxima concentración, obtenida como resultado de su síntesis y de sus compuestos relacionados, y es utilizado exclusivamente como materia prima en la formulación de plaguicidas.
- *Plaguicida formulado*, mezcla de uno o más plaguicidas técnicos, con uno o más ingredientes inertes o diluyentes, cuyo objeto es dar estabilidad al ingrediente activo o hacerlo útil y eficaz.

Tipo B. Organismos que controlan

- *Insecticida*, control de insectos
- *Acaricida*, control de ácaros
- *Fungicida*, control de hongos y levaduras
- *Bactericida*, control de bacterias
- *Herbicida*, control de hierba y maleza
- *Rodenticida*, control de roedores
- *Molusquicida*, control de moluscos

Tipo C. Modo de acción

- *De contacto*, actúa principalmente al ser absorbido por los tejidos externos de la plaga.
- *De ingestión*, debe ser ingerido por la plaga para su acción efectiva.
- *Sistémico*, al aplicarse en plantas o animales, se absorbe y traslada por su sistema vascular a puntos remotos del lugar en que se aplica y en los cuales actúa.
- *Fumigante*, se difunde en estado gaseoso o de vapor y penetra por todas las vías de absorción.

- *Repelente*, impide que las plagas ataquen.
- *Defoliante*, causa la caída del follaje de las plantas.

Tipo D. Composición química

- *Compuestos inorgánicos*, son compuestos que carecen de carbono. COFEPRIS en su catálogo sólo considera a los derivados de cobre, azufre, zinc y aluminio.
- *Compuestos orgánicos*, son aquellos que contienen átomos de carbono en su estructura química, la mayoría son de origen sintético, fabricados a partir de compuestos químicos básicos; algunos son extraídos de plantas, por lo que se conocen como botánicos. Los compuestos orgánicos sintéticos utilizados como plaguicidas pertenecen a distintos grupos o familias químicas. Cada uno de estos grupos tiene algunas características comunes y en cualquiera de ellos puede haber insecticidas, acaricidas, herbicidas, fungicidas u otros tipos de plaguicidas.
- *Plaguicidas biológicos*, se llama así a los virus, microorganismos o sus metabolitos, formulados como insumos, que pueden controlar a una plaga en particular.

Tipo E. Uso al que se destinan

- *Agrícolas*, usado en diversas extensiones, en sistemas de producción agrícola y en productos y subproductos de origen vegetal.
- *Forestales*, uso en bosques y maderas
- *Urbanos*, uso exclusivo en áreas urbanas, industriales, áreas no cultivadas, drenes, canales de riego, lagos, presas, lagunas y vías de comunicación.
- *Jardinería*, uso en jardines y plantas de ornato.
- *Pecuarios*, uso en animales o instalaciones de producción intensiva o extensiva cuyo producto será destinado al consumo humano o a usos industriales. Incluye el uso en animales domésticos.

- *Domésticos*, uso en el interior del hogar.
- *Biocidas*, se utiliza para el control de microorganismos en procesos o productos en la industria química.
- *Salud pública*, se utiliza para el control de vectores de enfermedades humanas

Tipo F. Por su origen

- Químicos
- Bioquímicos
- Microbianos
- Botánicos
- Misceláneos

La Organización Mundial de la Salud (WHO por sus siglas en inglés) tiene una clasificación toxicológica para los plaguicidas, según su grado de peligrosidad, con base en la dosis letal media (DL₅₀) de producto formulado, sólido o líquido en ratas expuestas por vía oral o cutánea, es decir la dosis que mata a la mitad en promedio de la población expuesta (WHO, 2009). La directriz de etiquetado de plaguicidas de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO por sus siglas en inglés) recomienda que las etiquetas de los productos incluyan frases de advertencia que indica el grado de peligrosidad, una banda de color diferente por cada uno y símbolos pictográficos para cada categoría (Food and Agriculture Organization , 2017).

La (OMS), clasifica a los plaguicidas principalmente con base en su toxicidad aguda en estudios con animales. En esté los plaguicidas se clasifican en clases (Tabla 1): extremadamente peligrosos (Ia), altamente peligrosos (Ib), moderadamente peligrosos (II), poco peligrosos (III), normalmente no ofrecen peligro bajo uso normal (IV, a veces no clasificados). En la Tabla 2 se presenta el color de la etiqueta que la OMS sugiere para los envases de los plaguicidas (OPS, 2016).

Tabla 1 Clasificación Toxicológica de los Plaguicidas en función de DL₅₀ en ratas

Clasificación Toxicológica de los Plaguicidas				
Clasificación de la OMS según los riesgos	Formulación Líquida DL ₅₀ Aguda		Formulación sólida DL ₅₀ Aguda	
	Oral	Dermal	Oral	Dermal
Clase Ia Productos Sumamente Peligrosos	>20	>40	>5	>10
Clase Ib Productos Muy Peligrosos	20 a 200	40 a 400	5 a 50	10 a 100
Clase II Productos Moderadamente Peligrosos	200 a 2000	400 a 4000	50 a 500	10 a 1000
Clase III Productos Poco Peligrosos	2000 a 3000	> a 4000	500 a 2000	> a 1000
Clase IV Productos que Normalmente No Ofrecen Peligro	> a 3000		> a 2000	

Fuente: (OPS, 2016)

Tabla 2 Color de etiqueta del plaguicida según la categoría toxicológica

Color de la Banda	Clasificación de la OMS según los riesgos	Clasificación del Peligro
Rojo (PMS 199 C)	Ia - Producto Sumamente Peligroso	MUY TÓXICO
Rojo (PMS 199 C)	Ib - Producto Muy Peligroso	TÓXICO
Amarillo (PMS Amarillo C)	II - Producto Moderadamente Peligroso	NOCIVO
Azul (PMS 293 C)	III Producto Poco Peligroso	CUIDADO
Verde (PMS 347 C)	IV -Producto que Normalmente no Ofrece Peligro	CUIDADO

Fuente: (OPS, 2016)

1.2 Degradación y biodegradación

Los datos de los estudios sobre hidrólisis, fotodegradación y biodegradación permiten determinar la velocidad a la cual los plaguicidas se degradan e identificar a los que pueden afectar adversamente al ambiente y otros

organismos que no son considerados plaga (organismos no blancos) (COFEPRIS, 2016).

- Hidrólisis. Es la descomposición de compuestos orgánicos por la interacción del agua, ya sea en el frío o en el calor, sola o en presencia de ácidos o álcalis.
- Fotodegradación. Es la ruptura química de moléculas causadas por energía radiante.

Las sustancias que son susceptibles a la biodegradación tienen menos probabilidad de persistir y acumularse. A menudo, los microorganismos tienen papeles importantes en la biodegradación (COFEPRIS, 2016).

1.3 Ventajas y desventajas de uso de plaguicidas

En la actualidad el control químico es una de las herramientas principales en la agricultura moderna, no obstante la importancia económica de estos productos, es necesario destacar que su aplicación indiscriminada puede ocasionar daños al ambiente; por ejemplo, el deterioro de la flora y la fauna silvestre, la contaminación de suelo, de mantos freáticos y aguas continentales y costeras, así como la generación de plagas resistentes (Klaassen, Watkins, Casaserri, & Dull, 1999).

En las últimas décadas ha tomado gran importancia los efectos nocivos de los plaguicidas sobre la salud. El grado de intoxicación depende de que tanto el individuo estuvo expuesto al compuesto, el trabajo agrícola, ingesta y uso de productos en los que fueron empleados los plaguicidas. También es importante una adecuada manipulación de estos productos, debido a su exposición se puede dar vía oral, dérmica, ocular y por inhalación. Los signos inmediatos a este tipo de exposiciones son mareos, fatiga física y mental, desorientación, irritación, convulsiones, náusea, vómito, cefalea, contracción de pupilas, palidez, parálisis muscular y taquicardia (COFEPRIS, 2016).

La presencia de residuos de plaguicidas en alimentos frescos y procesados, puede tener implicaciones graves en la comercialización de éstos, cuando derivado de un mal manejo o aplicaciones en cultivos donde no está permitido el uso, se detectan residuos por arriba de los límites máximos permitidos en los mercados nacional e internacional, dañando la imagen de los productos mexicanos y creando alarma entre los consumidores. Es por ello que dentro de las buenas prácticas agrícolas debe considerarse el uso y manejo adecuados de insumos utilizados en el control de plagas (MIP, 1999).

2. Glifosato

2.1 Breve historia

Un químico suizo que trabajaba para una compañía farmacéutica, el Dr. Henri Martin, sintetizó el glifosato [N- (fosfometil) glicina] en 1950 (Benbrook C. , 2016). Debido a que no se identificaron aplicaciones farmacéuticas, la molécula se vendió a otras empresas y el compuesto se probó para explorar sus posibles usos.

Un químico de Monsanto, el Dr. John Franz, identificó la actividad herbicida del glifosato en 1970, y fue cuando surgió un producto de uso final formulado llamado Roundup fue vendido comercialmente por Monsanto en 1974 (Duke & Powles, 2008).

Durante dos decenios, el número y la diversidad de usos agrícolas y no agrícolas creció constantemente, pero el volumen vendido fue limitado debido a que el glifosato sólo podía ser rociado donde se deseaba eliminar la vegetación (por ejemplo, entre hileras de huertos y viticultura; y vías de paso de tren, tuberías y líneas eléctricas). Algunas aplicaciones fueron, y todavía se hacen, después de que se recolecta una cosecha, para controlar las malas hierbas de la última estación que escaparon a otras medidas de control. En algunas regiones, las aplicaciones de desecantes se hacen a finales de la temporada de crecimiento para acelerar las operaciones de cosecha, especialmente en los cultivos de grano pequeño. En 1996, se aprobaron las

variedades denominadas "Roundup Ready" (RR), modificadas genéticamente (GE) tolerantes a herbicidas (HT), maíz y algodón para plantar en los Estados Unidos. Este avance tecnológico permitió utilizar el glifosato como herbicida de post-emergencia, extendiendo de este modo dramáticamente el período de tiempo durante el cual los herbicidas basados en glifosato podrían ser aplicados (Benbrook C. , 2016). Vegetales, como la alfalfa y betabel, diseñados para tolerar el glifosato fueron aprobadas y comercializadas comercialmente en 2005 y 2008 respectivamente, pero las demandas federales que citan violaciones judiciales a la Política Ambiental de Estados Unidos, retrasaron las ventas comerciales totales hasta 2011 para la alfalfa RR y 2012 para el betabel RR (Monsanto Company, 2017).

Los cultivos tolerantes a los herbicidas de próxima generación están en el mercado genéticamente modificados para soportar la aplicación de herbicidas adicionales (hasta más de una docena), incluyendo herbicidas que representan mayores daños ecológicos, daños a los cultivos y riesgos para la salud humana, por ejemplo, el 2,4-D y dicambato (Mortensen, 2012). Sin embargo, la creciente dependencia al uso del glifosato ha desencadenado la propagación de malezas tolerantes y resistentes en los EE.UU. y en todo el mundo. Para combatir las malas hierbas menos sensibles al glifosato, los agricultores suelen aumentar las tasas de aplicación de glifosato y rociar con más frecuencia (United States Department of Agriculture, 2017).

En la Figura 2 muestra los Hitos en la historia del descubrimiento de glifosato, comercialización y regulación, mientras que la Figura 3 muestra acontecimientos clave en la historia del uso y los impactos del glifosato. (Benbrook C. , 2016)

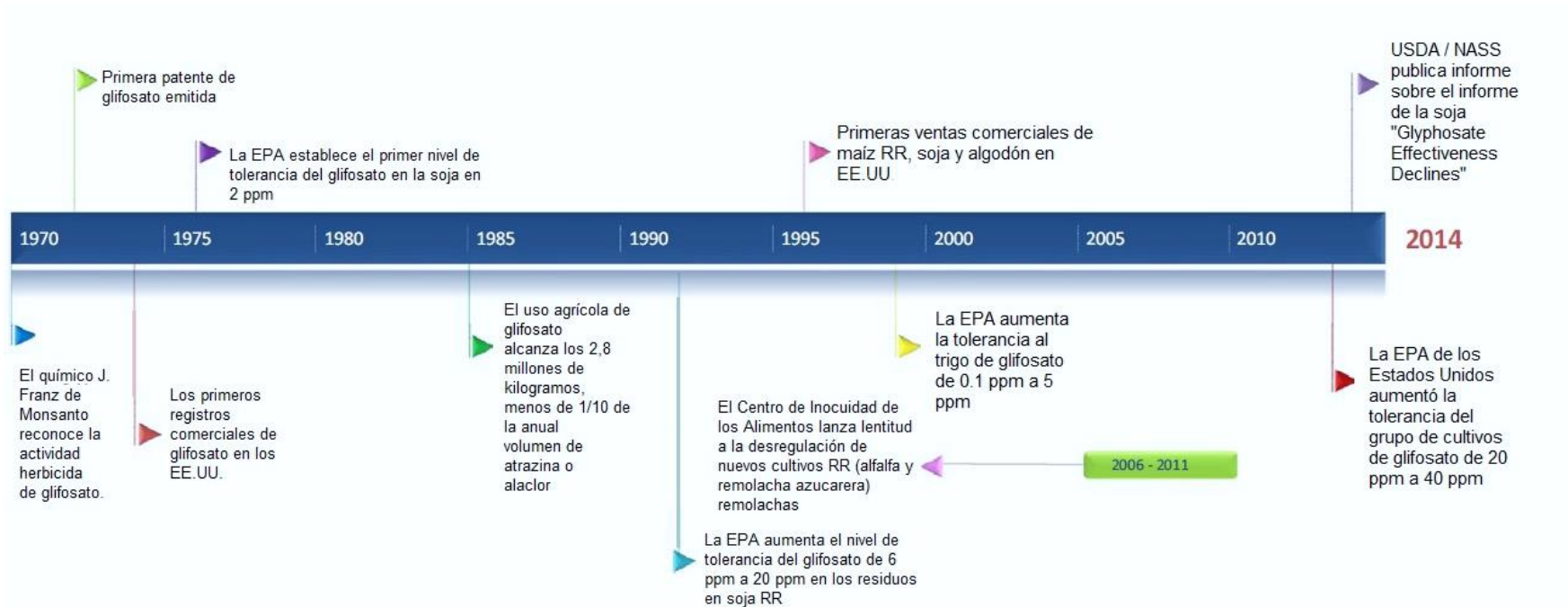


Figura 2 Hitos en la historia del descubrimiento, comercialización y regulación del glifosato

Fuente: Traducido y adaptado de (Benbrook C. , 2016)

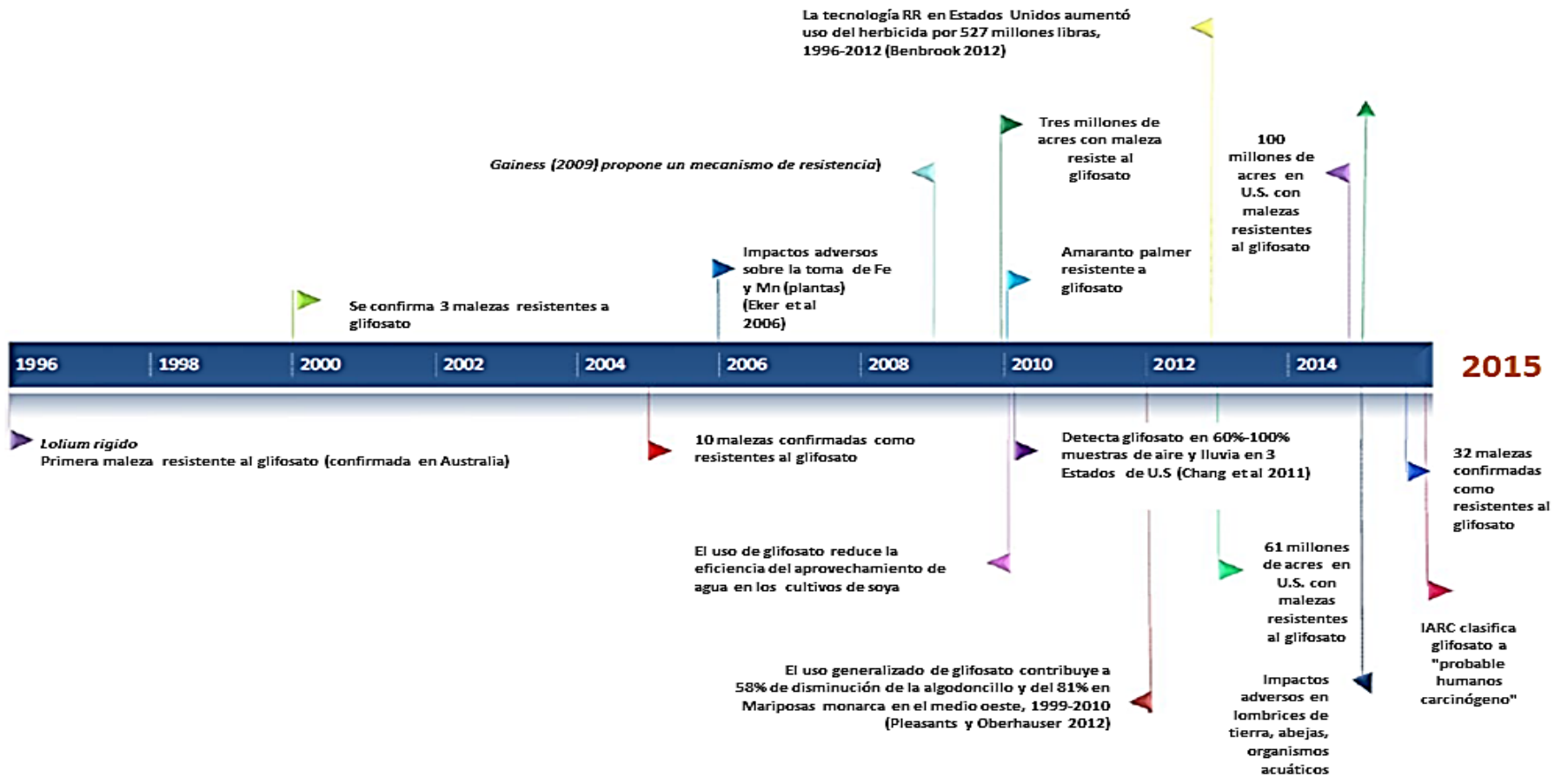


Figura 3 Acontecimientos clave en la historia del uso y los impactos del glifosato

Fuente: Traducido y adaptado de (Benbrook C. , 2016)

2.2 Comercialización del glifosato

En México el glifosato se comercializa en presentaciones de concentrado soluble, gránulo disoluble, líquido soluble, polvo soluble, disolución concentrada y disolución acuosa; las cuales se expenden en concentraciones de 350 a 720 gramos de ingrediente activo por litro o por kilogramo (COFEPRIS, 2016).

La formulación de glifosato más conocida es la sal isopropilamina con tres componentes básicos: el ingrediente activo, un agente tenso-activo y agua (Giesy, Dobson, & Solomon, 2000). Inició su comercialización en 1974; normalmente se distribuye como concentrados solubles en agua y polvos, debido a que estas sales son iónicas y altamente polares. Entre diferentes formulaciones las sales catiónicas son más tóxicas que las aniónicas (William, Kroes, & Munro, 2000).

A continuación se nombran países en los cuales se tiene registro del uso del glifosato: Alemania, Arabia Saudita, Argelia, Angola, Argentina, Australia, Austria, Bangladesh, Barbados, Bielorrusia, Bélgica, Belice, Benin, Bhutan, Bolivia, Bosnia-Herzegovina, Botswana, Brasil, Bulgaria, Burkina Faso, Burundi, Camerún, Canadá, Cabo Verde, Chad, Chile, China, Colombia, Islas Cook, Costa Rica, Croacia, Chipre, República Checa, República Democrática de Congo, Dinamarca, Djibouti, República Dominicana, Ecuador, Egipto, Emiratos Árabes Unidos, El Salvador, Eslovaquia, Eslovenia, España, Estados Unidos, Estonia, Etiopía, Fiji, Filipinas, Finlandia, Francia, Gabón, Gambia, Ghana, Grecia, Guatemala, Guinea, Holanda, Honduras, Islandia, Irán, Irlanda, Islas Salomón, Israel, Italia, Costa de Oro, Jamaica, Japón, Jordania, Kazajistán, Kenia, Kuwait, Latvia, Líbano, Lesoto, Libia, Lituania, Luxemburgo, Madagascar, Malawi, Malasia, Mali, Malta, Mauritania, Mauritius, México, Moldavia, Marruecos, Namibia, Nepal, Nueva Caledonia, Nueva Zelanda, Nicaragua, Níger, Nigeria, Noruega, Oman, Pakistán, Panamá, Paraguay, Perú, Polonia, Polinesia Francesa, Portugal, Puerto Rico, Qatar, República de Corea, Reino Unido, Rumanía, Rusia, Ruanda, Sahara

Occidental, Samoa, Senegal, Serbia, Sierra Leone, Somalia, Sudáfrica, Sri Lanka, Sudan, Suecia, Suiza, Siria, Taiwan, Tanzania, Tailandia, Togo, Tonga, Trinidad y Tobago, Túnez, Turquía, Turkmenistan, Uganda, Ucrania, United Kingdom, Uruguay, Uzbekistan, Vanuatu, Venezuela, Vietnam, Yemen, Zambia, Zimbabwe **(Monsanto Global, 2017)**.

El glifosato ha sido prohibido en Francia, Holanda, Sri Lanka, Dinamarca y Bélgica, mientras que otros países habían optado por restringir su uso, por ejemplo: Colombia, Reino Unido (UK), Alemania, Suiza, Canadá y algunos estados de Estados Unidos (EE.UU.) (Pastrana Cervantes, 2017; Arellano-Aguilar & Rendón von Osten, 2016).

Algunas de las razones de su restricción y/o prohibición son que fue catalogado como probable carcinógeno para las personas por la Agencia de Investigación sobre el Cáncer de la Organización Mundial de la Salud. Además, tan solo en EE. UU ha generado la resistencia por parte de 14 hierbas como el amaranto generando “super plagas”. Los cultivos en los que se emplea son sobre todos los cultivos transgénicos que son resistentes a este herbicida, como el maíz, soya, algodón. Sin embargo, también se aplica en cultivos convencionales de estas mismas semillas, así como cultivos de sorgo, aguacate, limón, naranjo entre muchos más debido a que es el herbicida más usado en México y en el mundo (Arellano-Aguilar & Rendón von Osten, 2016).

2.3 Usos del glifosato en México

En México el glifosato es utilizado para el control de malezas en los cultivos de aguacatero, arroz, cafeto, limonero, mango, naranjo, nogal, papayo, plátano, toronjo, vid etc... En la Tabla 3 se muestran los Límites máximos de residuos permitidos en mg/kg (LMR o LMRE) los alimentos no deben contener una cantidad mayor de residuos de plaguicidas a los LMR O LMRE, también se muestran todos los cultivos a los que se les aplica glifosato en México

(COFEPRIS, 2016). En la Tabla 4 de presenta los productos comerciales de glifosato empleados en México.

Tabla 3 Límites máximos de residuos permitidos de glifosato en México

LMR (mg/kg)	Cultivo
0.1	arroz, berenjena, cacahuete, centeno, chile, jitomate, mostaza
0.2	acelga, aguacatero, ajo, alcachofa, apio, betabel, brócoli, cacao, cebolla, chabacano, chícharo, ciruelo, coliflor, durazno, espinaca, frambuesa, frijol, guayabo, lechuga, mango, manzano, papa, papaya, pastos, peral, plátano, rábano, vid, zanahoria, zarzamora
0.5	calabacita, calaza, chayote, cítricos, esparrago, lima, limonero, mandarina, melón, naranjo, nectarino, pepino, sandía, tangerino, toronjo
1	café, maíz, nogal
2	caña de azúcar
5	trigo
15	sorgo
20	avena, cebada, soya
35	algodonero
175	alfalfa
200	pastizales
300	potreros
Exento	agave
Exento	áreas no cultivadas

Fuente: Anexo 3 del Catálogo de plaguicidas (COFEPRIS, 2016)

Tabla 4 Herbicidas comerciales más empleados de glifosato en México

Categoría toxicológica	Empresa	Nombre Comercial	Uso
IV	Monsanto Comercial, S.A. de C.V.	Faena, Round Up, Assadon, Batalla, Fiero, Potro, PoundUltra, Bronco, Mon77150, Mon 79496, Rounddup SI, Roundup 35.6 SL, Mon 8709, Mon 35085, Supriim, Dragochlor	control de maleza en los cultivos de: agave, acelga, aguacatero, ajo, alcachofa, alfalfa, apio, arroz, avena, berenjena, betabel, brócoli, cacahuete, cafeto, calabaza, caña de azúcar, cebada, cebolla, centeno, chabacano, chícharo, chile, ciruelo, cítricos, coliflor, durazno, espinaca, frijol, jitomate, lechuga, maíz mango manzano, melón, mostaza, nogal, papa, pastos, papayo, plátano.
IV	Pyrosa S.A. de C.V.	Lider	control de maleza en los cultivos de: aguacatero, arroz, cafeto, limonero, mango, naranjo, nogal, papayo, plátano, toronjo, vid
IV	Zimmer Constructores S.A. de C.V.	Zimmer Glifosato, Machete, Zimmone 360, Tremendo 360, Sistem 360	aplicación dirigida a la maleza en cultivos de: naranjo, lima, toronjo, mandarino, limonero, tangerino, aguacatero, vid, cafeto, plátano, ciruelo, durazno, mango, guayabo, manzano, peral y nogal
IV	Fertilizantes e Insecticidas Misión, S.A. de C.V.	Chap 48 LS, Herbifox 48 LS, Rayo 48 LS	control de malezas en los cultivos de: avena, lima, limonero, mandarino, naranjo, toronjo
IV	Cuproza, S.A. de C.V.	New Cap	control de maleza en los cultivos de: aguacatero, ajo, cafeto, cebolla, cítricos, plátano

Fuente: Anexo 2 del Catálogo de plaguicidas 2016 de COFEPRIS (COFEPRIS, 2016)

2.4 Química del glifosato

El glifosato (N- (fosfometil) glicina) es el componente activo del herbicida más utilizado en todo el mundo (Benbrook C. , 2016), es un herbicida de amplio espectro (Lupi, y otros, 2015; Peruzzo, Porta, & Ronco, 2008), es:

- **No selectivo.** Eliminan todo tipo de vegetal con el que entren en contacto. Normalmente utilizados para terrenos sin cultivos, zonas industriales, carreteras, entre otros. Si se aplican en terrenos con cultivos deben aplicarse de modo tal que no afecten al cultivo (Monsanto, 2016).
- **Sistémico de acción foliar.** Ingresa a la planta a través de las hojas para después migrar a otras partes del tejido vegetal donde será mínimamente metabolizado (Salazar López & Aldana Madrid, 2011).
- **Post-Emergente.** Se realiza después de que el cultivo emerge de manera indiscriminada (Schuette, 2017).

En la Figura 4 se presenta la estructura química del glifosato y en Tabla 5 se muestran sus las propiedades físicas y químicas generales.

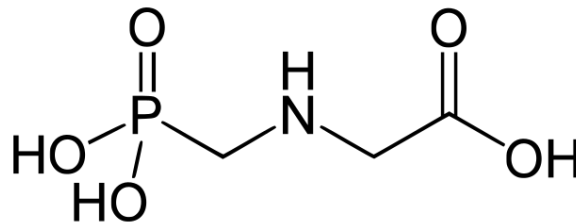


Figura 4 Fórmula estructural del glifosato

El glifosato es un compuesto muy polar de naturaleza anfótera sus valores de pK_a son 0.78, 2.29, 5.96 y 10.98 (Ossendrijver, Dijkman, & Baumann, 1999). En la Figura 5 se muestra los equilibrios ácido-base.

Tabla 5 Propiedades fisicoquímicas de glifosato

Característica	Descripción o valor
Nombres químicos	Glifosato; N- (fosfonometil) glicina; Glifosfato; Pondmaster; Roundup, Glycel TM , sal de isopropilamina de glifosato, mono-isopropilamonio-sul, Nitosorg TM , Rattler TM
Clasificación	Fosfonometilglicina
Tipo de plaguicida	Herbicida
Nombre de IUPAC	Ácido 2-(fosfonometilamino) acético
Fórmula Molecular	C ₃ H ₈ NO ₅ P
Peso Molecular	228.18 g/mol
Forma	Cristales incoloros
Punto de fusión	200 °C
Densidad	1.7 g/cm ³
Log K _{ow}	-3.2 a 25 °C
Solubilidad	12000 mg/L (a 25 °C)
Características físicas	Incoloro, inodoro, sólido cristalino
Estabilidad	Se mantiene estable hasta 60 °C
Vida media en los campos del suelo	DT ₅₀ 3-174 días
Vida media en agua	DT ₅₀ 5-91 días
pKa	0.78, 2.09, 5.96, 10.98

Fuentes: (Mensink H, 1994; Hogendoorn E.A, 1999; WHO, 1994; FOA, 2000 (PubChem, Liberty, 2017)

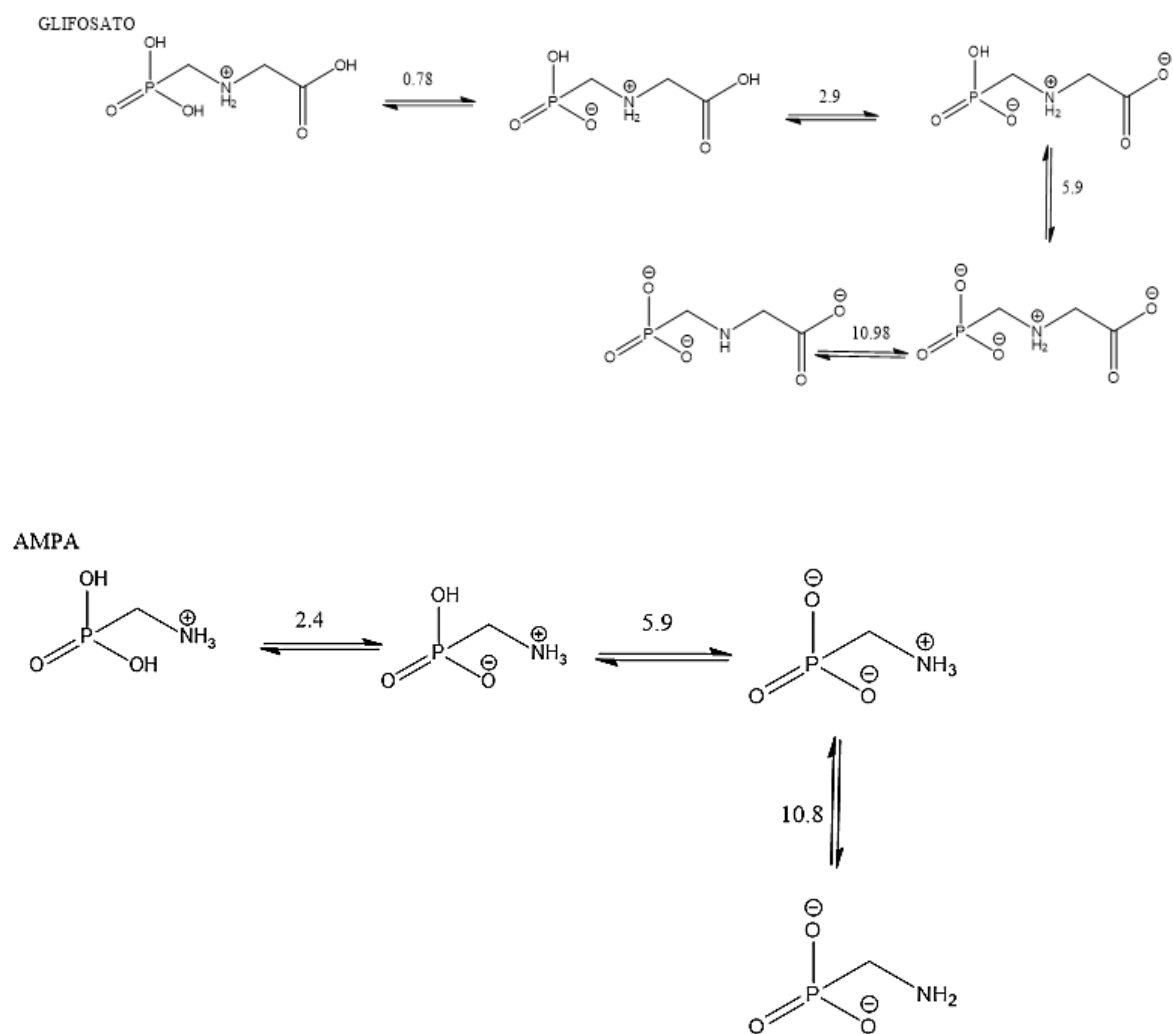


Figura 5 Estructuras y procesos de ionización de glifosato y AMPA

Tomada de: (You & Koropchak, 2003)

2.4.1 Degradación del glifosato

La principal vía de biodegradación del glifosato se encuentra mediante la ruptura del enlace C-N para producir glioxilato y AMPA por la enzima glifosato oxido-reductasa. El glioxilato se metaboliza adicionalmente a través del ciclo glioxilado. El AMPA se rompe para producir fosfato inorgánico y metilamina, que en última instancia se mineraliza en CO_2 y NH_3 . La enzima C-P liasa es

responsable de la escisión de AMPA y ha sido ampliamente estudiada, debido a que la escisión del enlace C-P es el paso crítico en la degradación del glifosato y otros fosfonatos, Figura 6. Una segunda ruta que también puede ocurrir es ruptura a través del enlace C-P que da lugar a la formación de fosfato y glicina (Schuette, 2017). Ambos procesos de degradación se realizan bajo condiciones aerobias y anaerobias (Borggaard & Gimsing, 2008; Jayasumana, Gunatilake, & Senanayake, 2014)

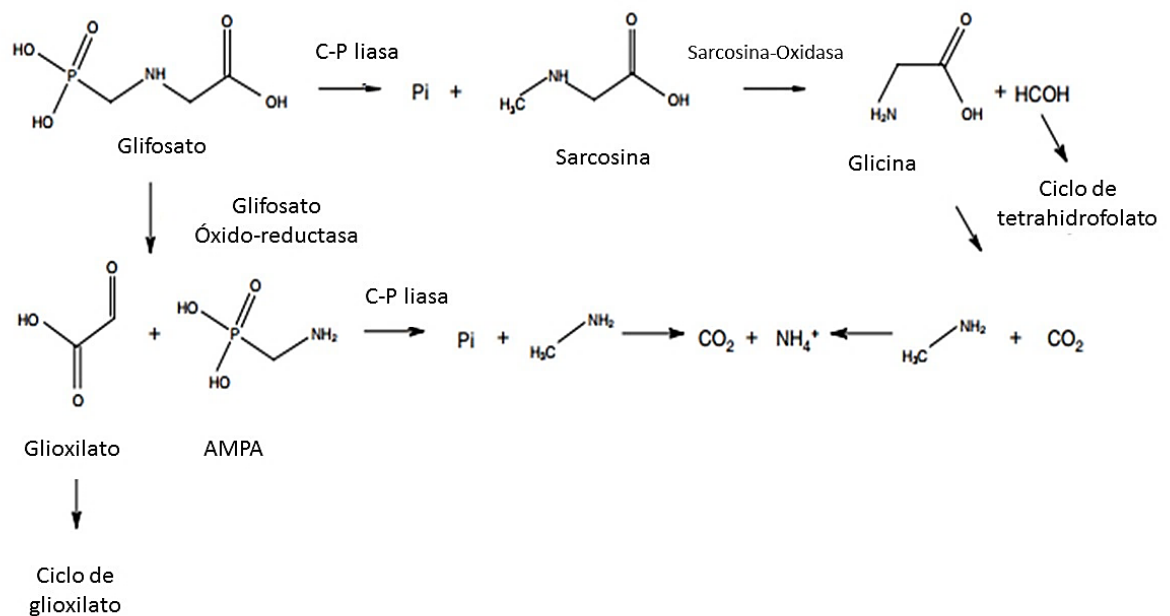


Figura 6 Vías de degradación de glifosato

Traducido de (Schuette, 2017)

El AMPA es el principal producto de degradación del glifosato (Ibáñez , Pozo , Sancho , López , & Hernández, 2005). El glifosato se adsorbe rápidamente en el suelo, haciéndolo esencialmente inmóvil, esta unión al suelo es reversible y en la desorción el glifosato es degradado por varias bacterias al ácido aminometilfosfónico (AMPA) o sarcosina, y finalmente al fosfato inorgánico, amoníaco y dióxido de carbono (Baylis, 2000). Debido a que el AMPA es el metabolito principal de degradación del glifosato no aparece en el catálogo

de COFEPRIS. En la Tabla 6 aparecen algunas de sus propiedades fisicoquímicas.

Tabla 6 Propiedades fisicoquímicas de AMPA

Característica	Descripción o valor
Nombres químicos	Ácido (aminometil) fosfónico, Ácido Aminometilfosfónico; Aminometanofosfónico, AMeP
Fórmula molecular	CH ₆ NO ₃ P
Peso molecular	111.037 g / mol
Nombre de la IUPAC	Ácido aminometilfosfónico
Forma	Cristales incoloros
Log K _{ow}	-2.36
pKa	2.4, 5.9, 10.8
Tipo de plaguicida	Metabolito
Tipo de metabolito	Suelo
Origen de la sustancia	Sintético

Fuente: (IUPAC, 2017)

2.4.2 Modo de acción del glifosato

El mecanismo de acción del glifosato es por medio de la inhibición de la biosíntesis de aminoácidos aromáticos en las plantas: triptófano, fenilalanina y tirosina (Salazar López & Aldana Madrid, 2011). Una vez dentro de la planta, el glifosato inhibe la actividad de una enzima, que impide la fabricación de ciertos aminoácidos esenciales para el crecimiento y vida de esa planta. A pocos días de la aplicación, la planta se marchita y se vuelve amarilla. Luego, a medida que su tejido se deteriora, ésta se vuelve marrón. Al mismo tiempo, las raíces subterráneas de la planta comienzan a descomponerse, finalmente, toda la planta muere, siendo incapaz de rebrotar y recuperarse (Monsanto, 2016).

El glifosato se transloca principalmente a los sumideros metabólicos, matando a los tejidos meristemáticos¹, lejos del sitio de aplicación. Sus propiedades floema-móviles y la acción lenta en matar malezas permite que el herbicida se

¹ Los meristemas pueden ser considerados tejidos embrionarios que permanecen en la planta durante toda la vida y que son los responsables del crecimiento permanente de la planta (Tejidos meristemáticos, 2017)

mueva por toda la planta para matar todos los meristemas, haciéndolo eficaz para el control de malezas perennes (Duke S. , 2017). En una primera etapa el ácido shikímico origina ácido corísmico. Este puede seguir dos caminos: por un lado formar el ácido antranílico y, seguidamente, triptófano y ácido indolacético; por otro lado puede, producir el ácido prefénico, que conduce a los aminoácidos naturales, tirosina y fenilalanina. Así, la síntesis del ácido corísmico se convierte en la etapa crítica para la obtención de los aminoácidos aromáticos, el glifosato actúa inhibiendo la formación de este ácido, lo que se traduce en una acumulación del ácido shikímico y una reducción de los niveles de corísmico, tirosina, fenilalanina y ácido indolacético (Islas, 2013), Figura 7.

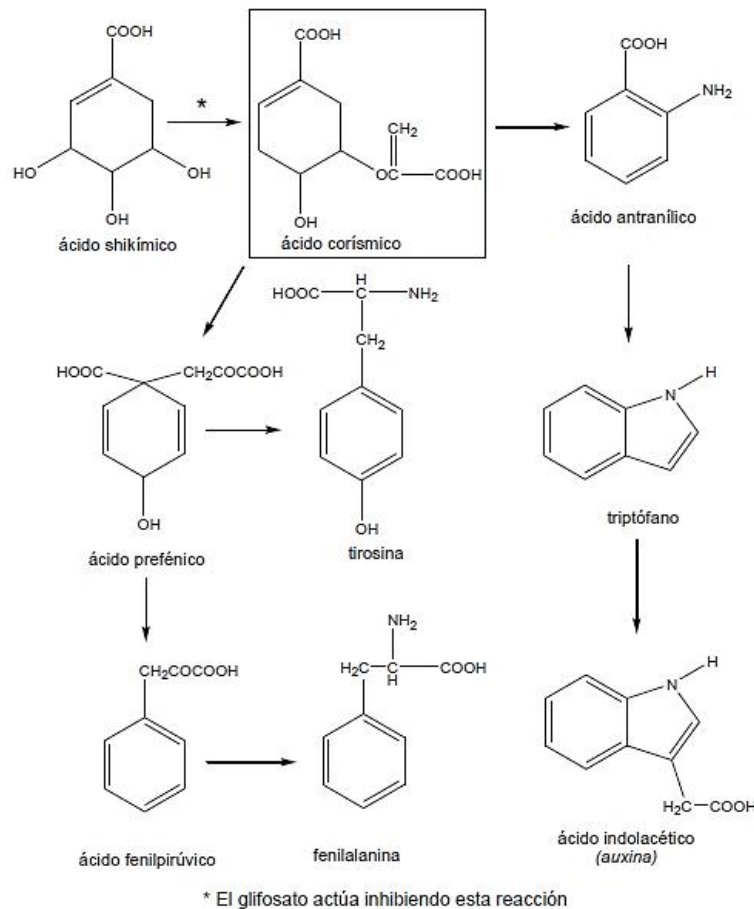


Figura 7 Biosíntesis de aminoácidos aromáticos

Tomada de (Islas, 2013)

2.4.3 Toxicidad y efectos adversos al ambiente

Los productos que contienen glifosato son extremadamente tóxicos para los animales, incluidos los humanos. Los síntomas incluyen irritación ocular y cutánea, depresión cardíaca, dolor gastrointestinal, vómitos y acumulación de exceso de líquido en los pulmones. El glifosato es un ácido orgánico débil. Su nombre químico es N- (fosfometil) glicina. Por lo general, se formula como la sal isopropilamina o trimetilsulfonio del glifosato. También se agregan otros ingredientes conocidos como inertes o aditivos a la formulación. Un tensioactivo (agente humectante) conocido como polioxietileno amina (o POEA), que ayuda al ingrediente activo a penetrar en la superficie de la planta, normalmente se agrega a las formulaciones de glifosato. Otros aditivos incluyen los ácidos sulfúrico y fosfórico. El tensioactivo polietoxilado utilizado en la formulación del producto conocido como Roundup es más agudamente tóxico que el propio glifosato; la combinación de los dos es aún más tóxica (Buffin & Jewell , 2017).

En estudios con animales, la ingestión de alimentos rociados con glifosato durante tres meses causó la reducción en el aumento de peso, diarrea y lesiones en las glándulas salivales. Los productos que contienen glifosato han causado daños genéticos en células sanguíneas humanas, moscas de la fruta (Buffin & Jewell , 2017).

La Agencia de Protección Ambiental (EPA) ubica al glifosato en categoría III de toxicidad (Cox, Glyphosate, Part 1: Toxicology., 1995) por ser irritante en los ojos. Sin embargo, la Organización Mundial de la Salud (OMS) lo clasificó de categoría IV de toxicidad aguda para exposición oral, dérmica e inhalación. Algunas formulaciones comerciales que contienen este agrotóxico se encuentran en la categoría I y II de toxicidad, debido a que la mezcla con otras sustancias causa la irritación primaria de los ojos o la irritación de la piel (COFEPRIS, 2016).

La introducción de cultivos genéticamente modificados tolerantes al glifosato dará lugar a un aumento significativo en el uso de este herbicida. Monsanto, la compañía que produce estos cultivos, afirma que su introducción será beneficiosa debido a la baja toxicidad y la seguridad ambiental del herbicida. Monsanto, debe notarse, también fabrica glifosato, lo comercializa como 'Round Up', y por lo tanto es capaz de vender semillas y herbicidas como un paquete comercial. La investigación independiente indica que el glifosato puede no ser tan seguro como se pensaba y puede suponer una amenaza para la salud humana y el medio ambiente. Es esencial que se respondan las preguntas relacionadas con la seguridad de este producto antes de que su uso se amplíe con la introducción de cultivos modificados genéticamente. La Tabla 7 proporciona una comparación de las afirmaciones de Monsanto y los hallazgos de investigaciones independientes (Buffin & Jewell , 2017).

Tabla 7. Comparativo de las afirmaciones de Monsanto y los hallazgos de investigaciones independientes

Afirmaciones de Monsanto acerca de su producto Roundup	Hallazgos de investigación independientes
Es casi imposible que la resistencia al glifosato evolucione en las malas hierbas	En 1996, se descubrió en Australia ryegrass "resistente al glifosato".
El cruzamiento de los cultivos transgénicos y la transferencia de nuevos genes ocurren a corta distancia y puede manejarse fácilmente	En los cultivos que se han examinado, las densidades del polen son mucho más altas y sus patrones de dispersión difieren de los encontrados en las parcelas experimentales. La dispersión del viento del polen ocurre a distancias mucho mayores y a concentraciones más altas de lo que predice la parcela experimental. El flujo de genes de los cultivos de semillas transgénicas es inevitable.
Los cultivos Roundup Ready reducirán los niveles de uso de herbicidas	Los cultivos tolerantes a los herbicidas se intensificarán y aumentarán la dependencia del uso de herbicidas en la agricultura en lugar de generar reducciones significativas. Se deberá reintroducir una variedad de herbicidas para controlar a las especies tolerantes a glifosato, poblaciones salvajes de cultivos y malezas resistentes.
...tiene un bajo potencial de irritación para los ojos y la piel y, de lo contrario, no representa un riesgo para la salud humana	Roundup se encuentra entre los pesticidas más reportados que causan incidentes de intoxicación en varios países. Provoca síntomas agudos que incluyen eccema recurrente, problemas respiratorios, presión arterial elevada y reacciones alérgicas.
... no causa ningún efecto reproductivo adverso	En conejos las pruebas de laboratorio, el glifosato causó efectos dañinos en la calidad del semen y el recuento de espermatozoides.

Tomado y traducido de (Buffin & Jewell , 2017)

Tabla 7 Comparativo de las afirmaciones de Monsanto y los hallazgos de investigaciones independientes (continuación)

Afirmaciones de Monsanto acerca de su producto Roundup	Hallazgos de investigación independientes
...no es mutagénico en mamíferos	En experimentos de laboratorio se ha observado daño en el ADN en órganos y tejidos de ratones.
... es ecológicamente seguro	<p>En la silvicultura y la agricultura, el glifosato es tóxico para los organismos benéficos del suelo y para los depredadores de artrópodos benéficos, y aumenta la susceptibilidad a las enfermedades de los cultivos, tiene efectos indirectos dañinos en las aves y pequeños mamíferos al dañar sus suministros de alimentos y su hábitat.</p> <p>"Roundup" contiene POEA que es letal para los renacuajos de tres especies de árboles y ranas molidas en Australia. El gobierno australiano ha prohibido el uso de estos productos cerca del agua.</p> <p>Las dosis subletales del rociado del glifosato dañan las comunidades de flores silvestres y pueden afectar a algunas especies a una distancia de hasta 20 metros del pulverizador.</p> <p>El uso de glifosato en las áreas cultivables causa muerte regresiva en los árboles de seto.</p> <p>El glifosato promueve el crecimiento de la población de un caracol acuático que es el huésped intermedio de la platija del hígado en los mamíferos.</p> <p>La degradación del glifosato por microorganismos en el agua puede estimular los efectos de eutrofización.</p>
... se inactiva rápidamente en el suelo y el agua	<p>El glifosato es muy persistente en suelos y sedimentos.</p> <p>El glifosato inhibió la formación de nódulos fijadores de nitrógeno en el trébol durante 120 días después del tratamiento.</p> <p>Los residuos de glifosato se encontraron en la lechuga, la zanahoria y la cebada cuando se plantaron un año después de la aplicación del glifosato.</p> <p>Los fertilizantes de fosfato pueden inhibir la degradación del suelo.</p>
... es inmóvil y no se filtra de los suelos	<p>El glifosato puede desorberse fácilmente de las partículas del suelo en una variedad de tipos de suelo. Puede ser extensivamente móvil y lixiviar para reducir las capas del suelo.</p> <p>El glifosato puede transportarse por partículas de suelo suspendidas en escorrentía.</p>
... no contamina el agua potable cuando las autoridades locales lo utilizan en superficies duras	En el Reino Unido, Welsh Water Company ha detectado niveles de glifosato en agua por encima del límite de la EE.UU. han sido detectados por cada año desde 1993.

Tomado y traducido de (Buffin & Jewell , 2017)

El uso masivo de los productos con el compuesto de origen, el glifosato y polifosfonatos, conduce a la ubicuidad de AMPA en el medio ambiente, y particularmente en agua. En suelos agrícolas, el AMPA se concentra en la capa superficial del suelo y se degrada lentamente en la mayoría de los suelos. Puede llegar a las aguas subterráneas poco profundas, pero raramente consigue entrar las profundas. El AMPA se adsorbe fuertemente a

las partículas del suelo y se mueve con las partículas hacia la corriente en la escorrentía de la lluvia. En las zonas urbanas, la AMPA proviene de los fosfonatos y del glifosato en las aguas residuales. Se encuentra comúnmente en los puntos de venta de plantas de tratamiento de aguas residuales. Los sedimentos tienden a acumular AMPA, donde pueden estar biodegradados. El AMPA aerotransportado no es despreciable, pero sí el lavado con fuertes lluvias. Se ha informado que la AMPA es persistente y puede degradarse biológicamente en suelos y sedimentos. Existe una fotodegradación limitada en las aguas. Las principales fuentes de generación de AMPA son los lixiviados agrícolas, y efluentes de aguas residuales urbanas. La contribución interna a las cargas urbanas es insignificante. Existe una falta crítica de datos epidemiológicos especialmente sobre la exposición al agua para comprender los efectos toxicológicos, si los hay, de la AMPA en seres humanos. Afortunadamente, las plantas de tratamiento de agua bien operadas eliminan una proporción significativa del AMPA del agua, aunque no hay límites regulatorios suficientes para los metabolitos (Grandcoin, Piel, & Baures, 2017).

2.5 Glufosinato

2.5.1 Breve historia

El glufosinato [ácido 2-amino-4- (hidroxi-metilfosfinil) butanoico], es un herbicida de contacto, de amplio espectro utilizado para controlar una extensa gama de malas hierbas después de la salida del cultivo o para el control total de la vegetación en tierras no utilizadas para el cultivo. El herbicida se introdujo por primera vez en Japón y el Reino Unido en 1984. El registro en los Estados Unidos fue en 1993. El glufosinato está registrado para su uso en más de 40 países. AgrEvo introdujo una formulación de glufosinato para su uso en cultivos resistentes al glufosinato a finales de los años noventa. AgrEvo es una empresa alemana (propiedad de las empresas químicas Hoechst y Schering). En 1984 la empresa AgrEvo introdujo a Liberty, este producto era una nueva formulación del herbicida no selectivo glufosinato, que

AgrEvo y Hoechst habían estado vendiendo bajo diversas marcas desde 1984 (por ejemplo, Basta, Ignite, Finale and Challenge). Los viejos productos de glufosinato se usaron particularmente en cultivos de frutas y hortalizas, pero Liberty puede ser utilizado en cultivos transgénicos de campo, por lo tanto, ampliando enormemente su mercado potencial (Bijman, 2017).

2.5.2 Comercialización del glufosinato

El glufosinato de amonio está registrado actualmente en 82 países para su uso en más de 100 cultivos: Albania, Argelia, Argentina, Australia, Austria, Bélgica, Bosnia-Herzegovina, Brasil, Bulgaria, Camerún, Canadá, Islas Canarias, Chile, Colombia, Costa Rica, Croacia, Cuba, República Checa, República Dominicana, Ecuador, El Salvador, Estonia, Francia, Georgia, Alemania, Gran Bretaña, Grecia, Guadalupe, Guatemala, Honduras, Hungría, Indonesia, Irlanda, Israel, Italia, Costa de Marfil, Jamaica, Japón, Kenia, Kosovo, Letonia, Liberia, Luxemburgo, Malasia, Mauricio, México, Moldavia, Marruecos, Holanda, Nueva Zelanda, Nicaragua, Panamá, Perú, Filipinas, Polonia, Portugal, China, Puerto Rico, , Rumanía, , Rusa, Serbia, Eslovaquia, Eslovenia, Sudáfrica, Corea del Sur, España, Sri Lanka, Suiza, Taiwán, Tanzania, Tailandia, Trinidad y Tobago, Túnez, Ucrania, Uruguay, Estados Unidos (EE. UU.), Venezuela, Zimbabue, en la Figura 8 se muestra estos países (Bayer CropScience, 2017).

En Europa y Asia, el glufosinato de amonio se utiliza para tratar las malas hierbas en cultivos convencionales, aunque en países como los EE. UU. y Australia, en los que los cultivos, como soya, maíz y algodón, que se han modificado genéticamente para que sean resistentes al efecto del herbicida (Bayer CropScience, 2017).

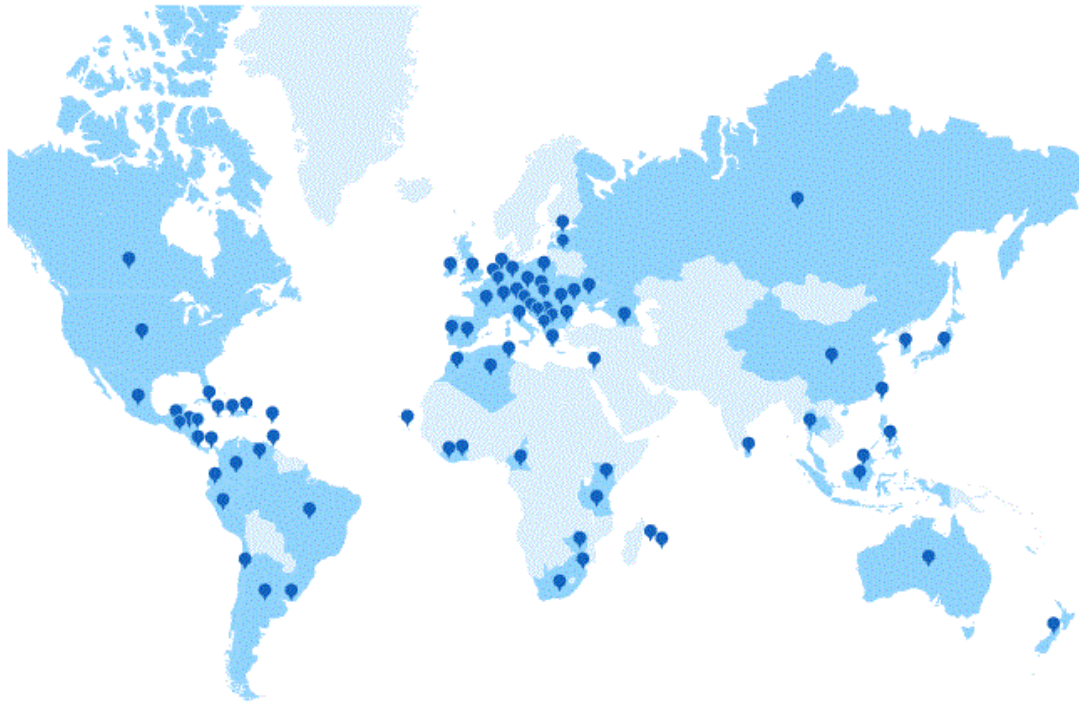


Figura 8 Países donde actualmente está registrado el glufosinato de amonio
Tomado de (Bayer CropScience, 2017)

2.5.3 Usos del glufosinato en México

Se utiliza para controlar una amplia gama de malezas después de que el cultivo emerja o para el control total de la vegetación. Los herbicidas de glufosinato también se usan frecuentemente para desecar los cultivos antes de la cosecha (Jewell & Buffin, 2017). Se espera que el uso de glufosinato aumente sustancialmente en los próximos años debido al cultivo de vegetales, como maíz y soya, que han sido manipulados genéticamente para tolerarlo (Cox, Herbicide fact sheet—glufosinate, 1996).

En la Tabla 8 se muestran los LMR o LMRE mg/kg teniéndose claro que los alimentos no deben contener una cantidad mayor de residuos de plaguicidas a los límites máximos de residuos, también me muestran todos los cultivos en los que se utiliza el glufosinato en México (COFEPRIS, 2016).

Tabla 8 LMR de glufosinato de amonio en México

LMR	Cultivo
0.05	manzano, vid
0.1	lima, lima persa, nogal, tangerino, toronjo
0.15	limonero, mandarina, naranjo
0.2	maíz
0.3	plátano
0.8	papa
1	arroz
2	soya
4	algodonero
Exento	agave

Fuente: Anexo 3 del Catálogo de plaguicidas (COFEPRIS, 2016)

En la Tabla 9 se muestran algunos de los nombres comerciales de este herbicida, categoría toxicológica, algunas de las empresas que lo venden y su uso.

Tabla 9 Herbicidas comerciales más empleados de glufosinato en México

Categoría toxicológica	Empresa	Nombre Comercial	Uso
III	Bayer de México, S.A. de C.V.	Finale SL14, Finale	control de maleza en los cultivos de: agave, algodonero, lima, lima persa, limonero, maíz, mandarina, manzano, naranjo, nogal, plátano, soya, tangerino, toronjo, vid, sorgo, caña de azúcar, y aplicación al follaje como desecante en papa
IV	Agrevo Mexicana, S.A. de C.V.	Finale Pro	herbicida de uso urbano para el control de malezas en áreas no cultivadas, jardines, áreas verdes y campos de golf

Fuente: Anexo 2 del Catálogo de plaguicidas 2016 de COFEPRIS (COFEPRIS, 2016)

2.5.4 Química del glufosinato

En la Figura 9 se presenta la estructura química del glufosinato y en la Tabla 10 se muestran las propiedades del glufosinato de amonio.

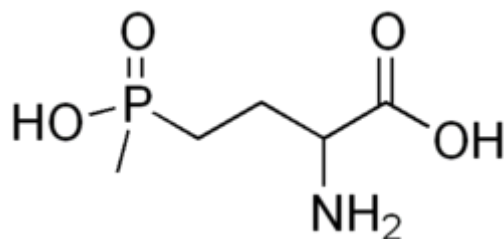


Figura 9 Fórmula estructural del glufosinato (sal de glufosinato de amonio)

Tabla 10 Propiedades fisicoquímicas de glufosinato de amonio

Característica	Descripción o valor
<i>Nombres químicos</i>	Glufosinato-amonio, Basta, DL-glufosinato, glufosinato, glufosinato amonio, glufosinato-amonio
<i>Fórmula molecular</i>	C ₅ H ₁₅ N ₂ O ₄ P
<i>Peso molecular</i>	198.159 g/mol
<i>Nombre de IUPAC</i>	azano, 2-amino-4-[hidroxi (metil) fosforil] butanoato de metilo
<i>Color</i>	Polvo cristalino blanco a amarillo claro
<i>Olor</i>	Olor ligeramente picante
<i>Punto de fusión</i>	215 ° C
<i>Solubilidad</i>	Solubilidad en agua 1370 g/L (+/- 11%)
<i>Solubilidad en disolventes orgánicos a 20 ° C, g/100 mL</i>	acetona=0.016, tolueno= 0.014, n-hexano=0.02, etanol=0.065, acetato de etilo =0.014
<i>Solubilidad en agua</i>	1.370 g/L a 22° C
<i>Densidad</i>	1.4 g/mL a 20 ° C
<i>Constantes de disociación</i>	pKa ₁ = <2 pKa ₂ = 2.9 pKa ₃ = 9.8
<i>Tiempo de vida media a 25 ° C y pH 5, 7 y 9</i>	> 300 días (EPA 161-1) h

Fuente: (PubChem, Liberty, 2017)*(Mensink H, 1994; Hogendoorn E.A, 1999; WHO, 1994; FOA, 2000)

Goerlitz (1985 A32265) y Goerlitz (1986 A33845) estudiaron la hidrólisis de glufosinato en disolución acuosa estéril a pH 5, 7 y 9 durante 300 días a 25 °C. La concentración de glufosinato permaneció constante durante todo el período de estudio y no se detectaron productos de descomposición. El glufosinato es estable en solución acuosa. La hidrólisis acuosa no es una vía de degradación significativa para el glufosinato (MacLachlan, 2017).

Los estudios demuestran que 1.37 g de glufosinato pueden disolverse en 1 L de agua y la vida media variará de 12 a 70 días, con un promedio de unos 40 días (Cox, Herbicide fact sheet—glufosinate, 1996). El uso de glufosinato en los Estados Unidos fue de 847.000 libras en 2003 (Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, 2006) e incluyó nueve estados: California, Iowa, Michigan, Minnesota, Dakota del Norte, Oregon, Dakota del Sur, Washington y Wisconsin.

Modo de acción

La aplicación de glufosinato a las plantas conduce a la reducción de la glutamina y niveles elevados de amoníaco en los tejidos, deteniendo la fotosíntesis, lo que resulta la muerte de la planta (Scribner, Battaglin, Gilliom, & Meyer, 2001).

El glufosinato es un aminoácido que contiene fósforo, inhibe la actividad de una enzima, la glutamina sintetasa, que es necesaria para la producción del aminoácido glutamina y para la desintoxicación de amoníaco. La aplicación de glufosinato conduce a una reducción de la glutamina y un aumento de los niveles de amoníaco en los tejidos de la planta, esto hace que la fotosíntesis se detenga y la planta muera en pocos días (Rasche , Cremer, Donn, & Zink, 1995).

La absorción de glufosinato es a través de las hojas y el tallo, y el daño se limita a las plantas que están en contacto directo con la pulverización. El ingrediente activo puede moverse dentro de las hojas, pero no pueden moverse a otras partes de la planta tales como rizomas subterráneos o estolones. A largo plazo el control de las malezas perennes es por lo tanto limitado. El tensoactivo aniónico emplea generalmente un polietoxilado, sulfato de sodio de un alquiletér polietoxilado, para aumentar la absorción de la planta de glufosinato (Jewell & Buffin, 2017).

2.5.5 Toxicidad y efectos adversos al ambiente del Glufosinato

La introducción de cultivos genéticamente modificados resistentes al glufosinato de amonio dará lugar a un aumento significativo en el uso de este herbicida. Aventis la empresa que produce estos cultivos, afirma que su introducción será beneficiosa debido a la baja toxicidad y la seguridad ambiental del producto, sin embargo, existen muchas lagunas en la evidencia de este reclamo y las investigaciones indican que el glufosinato de amonio puede representar una amenaza para la salud humana y el medio ambiente, en la Tabla 11 se resumen una comparación entre las afirmaciones de Aventis * y los resultados de investigaciones independientes (Jewell & Buffin, 2017) y en las Tablas 12 y 13 se resume la toxicidad del glifosato y el glufosinato respectivamente.

Tabla 11 Comparativo entre las afirmaciones de Aventis vs Investigaciones

Afirmaciones de Aventis	Resultados de investigación independientes
El glufosinato es seguro para los usuarios y consumidores	El glufosinato y su metabolito, MMPA-3 son neurotoxinas. El glufosinato afecta el desarrollo del sistema nervioso central en las ratas bebés. Los efectos teratogénicos del glufosinato incluyen retraso del crecimiento y deformidades del cerebro en ratas y ratones. El tensoactivo utilizado en las formulaciones de glufosinato también es tóxico.
El glufosinato no es una amenaza para el agua potable	El glufosinato es persistente y móvil en los suelos. En algunas condiciones del suelo tales como los suelos arenosos que cubren muchos acuíferos, el glufosinato es persistente y móvil.
El glufosinato es ecológicamente seguro	El glufosinato es tóxico para los microorganismos benéficos del suelo, es una amenaza para las comunidades de plantas silvestres, es tóxico para algunos organismos acuáticos. El glufosinato puede aumentar la lixiviación de nitrógeno en los campos de cultivo.
Los cultivos resistentes al glufosinato reducirán el impacto de la agricultura en el medio ambiente	Es probable que los cultivos resistentes a los herbicidas conduzcan a especies resistentes, poblaciones salvajes y malezas resistentes, y así se intensifique y aumente la dependencia del uso de herbicidas en lugar de provocar reducciones significativas. El material genético extranjero puede introducirse en las poblaciones silvestres y afectar la estructura de las comunidades vegetales.

Tomado y traducido de (Jewell & Buffin, 2017)

Tabla 12 Cuadro resumen de la toxicidad de glifosato

Glifosato		
Riesgos y peligros		No mezclarlo con otros herbicidas, excepto con alaclor, atrazina, ametrina, linuron y metribuzin
Efectos a la salud	<i>Exposición aguda</i>	Ligero irritante dérmico y oral. Se han reportado efectos hematológicos
	<i>Exposición crónica</i>	Se han reportado efectos hematológicos y pancreáticos en animales. Se ha clasificado como no carcinogénico
Efectos al medio ambiente	<i>Toxicidad</i>	Ligeramente tóxico a aves
	<i>Persistencia</i>	Ligeramente persistente. (14 a 22 días)
Recomendaciones de uso y manejo	<i>Uso</i>	Las aplicaciones realizadas antes del brote de las plantas no tienen efecto.
	<i>Equipo Especial de Protección</i>	Lentes de seguridad
	<i>Equipo Mínimo de Protección</i>	Overol de manga larga, guantes, calzado, sombrero

Fuente: ANEXO 1 HOJAS DE DATOS, (COFEPRIS, 2016)

Tabla 13 Cuadro resumen de la toxicidad del glufosinato

Glufosinato		
Riesgos y peligros		No es compatible con algunos productos utilizados en la construcción como son, hierro, aluminio, titanio y zinc
Efectos a la salud	<i>Exposición aguda</i>	Irritante al contacto con los ojos y la piel. Puede causar reacciones de hipersensibilidad o alergia, así como asma
	<i>Exposición crónica</i>	Algunos estudios en animales han mostrado efectos adversos en el feto
Primeros Auxilios		Contacto con los ojos enjuague con abundante agua. Contacto con la piel, lavar con abundante agua y jabón. Ingestión no inducir el vómito
Efectos al medio ambiente	<i>Toxicidad</i>	Tóxico para organismos acuáticos. Puede causar efectos adversos a largo plazo en el ambiente acuático
Recomendaciones de uso y manejo	<i>Equipo Especial de Protección</i>	Mascarilla y lentes de seguridad
	<i>Equipo Mínimo de Protección</i>	Overol de manga larga, guantes, calzado, sombrero

Fuente: ANEXO 1 HOJAS DE DATOS, (COFEPRIS, 2016)

3. Análisis de glifosato, AMPA y glufosinato

3.1 Técnicas de análisis de los plaguicidas de estudio

Debido a la naturaleza compleja de las matrices en las que los plaguicidas se encuentran presentes y a los bajos límites de residuos exigidos por los organismos reguladores, la preparación eficiente de la muestra, así como la identificación y detección a niveles de trazas, son aspectos muy importantes en un método analítico para la determinación de residuos de plaguicidas. Por tanto, los métodos de análisis aplicados deben incluir un tratamiento previo que permita: extraer el plaguicida selectiva y cuantitativamente de la propia matriz de la muestra, eliminando el mayor número posible de interferencias evitando así errores en la medida analítica (Ravelo, 2017).

A. Preparación de muestras

La etapa de preparación de la muestra es de vital importancia en un proceso analítico, ya que va a permitir cuantificar correctamente los analitos a bajos de Límites de niveles de concentración (LD). Es la etapa más laboriosa y lenta, y es donde se introducen un elevado número de errores como consecuencia de: la pérdida del analito durante todo el proceso, de su posible degradación, de la contaminación de la muestra. La elección y optimización de una etapa adecuada de preparación de la muestra no suele ser sencilla, especialmente cuando se trata de matrices muy complejas, como las muestras ambientales.

Idealmente, la preparación de la muestra debe ser lo más simple posible no sólo porque así se reduce el tiempo requerido sino, también, porque disminuye la probabilidad de introducir errores. Entre las técnicas más habituales para la extracción de plaguicidas orgánicos destacan: la extracción líquido-líquido (LLE), extracción en fase sólida y micro-extracción en fase sólida (Ravelo, 2017).

- a. **Extracción líquido-líquido.** La LLE ha sido tradicionalmente la técnica de extracción, pre-concentración y limpieza más utilizada hasta el momento en el análisis de plaguicidas en muestras líquidas, a pesar de

que esta técnica suele ser tediosa, larga y con requerimientos de grandes cantidades de disolventes orgánicos. Las principales ventajas asociadas a la LLE se encuentran su gran versatilidad, como consecuencia de la amplia gama de disolventes y mezclas de los mismos que se pueden emplear; su simplicidad, al no requerir el uso de instrumentación compleja ni de consumibles costosos.

b. Extracción sólido-líquido. Este tipo de extracción ha sido tradicionalmente la utilizada para la extracción de plaguicidas de muestras sólidas. Se basa en la puesta en contacto de un disolvente o mezcla de disolventes con la muestra. Esta mezcla se somete a distintos procesos (calentamiento, ultrasonidos, agitación, alta presión, etc...), cuya agresividad depende de la fortaleza de las interacciones plaguicida-matriz. Este procedimiento de extracción debe ser optimizado en cada aplicación, tratando de emplear unas condiciones de compromiso que permitan obtener una extracción cuantitativa de los analitos y, a la vez, la menor posible de otros compuestos no deseados de la matriz. Entre las técnicas de extracción sólido-líquido utilizadas convencionalmente para el análisis de plaguicidas por GC, HPLC destacan:

- **Extracción Soxhlet.** La muestra se coloca en una carcasa porosa y el disolvente recircula continuamente a través de ella mediante un sistema de destilación-condensación. Se trata de un método estándar, independiente del tipo de matriz, de bajo costo y en el que no es necesaria la filtración posterior del extracto obtenido. Sin embargo, los principales inconvenientes son el largo tiempo necesario para completar la extracción (12-48 h) y la gran cantidad de disolventes orgánicos empleados (300-500 mL), lo que supone un gasto significativo además de un problema ambiental, el calentamiento continuo durante largos períodos de tiempo a medida que se extraen los plaguicidas es otro factor a tener en cuenta, especialmente en el caso de plaguicidas termolábiles, que pueden sufrir procesos de degradación (Ravelo, 2017).

- **Extracción asistida por ultrasonido.** Se utilizan ondas de ultrasonido, ya sea introduciendo la mezcla muestra-disolvente de extracción, generalmente orgánico, en un baño ultrasónico o bien sumergiendo una sonda de ultrasónica en la misma, con el fin de extraer a los compuestos de interés, durante un cierto tiempo, generalmente de 3 a 60 minutos. Tras la extracción, se separa el disolvente con el analito extraído mediante centrifugación o filtración. La sonicación se ha utilizado en numerosas ocasiones para la extracción de plaguicidas de matrices sólidas de distinta naturaleza. Entre las ventajas de esta técnica de extracción se encuentran el bajo consumo de disolventes orgánicos y la posibilidad de procesar varias muestras simultáneamente hasta 24 muestras de forma secuencial. En general, los resultados obtenidos con esta técnica son comparables o incluso mejores (especialmente en términos de precisión) que los conseguidos por métodos clásicos, por lo que su aplicación para la extracción de plaguicidas cada vez es mayor (Ravelo, 2017).

B. Análisis de muestras

La elección de una técnica analítica adecuada para la determinación de plaguicidas depende de una variedad de factores que incluyen: las propiedades de los analitos, efectividad, rapidez, fiabilidad, selectividad y sensibilidad, costo, disponibilidad, compatibilidad con el medio ambiente y capacidad de análisis. En la actualidad, la cromatografía de gases (GC) es la técnica más ampliamente utilizada para el análisis multiresiduo de plaguicidas en diversas matrices, dada su elevada sensibilidad y selectividad en la detección de este tipo de compuestos. Sin embargo, la incompatibilidad de algunos plaguicidas con la GC debido a su inestabilidad térmica, elevado peso molecular, baja volatilidad y/o alta polaridad, hace que muchos de estos compuestos no estén incluidos en los métodos multiresiduo al no poder determinarse fácilmente por GC. Este inconveniente se puede solventar en algunos casos introduciendo una etapa de derivatización previa a la inyección.

A diferencia de la GC, la cromatografía de líquidos es aplicable a compuestos poco volátiles, altamente polares, no termolábiles y/o de elevado peso molecular. Esta técnica presenta la ventaja adicional de permitir derivatizaciones pre- y post-columna de los analitos con objeto de mejorar su detección (Ravelo, 2017).

3.2 Validación de métodos analítico cromatográfico

Un método analítico es la descripción de la secuencia de actividades, recursos materiales y parámetros que se deben cumplir, para llevar a cabo el análisis de un componente específico (analito) de una muestra.

La EURACHEM define la validación como “...la confirmación mediante examen y suministro de evidencia objetiva de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto” (EURACHEM, 2014).

La validación de un método analítico es el proceso para establecer el alcance del método ¿Qué analitos puede determinar el método, en qué matrices, en presencia de qué interferencias?, sus características de desempeño y sus limitaciones ¿En esas condiciones, qué niveles de precisión y de exactitud pueden alcanzarse? Es demostrar que el método es adecuado para su propósito (EURACHEM, 2014).

3.2.1 Parámetros a validar en un método cromatográfico

A continuación, se describen los parámetros de desempeño que comúnmente se obtienen para un método cromatográfico cuantitativo según la Guía Eurachem “La Adecuación al Uso de los Métodos Analíticos Una Guía de Laboratorio para Validación de Métodos y Temas Relacionados”

Intervalo de trabajo e intervalo lineal. Para cualquier método cuantitativo es necesario determinar el intervalo de concentraciones del analito o los valores de la propiedad relacionada, sobre los cuales el método puede aplicar. El intervalo de trabajo se refiere al intervalo de valores de concentración en las disoluciones que se miden realmente y no a la concentración en la muestra

original. El intervalo de trabajo es obtenido a través de la medición de muestras con diferente concentración del analito, y seleccionando el intervalo de concentración que proporciona un nivel de precisión aceptable. Dentro del intervalo de trabajo puede existir un intervalo de respuesta lineal entre la respuesta y la concentración del analito. El intervalo de trabajo es generalmente más amplio que el intervalo lineal.

- **Sensibilidad analítica.** Es el cambio en la respuesta del instrumento que corresponde a un cambio en la concentración del analito, y corresponde a la pendiente de la curva de calibración.
- **Límite de detección (LD).** El límite de detección es la concentración mínima del analito en una muestra, que puede ser detectada por un método analítico, pero no necesariamente cuantificada bajo condiciones experimentales establecidas.
- **Límite de cuantificación (LC).** Es la menor concentración de un analito que puede determinarse con una precisión (repetibilidad) y una exactitud aceptable bajo las condiciones establecidas de la prueba.
- **Precisión.** Las medidas de precisión más comunes son la “repetibilidad” y la “reproducibilidad”, y representan las dos medidas extremas de precisión que pueden obtenerse. La repetibilidad (la precisión más pequeña esperada) da una idea de la variabilidad esperada cuando un método se ejecuta por un solo analista, con un equipo en un período corto de tiempo, es decir, es la clase de variabilidad que se espera entre resultados cuando una muestra se analiza en forma replicada. Si la muestra se analiza por varios laboratorios para fines comparativos, entonces una medida de precisión más significativa a usarse es la reproducibilidad (ésta es la medida de precisión más grande normalmente encontrada, a pesar de que formalmente se excluye la variación con respecto del tiempo). La precisión se determina por lo general en términos de la desviación

estándar o la desviación estándar relativa. Entre la repetibilidad y la reproducibilidad se encuentra la precisión intermedia que es una media de la precisión en la aplicación de un método cuando se cambia un factor

- **Veracidad (exactitud).** Es la proximidad de concordancia entre el valor promedio obtenido de una serie grande de resultados de prueba y un valor de referencia aceptado. La medida de la veracidad se expresa por lo general en términos de recobro o sesgo.

II. Parte experimental

4. Reactivos, disolventes, materiales y equipos

4.1 Reactivos y disolventes

Fosfato diácido de potasio (KH_2PO_4), pureza 93.3%, J.T. Baker

Fosfato monoácido de potasio (K_2HPO_4), pureza 99.0%, J.T. Baker

Hidróxido de sodio (NaOH), pureza 98.1. %, J.T. Baker

Ácido clorhídrico (HCl), pureza 36.5. %, Química Didáctica

Cloruro de 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc-Cl), pureza $\geq 99.0\%$, SIGMA-ALDRICH

Borato de sodio ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \bullet 10\text{H}_2\text{O}$), grado técnico, Química Didáctica

Glifosato, pureza 98.0%, CHEM SERVICE

Ácido aminometilfosfónico (AMPA), pureza 99.5%, CHEM SERVICE

Glufosinato de amonio, pureza 99.5%, CHEM SERVICE

Éter etílico anhidro, grado analítico, J.T. Baker

Agua nanopura (Tipo I)

Acetonitrilo (ACN), grado cromatográfico J.T. Baker

Metanol (MeOH), grado cromatográfico Honeywell

Disolución reguladora (Biftalato), pH 4, J.T. Baker

Disolución reguladora (fosfatos), pH 7, J.T. Baker

Disolución reguladora (Boratos), pH 10, J.T. Baker

4.2 Materiales, accesorios y consumibles de equipos

Micropipetas Pippet-Lite XLS de capacidad variable (20-200 μL , 100-1000 μL , 500-5000 μL)

Viales de vidrio Supelco con tapa (4, 8, 12, 20 y 50 mL)

Probetas (100 y 1000 mL)

Pipetas volumétricas (2, 10 y 25 mL)

Vasos de precipitados (10, 25 y 100 mL)

Matraces volumétricos (5, 10, 25, 250, 500 y 1000 mL)

Matraces Erlenmeyer de 250 mL

Barras magnéticas de distintos tamaños

Espátula de acero inoxidable

Varilla de vidrio

Canastillas de aluminio

Pinzas para crisol

Desecador con sílica gel

Tubos de centrifuga de vidrio Kimax de 50 mL

Jeringas de plástico de 60 mL

Swinnex

Membranas de nylon de 0.22 μm

Columna Waters Carbamate Analysis partícula de tamaño 3.9 x 150 mm

Microjeringa Hamilton (100 μL)

Celdas de vidrio

4.3 Equipos

Agitador orbital

Balanza semianalítica Sartorius modelo 1416-MP8

Balanza analítica Sartorius modelo 1415MP8

Baño ultrasónico Branson

Centrifuga Damon/IEC Division

Controlador Water Automated Gradient Controller, modelo 680

Detector de Ultravioleta-Visible, SpectraFocus de Thermo Separation Products

Espectrofotómetro UV-VIS CARY3E, Varian

Mufla Thermolyne,

Parrilla de agitación Thermolyne SP-131325, StableTemp

Potenciómetro Beckman

Refrigerador General Electric

Sistema de agua Nanopure modelo D4741

Sistema de bombeo Waters 410

pHMETER Beckman 720

4.4 Preparación de disoluciones y reactivos

Preparación de la disolución buffer de boratos ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$), 0.1 M, pH 9.0. En un vaso de precipitados se pesan ~ 0.37 g de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, se colocan aproximadamente 10 mL de agua, se coloca agitación magnética 30°C , una vez que la disolución ya no presente turbidez, se completa el volumen a 25 mL con agua. Con ayuda de un potenciómetro se mide el pH de la disolución y si el pH es mayor a 9.0 se agregan gotas de (HCl), si el pH es menor se agregan gotas de una disolución de (NaOH). En adelante esta disolución se nombrará como buffer de boratos.

Preparación de la disolución de fosfatos, 0.05 M, pH 5.5. En una parrilla de agitación magnética se coloca un vaso de precipitados de 1L se colocan ~ 0.17 g de K_2HPO_4 y ~ 6.68 g de KH_2PO_4 , posteriormente se agregan 20 mL de agua y se pone en agitación hasta que se disuelvan por completo las sales. Una vez disueltas las sales se trasladan a un matraz aforado de 1L y se completa el aforo con agua. Se mide el pH de la disolución y se ajusta con HCl o NaOH a pH 5.5. En adelante disolución de fosfatos.

Preparación de la disolución derivatizante FMOC-Cl, 1000 mg/L. En un vial ámbar de 50 mL se pesan 0.025 g de FMOC-Cl, se agregan 25 mL de agua y se agita hasta disolver por completo. En adelante disolución de FMOC-Cl.

Preparación de la fase móvil (ACN: disolución de fosfatos, 45:55). Para preparar 1000 mL de la fase se mezclan 450 mL de ACN con 550 mL de la disolución de fosfatos.

Para el método analítico propuesto se utilizaron varias disoluciones, las cuales fueron preparadas a partir de disoluciones madre de glifosato, AMPA y glufosinato, cada una de ellas preparadas en agua. Todas las disoluciones se almacenaron en viales ámbar se mantuvieron en refrigeración (4°C).

Stock de glifosato 100 mg/L. Se disolvieron 0.00253 g de glifosato en 10 mL de agua, para después llevar al aforo en un matraz volumétrico de 25 mL con el mismo disolvente.

Stock de glufosinato 100 mg/L. Se disolvieron 0.00252 g de glufosinato de amonio en 10 mL de agua, para después llevar al aforo en un matraz volumétrico de 25 mL con el mismo disolvente.

Stock de AMPA 100 mg/L. Se disolvieron 0.00252 g de AMPA en 10 mL de agua, para después llevar al aforo en un matraz volumétrico de 25 mL con el mismo disolvente.

5. Experimentación

5.1 Optimización de la derivatización

La optimización de la derivatización se realizó con glifosato y AMPA debido a que el estándar de glufosinato tardó más tiempo en llegar al laboratorio, una vez que se tuvo el estándar de glufosinato se aplicó el procedimiento de derivatización final y no hubo necesidad de hacer ningún ajuste.

El glifosato, AMPA y glufosinato se derivatizaron con 9-fluorenilmetil-cloroformato que reacciona con grupos amina primaria y secundaria para producir derivados estables altamente fluorescentes (Sancho, y otros, 1996; Ibáñez, Pozo, Sancho, López, & Hernández, 2005; Hanke, Singer, & Hollender, 2008 y Hanke, Singer, & Hollender, 2008; Meyer, y otros, 2009; Lupi, y otros, 2015). Las reacciones y los productos que se obtuvieron se muestran en la Figura 10.

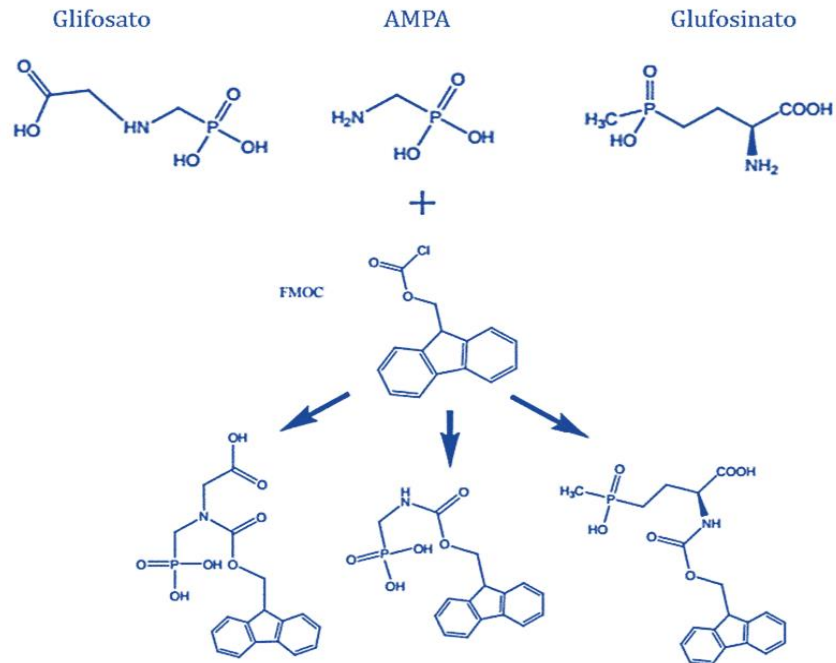


Figura 10 Estructura química del glifosato, AMPA, glufosinato, y sus compuestos derivatizados con 9-fluorenilmetil-cloroformato

Tomada de **(Meyer, y otros, 2009)**

El procedimiento de derivatización se adaptó y optimizó a partir de antecedentes bibliográficos (Sancho, y otros, 1996; Ibáñez, Pozo, Sancho, López, & Hernández, 2005). Y se describe a continuación:

- En un vial ámbar se colocó 1 mL de disolución estándar
- Se adicionaron 0.25 mL de buffer de boratos
- Se adicionaron 0.5 mL o 1 mL de la disolución de Fmoc-Cl de 1000 mg/L
- Se colocó en agitación por 20 o 30 minutos (a 600 rpm)
- Una vez transcurrido el tiempo de reacción se le realizaron 2 o 3 lavados con 2.5 mL de éter etílico anhidro.
- La fase acuosa se recuperó y se analizó mediante el sistema de CLAR.
- Para el análisis cromatográfico se tomaron 300 μ L de buffer de boratos más 250 μ L de la fase acuosa recuperada de las extracciones con éter etílico.

Los parámetros que se optimizaron fueron: tiempo de reacción (Tabla 14), cantidad de la disolución de FMOC-Cl 1000 mg/L (Tabla 15) y el número de extracciones con éter etílico anhidro (Tabla 16). Cada parámetro se realizó por triplicado. El procedimiento general se muestra en la Figura 11.

Tabla 14 Optimización del tiempo de reacción

	AMPA		Glifosato	
mL de muestra	1	1	1	1
Buffer	Borato	Borato	Borato	Borato
pH de buffer	9	9	9	9
mL de buffer de borato	0.25	0.25	0.25	0.25
Concentración de FMOC-Cl (mg/L)	1000 mg/L	1000 mg/L	1000 mg/L	1000 mg/L
mL de FMOC-Cl	1	1	1	1
Disolvente para FMOC-Cl	ACN	ACN	ACN	ACN
Tiempo de reacción [min]	30	20	30	20
Temperatura [°C]	Ambiente	Ambiente	Ambiente	Ambiente
Lavado con éter de 2.5 mL	2	2	2	2

Tabla 15 Optimización de cantidad de la disolución de FMOC-Cl 1000 mg/L

	AMPA		Glifosato	
mL de muestra	1	1	1	1
Buffer	Borato	Borato	Borato	Borato
pH de buffer	9	9	9	9
mL de buffer de borato	0.25	0.25	0.25	0.25
Concentración de FMOC-Cl	1000 mg/L	1000 mg/L	1000 mg/L	1000 mg/L
mL FMOC-Cl	1	0.5	1	0.5
Disolvente para FMOC-Cl	ACN	ACN	ACN	ACN
Tiempo de reacción [min]	20	20	20	20
Temperatura [°C]	Ambiente	Ambiente	Ambiente	Ambiente
Lavado con éter de 2.5 mL	3	3	2	2

Tabla 16 Optimización del número de lavados con éter etílico

	Glifosato		AMPA	
mL de muestra	1	1	1	1
Buffer	Borato	Borato	Borato	Borato
pH de buffer	9	9	9	9
mL de buffer de borato	0.25	0.25	0.25	0.25
Concentración de FMOCCl	1000 mg/L	1000 mg/L	1000 mg/L	1000 mg/L
mL de FMOCCl	1	1	1	1
Disolvente para FMOCCl	ACN	ACN	ACN	ACN
Tiempo de reacción [min]	20	20	20	20
Temperatura [°C]	Ambiente	Ambiente	Ambiente	Ambiente
Lavado con éter de 2.5 mL	2	3	2	3

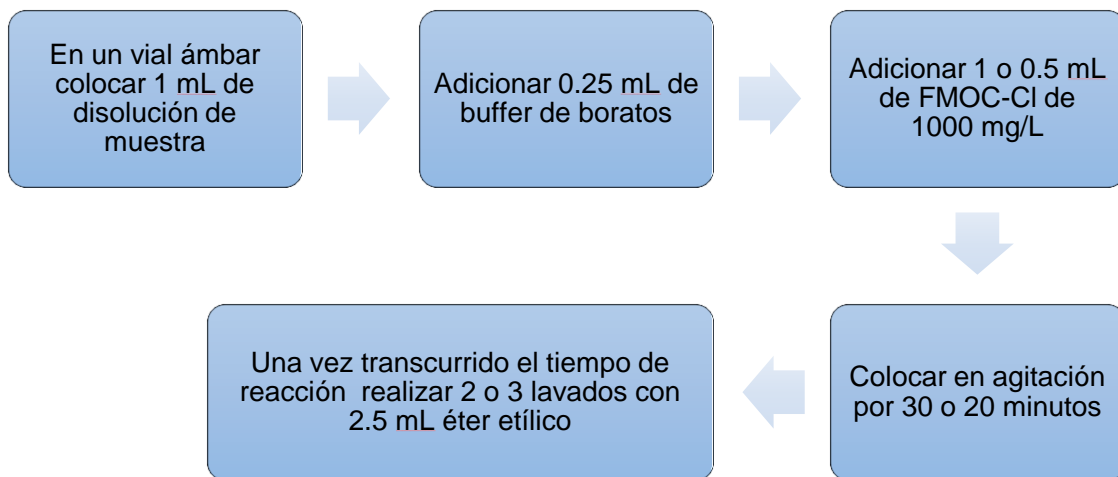


Figura 11. Procedimientos de derivatización

5.2 Optimización de la separación cromatográfica

La optimización de la separación cromatográfica se realizó con glifosato y AMPA debido a que el estándar de glufosinato tardó más tiempo en llegar al laboratorio, una vez que se tuvo el estándar de glufosinato se aplicaron las

condiciones que se fijaron para la separación cromatografía es importante mencionar que no hubo necesidad de hacer ningún ajuste.

La longitud de onda de trabajo de los derivados de herbicidas se obtuvo a partir del espectro de ultravioleta visible de cada herbicida, entre 200 y 800 nm, esto se realizó con un estándar de 20 mg/L.

Para la separación cromatográfica se utilizó una Columna Waters Carbamate Analysis 3.9 x 150 mm, empacada con una fase estacionaria esférica de sílica (C18), un sistema de bombeo Waters 510 HPLC Pump Modelo 510 Solvent Delivery System acoplado a un detector de Ultravioleta-Visible, Spectra Focus Forward Optical Scanning. Flujo 0.8 mL/min. Se detectó a una longitud de onda de 220 nm. Se inyectó un volumen de 20 μ L de extracto de la derivatización. Para establecer la mejor composición de fase móvil (FM) para la separación cromatográfica se varió la proporción de ACN en la fase móvil (ACN: disolución de fosfatos), de 35 a 55%. Se trazó el gráfico $\log k' = f(\%ACN)$, y se estableció la FM final ACN: disolución de fosfatos (45:55).

5.3 Validación del método analítico

Se realizó una validación parcial, y se obtuvieron los siguientes parámetros: intervalo lineal, sensibilidad analítica, límite de detección, límite de cuantificación, exactitud como %Recobro, repetibilidad y reproducibilidad. Se tomaron como referencia el documento de “Eurachem Guía de Laboratorio para la Validación de Métodos y Temas Relacionados” (EURACHEM, 2014), “Guía técnica sobre trazabilidad e incertidumbre en las mediciones analíticas que emplean las técnicas de cromatografía de gases (CG) y cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR)” (CENAM, Guía técnica sobre trazabilidad e incertidumbre en las mediciones analíticas que emplean las técnicas de cromatografía de gases (CG) y cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), 2008) y la “Guía de validación de métodos analíticos editada por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos” (Colegio Nacional de

QFB, 2001). El plan de validación del método y los criterios de aceptación correspondientes se muestra en la Tabla 17.

Tabla 17. Plan de validación

Parámetro	Analizar	Obtener	Criterio
Intervalo lineal y de trabajo	Preparar disoluciones para una curva de calibración a partir de un estándar. Se incluye un blanco y 5-8 niveles de concentración. Realizar el ensayo por triplicado. Leer el blanco. Leer las disoluciones estándar.	Coefficiente de determinación (r^2)	$r^2 \geq 0.98$
Sensibilidad analítica		Pendiente (m)	El intervalo de confianza de la pendiente no debe incluir al cero.
Límite de detección (LD) y Límite de cuantificación (LC)	Se prepararon 6 disoluciones a una concentración de menor nivel de la concentración más baja de la curva de calibración.	$LD = \frac{3s}{m}$ $LC = \frac{6s}{m}$ <p>s es la desviación estándar de la medición instrumental del analito es el valor de la pendiente obtenida por la curva de calibración</p>	LC debe ser menor la concentración más baja del intervalo lineal y el LD más bajo que el LC
Exactitud (% Recobro)	Se prepararon y analizaron 6 disoluciones independientes del nivel de concentración de la curva de calibración.	$\%R = \left(\frac{C_{obtenida}}{C_{esperada}} \right) \times 100$	Recobro $100 \pm 15\%$ con una DER $\leq 2\%$
Repetibilidad	Se prepararon y analizaron 6 disoluciones independientes del nivel de concentración al punto medio de la curva de calibración.	Desviación estándar relativa	DER $\leq 2\%$
Repetibilidad intermedia	Se prepararon y analizaron 6 disoluciones independientes del nivel de concentración al punto medio de la curva de calibración. En periodos de tiempo diferentes.		
Confirmación en matriz	Aplicar el procedimiento de extracción a una muestra de suelo adicionada, a 3 niveles de concentración. Por triplicado obtener el recobro y la curva.	Coefficiente de determinación (r^2) y la pendiente	$r^2 > 0.98$ El intervalo de confianza para la ordenada al origen debe contener al cero
	<i>Concentración recuperada = f (cantidad adicionada)</i>	DER y recobro	Recobro $100 \pm 15\%$ con una DER $\leq 20\%$

5.3.1 Linealidad y sensibilidad analítica

Se prepararon ocho niveles de concentración en un intervalo de 2-9 mg/L de glifosato. Para el AMPA se prepararon nueve niveles de concentración en un intervalo de 2-9 mg/L. Para el glufosinato se prepararon ocho niveles de concentración en un intervalo de 1-8 mg/L.

Todas estas concentraciones a partir del stock de 100 mg/L, de acuerdo a lo indicado en la Tabla 18, se prepararon curvas independientes.

Tabla 18 Preparación de los niveles de la curva de calibración

Concentración de analito (mg/L)	Alícuota del Stock de 100 mg/L de 100 mg/L (µL)
1	100
2	200
2.5	250
3	300
4	400
5	500
6	600
7	700
8	800
9	900

Una vez preparadas las disoluciones se les aplicó el procedimiento de derivatizaron descrito en el punto 5.1 y la determinación por CLAR se hizo con las condiciones cromatografías descritas en el punto 5.2.

5.3.2 Límite de detección y límite de cuantificación

Para la determinación de estos dos parámetros se realizó la medición de seis disoluciones preparadas de forma independiente. Para el caso del glifosato y AMPA se trabajó con una concentración de 1 mg/L y para el caso del glufosinato con una concentración de 0.5 mg/L.

5.3.3 Precisión y veracidad

Para evaluar la repetibilidad y veracidad (como recobro) se analizaron para cada herbicida seis disoluciones independientes de concentración 5 mg/L.

Para evaluar el parámetro de repetibilidad intermedia se repitió este procedimiento en 3 periodos de tiempo diferente.

5.3.4 Confirmación en matriz

El procedimiento de extracción se adaptó a partir de antecedentes bibliográficos (Peruzzo, Porta, & Ronco, 2008; Lupi, y otros, 2015). En la Figura 12 se muestra el procedimiento de extracción empleado.

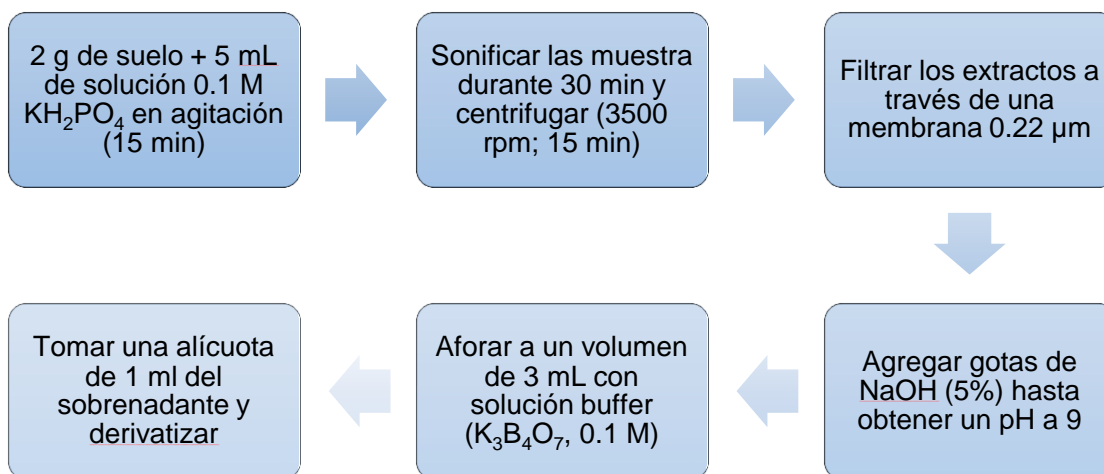


Figura 12. Procedimiento de extracción utilizado

El procedimiento de extracción se aplicó para confirmar el método en la matriz una muestra de suelo adicionada con los tres herbicidas en 3 niveles de concentración 5, 12.5 y 22.5 mg de plaguicida por kg de suelo. Estas pruebas se realizaron por triplicado de forma independiente. Una vez obtenidos los extractos se derivatizaron y posteriormente fueron analizados por CLAR. Se obtuvieron la precisión, el recobro y la curva:

Concentración recuperada= f (cantidad adicionada)

5.4 Aplicación a muestras ambientales

Concluida la validación del método analítico, este se aplicó a muestras ambientales tomadas las localidades de Tlanchinol, Lolotla, Molango, Xochicuatlan, Ixtlahuaco, Naopa y Chiconcuac, de la zona de Molango, Hidalgo, en donde se obtuvieron doce muestras donde se sospecha que se podría detectar glifosato, AMPA y glufosinato. Las muestras fueron identificadas con claves internas del laboratorio, se envasaron para evitar la contaminación exterior así como cualquier alteración y se mantuvieron en refrigeración (4 °C) para evitar la pérdida de los analito.

La preparación inicial de la muestra fue la siguiente:

- Se tomaron aproximadamente 5 g de muestra.
- Se colocaron en una cápsula de porcelana y se molieron con ayuda de un pistilo de porcelana hasta tener una composición homogénea.
- Posteriormente se pesaron aproximadamente 2 g y se aplicó el procedimiento de extracción, derivatización y análisis por CLAR.

Determinación de humedad. Se pesó la canastilla de aluminio donde se colocaron posteriormente aproximadamente 2g de la muestra de suelo y se registró el peso a continuación se colocaron en el horno de calentamiento y se dejaron secar a 105 °C. Durante su periodo de enfriamiento se colocaron en un desecador y finalmente se pesó la canastilla con la muestra y se registró el peso, este procedimiento se realizó por duplicado para cada una de las doce muestras. El porcentaje de humedad se calculó con la siguiente ecuación:

$$\%Humedad\ de\ la\ muestra\ (\%H) = \frac{A - B}{A} \times (100)$$

Donde:

A= Peso de la muestra con humedad de campo (g)

B= Peso de la muestra seca (g)

Este procedimiento está basado con lo establecido en la NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004.

Determinación de plaguicidas por CLAR. Para la extracción y análisis se aplicaron los procedimientos descritos en los apartados anteriores y se agruparon en lotes de 8 muestras, en como control de calidad se analizaron muestras duplicadas o adicionadas, un blanco y un blanco adicionado. En el caso del blanco el procedimiento de extracción se aplicó, pero sin muestra de suelo al igual que al blanco fortificado Tabla 19.

Tabla 19. Muestras analizadas

N.	Muestra	Duplicada	Adicionada
1	628-16		x
2	629-16		
3	630-16	x	
4	631-16	x	x
5	632-16		x
6	633-16		x
7	634-16	x	x
8	635-16		x
9	636-16		
10	637-16		x
11	638-16	x	
12	639-16		

III. Análisis de resultados y discusión

En el presente apartado se analizan los resultados obtenidos:

- a. Optimización de la derivatización
- b. Optimización de la separación (curvas de $\log k'$ vs % de disolvente de la fase orgánica)
- c. Validación del método analítico
- d. Aplicación a muestras ambientales

6. Desarrollo del método

6.1 Optimización de la derivatización

El primer parámetro que se optimizó fue el tiempo de derivatización de los analitos con FMOC-Cl en la literatura este va desde unos pocos minutos a horas (Sancho, y otros, 1996; Baez, Fuentes, Espina, & Espinoza, 2014); o incluso durante toda la noche (Ibáñez, Pozo, Sancho, López, & Hernández, 2005; Chamkasem & Harmon, 2016). En este estudio, se evaluaron: 20 y 30 min, estos tiempos se seleccionaron por dos razones principales: a) Los resultados reportados en la literatura fueron satisfactorios, y b) se buscó trabajar con periodos de tiempo cortos con la finalidad de hacer el análisis de muestras lo más rápido posible.

Los resultados se presentan en la Figura 13, en la gráfica presentada se observa que hay un mejor rendimiento de derivatización para glifosato (visto como una mayor área de pico cromatográfico) a un tiempo de 20 minutos, y para AMPA en 30 minutos. Como el glifosato es el herbicida de interés se seleccionó el tiempo de 20 minutos.

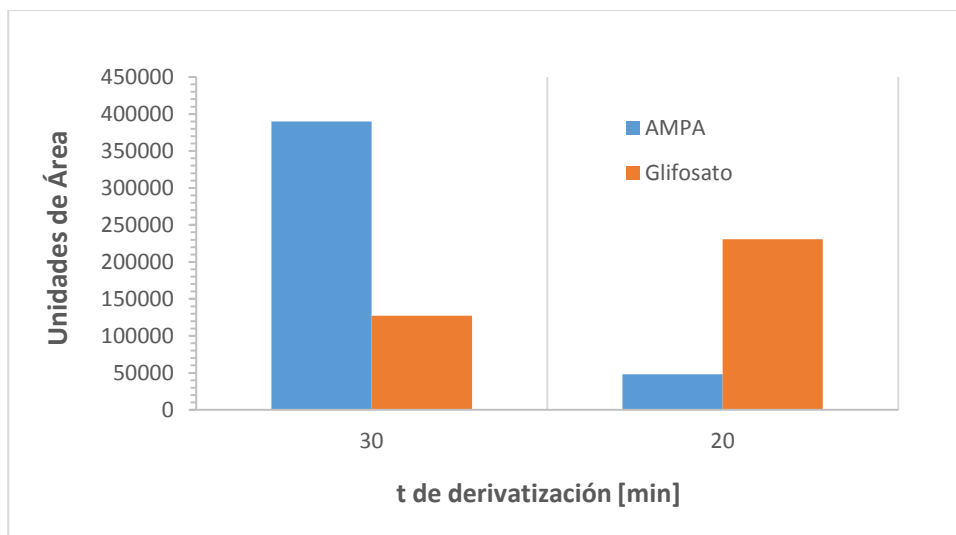


Figura 13 Gráfico de barras: Tiempo de derivatización

Una vez fijado el tiempo de derivatización, se optimizó la cantidad reportada de FMOC-Cl adicionado, al igual que con los otros parámetros la cantidad a adicionar de FMOC-Cl es muy variable (Sancho, y otros, 1996; Lupi, y otros, 2015). En los experimentos que se realizaron se varió la cantidad (como alícuota) de FMOC-Cl de 0.5 y 1 mL. Como se puede observar en la Figura 14, cuando se adicionan solo 0.5 mL de FMOC-Cl el área de los picos cromatográficos es mucho menor que cuando se adiciona 1 mL de FMOC-Cl.

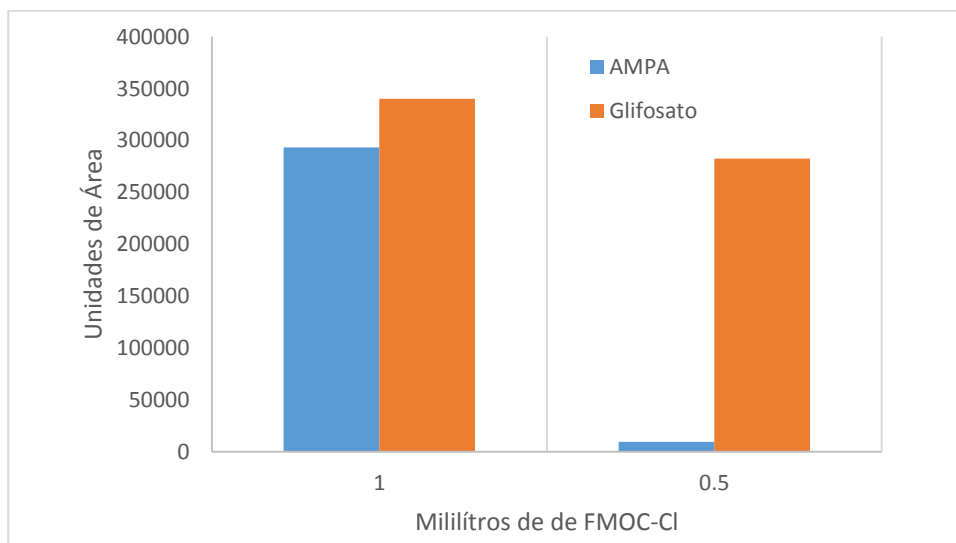


Figura 14. Gráfico de barras: Cantidad de derivatizante

El último parámetro que se optimizó fue el número de extracciones realizadas con éter etílico anhidro, estas extracciones se realizaron con el fin de eliminar el exceso de la disolución de FMOC-Cl. En la literatura se encuentran reportados volúmenes de extractante entre 1-5 mL y número de extracciones variables (Druart, Delhomme, Vaufleury, Ntcho, & Millet, 2011 ; Stalikas & Konidari , 2001). Se realizaron pruebas con 2 y 3 extracciones líquido-líquido, con 2.5 mL de éter etílico c/u.

La fase acuosa se recuperó y se analizó mediante el sistema de CLAR. En Figura 15 se muestran los resultados obtenidos. En la gráfica de barras se puede ver que se obtienen mayores áreas de pico cromatográfico tanto para glifosato como para AMPA cuando se realizar solo dos extracciones con 2.5 mL de éter etílico.

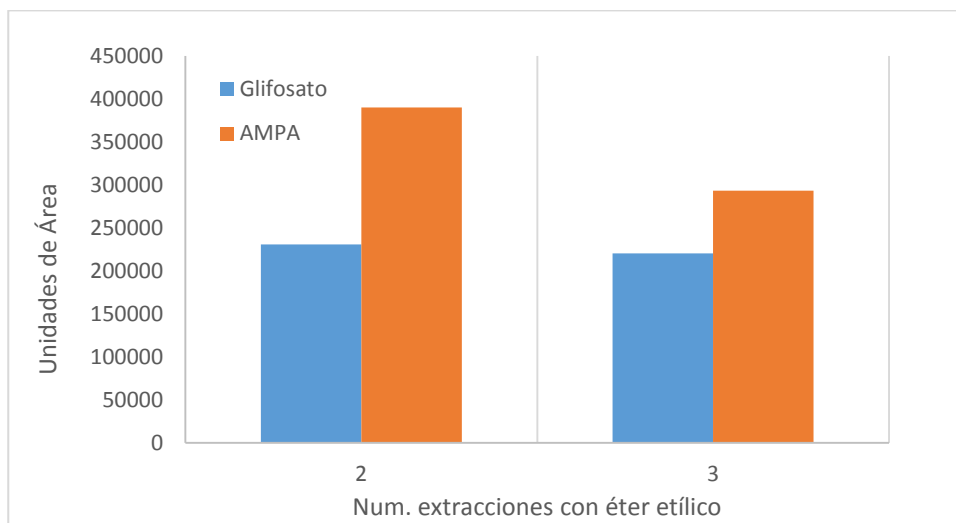


Figura 15 Gráfico de barras: Extracciones con éter etílico

Con los resultados presentados anteriormente se estableció el procedimiento de derivatización final con el que se trabajó para validar el método analítico el cual se muestra en la Figura 16. En la Tabla 20 Las condiciones del procedimiento de derivatización optimizado para glifosato y AMPA.

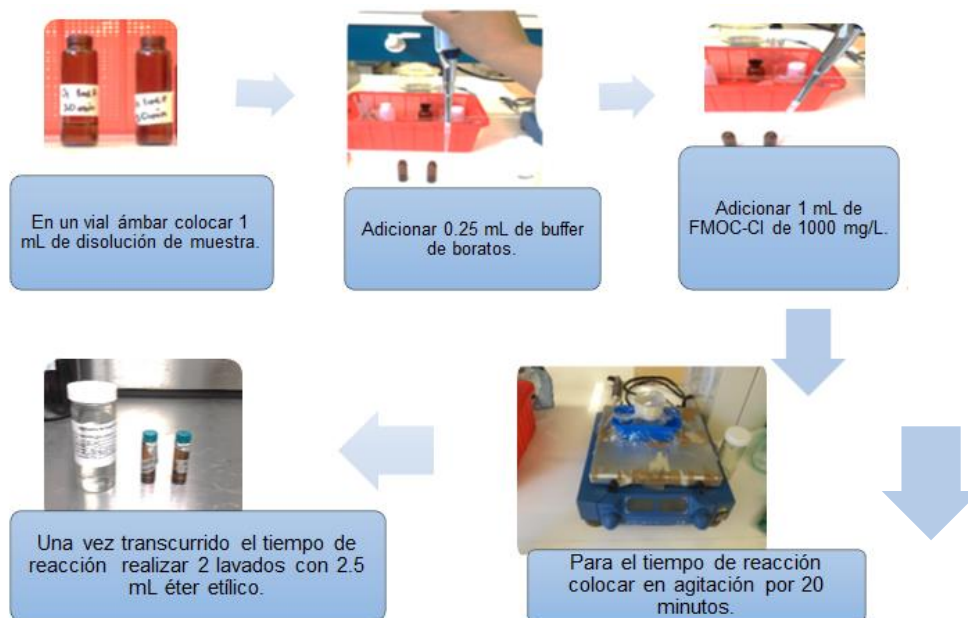


Figura 16. Procedimiento final de derivatización

Tabla 20 Condiciones del procedimiento de derivatización optimizado

	AMPA	Glifosato
mL de muestra	1	1
Buffer	Borato	Borato
pH de buffer	9	9
mL de buffer de borato	0.25	0.25
Concentración de FMOC-Cl	1000 mg/L	1000 mg/L
mL FMOC-Cl	1	1
Disolvente para FMOC-Cl	ACN	ACN
Tiempo de reacción [min]	20	20
Temperatura [°C]	Ambiente	Ambiente
Lavado con éter de 2.5 mL	2	2

6.2 Optimización de la separación

Los espectros de los derivados de los herbicidas se obtuvieron con el espectrofotómetro UV-VIS Varian, modelo CARY3E, en los cuales se confirmó la longitud de onda en 220 nm, para efectuar la cuantificación por CLAR de los derivados de glifosato, AMPA y glufosinato.

Para la establecer las condiciones de la separación cromatográfica se obtuvieron los parámetros de retención, y se trazó la curva $\log k' = f(\% ACN)$, Figura 17, (Ver Anexo A para el cálculo de $\log k'$), variando la proporción de

disolvente orgánico. Se seleccionó la proporción de la composición de fase móvil ACN:disolución de fosfatos (45:55), debido a que con esta proporción el tiempo de retención de cada analito es corto, el tiempo de análisis es de 15 minutos, en comparación a las otras proporciones en las cuales el tiempo de análisis puede llegar a ser de 30 minutos.

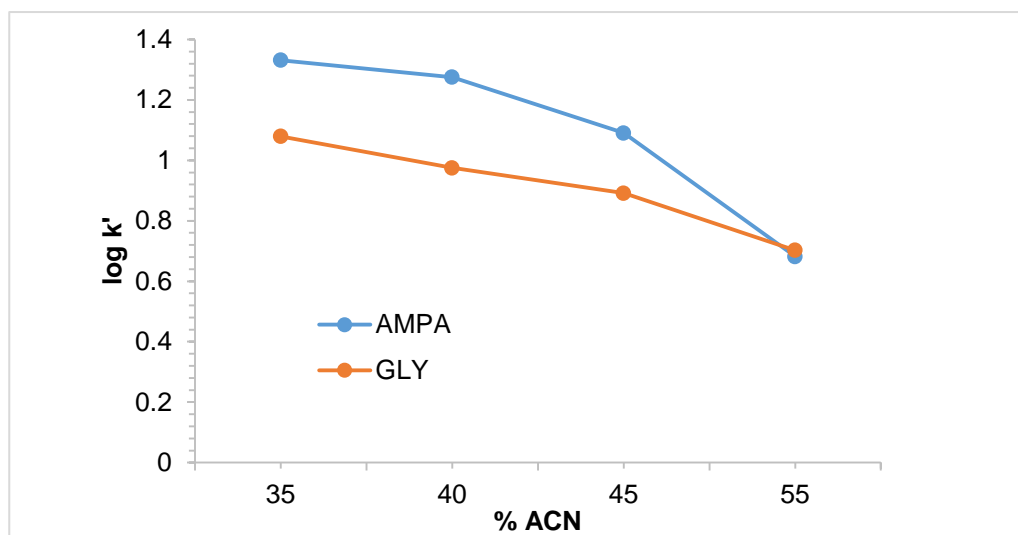


Figura 17. Curva de $\log k' = f(\%ACN)$ en la fase móvil (ACN:disolución de fosfatos)

7. Validación del método analítico

Se obtuvieron los siguientes parámetros de desempeño: intervalo lineal y de trabajo, sensibilidad analítica, precisión (repetibilidad y repetibilidad intermedia), exactitud (como recobro), límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC).

7.1 Linealidad y sensibilidad analítica

Para obtener estos parámetros se trazaron las curvas de calibración $Area = f(Concentración)$, en el caso del glifosato y AMPA se trabajó con un intervalo de concentraciones de 2-9 mg/L y para el glufosinato se trabajó con un intervalo de 1-8 mg/L. En las Figura 18, 19 y 20 se puede observar un comportamiento lineal de respuesta analítica en función de la concentración. Mediante un análisis de regresión lineal por el método de mínimos cuadrados, realizado en Excel, se obtuvieron los parámetros de regresión mostrados en la Tabla 21, donde los coeficientes de determinación (r^2) que se obtuvieron

fueron 0.997 para el glifosato, 0.9958 para el AMPA y 0.9953 para el glufosinato cumplen con el criterio de aceptación de $r^2 \geq 0.98$.

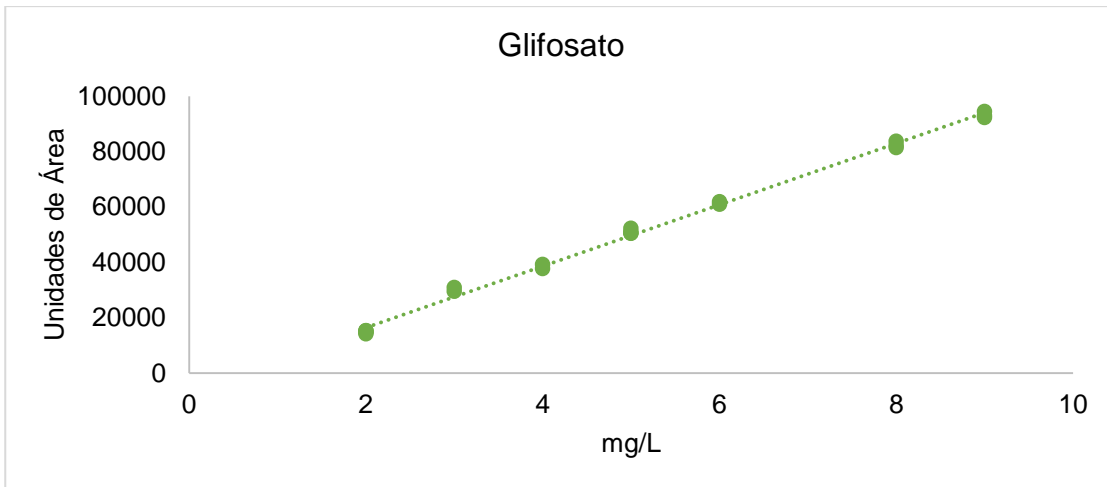


Figura 18 Curva de calibración promedio de glifosato

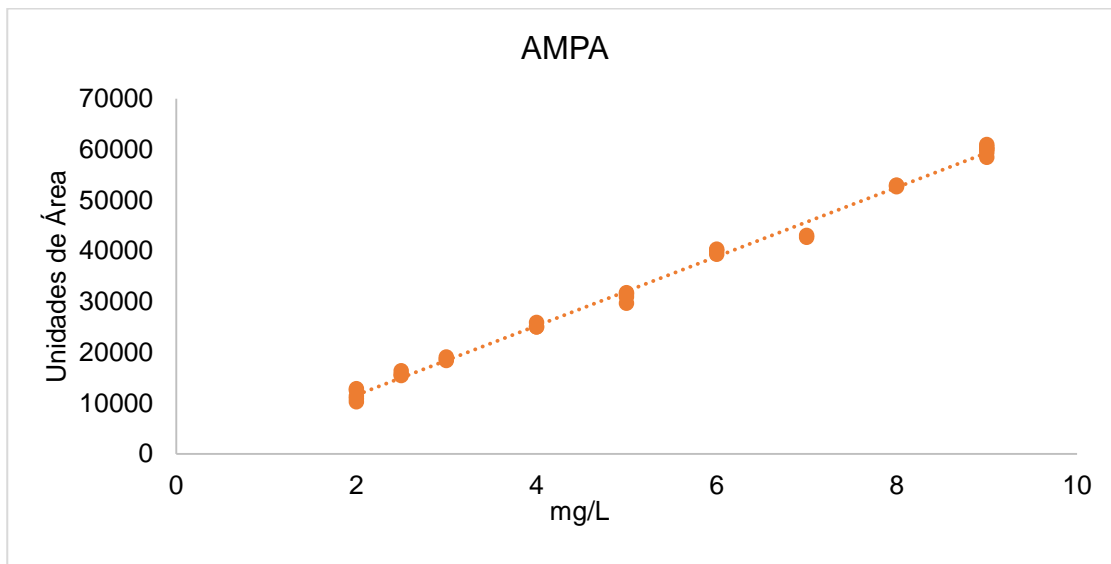


Figura 19 Curva de calibración promedio de AMPA

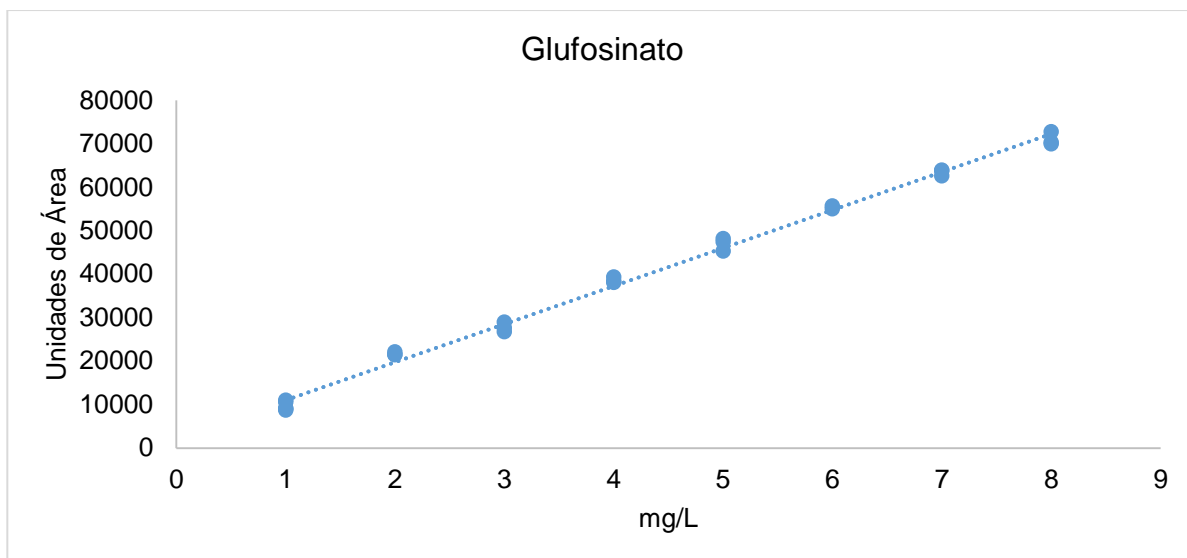


Figura 20 Curva de calibración promedio de glufosinato

Tabla 21 Estadística de regresión

Parámetro	Glifosato		AMPA		Glufosinato	
Intervalo lineal (mg/L)	2-9		2-9		1-8	
Centro de gravedad	<i>mg/L</i>	5	5		4	
	<i>Cuentas de Área</i>	50768	33868		38686	
Coefficiente de correlación r	0.9985		0.9979		0.9976	
Coefficiente de determinación r²	0.9970		0.9958		0.9953	
Intervalos de confianza al 95 %	Inferior	Superior	Inferior	Superior	Inferior	Superior
Sensibilidad Analítica (m, en mg/L)	10790	11374	6654	6985	8485	9006

7.2 Límites de detección y de cuantificación

Para calcular los límites de detección y de cuantificación se analizaron seis disoluciones independientes. Para el glifosato y el AMPA se trabajó con una concentración de 1 mg/L, mientras que para el glufosinato con una concentración de 0.5 mg/L. Los límites de detección y cuantificación para el

glifosato y AMPA se muestran en la Tabla 22 mientras que el límite de detección y cuantificación para el glufosinato se muestra en la Tabla 23.

Tabla 22 Límites de detección y cuantificación para el glifosato y AMPA

N	mg/L	AMPA Unidades de área	Glifosato Unidades de área
1	1.0	9826	9965
2	1.0	9863	9816
3	1.0	10004	9901
4	1.0	9739	9891
5	1.0	9732	9842
6	1.0	9729	9859
Media		9816	9879
s		107.89	52.46
DER		1.10	0.53
LD (mg/L)		0.093	0.074
LC (mg/L)		0.19	0.15

Tabla 23 Límite de detección y cuantificación para el glufosinato

N	mg/L	Glufosinato Unidades de área
1	0.5	4005
2	0.5	4022
3	0.5	4036
4	0.5	4021
5	0.5	4054
6	0.5	4055
Media		4032
s		19.89
DER		0.49
LD (mg/L)		0.0068
LC (mg/L)		0.014

Como criterios de aceptación se estableció que el límite de detección debe ser menor al límite de cuantificación como se puede observar en la Tabla 24 se puede observar que ambos límites cumplen con el criterio establecido que el LC deber menor que la concentración más baja del intervalo lineal y el LD más bajo que el LC.

Tabla 24 Límites de detección y límites de cuantificación

	Glifosato	AMPA	Glufosinato
LD (mg/L)	0.074	0.093	0.0068
LC mg/L	0.15	0.19	0.014

7.3 Precisión y veracidad

La repetibilidad y veracidad (como recobro) fueron evaluadas a partir de los resultados del análisis de 6 disoluciones estándar de glifosato, ácido aminometilfosfónico (AMPA) y glufosinato a 5 mg/L. A partir de los resultados se calculó la desviación estándar relativa y el porcentaje de recobro. En la Tabla 25 se muestran los resultados para glifosato en la Tabla 26 para el AMPA y en la 27 para el glufosinato.

Los criterios de aceptación que se establecieron son los siguientes:

Recobro de $100 \pm 15 \%$ con un DER $\leq 2\%$ y

Repetibilidad DER $\leq 2\%$

Repetibilidad intermedia DER $\leq 2\%$

Tabla 25 Precisión y recobro en glifosato

N	mg/L	Día 1		Día 2		Día 3	
		mg/L	Recobro (%)	mg/L	Recobro (%)	mg/L	Recobro (%)
1	5.0	5.2	104.3	5.1	101.4	5.2	103.6
2	5.0	5.0	100.6	5.1	101.5	5.1	101.5
3	5.0	5.2	104.9	5.1	102.5	5.1	102.8
4	5.0	5.0	100.9	5.2	104.6	5.1	102.4
5	5.0	5.2	103.7	5.0	100.8	5.2	104.2
6	5.0	5.2	103.5	5.0	100.8	5.2	104.6
Media mg/L		5.1	103.0	5.1	101.9	5.2	103.2
s		0.1	1.8	0.1	1.5	0.1	1.2
DER		1.8	1.8	1.4	1.4	1.2	1.2
<i>Repetibilidad Intermedia (estadísticos de los tres días)</i>							
Media mg/L		102.7					
s		1.5					
DER		1.5					

En el caso de glifosato se obtuvo un recobro cercano al 100 % en los tres días de análisis y una DER intermedia ≤ 2 % de 1.5% por lo cual podemos decir que la metodología empleada para la detección de este analito es precisa y exacta y repetible al cumplir con los criterios de aceptación referidos.

Tabla 26 Precisión y recobro en ácido aminometilfosfónico (AMPA)

N	mg/L	Día 1		Día 2		Día 3	
		mg/L	Recobro (%)	mg/L	Recobro (%)	mg/L	Recobro (%)
1	5.0	4.3	85.0	4.4	87.8	4.3	85.9
2	5.0	4.1	82.2	4.1	82.8	4.2	84.9
3	5.0	4.3	86.2	4.3	85.0	4.3	86.0
4	5.0	4.1	82.5	4.3	85.6	4.3	86.7
5	5.0	4.3	85.1	4.3	86.2	4.3	85.1
6	5.0	4.3	85.6	4.3	85.8	4.3	85.8
Media mg/L		4.2	84.4	4.3	85.5	4.3	85.7
s		0.1	1.7	0.1	1.6	0.03	0.7
DER		2.0	2.0	1.9	1.9	0.8	0.8
<i>Repetibilidad Intermedia (estadísticos de los tres días)</i>							
Media mg/L				85.2			
s				1.4			
DER				1.7			

En el caso del AMPA se obtuvo un recobro cercano al 85 % en los tres días de análisis y una DER intermedia ≤ 2 % de 1.7 % por lo cual podemos decir que la metodología empleada para la detección de este analito es exacta y repetible al cumplir con los criterios de aceptación referidos.

En el caso de glufosinato se obtuvo un recobro cercano al 105 % en los tres días de análisis y una DER intermedia ≤ 2 % de 1.7 % por lo cual podemos decir que la metodología empleada para la detección de este analito es precisa y exacta al cumplir con los criterios de aceptación referidos, ver Tabla 27.

Tabla 27 Precisión y recobro en glufosinato

N	mg/L	Día 1		Día 2		Día 3	
		mg/L	Recobro (%)	mg/L	Recobro (%)	mg/L	Recobro (%)
1	5.0	5.3	105.1	5.2	103.6	5.3	106.0
2	5.0	5.3	105.2	5.2	104.0	5.3	106.5
3	5.0	5.3	105.9	5.3	105.2	5.3	106.7
4	5.0	5.1	101.1	5.2	103.7	5.3	106.4
5	5.0	5.2	104.2	5.2	103.7	5.3	106.2
6	5.0	5.3	106.9	5.3	106.2	5.4	108.7
Media mg/L		5.2	104.7	5.2	104.4	5.3	106.7
s		0.1	2.0	0.1	1.0	0.1	1.0
DER		1.9	1.9	1.0	1.0	0.9	0.9
<i>Repetibilidad Intermedia (estadísticos de los tres días)</i>							
Media mg/L				105.2			
s				1.8			
DER				1.7			

7.4 Confirmación en matriz

Para la confirmación de matriz se fortificó por triplicado, una muestra de suelo con una disolución de una mezcla de glifosato, AMPA y glufosinato, a 3 niveles de concentración: 4, 11 y 22 mg de cada plaguicida por kg de suelo, respectivamente, a las cuales se les aplicó el método de extracción descrito en la sección experimental, este análisis. El análisis de los extractos para la determinación de los analitos se llevó a cabo por CLAR, para obtener el porcentaje de recobro y la precisión asociada, y así evaluar el procedimiento de extracción para la cuantificación de los analitos. Se establecieron los siguientes criterios de aceptación:

Recobro 100 ± 20 % con una DER ≤ 20 %.

Se trazó la curva *Cantidad adicionada vs Cantidad recuperada*, Figuras 21, 22 y 23. En la Tabla 28 se presentan los estadísticos de regresión. Los criterios de aceptación establecidos fueron de

$$r^2 > 0.98$$

Intervalo de confianza de la pendiente incluya la unidad.

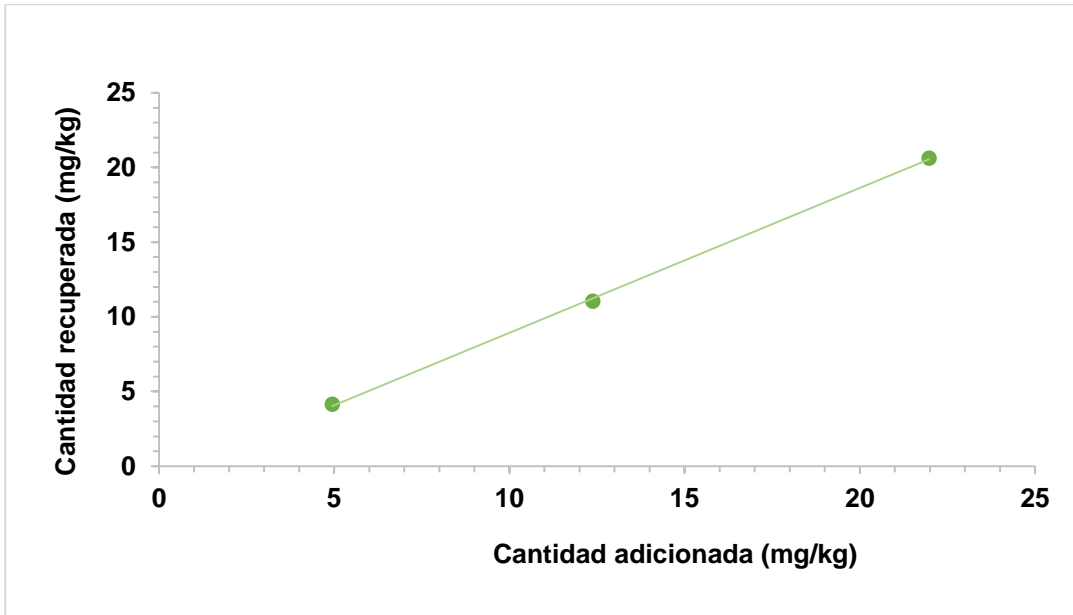


Figura 21. Curva Cantidad adicionada vs Cantidad recuperada, glifosato

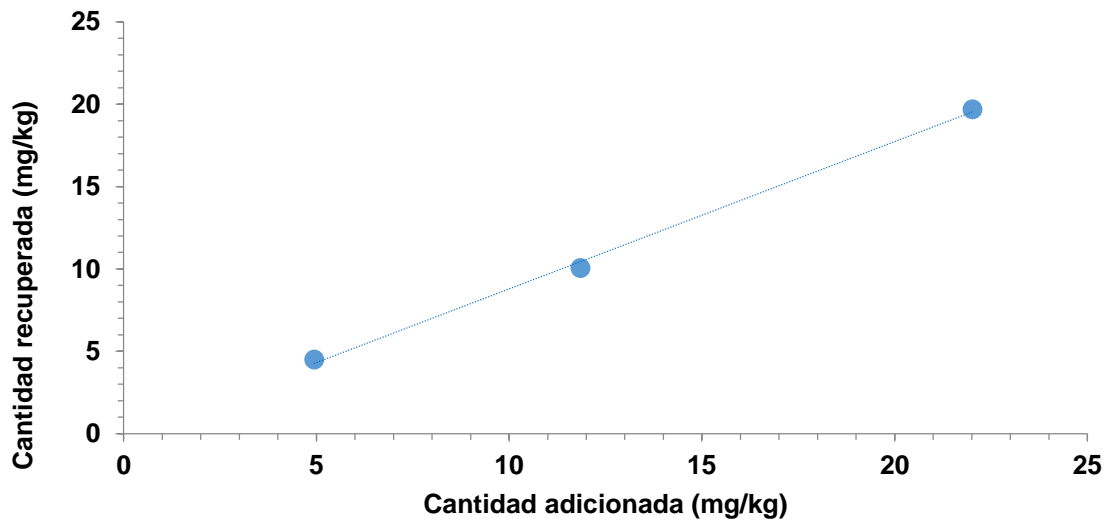


Figura 22. Curva Cantidad adicionada vs Cantidad recuperada, AMPA

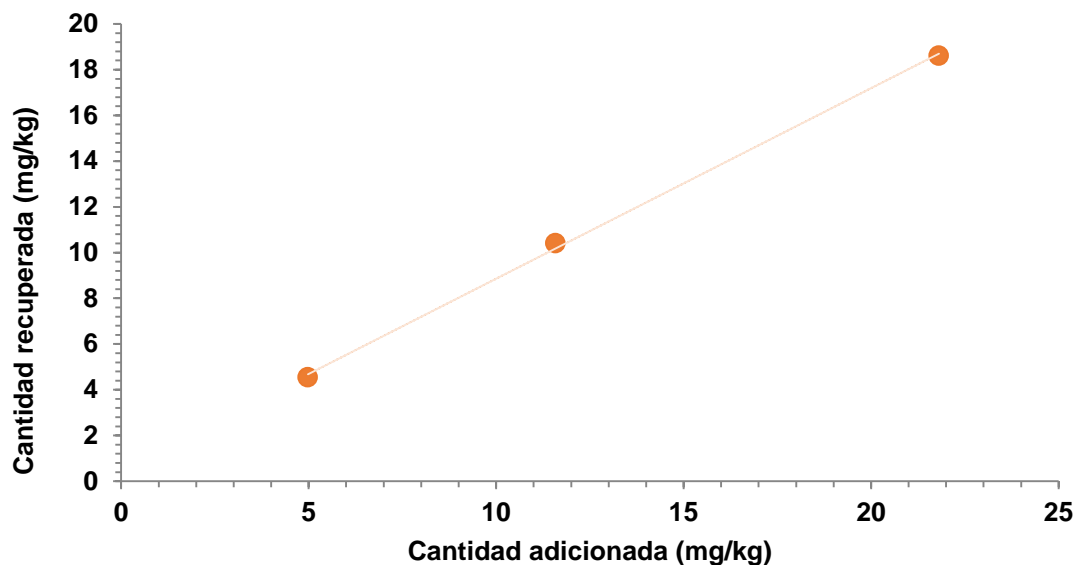


Figura 23 Curva Cantidad adicionada vs Cantidad recuperada, glufosinato

Tabla 28. Estadísticos de Cantidad adicionada vs Cantidad recuperada

Parámetro	Glifosato		AMPA		Glufusinato	
Intervalo de concentraciones (mg/kg)	4-22					
Coefficiente de correlación r	0.9996		0.9990		0.9995	
Coefficiente de determinación r ²	0.99992		0.9981		0.9991	
Pendiente	0.98		0.90		0.83	
Intervalos de confianza al 95 % de la pendiente	Inferior	Superior	Inferior	Superior	Inferior	Superior
	0.51	1.44	0.40	1.39	0.53	1.13

A partir de los resultados anteriores se puede concluir que el para la determinación de glifosato, AMPA y glufusinato el método queda confirmado en la matriz.

7.5 Resumen de los parámetros de desempeño

Se obtuvieron los siguientes parámetros de desempeño: intervalo lineal, sensibilidad analítica, precisión (repetibilidad y reproducibilidad), exactitud (como recobro), límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC).

En la Tabla 29 se presentan los parámetros de desempeño obtenidos de la validación para glifosato, AMPA y glufosinato, respectivamente.

Tabla 29. Resultados de los parámetros de desempeño los compuestos de estudio

Parámetro	Glifosato	AMPA	Glufosinato
λ (nm)	220		
IL (mg /L)	2-9	2-9	1-8
Sensibilidad analítica	11082	6820	8746
r^2	0.997	0.9958	0.9953
LD (mg/L)	0.074	0.093	0.0068
LC (mg/L)	0.15	0.19	0.014
% Recobro	100.8	85.7	104.4
Repetibilidad DER (%)	1.2	0.8	0.9
Reproducibilidad DER (%)	1.5	1.7	1.7

De manera general con los parámetros de desempeño obtenidos de acuerdo a lo descrito en la sección experimental para glifosato, AMPA y glufosinato mostrados en las tablas anteriores, se concluye que el método empleado para la detección y cuantificación de estos plaguicidas es confiable debido a que tienen valores que cumplen con los criterios de aceptación.

8. Aplicación a muestras ambientales

El muestreo se realizó en el mes de octubre del 2016 en las cercanías de la región de Molango, situado al norte del estado de Hidalgo, a una altitud sobre el nivel del mar de 1,612 m, además cuenta con ríos, arroyos y manantiales. Esta región se caracteriza por enormes montañas y profundas barrancas, tupida vegetación. Presenta un clima templado, con lluvias regulares y precipitaciones con un promedio anual de 1,438 mm, con temperatura de

17°C, por lo que presenta un clima semi-cálido y semi-frío. Se tiene para uso agrícola 6,625 has., con 8,231 de bosques o selva, 221 de pastos naturales. Uno de los principales sectores de actividad económica es la agricultura; los cultivos son comúnmente los siguientes: Maíz, frijol, café, arvejón, chile, tomate, aguacate, naranja, limón, durazno y chabacano (Gobierno del Estado de Hidalgo, 2016). Los puntos de recolección se presentan en el mapa de la Figura 22.

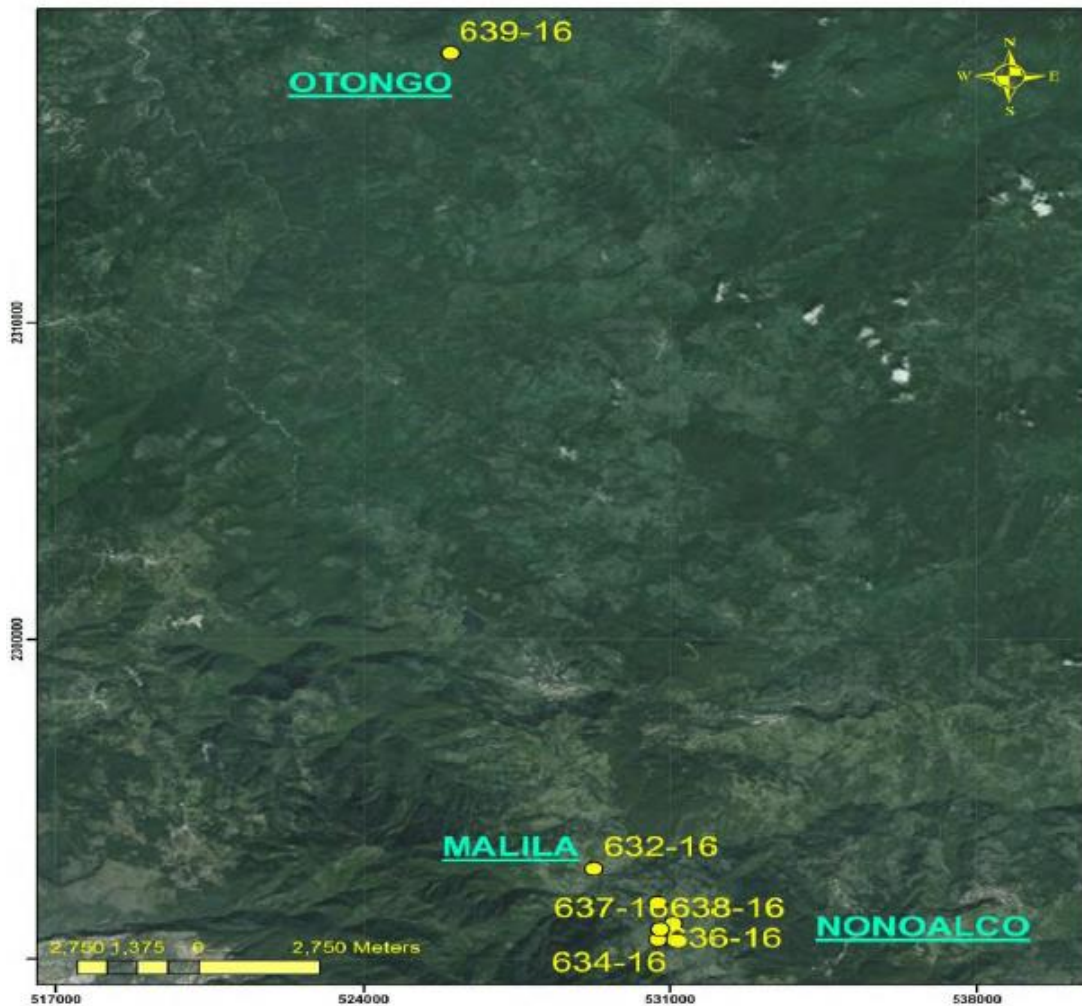


Figura 22 Mapa de los sitios de muestreo

Se analizaron muestras de suelo de la región de Molango donde se sospecha la aplicación reciente de los herbicidas de estudio. En la Tabla 30 se presentan los resultados de la aplicación del método propuesto a las muestras, como se puede observar en las muestras analizadas solo se encontró en las muestras de suelo la presencia de AMPA y de glufosinato. No se detectó glifosato esto debido a que es un herbicida no residual que se degradan fácilmente del suelo, con semividas estimadas que van de 4,2 días en agua corriente y la degradación lenta está asociada con la presencia de microorganismos en fase acuosa (Vera, y otros, 2001). Sin embargo, se detectó ácido aminometilfosfónico (AMPA), el metabolito principal de glifosato (Sancho, y otros, 1996). Ver Figura 24 y 25.

Tabla 30. Concentración de los analitos en las muestras de suelo

Clave LABQA	Glifosato [mg/kg]	AMPA [mg/kg]	Glufosinato [mg/kg]
628-16	ND	ND	3.59
629-16	ND	ND	ND
630-16	ND	ND	ND
631-16	ND	ND	2.40
632-16	ND	10.90	4.61
633-16	ND	40.86	ND
634-16	ND	4.18	3.94
635-16	ND	ND	ND
636-16	ND	ND	ND
637-16	ND	50.09	26.91
638-16	ND	108.26	29.02
639-16	ND	35.12	24.47

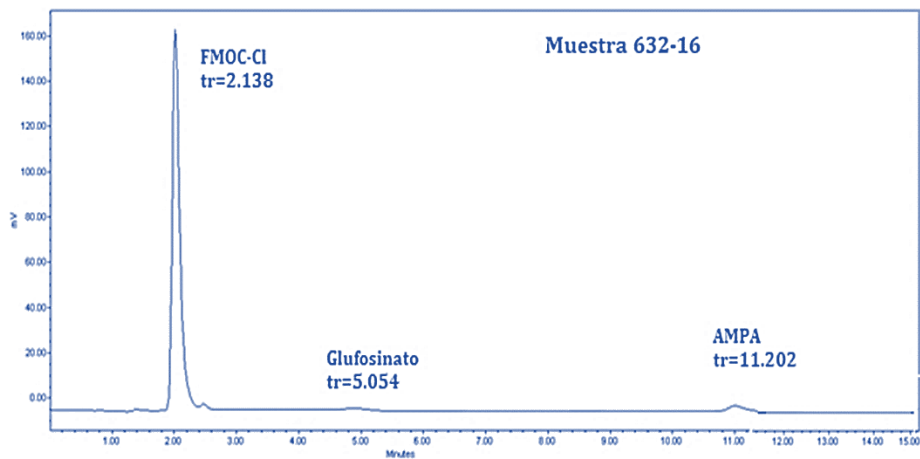


Figura 24. Cromatograma de la Muestra ambiental 632-16

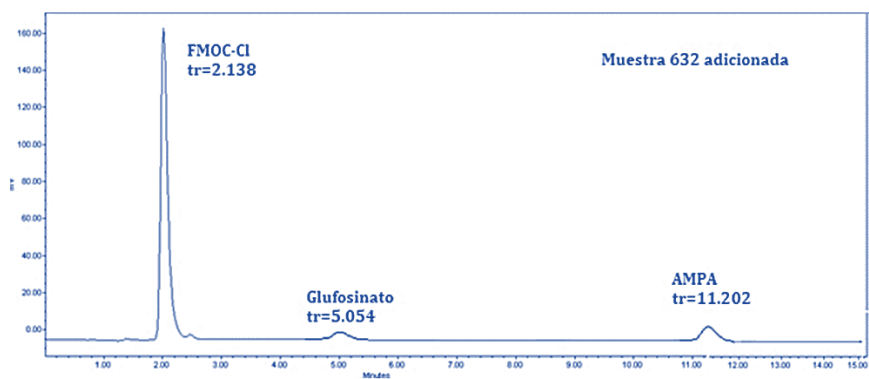


Figura 25. Cromatograma de la Muestra ambiental 632-16 adicionada

IV. Conclusiones

Los parámetros de desempeño obtenidos en la validación del método de análisis utilizado en la determinación de plaguicidas en matrices ambientales, garantizan que este es apto para el fin propuesto debido a que los parámetros se encuentran entre los valores recomendados para un método analítico.

Una vez validado el método analítico se trabajó con muestras de suelo que fueron tomadas en varias poblaciones de Molango Hidalgo, esto con la finalidad de determinar las concentraciones de glifosato, AMPA y glufosinato.

En las muestras analizadas se encontraron concentraciones de AMPA en un intervalo de (4.18-108.26) mg/kg. El AMPA es el metabolito principal de glifosato.

En las muestras analizadas se encontraron concentraciones de glufosinato en un intervalo de (2.40-29.02) mg/kg.

V. Bibliografía

- Arellano, O., & Rendon, J. (13 de Septiembre de 2017). *La huella de los plaguicidas en México*. Obtenido de Greenpeace.: http://www.greenpeace.org/mexico/Global/mexico/Graficos/2016/comida-sana/Plaguicidas_en_agua_ok_EM.pdf
- Arellano-Aguilar, O., & Rendón von Osten, J. (12 de Marzo de 2016). *Greenpeace*. Obtenido de LA HUELLA DE LOS PLAGUICIDAS EN MÉXICO: http://m.greenpeace.org/mexico/Global/mexico/Graficos/2016/comida-sana/Plaguicidas_en_agua_ok_EM.pdf
- Baez , M., Fuentes, E., Espina, M., & Espinoza, J. (2014). Determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in aqueous soil matrices: A critical analysis of the 9-fluorenylmethyl chloroformate derivatization reaction and application to adsorption studies. *J. Sep. Sci.*, 3125–3132.
- Bayer CropScience. (13 de Septiembre de 2017). *Facts about GA*. Obtenido de ¿Dónde se utiliza el glufosinato de amonio?: <https://www.glufosinate-ammonium.com/es-ES/Basics/Where-is-Glufosinate-ammonium-used.aspx>
- Baylis, A. (2000). Why glyphosate is a global herbicide: strengths, weaknesses and prospects. *Pest Manag Sci* 56, 299-308.
- Benbrook, C. (2016). Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. *Benbrook Environ Sci Eur* 28:3, 2-15.
- Benbrook, C. (2016). Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. *Environmental Sciences Europe*, 28(3).
- Bijman, J. (12 de Septiembre de 2017). *AgrEvo: From Crop Protection To Crop Production*. Obtenido de <http://www.agbioforum.org/v4n1/v4n1a04-bijman.htm>

- Borggaard , O. K., & Gimsing, A. L. (2008). Fate of glyphosate in soil and the possibility of leaching to ground and surface waters: a review. *Pest Manag Sci* 64, 441–456.
- Buffin , D., & Jewell , T. (11 de Septiembre de 2017). *Friends of the Earth*. Obtenido de Health and environmental impacts of glyphosate: The implications of increased use of glyphosate in association with genetically modified crops: https://friendsoftheearth.uk/sites/default/files/downloads/impacts_glyphosate.pdf
- CENAM. (2008). *Guía técnica sobre trazabilidad e incertidumbre en las mediciones analíticas que emplean las técnicas de cromatografía de gases (CG) y cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR)*. México: CENAM.
- CENAM. (2008). GUÍA TÉCNICA SOBRE TRAZABILIDAD E INCERTIDUMBRE EN LAS MEDICIONES ANALÍTICAS QUE EMPLEAN LAS TÉCNICAS DE CROMATOGRFÍA DE GASES (CG) Y CROMATOGRFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR). En CENAM.
- Cerdeira, A., Gazziero , D., Duke , S., & Matallo , M. (2011). Agricultural impacts of glyphosate-resistant soybean cultivation in South America. *Agric Food Chem* 59, 5799–5807.
- Chamkasem, N., & Harmon, T. (2016). Direct determination of glyphosate, glufosinate, and AMPA in soybean and corn by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*.
- COFEPRIS. (2016). *Catálogo oficial de plaguicidas*. Obtenido de <http://www.cofepris.gob.mx/AZ/Paginas/Plaguicidas%20y%20Fertilizantes/CatalogoPlaguicidas.aspx>
- Colegio Nacional de QFB. (2001). *Guía de validación de métodos analíticos*. D.F: Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos.

- Cox, C. (1995). Glyphosate, Part 1: Toxicology. *Journal of Pesticide Reform*, Volume 15, Number 3, 14-20.
- Cox, C. (1996). Herbicide fact sheet—glufosinate. *Journal of Pesticide Reform*, Winter 1996, V. 16, No. 4, 15-19.
- Dill, G., Sammons , R., Feng , P., Kohn , F., Kretzmer , K., Kohn, F., . . .
 Hauptfear, E. (2010). Chapter 1: Glyphosate resistance in crops and weeds: history, development, and management. En *Glyphosate Resistance in Crops and Weeds: History, Development, and Management* (págs. 1–33). New York: Wiley.
- Druart, C., Delhomme, O., Vaufleury, A., Ntcho, E., & Millet, M. (2011). Optimization of extraction procedure and chromatographic separation of glyphosate, glufosinate and aminomethylphosphonic acid in soil. *Anal Bioanal Chem*, 1725–1732.
- Duke, S. (2014). Perspectives on transgenic, herbicide-resistant crops in the USA almost 20 years after introduction. *Pest Manag Sci* 71(5), 652–657. doi:10.1002/ps.3863
- Duke, S. (2017). *The history and current status of glyphosate*.
- Duke, S. O. (2014). Perspectives on transgenic, herbicide-resistant crops in the USA almost 20 years after introduction. *Pest Manag Sci* 71(5), 652–657. doi:10.1002/ps.3863
- Duke, S. O. (2017). The history and current status of glyphosate. *Pest Manag Sci*.
- Duke, S. O., & Powles, S. B. (2008). Mini-review Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. *Pest Manag Sci* 64, 319–325. doi:10.1002/ps.1518
- Edward D. Harris, P. (07 de Septiembre de 2017). *Biochemical Facts behind the Definition and Properties of METABOLITES*. Obtenido de Biochemical Facts behind the Definition and Properties of METABOLITES:

https://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/03/briefing/3942b1_08_Harris%20Paper.pdf

Eker , S., Ozturk , L., Yazici , A., Erenoglu , B., & Romheld , V. (2006). Foliarapplied glyphosate substantially reduced uptake and transport of iron and manganese in sunflower (*Helianthus annuus* L.) plants. *J Ag Food Chem* 54(26), 10019–10025.

EURACHEM. (2014). Guía de Laboratorio para la Validación de Métodos y Temáticas Relacionadas. 1-59.

Facts about GA, . (12 de Octubre de 2017). *¿Dónde se utiliza el glufosinato de amonio?* Obtenido de <https://www.glufosinate-ammonium.com/es-ES/Basics/Where-is-Glufosinate-ammonium-used.aspx>

FAOSTAT. (13 de Septiembre de 2017). *Pesticides Use*. Obtenido de <http://www.fao.org/faostat/en/#data/RP/visualize>

Food and Agriculture Organization , o. (11 de Octubre de 2017). *Guidelines on Good Labelling Practice for Pesticides*. Obtenido de http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/Code/Old_guidelines/label.pdf

Gaines, T., Zhang, W., Wang, D., Bukun, B., Chisholm, S., Shaner, D., . . . Westra, P. (2010). Gene amplification confers glyphosate resistance in *Amaranthus palmeri*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1029–1034.

Giesy, J. P., Dobson, S., & Solomon, K. R. (2000). Ecotoxicological risk assessment for Roundup herbicide. *Environmental Contamination and Toxicology*. 167, 35-120.

Gobierno del Estado de Hidalgo. (2016). Recuperado el 06 de agosto de 2017, de <http://siieh.hidalgo.gob.mx/files/molango.pdf>

Grandcoin, A., Piel, S., & Baures, E. (2017). AminoMethylPhosphonic acid (AMPA) in natural waters: Its sources, behavior and environmental fate. *Water Research*. doi:10.1016/j.watres.2017.03.055

- Hanke, I., Singer, H., & Hollender, J. (2008). Ultratrace-level determination of glyphosate, aminomethylphosphonic acid and glufosinate in natural waters by solid-phase extraction followed by liquid chromatography–tandem mass spectrometry: performance tuning of derivatization, enrichment and detection. *Anal Bioanal Chem*, 2265-2266.
- Heap, I. (2014). Global perspective of herbicide-resistant weeds. *Pest Manag Sci* 70, 1306–1315.
- Heap, I. (2014). Global perspective of herbicide-resistant weeds. *Pest management science*, 70(9), 1306-1315.
- Hidalgo, G. d. (2016). Recuperado el 06 de agosto de 2017, de <http://siieh.hidalgo.gob.mx/files/molango.pdf>
- Hiroiyuki , K., Sunhi , R., Norihisa, S., & Masami , 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. *Journal of Chromatography A*, 253-258.
- Ibáñez , M., Pozo , O., Sancho , J., López , F., & Hernández, F. (2005). Residue determination of glyphosate, glufosinate and aminomethylphosphonic acid in water and soil samples by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry. *ELSEVIER*, 145–155.
- Islas, G. (2013). *DETERMINACIÓN DE GLIFOSATO Y ÁCIDO AMINOMETILFOSFÓNICO EN SUELOS MEDIANTE HPLC CON DERIVATIZACIÓN PRE-COLUMNA*. PACHUCA DE SOTO HIDALGO: UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO.
- ISO 8402. (1994).
- IUPAC. (13 de Septiembre de 2017). *global availability of information on agrochemicals*. Obtenido de <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/Reports/842.htm>

- Jayasumana, C., Gunatilake, S., & Senanayake, P. (2014). Glyphosate, Hard Water and Nephrotoxic Metals: Are They the Culprits Behind the Epidemic of Chronic Kidney Disease of Unknown Etiology in Sri Lanka? *Int. J. Environ. Res. Public Health* , 11(2), 2125-2147.
- Jewell, T., & Buffin, D. (11 de septiembre de 2017). *Health and environmental impacts of glufosinate ammonium*. Obtenido de Friends of the Earth: https://www.foe.co.uk/sites/default/files/downloads/impacts_glufosinate_ammon.pdf
- Klaassen, C., Watkins, J., Casasertt, & Dull . (1999). *Manual de Toxicología*. México: Ed Mc Graw-Hill.
- Ley General de Salud. (2003). *Ley General de Salud*. Obtenido de http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/legis/lgs/LEY_GENERAL_DE_SALUD.pdf
- Lupi, L., Miglioranza, K., Aparicio , V., Marino, D., Bedmar, F., & Wunderlin, D. (2015). Occurrence of glyphosate and AMPA in an agricultural watershed from the southeastern region of Argentina. *Science of the Total Environment* 536, 687-694.
- MacLachlan, D. (11 de Septiembre de 2017). *GLUFOSINATE AMMONIUM (175)*. Obtenido de Glufosinate ammonium.
- Meyer, M., Loftin, K., Lee, E., Hinshaw, G., Dietze, J., & Scribner, E. (2009). Determination of Glyphosate, its Degradation Product Aminomethylphosphonic Acid, and Glufosinate, in Water by Isotope Dilution and Online Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. *U.S. Geological Survey, Reston, Virginia*, 1-44.
- MIP. (1999). *Report of the OECD/FAO workshop on integrated pest management and pesticide risk reduction. ENV/JM/MONO(99)7*.

- Monsanto. (2016). *Monsanto*. Recuperado el 06 de 03 de 2017, de <http://www.monsanto.com/global/ar/productos/pages/el-glifosato-y-los-herbicidas-roundup.aspx>
- Monsanto Company. (11 de Septiembre de 2017). *Lawsuit Involving Roundup Ready Alfalfa*. Obtenido de <http://www.monsanto.com/newsviews/pages/roundup-ready-alfalfasupreme->
- Monsanto Global. (12 de Septiembre de 2017). *Acerca del Glifosato*. Obtenido de <http://www.monsantoglobal.com/global/ar/noticias-y-opiniones/pages/acerca-del-glifosato.aspx>
- Mortensen. (2012). Navigating a critical juncture for sustainable weed management. *Bioscience* 62, 75–84.
- Mortensen, D. A., Egan, J. F., Maxwell, B. D., & Ryan, M. R. (2012). Navigating a critical juncture for sustainable weed management. *Bioscience* 62, 75–84.
- Nelson, D., & Cox, M. (2005). *Principios de bioquímica*. 4ª.ed. S.A. . Barcelona. España: OMEGA.
- OMS. (marzo de 2010). *Código Internacional de Conducta sobre la Distribución y Utilización de Plaguicidas*. Recuperado el 14 de agosto de 2017, de http://www.who.int/whopes/recommendations/Guidelines_pesticide_advertising_Spa.pdf?ua=1
- OPS. (2016). Recuperado el 20 de Abril de 2017, de <http://publicaciones.ops.org.ar/publicaciones/publicaciones%20virtuales/proyectoPlaguicidas/pdfs/anexoB.pdf>
- OPS. (s.f.). Anexo B: Clasificación Toxicológica de los Plaguicidas.
- Ossendrijver, F. M., Dijkman, E., & Baumann, R. (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. *Journal Chromatography A*. 833, 67-73.

Owen , M., Beckie, H., Leeson , J., Norsworthy, J., & Steckel, L. (2014). Integrated pest management and weed management in the United States and Canada. *Pest Manag Sci* 71(3), 357–376. doi:10.1002/ps.3928

Pastrana Cervantes, D. (13 de Septiembre de 2017). *Glyphosate and AMPA concentrations in two types of agroecosystems and in the natural vegetation of Hopelchen, Mexico*. Obtenido de WAGENINGENUR: <http://edepot.wur.nl/406379>

Peruzzo, P., Porta, A., & Ronco, A. (2008). Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina. *Environmental Pollution* 156, 61-66.

Powles, S. (2008). Evolved glyphosate-resistant weeds around the world: lessons to be learnt. *Pest Manag Sci* 64, 360–365. doi:10.1002/ps.1525

PubChem. (10 de Octubre de 2017). *Liberty*. Obtenido de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/53597#section=Top>

PubChem. (04 de septiembre de 2017). *PubChem*. Obtenido de Glyphosate: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/glyphosate#section=Top>

Ramírez, L. (2006). EL CICLO ESTRAL Y MENSTRUAL. *Mundo Pecuario*, Vol. II, Nº 2,, 30-31.

Rasche , E., Cremer, J., Donn, G., & Zink, J. (1995). The Development of Glufosinate Ammonium Tolerant Crops into the Market. In Brighton Crop Protection Conference, Weeds. *British Crop Protection Council, Farnham, Surrey*.

Ravelo, L. M. (2017 de Octubre de 2017). *Metodologías analíticas alternativas para la determinación de plaguicidas en aguas y productos agroalimentarios*. Obtenido de <ftp://tesis.bbt.ull.es/ccppytec/cp582.pdf>

- Rojo Callejas , F. (2018 de Marzo de 2018). *Cromatografía (Definiciones)*.
- Salazar López , N., & Aldana Madrid, M. (2011). Herbicida glifosato: Usos, toxicidad y regulación. *Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud*, XIII(2), 23-28.
- Sancho, J., Hernández , F., López, F., Dijkman, E., Hogendoorn, E., & Zoonen, P. (1996). Rapid determination of glufosinate, glyphosate and aminomethylphosphonic acid in environmental water samples using precolumn fluorogenic labeling and coupled-column liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 75-83.
- Schuette, J. (12 de Octubre de 2017). *Environmental of Fate Glyphosate*.
Obtenido de <http://www.cdpr.ca.gov/docs/emon/pubs/fatememo/glyphos.pdf>
- Scribner, E., Battaglin, W., Gilliom, R., & Meyer, M. (2001). Concentrations of Glyphosate, Its Degradation Product, Aminomethylphosphonic Acid, and Glufosinate in Ground- and Surface-Water, Rainfall, and Soil Samples Collected in the United States, 2001–06. *Scientific Investigations Report 2007–5122 Concentrations*, 1-121.
- Service, U. S. (13 de Septiembre de 2017). *Agricultural chemical usage field crops and potatoes*. Obtenido de <http://usda.mannlib.cornell.edu/MannUsda/viewDocumentInfo.do?documentID=1560>
- Skoog, D. (2008). *Principios de análisis instrumental* (Sexta Edición ed.). CENGAGE Learning.
- Sprankle, P., Meggitt, W., & Penner, D. (1975). *Adsorption, mobility and microbial degradation of glyphosate in the soil*. *Weed Sci.* 23.
- Stalikas, C., & Konidari , C. (2001). Analytical methods to determine phosphonic and amino acidgroup-containing pesticides. *J. Chromatogr. A* 907, 1-19.

- Steinrucken , H. C., & Amrhein , N. (1980). The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvyl shikimate acid-3-phosphate synthase. *Biochim Biophys Res Commun* 94, 1207–1212.
- Tejidos meristemáticos. (2017 de Octubre de 2017). Obtenido de <http://www.biologia.buap.mx/paleo/Vegetal/meristemas.pdf>
- United States Department of Agriculture. (12 de Septiembre de 2017). *nited States Department of Agriculture*. Obtenido de <http://usda.mannlib.cornell.edu/MannUsda/viewDocumentInfo>.
- Vera, M., Lagomarsino, L., Sylvester , M., Pérez, G., Rodríguez , P., Mugni, H., . . . Pizarro, H. (2001). *Ecotoxicology* 19, 710–721.
- WHO. (2009). *The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification 2009*. Germany: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH.
- William, G. M., Kroes, R., & Munro, I. C. (2000). Safety evaluation and risk assessment of herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 31, 117-165.
- You, J., & Koropchak, J. A. (2003). Condensation nucleation light scattering detection with ion chromatography for direct determination of glyphosate and its metabolite in water. *Journal of Chromatography A*, 989, 231–238.

Anexo A. Cromatografía de líquidos de alta resolución

La cromatografía de líquidos es la técnica analítica de separación más ampliamente utilizada. Las razones de su popularidad son su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para automatizarla, su capacidad para separar especies no volátiles o termolábiles, pero, sobre todo, su amplia aplicabilidad a sustancias que son importantes en la industria, muchos campos de la ciencia y para la sociedad en general. Algunos ejemplos de estos materiales son aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, hidrocarburos, carbohidratos, fármacos, terpenoides, plaguicidas, antibióticos, esteroides, especies organometálicas y una variedad de sustancias inorgánicas (Skoog, 2008), Tabla A.

Tabla A. Rellenos de fase normal y de fase inversa

	Fase Normal	Fase Inversa
Fase Móvil	Un disolvente relativamente no polar, como el hexano o el isopropiléter.	Un disolvente relativamente polar, como agua, metanol, acetonitrilo o tetrahidrofurano.
Elución de componentes	El componente menos polar se eluye primero; al aumentar la polaridad de la fase móvil ocasiona una disminución del tiempo de elución.	Los componentes más polares aparecen primero y un aumento de la polaridad de la fase móvil incrementa el tiempo de elución.
Retención	En la mayoría de los tipos de cromatografía en fase normal parece estar regida por procesos de desplazamiento de la adsorción.	Los rellenos de fase unida químicamente se llaman de fase inversa cuando el revestimiento enlazado tiene un carácter no polar, y de fase normal cuando el revestimiento contiene grupos funcionales polares.

Elaboración propia a partir de la información encontrada en (Skoog, 2008)

Se calcula que tal vez más de las tres cuartas partes de todas las separaciones mediante cromatografía de líquidos de alta resolución se llevan a cabo en la actualidad en columnas con rellenos de fase inversa. La principal ventaja de las separaciones en fase inversa es que el agua se puede utilizar

como fase móvil. El agua es barata, no tóxica, es un solvente transparente a la radiación UV y compatible con los solutos biológicos. Asimismo, la transferencia de masas es rápida con fases estacionarias no polares, como el equilibrio de solvente después de la elución con gradiente. Lo más común es que el grupo R del siloxano en estos revestimientos sea una cadena C8 (n-octilo) o una cadena C18 (n-octildecilo) (Skoog, 2008).

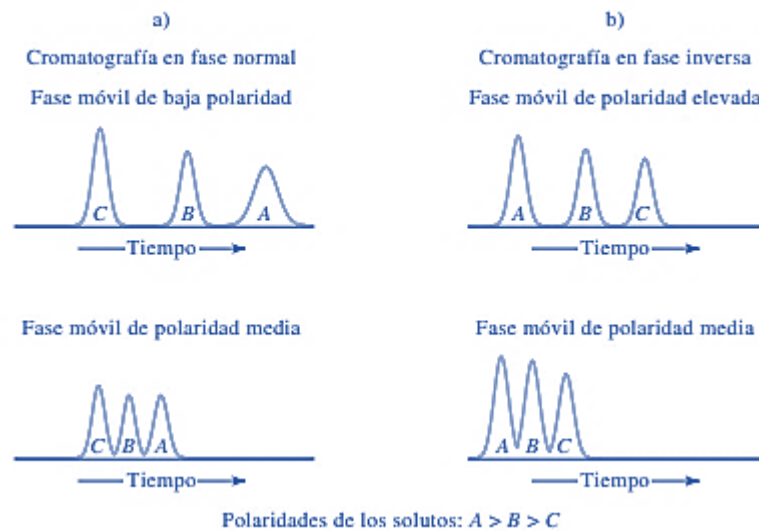


Figura A.1 Relación entre la polaridad y los tiempos de elución en cromatografía en fase normal y en fase inversa. Tomada de (Skoog, 2008)

Parámetros cromatográficos (Skoog, 2008); (Rojo Callejas , 2018)

Tiempo de retención (t_r): Es el tiempo que un soluto permanece en la columna. Se mide desde el momento de la inyección hasta la elución del máximo del pico. Es característico del soluto para condiciones de operación constantes.

Tiempo muerto (t_0): Es el tiempo requerido para eluir un soluto que no se retiene en la fase estacionaria. Tiempo que cualquier soluto permanece en fase móvil. Representa el espacio vacío de la columna.

Tiempo de retención ajustado (t'_r): Mide el tiempo que el componente permanece en fase estacionaria.

$$t'_r = t_r - t_o$$

Ancho a la base (wb): Es la porción de la línea base intersectada por las tangentes al pico. Para un pico gaussiano es igual a 4σ . Tradicionalmente usado en el cálculo de la eficiencia del sistema

Ancho a la mitad de la altura ($w^{1/2}$): Es una medida más reproducible, adecuada para evaluar manualmente la eficiencia del sistema (platos teóricos).

Factor de capacidad (k'): Se define como la razón de la cantidad de soluto en fase estacionaria entre la cantidad en fase móvil al equilibrio. Es igual a la relación del tiempo que el soluto permanece en fase estacionaria respecto al tiempo en fase móvil.

$$k' = \frac{t'_r}{t_o}$$

Altura equivalente a un plato teórico (H): Segmento de columna que representa un plato teórico. Es la medida inversa de la eficiencia del sistema, entre menor sea H el sistema es más eficiente (se tienen más platos teóricos en la misma longitud de columna). Se calcula como:

$$H = \frac{L}{N}$$

Selectividad (α): Mide las diferencias relativas entre la interacción de dos solutos con la fase estacionaria. Un valor mayor de α significa una columna más selectiva y mejor separación entre solutos. Se calcula como el tiempo de retención corregido del soluto más retenido entre el del menos retenido.

$$\alpha = \frac{k'_{2}}{k'_{1}} = \frac{t'_{r,2}}{t'_{r,1}}$$

Resolución (R_s): Es la medida cuantitativa del grado de separación entre dos solutos. Se calcula con:

$$R_s = \frac{2(t_{r,B} - t_{r,A})}{(w_{1/2B} + w_{1/2A})}$$

La resolución mínima aceptable en mezclas sencillas es 1.0, una resolución de 2 representa separación a la línea base.

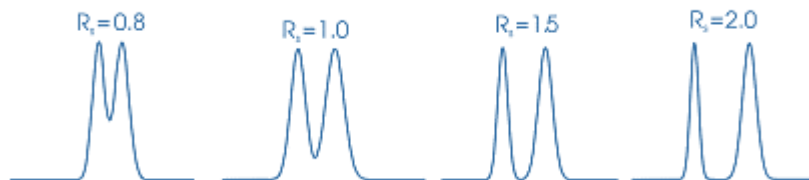


Figura A2. Ejemplos de resolución entre dos picos cromatográficos

Tomada de (Rojo Callejas , 2018)