

**ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DE GLIFOSATO DURANTE SU
EXTRACCIÓN POR DISPERSIÓN DE MATRIZ EN FASE SÓLIDA**



MARÍA ALEJANDRA SARASTY PABÓN

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA,
GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN PROCESOS ELECTROQUÍMICOS (GIPEL)
POPAYÁN
2019**

**ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DE GLIFOSATO DURANTE SU
EXTRACCIÓN POR DISPERSIÓN DE MATRIZ EN FASE SÓLIDA**

Trabajo de grado presentado como
requisito parcial para optar al título de Químico

MARÍA ALEJANDRA SARASTY PABÓN

Director:

Dra. TANIA MILENA GUTIERREZ VALENCIA

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA,
GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN PROCESOS ELECTROQUÍMICOS (GIPEL)
POPAYÁN
2019**

Nota de Aceptación:

Director
Dra. Tania Milena Gutiérrez V.

Jurado
Dr. Rodrigo Andrés Sarria.

Jurado
M.Sc. Edier Gaviria

Popayán, 06 de Mayo del 2019

DEDICATORIA

A mi familia, Por apoyarme en todo momento de mi formación académica, y por todos los sacrificios que esto ha conllevado. Gracias por dedicar su vida y su amor para brindarme todo lo necesario para hacerme feliz.

A mi madre María Elena por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por su amor.

A mi padre por los ejemplos de perseverancia y constancia que lo caracterizan y que me ha infundado siempre, por el valor mostrado para salir adelante y por su amor.

A mi hermano Anthony David por estar conmigo y apoyarme siempre, te quiero mucho.

A mis amigos Lina Marcela, Lina Gabriela, Edith Consuelo, Harold, Juan Carlos, Santiago, Katerin, Eymí y muchos otros amigos y compañeros que nos apoyamos mutuamente en nuestra formación profesional y que hasta ahora, seguimos siendo amigos, gracias a todos ellos por haber estado conmigo en las buenas y en las malas, por todo el apoyo, por todas esas aventuras y locuras compartidas.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por ser mi pilar fundamental y haberme apoyado incondicionalmente, quienes son mi motor y mi mayor inspiración, que a través de su amor, paciencia, buenos valores, ayudan a trazar mi camino.

A mi directora de tesis, Dra. Tania Milena Gutiérrez por haberme guiado, no solo en la elaboración de este trabajo de grado, sino a lo largo de mi carrera universitaria y haberme brindado el apoyo para desarrollarme profesionalmente, por su paciencia, dedicación y apoyo incondicional.

A la Universidad del Cauca y al Departamento de Química.

A los profesores que me han dado clases, por sus enseñanzas.

A mis compañeros del grupo de investigación GIPEL.

Al profesor German Cuervo por haber compartido sus conocimientos a lo largo de mi formación profesional.

A la unidad de análisis industriales y a sus monitores.

Al profesor Fernando Hernández, por facilitarme el uso del material y los equipos de la UAI.

A los jurados Rodrigo Sarría y Edier Gaviria por tomarse su tiempo en la evaluación de este trabajo.

A esas personas que de una u otra forma fueron parte de este proyecto y de mi vida.

TABLA DE CONTENIDO

Resumen	13
1. Planteamiento del problema.....	15
2. Marco teórico y estado del arte	16
2.1 Glifosato	16
2.2 Modo de acción y metabolismo de glifosato	19
2.3 Control del glifosato por parte de las entidades de salud en Colombia.....	22
2.4 Glifosato en los seres humanos y el medio ambiente.....	23
2.5 Antecedentes en la determinación de glifosato.....	24
2.6 Técnica ultra-cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas con trampa de iones	28
2.6.1 Ultra cromatografía líquida de alta resolución.....	29
2.6.2 Parámetros cromatográficos	29
2.6.3 Espectrometría de masas	31
2.6.4 Modo de adquisición control selectivo de reacción SRM (selected reaction monitoring).....	33
2.6.5 Acople ultra-cromatografía líquida de alta eficiencia a espectrometría de masas con trampa de iones.....	34
2.7 Dispersión de matriz en fase sólida.	35
2.7.1 Principios generales de DMFS	36
2.7.2 Extracción de glifosato por DMFS.....	37
2.7.3 Estandarización de una metodología para la determinación de glifosato	38
3. Objetivos	40
3.1 Objetivo general	40
3.2 Objetivos específicos	40
4. Metodología.....	41
4.1 Materiales, equipos y reactivos	41
4.2 Optimización de la técnica de cromatografía líquida-espectrometría de masas	42
4.2.1 Determinación de las condiciones de detección del glifosato por EM... ..	42
4.2.2 Determinación de las condiciones cromatográficas de UCLAR-EM para glifosato	43

Factor de capacidad	44
4.3 Estandarización del método de cuantificación	44
4.3.1 Linealidad Instrumental.....	44
4.3.2 La sensibilidad	45
4.3.3 Precisión	45
4.3.4 Límite de cuantificación y detección	45
4.4 Diseño experimental para la optimización del proceso de extracción de glifosato por DMFS	46
4.5 Estabilidad de glifosato en la extracción por DMFS	47
4.6 Extracción de glifosato por DMFS con soluciones patrón	47
4.7 Aplicación de la DMFS a muestra reales	49
5. Análisis de resultados	50
5.1 Condiciones de detección del glifosato por espectrometría de masas.....	50
5.2 Condiciones en ultra cromatografía líquida de alto rendimiento acoplada a espectrometría de masas para glifosato.	53
5.2.1 Determinación de parámetros en la separación cromatográfica	53
5.3 Implementación de la metodología analítica para determinar glifosato y AMPA por UCLAR-EM-TI.....	58
5.3.1 Linealidad Instrumental.....	58
5.3.2 Límite de cuantificación y detección	65
5.4 Extracción de glifosato por dispersión de matriz en fase sólida-DMFS.....	66
5.5 Comportamiento de glifosato en la extracción por dispersión de matriz en fase sólida.....	70
5.5.1 Efecto del pH.....	70
5.5.2 Efecto temperatura.....	71
5.5.3 Proceso de Limpieza en la DMFS.....	75
5.5.4 Modificador de matriz en DMFS.....	78
5.6 Extracción de glifosato en muestras de sangre por DMFS.....	79
6. Conclusiones.....	85
7. Recomendaciones.....	86
8. Bibliografía	86

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de glifosato (datos generales).....	17
Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas de AMPA (datos generales).	18
Tabla 3. Revisión de metodologías analíticas para el análisis de glifosato	27
Tabla 4. Extracciones de plaguicidas organofosforados por DMFS	38
Tabla 5. Reactivos y solventes.....	41
Tabla 6. Equipos de laboratorio utilizados.....	41
Tabla 7. Variables de estudio	47
Tabla 8. Parámetros EM-ESI en modo positivo para la fase móvil seleccionada..	52
Tabla 9. Parámetros optimizados de ESI-MS/MS	53
Tabla 10. Condiciones para la determinación de glifosato y AMPA por UCLAR ...	57
Tabla 11. Evaluación de la normalidad de los datos obtenidos en función del tiempo para Gly (Días consecutivos).....	59
Tabla 12. Evaluación de la normalidad de los datos obtenidos en función del tiempo para AMPA (Días consecutivos).	59
Tabla 13. ANOVA para área vs día (Gly)	59
Tabla 14. ANOVA para área vs día (AMPA).....	60
Tabla 15. ANOVA para área vs Nivel de concentración (Gly)	60
Tabla 16. ANOVA para área vs nivel de concentración (AMPA)	61
Tabla 17. Prueba de Tukey (glifosato)	61
Tabla 18. Prueba de Tukey (AMPA).....	61
Tabla 19. Coeficientes de correlación. (Evaluación de la linealidad instrumental)	64
Tabla 20. ANOVA para evaluar la regresión lineal en la curva de calibración (glifosato).....	65
Tabla 21. Puntos de diseño experimental para DMFS	67
Tabla 22. Estabilidad del glifosato a diferente pH durante 2,5 horas	70
Tabla 23. Estabilidad de glifosato a 10°C (pH 8,5).....	72
Tabla 24. Estabilidad de glifosato a 20°C (pH 8,5).....	73
Tabla 25. Estabilidad de glifosato a 35°C (pH 8,5).....	74
Tabla 26. Estabilidad de glifosato a 40°C (pH 8,5).....	75
Tabla 27. Extracción sin proceso de limpieza	76
Tabla 28. Extracción con limpieza empleando acetonitrilo	77
Tabla 29. Extracción con limpieza empleando acetonitrilo + ácido trifluoroacético 0,5 %	78
Tabla 30. Extracción con modificador de matriz (NaCl)	79
Tabla 31. Extracción del glifosato a partir de muestras de sangre sin limpieza	81
Tabla 32. Extracción del Gly a partir de sangre y limpieza con acetonitrilo.....	82

Tabla 33. Extracción del Gly a partir de sangre y limpieza con acetonitrilo + ácido trifluoroacético 0,5 %.....	83
Tabla 34. Extracción del Gly a partir de sangre con adición de NaCl.....	84

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructuras y reacciones de disociación ácido-base de glifosato y AMPA	18
Figura 2. Biosíntesis de aminoácidos aromáticos	19
Figura 3. Cambio de concentración en sangre y orina	21
Figura 4. Vía degradación del glifosato a través de la sarcosina y AMPA	22
Figura 5. Fuentes de origen y el destino del glifosato en una cuenca.....	24
Figura 6. Ultra cromatógrafo líquido de alta resolución acoplado a espectrómetro de masas.....	28
Figura 7. Parámetros básicos de un cromatograma.....	30
Figura 8. Componentes básicos de espectrómetro de masas con fuente de ionización ESI y detector de trampa de iones.	32
Figura 9. Acople UCLAR-EM.....	35
Figura 10. Procedimiento de dispersión de matriz en fase sólida.	36
Figura 11. Procedimiento para extracción de glifosato por DMFS	48
Figura 12. Procedimiento para la extracción de muestras por DMFS	50
Figura 13. Espectro de masas por ESI del glifosato+ NH ₄ OH 0,1 %.....	51
Figura 14. Espectro de masas por ESI para la mezcla Gly y AMPA+ NH ₄ OH 0,1 %	52
Figura15. Perfiles cromatográficos para el cambio de fase móvil aumento de la proporción de acetonitrilo	55
Figura 16. Grafica log k' vs proporción acetonitrilo : Agua	56
Figura 17. Gráfica respuesta lineal área vs concentración (mg L ⁻¹) (Glifosato)....	62
Figura 18. Gráfica respuesta lineal área vs concentración (mg L ⁻¹) (AMPA).....	63
Figura 19. Gráficas de linealidad y repetibilidad de las curvas de calibración en los 5 días consecutivos (glifosato)	63
Figura 20. Gráficas de linealidad y repetibilidad de las curvas de calibración en los 5 días consecutivos (AMPA)	64
Figura 21. Diagrama de pareto A) para el Gly B) para el AMPA	68
Figura 22. Superficie de respuesta para la extracción del glifosato	69
Figura 23. Superficie de respuesta para la extracción del AMPA.....	69
Figura 24. Estabilidad del glifosato a diferente pH.	71
Figura 25. Estabilidad glifosato a 10°C (pH 8,5).....	72
Figura 26. Estabilidad de glifosato a 20°C (pH 8,5).....	73
Figura 27. Estabilidad de glifosato a 35°C (pH 8,5).....	74
Figura 28. Estabilidad de glifosato a 40°C (pH 8,5).....	75
Figura 29 . Reacción de formación del derivado fluoroacetilado - fluoroetilesterificado del glifosato.	77

LISTADO DE ACRÓNIMOS

ANOVA: Análisis de varianza
AEC-IPAD: cromatografía líquida de intercambio aniónico con detección amperométrica pulsada integrada
AMPA: Ácido aminometilfosfónico
ACN: Acetonitrilo
CG-EM: Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas
CV: Coeficiente de variación.
CE-ECL: La electroforesis capilar con electroquimioluminiscencia
CLAR: Cromatografía líquida de alta resolución
DFMS: Dispersión de matriz en fase sólida.
EM: Espectrometría de masas.
ESI: Ionización por electrospray.
EPSPS: 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa
SRM: Monitoreo de reacción seleccionada
gl: Grados de libertad.
Gly: Glifosato
Ha: Hipótesis alternativa.
Ho: Hipótesis nula.
k': Factor de capacidad.
LC: Límite de cuantificación
LD: Límite de detección
m/z: Relación masa-carga
Mⁿ: Espectrometría de masas a la n
MS: Masas
NaCl: Cloruro de sodio
ppm: Partes por millón
Sig: Significancia
tm: Tiempo muerto
tr: Tiempo de retención
UAI: Unidad de análisis industrial
UCLAR: Ultra cromatografía líquida de alta resolución
UCLAR-EM: Ultra cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masa
UCLAR-EM-TI: Ultra cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masa con trampa de iones

LISTADO DE SÍMBOLOS

b: Intercepto de la curva en el eje Y

m: Pendiente de la curva.

r: Coeficiente de correlación.

r²: Coeficiente de regresión.

s: Desviación estándar.

S: Sesgo.

μ: Incertidumbre

E: exponente

Resumen

El glifosato (N-fosfometilglicina) fue introducido en la década de 1970 en la práctica agrícola, es el principal ingrediente activo en los plaguicidas de la marca Roundup® producidos por la Compañía Monsanto. Los plaguicidas a base de glifosato incluido el Roundup®, son los plaguicidas más ampliamente utilizados en todo el mundo.¹ su uso incluye manejo agrícola, industrial, de jardinería ornamental y de malezas en las residencias, la formulación se encuentra registrada en más de cien países y es usado en 60 cultivos agrícolas, aproximadamente. El ácido aminometilfosfónico (AMPA) principal producto de biodegradación de glifosato es un residuo conocido en los cultivos y otras plantas tratadas con glifosato. El glifosato en el cuerpo humano, se metaboliza y se genera como principal metabolito el AMPA del cual se puede asumir que tienen un perfil de toxicidad comparable.²

El glifosato es una sustancia de baja persistencia y limitada potencialidad de bioacumulación y toxicidad sobre organismos no blanco. No obstante, su uso masivo y extendido amerita una evaluación constante de corto, mediano y largo plazo. La implementación de metodologías para la determinación y posterior cuantificación de glifosato en diversos tipos de muestras, es de vital importancia para establecer focos de contaminación en humanos, animales y otras especies. Dadas las características fisicoquímicas del glifosato es importante establecer su comportamiento en el momento de su análisis; para este fin se llevó a cabo un estudio de estabilidad durante su extracción por dispersión de matriz en fase solida (DMFS). Determinando el efecto de la temperatura, pH y tiempo, igualmente del impacto de la etapa de limpieza y modificador de matriz. La extracción del glifosato por DMFS en fase reversa ha sido poco estudiada a pesar de ser un método de preparación de muestras efectivo y de bajo costo. Además, el consumo de solvente es menor respecto a las metodologías convencionales; los

extractos obtenidos por DMFS son llevados directamente al análisis instrumental, para la inyección directa sin ningún otro tipo de tratamiento.³

El presente documento exhibe las condiciones apropiadas para la identificación y cuantificación de glifosato empleando la extracción por DMFS y su posterior análisis empleando Ultra cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (UCLAR-EM). La metodología implementada para la determinación de glifosato cumplió con los parámetros estadísticos requeridos de linealidad y precisión instrumental registrando coeficientes de variación menor o iguales al 20 %, límites de cuantificación y detección de 0,5 mg L⁻¹ y 0,1 mg L⁻¹ respectivamente. Una vez implementada la metodología de análisis de glifosato por UCLAR-EM, y las condiciones óptimas para la extracción por DMFS se aplicó la metodología a una matriz más compleja como la sangre humana con un porcentaje de recuperación del 37 %.

1. Planteamiento del problema

El empleo creciente de plaguicidas se debe a que son considerados un factor principal de la producción agrícola y de la calidad de la cosecha, sin embargo, a causa de las deficiencias operativas en las prácticas agrícolas trae como consecuencia que los residuos de plaguicidas se acumulen en alimentos y en el ambiente a niveles que rebasan los límites permitidos, lo cual es motivo de preocupación por los efectos tóxicos resultantes a largo plazo debido a la exposición cotidiana a plaguicidas⁴. En Colombia, el uso del glifosato para el tratamiento de plagas en los cultivos propios de la región es muy común por lo cual la población se ha visto expuesta al plaguicida por diferentes fuentes de contaminación como lo son el aire, el agua y los alimentos.

A pesar del desarrollo de variedad de técnicas y métodos (extracción en fase sólida, extracción líquido-líquido, entre otras) para evaluar el glifosato en diferentes matrices, principalmente muestras ambientales y de alimentos, solo unas pocas se han usado para suero o plasma, lo cual refleja los problemas asociados con el análisis de este tipo de matriz. Para el desarrollo de un método idóneo para analizar estos compuestos en sangre total humana, se consideró la técnica de DMFS para el proceso de extracción, debido a la viabilidad y versatilidad del proceso; además los estudios sobre la técnica de DMFS en fase reversa de plaguicidas organofosforados en fluidos biológicos son pocos.

Muchos plaguicidas organofosforados son inestables y pueden sufrir pérdidas de hasta el 100 % una gran cantidad de reacciones físicas, químicas y biológicas pueden ocurrir en las muestras durante la recolección y análisis. Por tanto el estudio del efecto del pH, temperatura y tiempo sobre la estabilidad del pesticida glifosato en soluciones acuosas es de vital importancia. Otros factores que influyen en la evaluación de la pérdida de residuos de plaguicidas incluyen las propiedades y tipo de la matriz. El objetivo de este estudio fue evaluar la estabilidad del pesticida organofosforado glifosato en el proceso de extracción mediante la técnica de DMFS

y su posterior análisis por cromatografía líquida acoplado a espectrometría de masas UCLAR-EM

2. Marco teórico y estado del arte

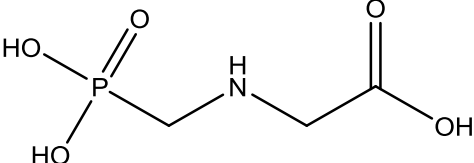
2.1 Glifosato

El plaguicida glifosato ($C_3H_8NO_5P$), N-fosfometilglicina, fue descubierto en el año 1970. Es una molécula formada por una fracción de glicina y un radical aminofosfato unido como sustituyente de uno de los hidrógenos del grupo α -amino.⁵ El glifosato es un plaguicida organofosforado con amplio espectro de acción, sistemático, no selectivo y usado en post-emergencia; se aplica principalmente en zonas agrícolas para el control de vegetación. Es el plaguicida más usado en el mundo ya que está considerado como relativamente “sano” debido a su rápida degradación en suelos. La formulación de glifosato más conocida es la sal isopropilamina con tres componentes básicos: el ingrediente activo, un agente tenso-activo y agua.⁶

A través de la tecnología de ADN recombinante, ha sido posible producir cultivos transgénicos tolerantes al glifosato con altos niveles de resistencia, particularmente variedades de soja y maíz. El uso creciente de cultivos con resistencia a los plaguicidas seleccionados y particularmente al glifosato, ha generado cierta preocupación en términos de calidad ambiental, seguridad alimentaria y salud del consumidor. De hecho, a pesar del uso creciente de este plaguicida, sus efectos en organismos no objetivo todavía no se han evaluado por completo.⁷

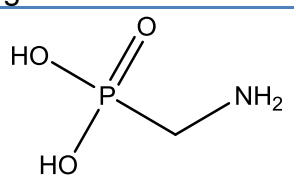
El glifosato (Gly) se degrada rápidamente en su metabolito ácido aminometilfosfónico (AMPA), que se acumula y se puede encontrar en plantas y animales.⁷ Las propiedades fisicoquímicas del glifosato y su principal producto de degradación AMPA se resumen en las tablas 1 y 2. Se observa que ambos compuestos son extremadamente polares, ya que respectivamente el logaritmo de su coeficiente de reparto octanol/agua (k_{ow}) es negativo. Son solubles en agua, poseen propiedades ácido-base como se representa en la Figura 1.

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de glifosato (datos generales)

Nombre IUPAC	N-(fosfonometil)glicina Número CAS1071-83-6
Nombre común	Glifosato
Formula molecular	C ₃ H ₈ NO ₅ P
Peso molecular	169,1 g mol ⁻¹
Formula Estructural	
Forma	Cristales incoloros
Punto de fusión	200 °C
Densidad	1,7 g /cm ³
Log K _{ow}	-3,2 a 25 °C
Solubilidad	12 g /L a 25 °C en agua, y es prácticamente insoluble en disolventes orgánicos
Características físicas	Incoloro, inodoro, solido cristalino
Estabilidad	Se mantiene estable hasta 60 °C
Vida media en los campos del suelo	DT50 3-174 días
Vida media en agua	DT50 5-91 días
pKa	0,78, 2,09, 5,96, 10,98

Fuente: Adaptada de (Islas G.2013 p. 10) ⁸

Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas de AMPA (datos generales)

Nombre IUPAC	Ácido aminometilfosfónico Número CAS1066-51-9
Nombre común	AMPA
Formula molecular	CH ₆ NO ₃ P
Peso molecular	111,04 g mol ⁻¹
Formula estructural	
Log K _{ow}	-2.,36
pKa	2,4, 5,9, 10,8

Fuente: Adaptada de (Islas G.2013 p. 10) ⁸

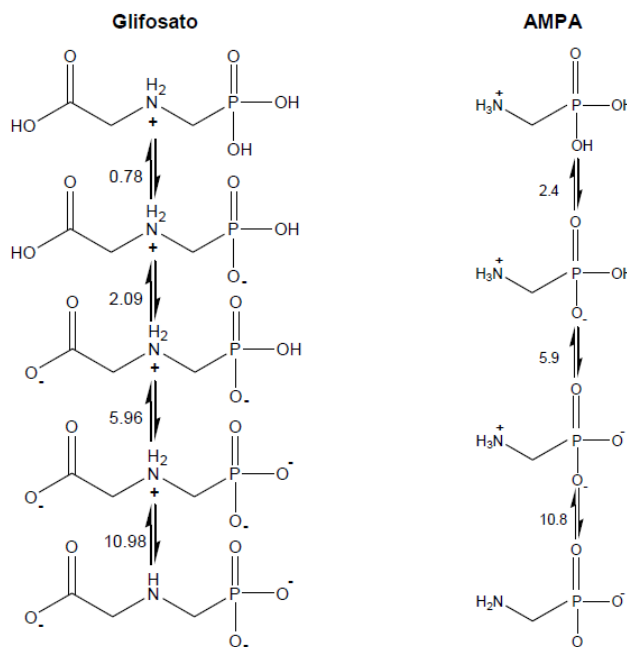


Figura 1. Estructuras y reacciones de disociación ácido-base de glifosato y AMPA

Fuente: Adaptada de (Islas G.2013 p. 10) ⁸

El glifosato es un ácido débil que presenta cuatro constantes de acidez: para el grupo fosfónico (pK_{a1}, pK_{a3}), amino (pK_{a4}), y carboxilo (pK_{a2})⁹. Estas propiedades

químicas proporcionan un desafío considerable para las técnicas analíticas tradicionales en la detección de glifosato y AMPA, especialmente en niveles de trazas en una variedad de matrices. Se han desarrollado varios métodos para el análisis del glifosato y su metabolito AMPA en aguas, suelos, cultivos y animales.

2.2 Modo de acción y metabolismo de glifosato

El glifosato actúa sobre la vía del shikimato en las plantas mediante la inhibición de la enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) que afecta a la vía biosintética del aminoácido aromático (fenilalanina, tirosina y triptófano)^{10,11} como se muestra en la Figura 2. La inhibición de EPSPS por glifosato causa escasez de proteína y, en consecuencia, muerte de la planta.¹²

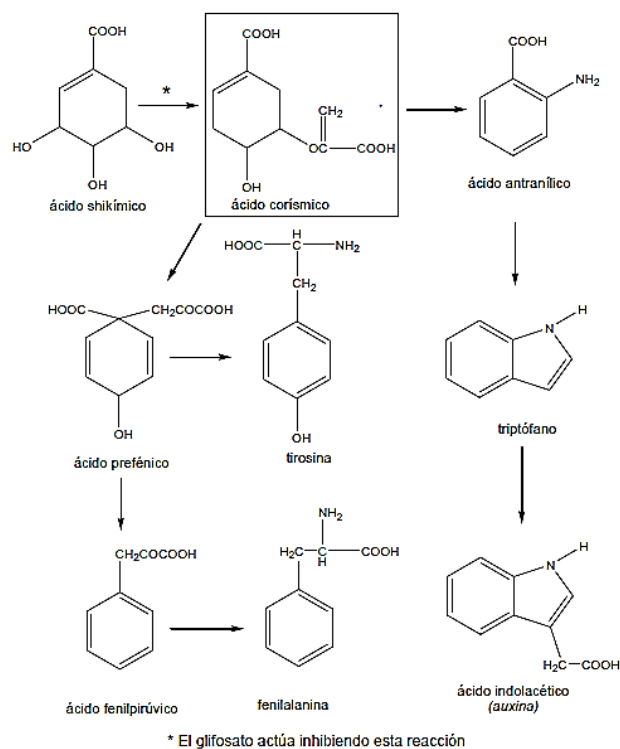


Figura 2. Biosíntesis de aminoácidos aromáticos
Fuente: Adaptada de (Islas G.2013 p. 10) ⁸

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.⁸ Debido a que esta ruta bioquímica no existe en los vertebrados, como consecuencia, el glifosato saltó a una posición de liderazgo entre los plaguicidas comerciales de la década de 1970 y su uso siguió aumentando cada año.¹²

Los síntomas por contacto, de formulaciones comerciales que contienen glifosato, en seres humanos incluyen irritaciones dérmicas, oculares, náuseas, mareos, edema pulmonar, descenso de la presión sanguínea, reacciones alérgicas, dolor abdominal, vómitos, pérdida de conciencia, destrucción de glóbulos rojos y falla renal.¹³⁻¹⁴ La toxicidad de los compuestos organofosforados en los mamíferos, se debe a la fosforilación del ingrediente activo y la consecuente inhibición de la enzima acetilcolinesterasa (AChE), que favorece la desactivación de la acetilcolina en el sistema nervioso. La inhibición de la AChE en sangre, cerebro y otros tejidos causa una excesiva estimulación de los receptores muscarínicos y nicotínicos del sistema nervioso y, como consecuencia de la acumulación de la acetilcolina a nivel de sinapsis colinérgica, causa varios efectos farmacéuticos que culminan con la muerte por paro respiratorio.¹⁵

La medición de la AChE en eritrocitos o en sangre total son los biomarcadores desarrollados para evaluar exposición a plaguicidas organofosforados y carbamatos^{16,17,18} ya que representan el blanco molecular de la toxicidad de estos plaguicidas. Cuando la enzima es bloqueada no participa en la hidrólisis de la acetilcolina, lo que conlleva a una acumulación del neurotransmisor produciendo efectos tóxicos que involucran los sistemas parasimpáticos, simpático, motor y nervioso central.^{16,19,20}

Muchos tejidos como la piel, los pulmones y los riñones contienen enzimas que pueden metabolizar los organofosforados, los sitios principales son el hígado y la sangre. El metabolismo de organofosforados de los mamíferos involucra muchas enzimas y posibles vías. El proceso metabólico dependerá del tipo de organofosforado, la ruta de exposición y la dosis. Sus principales rutas de exposición para la población son generalmente la ingestión o la inhalación. Los plaguicidas se metabolizan rápidamente y sus metabolitos se eliminan en la orina. La sangre también se ha utilizado como una matriz para el biomonitoreo de plaguicidas pero tienden a tener vidas más cortas en la sangre y las concentraciones son generalmente alrededor de tres órdenes de magnitud más bajos que los niveles de metabolitos en la orina (Figura 3).²¹ y en la figura 4 la Vía degradación del glifosato.²²

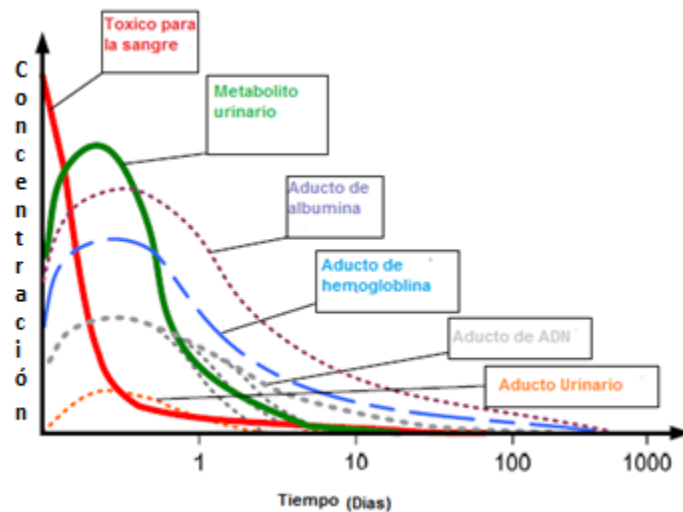


Figura 3. Cambio de concentración en sangre y orina

Fuente: Adaptado de (Kuklennyik, P. 2009 p.9)²¹

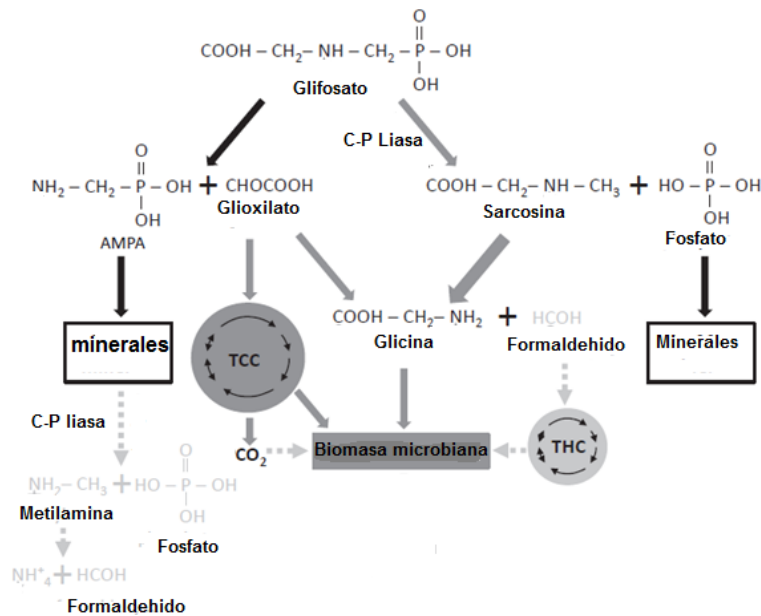


Figura 4. Vía degradación del glifosato a través de la sarcosina y AMPA

Flechas gris oscuro: formación de residuos biogénicos; **flechas negras:** formación xenobiotica
TCC: ciclo del ácido tricarboxílico; **THC:** ciclo tetrahidrofolato;

Fuente: Adaptado de (Wang, S. 2016 p 96) ²²

2.3 Control del glifosato por parte de las entidades de salud en Colombia

Teniendo en cuenta los problemas de intoxicación por plaguicidas en Colombia, el Ministerio de Salud estableció mediante el **Decreto 1843 de 1991** el control y vigilancia epidemiológica en el uso y manejo de plaguicidas Organofosforados (OF) y Carbamatos (C) (VEO). Así los diferentes frentes institucionales como la Secretaria de Salud, las Universidades (docencia e investigación), las entidades gubernamentales del Departamento del Cauca, buscan crear herramientas que contribuyan al fortalecimiento de las actividades de vigilancia epidemiológica de plaguicidas mediante el programa VEO que tiene entre sus objetivos “*Determinar los niveles de actividad de acetilcolinesterasa en sangre de individuos con riesgo de exposición a plaguicidas organofosforados (OF) y carbamatos (C) e impulsar el desarrollo de acciones de promoción, prevención, seguimiento y control que disminuyan el efecto de estos tóxicos sobre la salud*”. Por lo tanto, es muy

importante la implementación de un método de determinación rápida y sensible para glifosato, y sus metabolitos en humanos.

2.4 Glifosato en los seres humanos y el medio ambiente

La exposición acumulativa a plaguicidas puede provenir de alimentos, agua, aire, polvo, tierra, etc (Figura 5). Los plaguicidas pueden ser absorbidos por contacto con la piel, inhalación o ingestión accidental. Los trabajadores agrícolas también entran en contacto directo con plaguicidas en el trabajo y están expuestos a ellos en el trabajo. Cuando una persona está expuesta a plaguicidas, los mecanismos de desintoxicación del cuerpo se activan. Algunos plaguicidas se metabolizan en diferentes productos químicos y se excretan y otros se almacenan en los tejidos grasos del cuerpo. Los datos de la carga corporal del análisis de la sangre proporcionan evidencia de la exposición a sustancias químicas almacenadas en nuestro cuerpo²³.

El glifosato aplicado se concentra inicialmente en las capas superiores del suelo experimentos de una instalación de simulación de lluvia artificial en suelo desnudo. Mostraron que el 72 % del plaguicida aplicado se encuentra a una profundidad de entre 0 y 2 cm. Después de su aplicación, el glifosato tiende a absorber minerales a través de su grupo fosfonato y se biodegradan²⁴. Aunque la sorción inactiva rápidamente el glifosato en el suelo y limita su transporte al medio ambiente acuático, este plaguicida y su principal metabolito, el ácido aminometilfosfónico (AMPA), se detectan a menudo en aguas superficiales y subterráneas²². Debido a la aparición generalizada de glifosato y AMPA en ambientes acuáticos y terrestres la preocupación por sus posibles impactos ambientales ha ido en aumento recientemente²⁵.

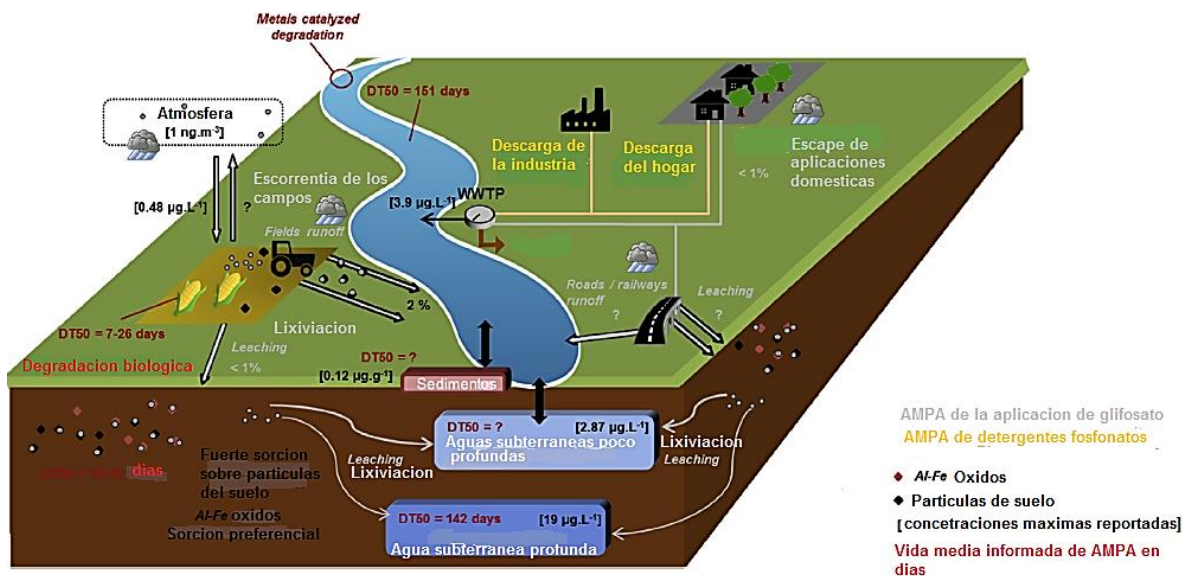


Figura 5. Fuentes de origen y el destino del glifosato en una cuenca.

Fuente: Adaptada de Grandcoin, A. 2017 p189 25

2.5 Antecedentes en la determinación de glifosato

Con referencia a los ensayos empleados en la separación y cuantificación de glifosato, la gran mayoría se basan en el uso de la cromatografía de gases (CG-EM) siendo este el más popular. Las metodologías que emplean CLAR para la cuantificación de glifosato están basadas en la separación en fase reversa o normal, empleando como columna de cromatografía líquida de interacción hidrofílica (HILIC) o C₁₈ la cual aún es poco implementada.

Hasta la fecha, se ha desarrollado varios métodos analíticos para detectar estos plaguicidas en los fluidos corporales²⁶. Entre ellos está la cromatografía líquida de alta resolución con detección UV²⁷, con detección de fluorescencia⁷, electroforesis capilar (CE)²⁸, ultra cromatografía líquida acoplado a espectrometría de masas (UCLAR-EM), y la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM)²⁹ han acumulado una excelente trayectoria con respecto a la determinación exitosa de estos plaguicidas. Sin embargo, debido a que estos

métodos dependen en gran medida de los procedimientos de derivatización utilizando reactivos tales como:

- cloruro de *p*-toluensulfonilo,
- cloruro de *p*-nitrobenzoilo (PNBC),
- cloroformiato de 9-fluorenilmetilo (FMOC-Cl),
- clorhidrato de (+)-1-(9-fluorenil) etilo,
- trimetilo ortoacetato, o *N*-metil-*N*-(*terc*-butildimetilsilil) trifluoroacetamida (MTBSTFA) ,

el proceso de determinación general se considera tedioso y lento.¹⁰ Mientras tanto, se han descrito métodos alternativos que no recurren a la derivatización, como la cromatografía líquida de intercambio aniónico con detección amperométrica pulsada integrada (AEC-IPAD) La electroforesis capilar con electroquimioluminiscencia (CE-ECL)^{28,30}. Desafortunadamente, estos métodos no se consideran detectores universales y pocos laboratorios están equipados con estos costosos instrumentos.

La falta de cromóforo o fluoróforo y el requisito actual de límites de detección favorables requerían técnicas de derivatización para la determinación de residuos de glifosato y su metabolito en UCLAR.³¹ Los detectores UV-Vis y de fluorescencia convencionales se usan con mayor frecuencia en UCLAR para el análisis directo de glifosato y AMPA después de la derivatización apropiada.^{7,31,32}

Los métodos en CLAR consultados incluyen diversas variantes, como la velocidad del flujo y principalmente la relación de solventes en la fase móvil, donde se utilizan mezclas acetonitrilo / agua en modo isocrático o gradiente. Éste método es muy usado independientemente del tratamiento previo que se le da a la muestra. En general, hay varios métodos para la identificación y cuantificación de glifosato, pero sobresalen aquellos en los que se utiliza (CG-EM/CLAR-EM), estos métodos y sus diferencias se resumen en la (Tabla 3).

La UCLAR en sí misma no se acepta como una técnica de identificación pura por lo cual se implementaron técnicas acopladas, cubriendo una gama más amplia de plaguicidas polares como glifosato; con frecuencia requiere la confirmación de EM para determinar la identidad de los picos del analito en un cromatograma de una muestra de la vida real^{33,31}. Se han examinado diferentes interfaces EM, como termonebulización, electrospray e ionización química a presión atmosférica con respecto a su idoneidad para la detección específica de sustancia^{31,34,35}. El progreso en el acoplamiento de UCLAR-EM y la posibilidad de obtener información estructural adicional por medio de las nuevas técnicas de EM motivó su uso en el análisis del plaguicida estudiado y su metabolito.

A pesar de la gran variedad de técnicas y métodos propuestos para evaluar el glifosato y el AMPA en diferentes matrices, principalmente muestras ambientales y de alimentos, solo unas pocas se han usado para suero o plasma, que refleja los problemas asociados con este análisis. Para desarrollar un método confiable para analizar estos compuestos en sangre total humana, hemos considerado todas las opciones antes mencionadas, teniendo en cuenta que los métodos de UCLAR son los más ampliamente utilizados para fluidos biológicos. Por lo tanto, empleamos la cromatografía líquida sin recurrir a la de la derivatización y utilizamos como detector el espectrómetro de masas con trampa de iones e ionización por electrospray.

Tabla 3. Revisión de metodologías analíticas para el análisis de glifosato

Analito	Matriz	Método de extracción	Método analítico	Año.
Glifosato, AMPA y glufosinato	Suero humano	Precipitación de proteínas utilizando acetonitrilo y extracción en fase sólida.	CG-EM	2008 ²⁹
Organoclorados (OCs) y organofosforados (OPs) (34 plaguicidas)	Tejido animal (hígado de pollo, cerdo y cordero)	Extracción sólido-líquido, cromatografía de permeación de gel (GPC) y dispersión de matriz en fase sólida (DMFS)	(CG-(EI-) EM) (QqQ)	2007 ³⁶
Glifosato y AMPA	Orina humana	Extracción líquido-líquido	CG-EM	2017 ³⁷
15 organofosforados (OPs) y 9 triazinas	Manzanas, peras y albaricoques	Dispersión de matriz en fase sólida asistida por ultrasonido(UA-DMFS)	CG-EM	2008 ³⁸
Glifosato y AMPA	Tomate	Dispersión de matriz en fase sólida (MSPD)	CLAR -fluorescencia	2005 ³⁹
Glifosato y AMPA	Sangre y orina humana	Extracción líquido-líquido	CLAR-EM	2013 ¹⁴
Glifosato y AMPA	Sangre humana	Desproteización, cartucho de ultrafiltración, seguido de la extracción líquido-líquido y la columna híbrida SPE-fosfolípido	CLAR-EM	2016 ⁴⁰
Glifosato, glufosinato, bialafos y metabolitos	Sangre humana	Método modificado de extracción de Plaguicidas polares (QuPPE)	CLAR-EM	2018 ⁴¹
Organofosforados y carbamatos de N-metilo	Tejido porcino	Dispersión de matriz en fase sólida (DMFS)	CLAR-EM	2011 ⁴²
Glifosato y AMPA	Agua	Extracción en fase sólida	CLAR-(ESI/EM)	1998 ³⁵
Glifosato, glufosinato, bialafos y metabolitos	Suero humano	Membrana de ultrafiltración para eliminar las proteínas. Lavado CHCl ₃	CLAR-EM	2011 ¹⁰

2.6 Técnica ultra-cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas con trampa de iones

El acoplamiento de un cromatógrafo de líquidos a un espectrómetro de masas, permite hacer un estudio rápido y confiable, para el análisis cualitativo y cuantitativo de mezclas complejas. Este sistema de UCLAR-EM consta de tres bloques: cromatógrafo de líquidos, espectrómetro de masas y un sistema de datos. El sistema de datos, convierte las señales procedentes del espectrómetro de masas, en cromatogramas y espectros de masas, permitiendo obtener información estructural de los componentes, de acuerdo con el patrón de fragmentación del compuesto.⁴³

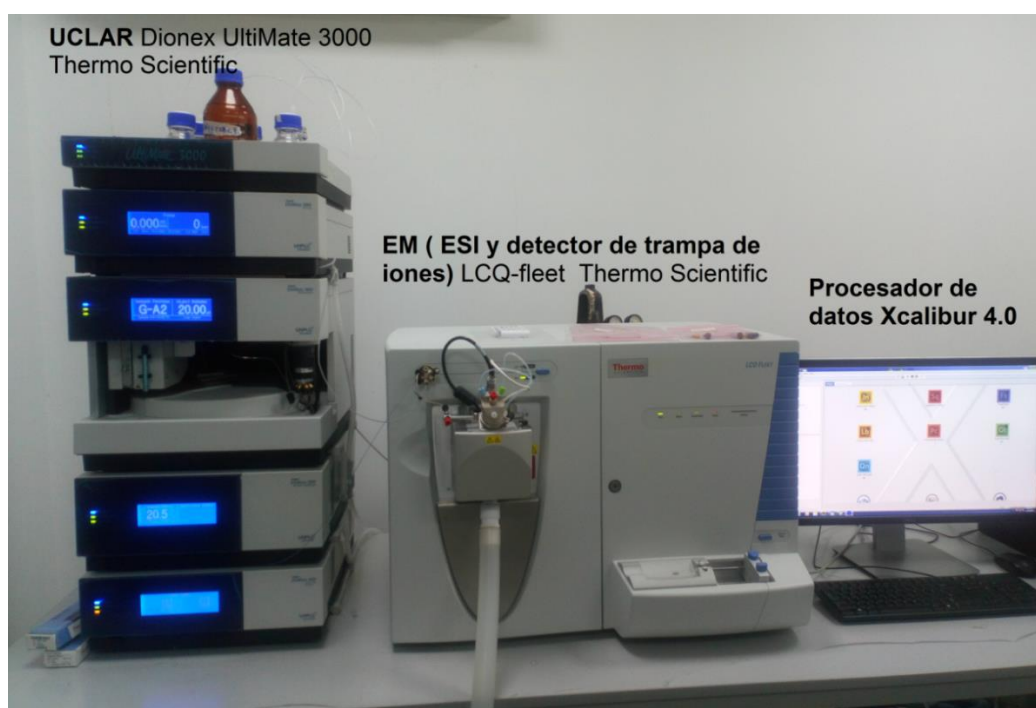


Figura 6. Ultra cromatógrafo líquido de alta resolución acoplado a espectrómetro de masas

Fuente: Fotografía tomada por el autor en la UAI

2.6.1 Ultra cromatografía líquida de alta resolución

La Ultra cromatografía líquida de alta resolución (UCLAR-EM) 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 amplia aplicabilidad a sustancias que son importantes en la industria, muchos campos de la ciencia y para la sociedad en general. Algunos analitos que se pueden analizar por esta técnica son hidrocarburos, carbohidratos, farmacosterpenoides, plaguicidas, antibióticos, esteroides, especies organometálicas y una variedad de sustancias inorgánicas. ⁴³

Las características principales de UCLAR son Resolución más alta, La mayor sensibilidad alcanzable y Las velocidades de análisis más rápidas. Las diferencias esenciales entre UCLAR y CLAR normal están en las dimensiones de la columna: las columnas UCLAR son generalmente más cortas y más estrechas, presiones operativas: Los sistemas UCLAR son capaces de manejar altas presiones (15,000-18,000 psi) en comparación con el rango analítico normal (5000 - 6000 psi), Caudales: Las separaciones de UCLAR requieren tasas de flujo más bajas (250-750 $\mu\text{L}/\text{min}$) en comparación con la CLAR normal (1-2 mL/min), además UCLAR disminuye el tiempo de análisis, mejora en la resolución y reduce los costos operacionales.

2.6.2 Parámetros cromatográficos

Los parámetros básicos de cromatografía a tener en cuenta son: **Retención, factor de capacidad, coeficiente de distribución y retención relativa**. Cuando se introduce un compuesto en la corriente de la fase móvil de un sistema cromatográfico, se presenta un comportamiento de retención que manifiesta la distribución del soluto entre la fase móvil y la estacionaria. Los parámetros de retención son:

- **Tiempo de retención (t_R):** tiempo transcurrido desde la inyección de la muestra hasta que uno de los componentes llega al detector.
- **Tiempo muerto (t_M o t_0):** tiempo requerido para que una especie no retenida alcance el detector.

Tiempo neto de retención o tiempo de retención corregido (t'_R): es la diferencia entre el tiempo de retención de un componente con respecto al de una sustancia no retenida ($t_R - t_M$). el cual se deduce que es el tiempo real en el cual aparece el compuesto.

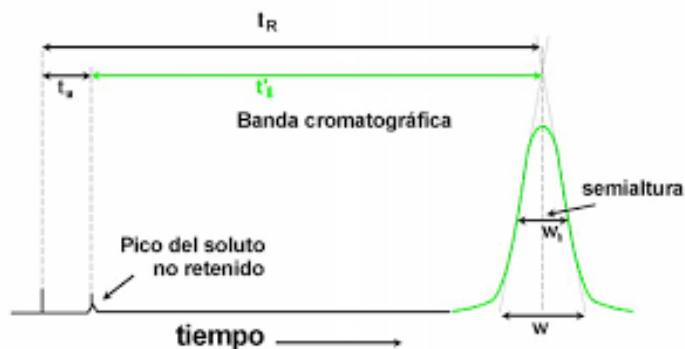


figura 7. Parámetros básicos de un cromatograma.

Fuente: http://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es_ES/investigación/cromatografía/principios_de_cromatografía.pdf

El factor de capacidad (k') mide la relación entre el tiempo que las moléculas del analito están en la fase estacionaria y el que están en la fase móvil. Se usa para comparar las velocidades de migración de los analitos en las columnas y se interpreta considerando que mientras mayor sea el valor de este factor menor es la velocidad de migración de los solutos en la columna, el factor de capacidad k' se define como:

$$k' = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (1)$$

Coefficiente de distribución o de reparto

Cuando un soluto entra al sistema cromatográfico inmediatamente se reparte o distribuye entre la fase móvil y la estacionaria. Si la fase móvil se para en cualquier momento, el soluto establece un equilibrio de distribución entre las dos fases. La concentración en fase está dada por el *coeficiente termodinámico de reparto*:

$$K = C_S/C_M \quad (2)$$

donde C_S , y C_M son las concentraciones de soluto en la fase estacionaria y móvil, respectivamente. Cuando $K = 1$, el soluto se encuentra igualmente distribuido entre las dos fases. El coeficiente de reparto determina la velocidad promedio de cada zona de soluto conforme la fase móvil avanza a lo largo de la columna.

Retención relativa o factor de selectividad

La *retención relativa o factor de selectividad*, α de dos solutos, donde el soluto 1 eluye antes del soluto 2, es

$$\alpha = k'_2 / k'_1 = K_2 / K_1 = V'_{R,2} / V'_{R,1} = t'_{R,2} / t'_{R,1} \quad (3)$$

La retención relativa depende de 1) la naturaleza de las fases estacionaria y móvil, y 2) la temperatura de operación de la columna. Al escoger un par de fases para los solutos adyacentes más difíciles de separar se debe ser tan selectivo como sea posible.

2.6.3. Espectrometría de masas

La espectrometría de masas es una técnica analítica en la que los átomos o moléculas de una muestra son ionizados, con mayor frecuencia positivamente, separados por su relación masa/carga (m/z) y posteriormente detectados y registrados. La importancia y proyección de la MS es debida a su potencial analítico.

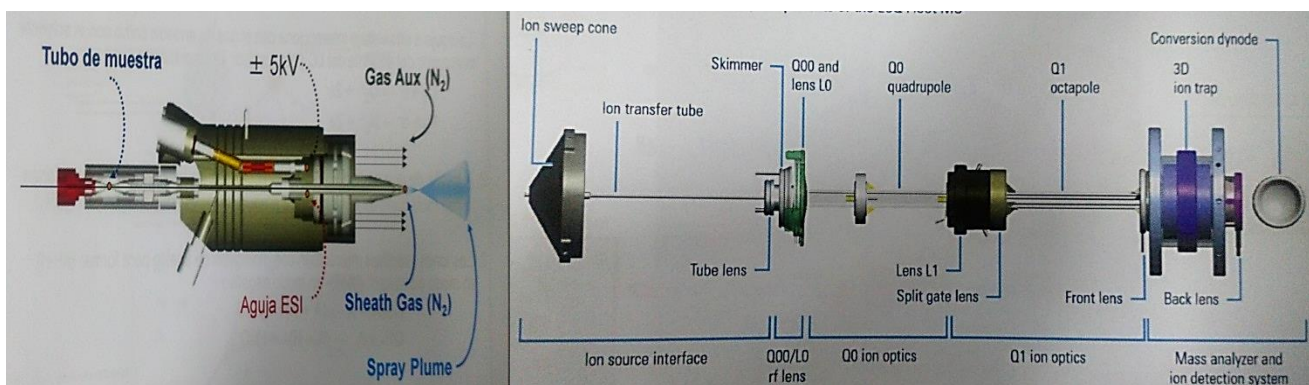


Figura 8. Componentes básicos de espectrómetro de masas con fuente de ionización ESI y detector de trampa de iones

Fuente: Manual LCQ-FLEET <https://assets.thermofisher.com/.../BR-63218-LC-MS-LCQ-Fleet>

El análisis por espectrometría de masas se realiza en cuatro etapas básicas:

1. **Introducción de la muestra**, debido a la naturaleza de la muestra que se estudia (líquidos y sólidos no volátiles), se utiliza el sistema por sonda *directa*, permiten trabajar con pequeñas cantidades de muestras.
2. **Ionización de la muestra**, en esta etapa se transforman los átomos o moléculas en especies iónicas en fase gaseosa, con la consiguiente pérdida de electrones o protones. La elección del tipo de ionización viene determinada por la naturaleza de la muestra y la clase de información que se desea obtener. En la ionización por electrospray, la muestra disuelta en un disolvente adecuado pasa a través de un capilar metálico, en cuya punta se aplica un potencial de 3 a 5 kV y una presión de 1 atmósfera se produce una fina niebla de gotas de elevada carga y la evaporación del solvente hace que aumente la densidad de carga, produciéndose la desorción en fase gaseosa.
3. **Analizador de masas**, el analizador tiene dos misiones fundamentales: separar los iones en función de su relación m/z y enfocar los iones separados hacia un determinado punto. Para la separación de estos existen varios

procedimientos, los más utilizados son el de campo magnético, cuadrupolar y trampa de iones, este último analizador se basa en la utilización de una zona de confinamiento electromagnético generado por medio de dos señales de radiofrecuencia, donde un cambio del campo de radiofrecuencia, dará lugar a que los iones sean eyectados de la trampa en orden creciente de su relación m/z lo que da lugar al espectro de masas.

4. **Finalmente**, los iones son enfocados al detector, transductor que convierte el haz de iones en una señal eléctrica que puede ser procesada, almacenada en la memoria de una computadora donde se obtiene el espectro de masas, en el que se presenta la abundancia relativa de los iones y fragmentos separados respecto a la relación masa/carga.

2.6.4 Modo de adquisición control selectivo de reacción SRM (*selected reaction monitoring*)

Es la forma de trabajar más utilizada en las determinaciones cuantitativas por espectrometría de masas. En este método aparece un solo pico en el espectro debido a un único ión lo que lo hace ideal para cuantificación. Este pico puede ser monitorizado y cuantificado en matrices complejas.

Conceptualmente significa trabajar con espectrometría de masas en tándem MS/MS pero seleccionando una única masa (m/z) del espectro, que corresponde a un fragmento iónico del compuesto problema.⁴⁴

Su forma de operar se basa en obtener en el primer espectrómetro de masas varios fragmentos y entre ellos, el ion precursor del analito problema. Este ion precursor se fragmenta en presencia de gas inerte aplicando una energía de colisión adecuada; uno de los iones fragmento obtenido se selecciona etiquetándose como ion producto. La adquisición en SRM es la más utilizada en las aplicaciones

analíticas cuantitativas ya que minimiza al máximo la presencia de otros interferentes y se presenta como una herramienta de alta sensibilidad y selectividad⁴⁵

2.6.5 Acople ultra-cromatografía líquida de alta eficiencia a espectrometría de masas con trampa de iones

La cromatografía de líquidos separa los compuestos de una mezcla, pero para su identificación se hace necesario implementar otras técnicas espectroscópicas como la espectrometría de masas (EM). En la actualidad, el detector espectrométrico de masas acoplado al cromatógrafo de líquidos constituye una herramienta indispensable para determinar la composición de una muestra compleja. En esta unión se obtienen espectros de masas de los compuestos que eluyen de la columna cromatográfica.⁴³

La unión entre las técnicas, se puede realizar con una conexión en T; este tipo de conexión es útil para análisis primarios donde se requiere conocer la influencia de la fase móvil en la detección de un analito. En la Figura 9 se muestra como se ajusta el sistema, inicialmente se inyecta analito de forma directa a través de la jeringa, posteriormente se hace pasar un flujo de fase móvil desde el UCLAR; en la unión T se da la mezcla del solvente y el analito, esta solución pasa a través del canal al espectrómetro de masas para su detección.

Para realizar el acople o interface entre UCLAR y EM inicialmente se debe ajustar en el EM la sonda de ESI en la posición D ya que al unir la línea de transferencia de muestra del cromatógrafo líquido al espectrómetro de masas va a pasar un flujo mayor de solvente, y según las recomendaciones de manejo en el equipo se debe tener en cuenta este criterio, para que no se afecte el proceso de ionización de muestras o se presente efecto de arco por flujos y voltajes altos.



Figura 9.Acople UCLAR-EM

Fuente: Fotografía tomada por el autor en la UAI

2.7 Dispersión de matriz en fase sólida

La dispersión de matriz en fase sólida (DMFS) es un proceso patentado introducido por primera vez en 1989 por *Barker et al.*, para la preparación, extracción y fraccionamiento de muestras sólidas, semisólidas o viscosas, incluidos tejidos animales y alimentos. La novedad de la técnica consistió en obtener aislamiento de analitos dispersando tejidos sobre un soporte sólido, evitando muchas de las dificultades encontradas empleando el enfoque clásico de extracción en fase sólida, como la necesidad de homogenización de muestra y eliminación de restos de tejido antes de la aplicación de la columna, así como la interrupción celular incompleta .^{3,46}

El empleo y los desarrollos de la DMFS siguen creciendo debido a la viabilidad y versatilidad del proceso, evita los inconvenientes asociados a la extracción con disolventes como elevado consumo de los mismos, separación incompleta de fases, e interferencias de matriz, y se obtienen ventajas como reducción de la cantidad de muestra y de tiempo de extracción.

2.7.1 Principios generales de DMFS

Los principales pasos del procedimiento de extracción de dispersión de matriz en fase sólida se representan en la figura 10. (I) la muestra se mezcla con el material dispersante en un mortero con una mano de mortero; (II) el polvo homogeneizado se transfiere en un cartucho de extracción en fase sólida y se comprime; (III) la elución con un disolvente o mezcla de disolventes adecuados se realiza con la ayuda de una bomba de vacío.³

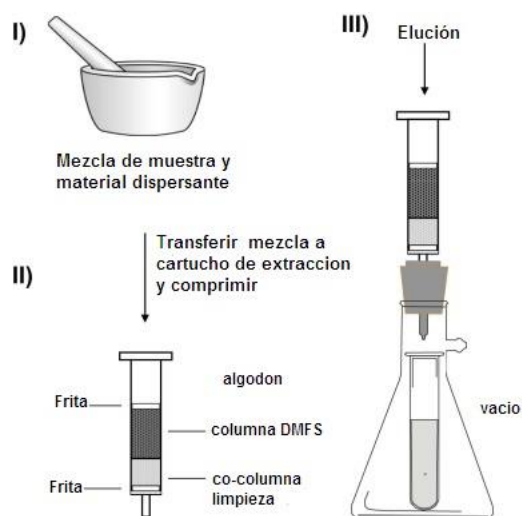


Figura 10. Procedimiento de dispersión de matriz en fase sólida.

Fuente: Adaptada de (Barker, S. 2007, pp. 151-162)

En la DMFS se dispersa la muestra problema con una fase sólida comercial como C₁₈, C₈, arena, etc, hasta conseguir una mezcla homogénea, que se introduce, en una columna cromatográfica, los cuales se usan en la mayoría de los trabajos, mientras que la alúmina, sílice y Florisil se usan típicamente como materiales de fase normal. Un parámetro crítico es la relación de muestra y material dispersante que es generalmente 1:1 - 1:4, que depende del tipo de muestra y las características físico-químicas del material. La elección del eluyente depende de la fuerza de las interacciones entre el soporte sólido y los analitos objetivos.

Para el mejoramiento del proceso de extracción se deben optimizar todos los parámetros principales de la DMFS (es decir, cantidad de muestra, cantidad y tipo de material dispersante, posible etapa de limpieza, composición del eluyente, modificador de matriz, pH entre otros). Además el eluyente obtenido en DMFS puede ser tomado directamente para análisis instrumental, ya que es considerado “limpio” para inyección directa.

2.7.2 Extracción de glifosato por DMFS

Actualmente, existen diversos estudios donde se emplea la dispersión de matriz en fase sólida para la extracción de plaguicidas tanto organoclorados como organofosforados en conjunto con otros analitos (análisis multianalíticos), en diversas matrices entre las que predominan los alimentos y tejido animal. La elección de la fase sólida depende de la polaridad de los plaguicidas y del tipo de matriz utilizada. Las más empleadas son C₁₈, C₈, Florisil y aminopropilo⁴. En la (Tabla 4) se resumen algunas extracciones de organofosforados por DMFS.

El análisis del extracto de plaguicidas comúnmente se realiza por cromatografía de gases/espectrometría de masas (CG/EM), recientemente se está aplicando la técnica de UCLAR/EM. En relación al análisis del glifosato y su principal metabolito el ácido aminometilfosfónico (AMPA) por DMFS en una matriz biológica como la sangre humana la investigación documental es poca.

El aislamiento de compuestos de interés a partir de matrices ambientales, alimentarias o biológicas es siempre un paso clave en el desarrollo de un método analítico, a menudo se necesita una interrupción previa de la arquitectura general de la muestra. Durante años, la técnica clásica de extracción en fase sólida (SPE) ha evolucionado para satisfacer la necesidad de monitorear varias clases de sustancias en muestras de diferentes orígenes, presentes en niveles de trazas.⁴⁶

Tabla 4. Extracciones de plaguicidas organofosforados por DMFS

Analito	matriz	Material dispersante	Relación matriz/sorbente	Solvente de elución	año
15 organofosforados (OPs) y 9 triazinas	Manzanas, pera, albaricoque,	Sílice derivatizada de octasilil de fase reversa (C ₈)	1:4	Acetato de etilo	2008 ³⁸
Plaguicidas organofosforados (OPs)	Coco	C ₁₈	1:2	40 mL de acetonitrilo saturado con n-hexano	2008 ⁴⁶
Plaguicidas organofosforados (OPs)	Tejido bovino	Sílice C ₁₈	1:4	Acetonitrilo	2011 ⁴²
Plaguicidas organofosforado (glifosato y AMPA)	Tomate	NH ₂ -sílice	1:2	Agua desionizada (AMPA) y NaH ₂ PO ₄ 0,005 M (glifosato)	2005 ³⁹

2.7.3 Estandarización de una metodología para la determinación de glifosato

La estandarización del método consiste en encontrar aquellos parámetros operacionales y de preparación de la muestra que garanticen una respuesta adecuada y reproducible por parte del equipo, el análisis consiste en demostrar experimentalmente la funcionalidad del método para las aplicaciones analíticas propuestas, como también en obtener la evidencia documentada del procedimiento seguido, lo cual debe corresponder a un diseño experimental, un tratamiento estadístico apropiado y unos criterios de aceptación de acuerdo con los atributos que describen cada técnica analítica, para lo cual se establecen las variables químicas e instrumentales que permitan conseguir las mejores condiciones de

selectividad, exactitud, precisión, límite de detección, límite de cuantificación y linealidad³⁷.

Con base en diseños experimentales es posible evaluar más rápidamente el efecto de las variables independientes que afectan a la variable respuesta, el tratamiento de datos por medio de software SPSS garantiza el análisis estadístico de los resultados obtenidos en cualquier experimento.

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

Establecer el comportamiento del plaguicida glifosato durante su extracción por dispersión de matriz en fase sólida y cromatografía de líquidos

3.2 Objetivos específicos

- Estudiar el efecto del pH, temperatura y tiempo de análisis sobre la estabilidad del plaguicida glifosato en soluciones acuosas empleando cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas como técnica de análisis.
- Evaluar el efecto del pH, temperatura y tiempo de análisis sobre la estabilidad del plaguicida glifosato en el proceso de extracción mediante dispersión de matriz en fase sólida DMFS.

4. Metodología

4.1 Materiales, equipos y reactivos

En la tabla 5 se resumen los reactivos y solventes empleados en el desarrollo del trabajo.

Tabla 5. Reactivos y solventes

Reactivos y solventes	Especificaciones
Acetonitrilo grado CLAR	Grado CLAR Fisher Scientific
Acido fórmico	Pureza: 99 % Merck
Hidróxido de amonio	Pureza: 29,54 % Fisher Scientific
Glifosato PESTANAL™,	Pureza: 99,7 % Sigma –Aldrich
Ácido aminometilfosfónico	Pureza: 99 % Sigma –Aldrich
Sílica C ₁₈	Supelco
Cloruro de sodio	Pureza: 99,8 % Sigma –Aldrich

En la tabla 6 se resumen los equipos de laboratorio empleados en el desarrollo del trabajo.

Tabla 6. Equipos de laboratorio utilizados

Equipos y material	Especificaciones
Ultra cromatógrafo líquido de alta resolución	Thermo Scientific modelo Dionex UltiMate 3000
Espectrómetro de masas	Thermo Scientific LCQ-fleet con una fuente de ionización por electrospray (ESI) y detector de trampa de iones
Estufa	Fischer Scientific
pH metro	Thermo Scientific
Colector al vacío Manifold	Supercol-Visiprep N°5-7044 para extracción en fase sólida (SPE)
Balanza analítica	Precisa XB 220A ± 0,0001g
Refrigerador para almacenamiento de muestras	Haceb (temperatura 10 °C)
Membranas de Nylon 0,22 um	SIMPLEPURE MCE Syringe Filter
Cartuchos de extracción DMFS	MERCK LiChrolut RP-18
Viales 1 mL	Fischer Scientific
Micropipeta 2-20 uL	Lab Genius
Micropipeta 20-200 uL	Lab Genius
Estufa	Fischer Scientific
Balones aforados de 10 mL	MARIENFELD ± 0,025 ISO

4.2 Optimización de la técnica de cromatografía líquida-espectrometría de masas

4.2.1 Determinación de las condiciones de detección del glifosato por EM

Para establecer las condiciones óptimas para la detección de glifosato (Gly) y su metabolito primario AMPA se usó un espectrómetro de masas marca Thermo Scientific LCQ-fleet con una fuente de ionización por electrospray (ESI) y analizador de trampa de iones. El voltaje del Spray se estableció en 5,0 kV en modo de ionización positiva⁴⁷.

Para la detección del pesticida glifosato y su metabolito AMPA mediante el espectrómetro de masas (EM) los pasos a seguir fueron: Primero se prepara un patrón de 10 mg/L, que contiene los dos analitos disueltos en agua desionizada, se utilizaron diferentes agentes ionizantes hidróxido de amonio y ácido fórmico al 0,1 %, en modo de ionización positiva esto con el fin de explorar el efecto de los diferentes agentes ionizantes sobre la ionización del analito a continuación con este patrón se realizó la sintonización automática y semiautomática de los picos base de los analitos ajustando los parámetros del ESI y la óptica de EM, por medio de la inyección directa al espectrómetro de masas, para lo cual se empleó una jeringa Hamilton de 500 µL a un flujo de 5 µL/min. Ajustado como el mínimo flujo por el equipo.

Del proceso se identificó el agente ionizante que brinda mayor sensibilidad para la determinación del analito, esto según su nivel de normalización el cual indica la sensibilidad, el patrón de fragmentación y los picos característicos para el glifosato. Para la determinación de glifosato mediante UCLAR-EM (MS/MS) se seleccionó como ion precursor el más abundante de cada compuesto y sus iones producto, se detectaron mediante el método SRM (Selected Reaction Monitoring).

4.2.2 Determinación de las condiciones cromatografías de UCLAR-EM para glifosato

Una vez establecida la sintonización automática por ajuste directo en el EM para detección de Gly y AMPA, se establecieron las condiciones adecuadas para la separación de los analitos con el Cromatógrafo de Líquidos de Ultra Alta Resolución (UCLAR) ultimate 3000 empleando una columna C₁₈ Hypersild Gold tamaño de partícula 1,9 µm dimensiones de (100 X 2,1mm), la temperatura de horno de columna seleccionada fue de 20°C.

A continuación se evalúa la influencia del flujo de la fase móvil compuesta de acetonitrilo/Agua 50:50 con 0,1 % de ácido fórmico sobre la identificación de glifosato, manteniendo las condiciones ajustadas inicialmente en EM. Para ello primero se debe ajustar la sonda de ESI en la posición D, dado que va a pasar un flujo mayor de solvente, se procede a realizar la conexión en T entre el UCLAR y EM, donde se da la mezcla del solvente y el analito, esta solución pasa a través del canal al espectrómetro de masas para su detección. Realizando inyección a través de jeringa incorporada en EM del patrón de glifosato y pasando un flujo entre 0,05 y 0,1 mL/min de fase móvil desde el UCLAR. Debido a la influencia de flujo del solvente se procedió a modificar el flujo de gas envolvente y gas auxiliar en el EM. Estas nuevas condiciones se utilizarán para los análisis posteriores.

Tiempo de retención y separación cromatográfica entre glifosato y AMPA

Con el fin de determinar los parámetros de la columna cromatográfica tales como: tiempo de retención (tr), tiempo muerto (tm) y factor de capacidad (k'), se inyectó una solución de trabajo de 10 mg L⁻¹ de glifosato y se empezó a variar el flujo de fase móvil (acetonitrilo:agua + ácido fórmico) entre 0,05 y 0,1 mL/min lo cual se encuentra en un rango recomendado como idóneo, esto con el propósito de obtener una adecuada resolución de las señales o picos cromatográficos en el menor tiempo de corrida posible, lo cual hace más versátiles y rápidas las medidas cromatográficas. Durante la corrida cromatográfica, el tiempo de retención del

analito se evaluó al inyectar réplicas de la solución patrón de trabajo. Para la identificación del tiempo muerto se inyectó aire al sistema cromatográfico con vial vacío.

La separación de Gly y AMPA se evaluó, inyectando una solución patrón de 10 mg L⁻¹. Se realizaron las corridas iniciando con 100 % de acetonitrilo (con ácido fórmico), posteriormente se fue aumentando de forma gradual la proporción de agua; por cada cambio en la proporción de solvente se dejó estabilizar la columna por 15 min y se fue registrando con los cromatogramas si se daba la separación de los analitos.

Factor de capacidad

Esta medida se determina directamente de los cromatogramas, utilizando los tiempos de retención en la separación de glifosato y AMPA y con base al t_m , se utilizó la ecuación 1 para calcular k' y el Log k .

4.3 Estandarización del método de cuantificación

Se realizó la estandarización del método para la determinación y cuantificación de glifosato por UCLAR-EM-TI. Para ello, se realizaron curvas de calibración, por patrón externo. Se preparó un patrón de 250 mg/L a partir del estándar de glifosato al 99,7 % todas las soluciones se disuelven en agua a pH 8,5. Las soluciones empleadas para las curvas de calibración se inyectaron por triplicado y se les adicionó agente ionizante, los resultados obtenidos se reportaron como el promedio de las tres mediciones. Todos los patrones de calibración se filtraron con filtro de Nylon de 0,22 μm y fueron preparados justo antes del análisis.

4.3.1 Linealidad Instrumental

Para analizar la linealidad instrumental se evaluaron 7 niveles de concentración durante 5 días diferentes. Se prepararon 5 curvas de calibración durante los 5 días, una curva de calibración por día, las cuales fueron sometidas al proceso descrito

anteriormente (ítem 4.3). Los resultados obtenidos en las pruebas estadísticas para la evaluación de linealidad, permitieron establecer el rango dinámico de trabajo.

4.3.2 La sensibilidad

Se evaluó en términos de %C.V y s de la pendiente de la curva de calibración.

4.3.3 Precisión

Se evaluó bajo condiciones de repetibilidad (en un periodo corto de tiempo) y reproducibilidad a lo largo de un periodo de tiempo más prolongado. En condiciones de repetibilidad se prepararon 7 niveles de concentración durante 5 días, una curva de calibración por día. Para el ensayo de reproducibilidad se prepararon 3 curvas de calibración durante un tiempo prolongado o días diferentes. Se calculó la desviación estándar y el coeficiente de variación en términos de porcentaje (%C.V) por nivel de concentración bajo condiciones de repetibilidad y reproducibilidad.

4.3.4 Límite de cuantificación y detección

La determinación del límite de detección (LD) se llevó a cabo por medio de análisis en orden decreciente de la concentración de glifosato, en busca de la concentración experimental a la cual la señal de glifosato fue distinguible del ruido, mientras que la determinación del límite de cuantificación (LC) se llevó a cabo mediante la determinación de la concentración en mg L^{-1} a la cual el sistema de análisis de datos del EM puede integrar el área bajo los picos obtenidos para el glifosato.

Con el fin de establecer la diferenciación entre el ruido de fondo del equipo analítico y la perturbación por el cambio en la señal, se estableció dentro de la realización del análisis la determinación del Límite de Detección (LD) y Límite de Cuantificación (LC) para el glifosato y AMPA.

4.4 Diseño experimental para la optimización del proceso de extracción de glifosato por DMFS

Se estudió el efecto de absorbentes como C₁₈, alúmina, amino, y tierras diatomeas las cuales son frecuentemente empleadas para extracción de plaguicidas organofosforados^{4,47}. Estas pruebas consistieron: en dopar los absorbentes con Gly y AMPA a un nivel de concentración de 3 mg L⁻¹ posteriormente se aplica la metodología de DMFS. Se evalúan diferentes parámetros de procedimiento, es decir, tipo de adsorbentes, cantidad de adsorbentes y eluyente.

Para el diseño experimental se estableció como variables independientes: el pH, volumen de elución y secado como la variable respuesta el porcentaje de recobro de glifosato por DMFS.

Variables	Nivel alto	Nivel medio	Nivel bajo
pH	8,5	5,5	2,5
Volumen de elución	10 mL	6 mL	3 mL
Secado	Con secado	-	Sin secado

Los experimentos se efectuarán acorde con la matriz de diseño experimental factorial 3^k x 2 con k= 2, puntos estrella y punto central en el cuerpo. El análisis de los resultados empleando el adsorbente se realizará mediante análisis de varianza (ANOVA) y las diferencias significativas mediante pruebas de contraste según sea el caso a un nivel de confianza del 95 %. Se procedió a realizar estudios de recobros a diferentes niveles de concentración para el plaguicida y así establecer la exactitud, la precisión y los límites de detección del método.

Para el diseño de los puntos experimentales se hizo uso del software Statgraphics Centurion XVII y para llevar a cabo las pruebas estadísticas requeridas para este trabajo se utilizó el paquete estadístico SPSS versión 23 y el programa Excel.

4.5 Estabilidad de glifosato en la extracción por DMFS

Teniendo en cuenta las propiedades fisicoquímicas del Gly y AMPA y los parámetros que inciden en el proceso de extracción de analitos por DMFS, se estimaron las siguientes variables:

Tabla 7. Variables de estudio

Parámetro	Rangos
Temperatura	10-40 °C
pH	2,5 - 8,5
Tiempo	0-4 horas
Limpieza de la muestra	Acetonitrilo y acetonitrilo con 0,5 % de ácido trifluoroacético y la modificación química de la matriz o mezcla de soporte sólido de matriz para lo cual se emplea cloruro de sodio (NaCl)

Uno de los problemas principales que se encuentran para el análisis de analitos en sangre total, el plasma o el suero es la presencia de proteínas; las cuales puede interferir en las determinaciones realizadas por métodos espectroscópicos y cromatográficos como la CLAR. Con el propósito de retirar proteínas abundantes y compuestos interferentes, se realizó una comparación entre un previo lavado con acetonitrilo el cual permite la desnaturalización de las proteínas y otro estudio con ácido trifluoroacético/acetonitrilo. El ácido trifluoroacético se usa como contra ion para asociarse con grupos cargados en la proteína y aumentar su hidrofobicidad²³.

4.6 Extracción de glifosato por DMFS con soluciones patrón

Para llevar a cabo la adecuación del proceso de extracción por dispersión de matriz en fase sólida (DMFS)-sin muestra, se tiene en cuenta la metodología planteada por Barker ³. Inicialmente el proceso se acondicionó determinando el porcentaje de recobro de glifosato en la extracción empleando solución patrón.

El procedimiento general utilizado se muestra en la Figura 11. Inicialmente se procedió a mezclar 200 mg de material de soporte con una cantidad (60 μL) de glifosato equivalente a una concentración de 3 mg L^{-1} (dopaje) el cual al adicionarlo al adsorbente; los componentes son mezclados en un mortero de ágata mecánicamente usando un pistilo de ágata. El patrón ya mezclado y distribuido en la fase soporte es transferido y empacado dentro de un cartucho de extracción y luego ligeramente comprimidos para eliminar espacios de aire interno. Finalmente se realiza la elución del glifosato con agua. Se estudió como solvente de limpieza acetonitrilo y acetonitrilo + ácido trifluoroacético 0,5 %, también se estudió el efecto de cloruro de sodio como modificador de matriz ^{3,46}.

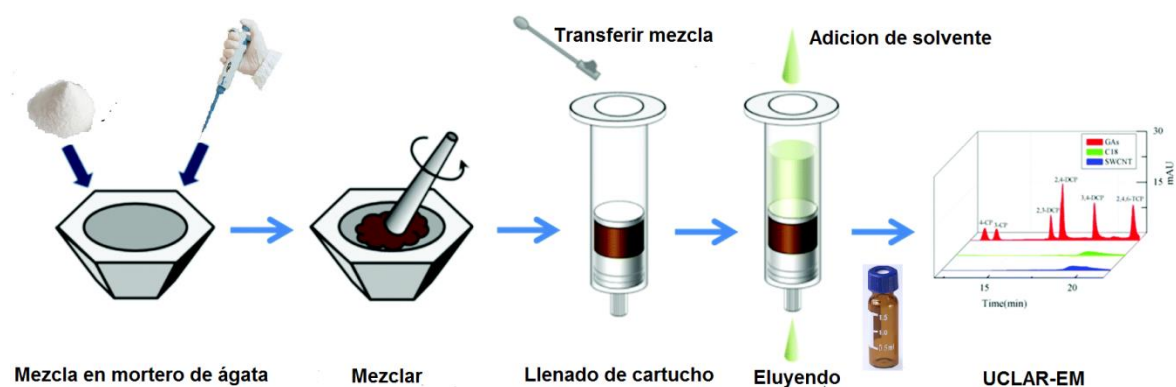


Figura 11. Procedimiento para extracción de glifosato por DMFS

Fuente: Adaptada de www.invernus.uson.mx

Todas las fracciones recogidas se filtraron y analizaron directamente en UCLAR-EM-TI; a partir de los análisis de las fracciones recogidas utilizando el manifold para facilitar la elución del analito, se determinó las posibles pérdidas de analito en el lavado y el volumen total requerido para la extracción de glifosato. De manera análoga se realizó blanco de solvente de C₁₈ y todos los análisis se realizaron por triplicado

Se determinó el porcentaje de recobro para el procedimiento descrito, evaluándose el área del analito extraído en un volumen de 1,0 mL por DMFS frente al área del

estándar de glifosato de 3 mg L⁻¹. A partir de los datos se calculó el porcentaje de recobro ($\%R = (\text{área glifosato extraída}/\text{área 3 mg L}^{-1} \text{ glifosato}) * 100$) del método y se determinó la precisión en términos del % C.V y (s) y la desviación estándar.

4.7 Aplicación de la DMFS a muestra reales

Con el fin de evaluar la metodología analítica implementada por UCLAR-EM-TI y DMFS en muestras reales, se aplicó el procedimiento antes mencionado a muestras de sangre.

Las muestras de sangre humana fueron obtenidas de una persona sana libre de contaminación por glifosato empleando una jeringa estéril de un solo uso sin anticoagulante. La muestra se almacena en frío a 10 ± 2 °C la cual se usa dentro de las 72 h, a continuación se aplicó la metodología de extracción por DMFS descrita en el ítem 4.6. Para lo cual se toman 50 mg de sangre y se dopan con 60 µL de una solución de glifosato a una concentración de 50 mg L⁻¹ con el fin de obtener una concentración de 3 mg L⁻¹ en un volumen de un mL. Posteriormente, se procedió a mezclar 200 mg de material de soporte y aplicar la DMFS como se ilustra en la figura 12. Finalmente se realiza la elución del glifosato con las condiciones óptimas resultantes del estudio de la sección 4.5 (tabla7). En la Figura 12 se muestra el procedimiento de extracción por DMFS para muestras reales las cuales se realizan por triplicado.

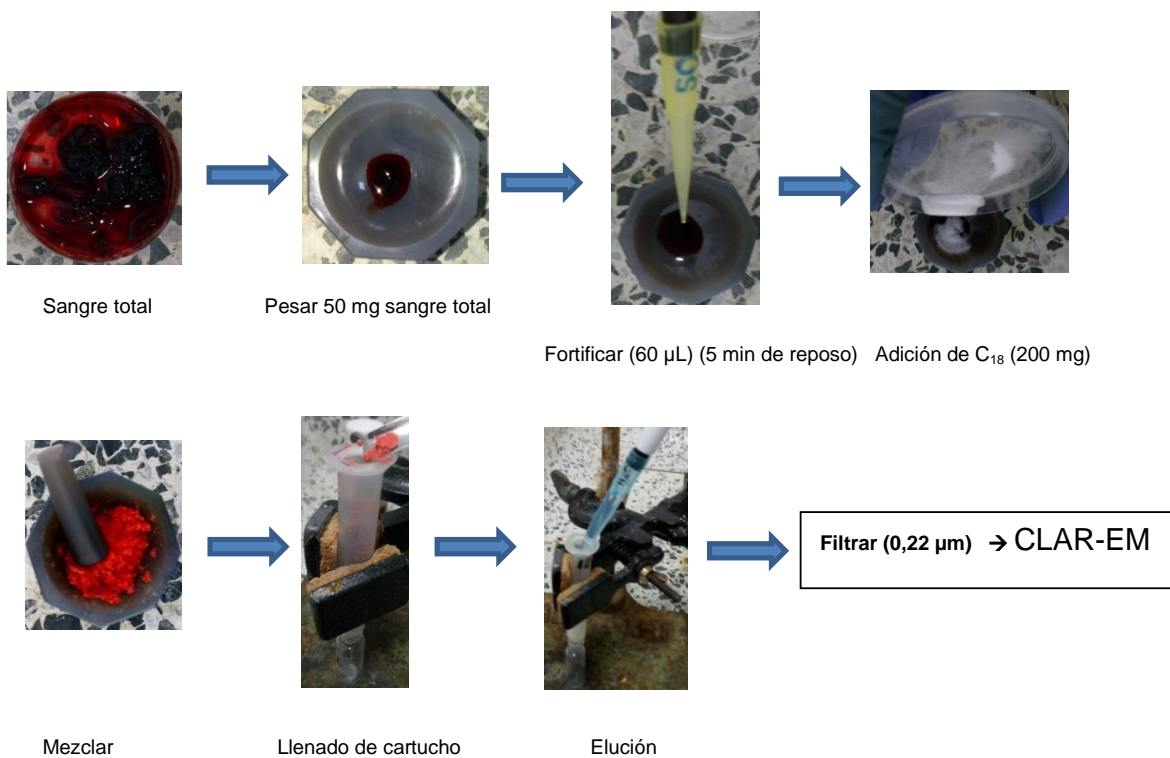


Figura 12. Procedimiento para la extracción de muestras por DMFS

Fuente: Fotos tomadas por el autor

5. Análisis de resultados

5.1 Condiciones de detección del glifosato por espectrometría de masas

En primer lugar, los parámetros de funcionamiento del EM para la determinación del glifosato y AMPA, se optimizaron mediante observación de la respuesta máxima obtenida para los espectros de masas en la sintonización automática.

Se encontró que para cada agente ionizante utilizado (hidróxido de amonio y ácido fórmico al 0,1 %), se alcanza una adecuada señal de respuesta en el EM. Sin embargo por medio de análisis de los espectros se determinó que el mejor agente ionizante es el hidróxido de amonio, cuyo espectro de masas para el glifosato sugiere los iones moleculares de m/z 88 y 170, siendo el más abundante el pico de

170,22 (M+1); (Figura 13) en el (anexo 1A) se muestra los espectros de MSⁿ donde se corrobora la presencia de los picos más comunes para el glifosato, de igual forma se realizó la sintonización de AMPA cuyo espectro de masas presenta iones moleculares de *m/z* 112, 223 siendo este último el más abundante el anexo 1B muestra los espectros de MSⁿ.

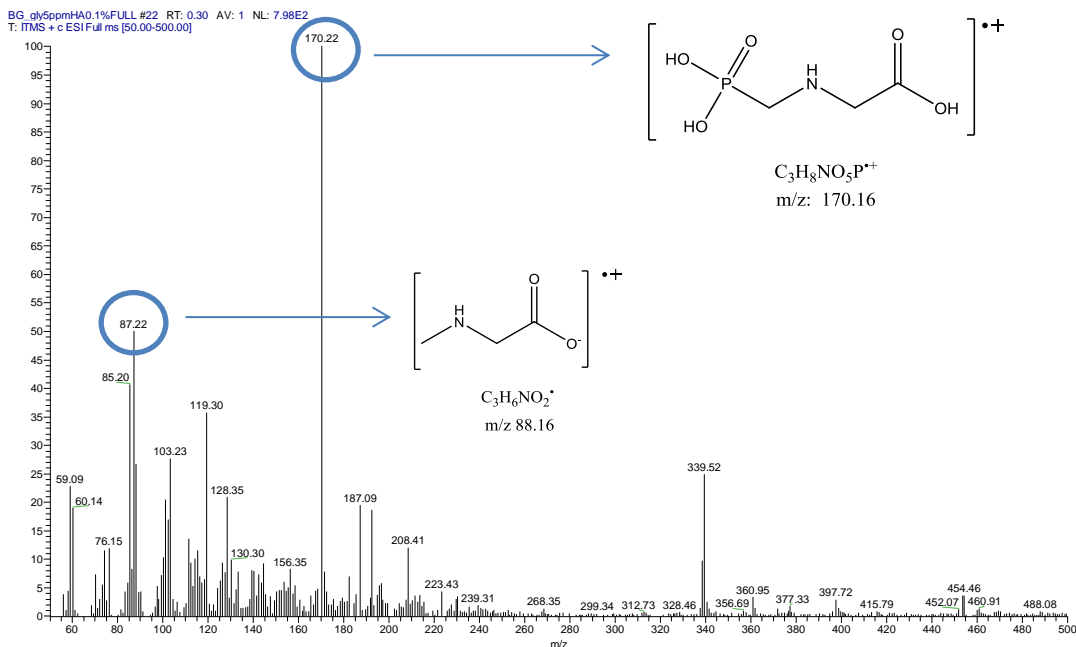


Figura 13. Espectro de masas por ESI del glifosato+ NH₄OH 0,1%

Fuente: Propia. Condiciones del equipo (Tabla 8)

Al utilizar hidróxido de amonio como agente ionizante se registró un nivel de normalización E² (sensibilidad) esto implica que la cantidad de iones que entran a la trampa de iones es alta, por lo que el proceso de ionización que se efectúa es el adecuado para la identificación del analito; por otro lado el ácido fórmico fue también un buen agente ionizante y presenta un espectro de masas parecido al que se registra con el hidróxido de amonio (Anexo 2), sin embargo, debido a que el analito se degrada fácilmente a pH ácido (3,0) se descarta utilizar fuentes ácidas para ionizar directamente la solución patrón de glifosato. La comparación directa de los espectros con la bibliografía no fue posible ya que la ionización depende parcialmente de los parámetros de ionización que se establecen en el

espectrómetro de masas⁹. Finalmente en la (Tabla 8), se especifican las condiciones que fueron adecuadas para la detección de Gly y AMPA por la sintonización automática en el EM (Figura 14).

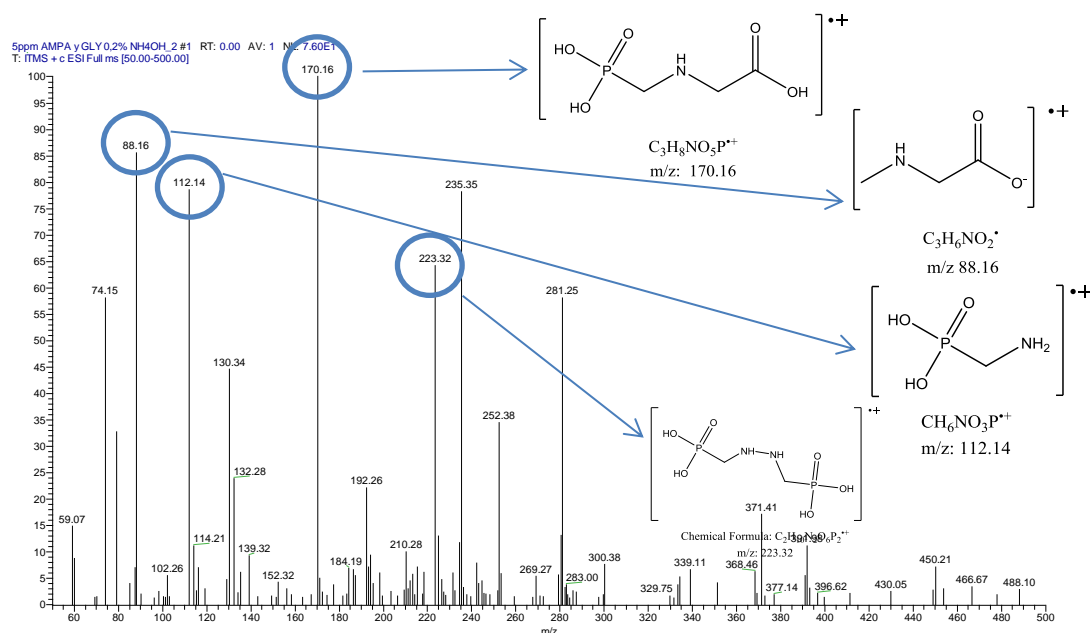


Figura 14. Espectro de masas por ESI para la mezcla Gly y AMPA+ NH₄OH 0,1 %

Fuente: Propia. Condiciones del equipo (Tabla 8)

Tabla 8. Parámetros EM-ESI en modo positivo para la fase móvil seleccionada

Parámetro	Valor óptimo
Flujo de gas envolvente (arb)	35
Flujo de gas auxiliar (arb)	10
Flujo de gas de barrido (arb)	0
Voltaje de el spray (kV)	5
Corriente de el spray (µa)	0,05
Temperatura del capilar (°C)	275
Voltaje del capilar (V)	16
Lente del tubo (V)	60

Aplicando el modo de análisis por EM denominado SRM (Selected Reaction Monitoring), se selecciona como ion precursor al pico más abundante en el caso de glifosato fue 170 m/z y para el AMPA 223 m/z a los cuales se aplicó una energía de colisión para obtener el ion producto el cual es monitoreado para la adquisición de

datos en el acople UCLAR-EM. Los parámetros optimizados para cada analito se muestran en la tabla 9.

Tabla 9. Parámetros optimizados de ESI-MS/MS

Analito	Ion precursor (m/z)	Ion producto (m/z)	Energía de Colisión
Glifosato	170	87	25
Ácido aminometilfosfónico	223	112	28

5.2 Condiciones en ultra cromatografía líquida de alto rendimiento acoplada a espectrometría de masas para glifosato

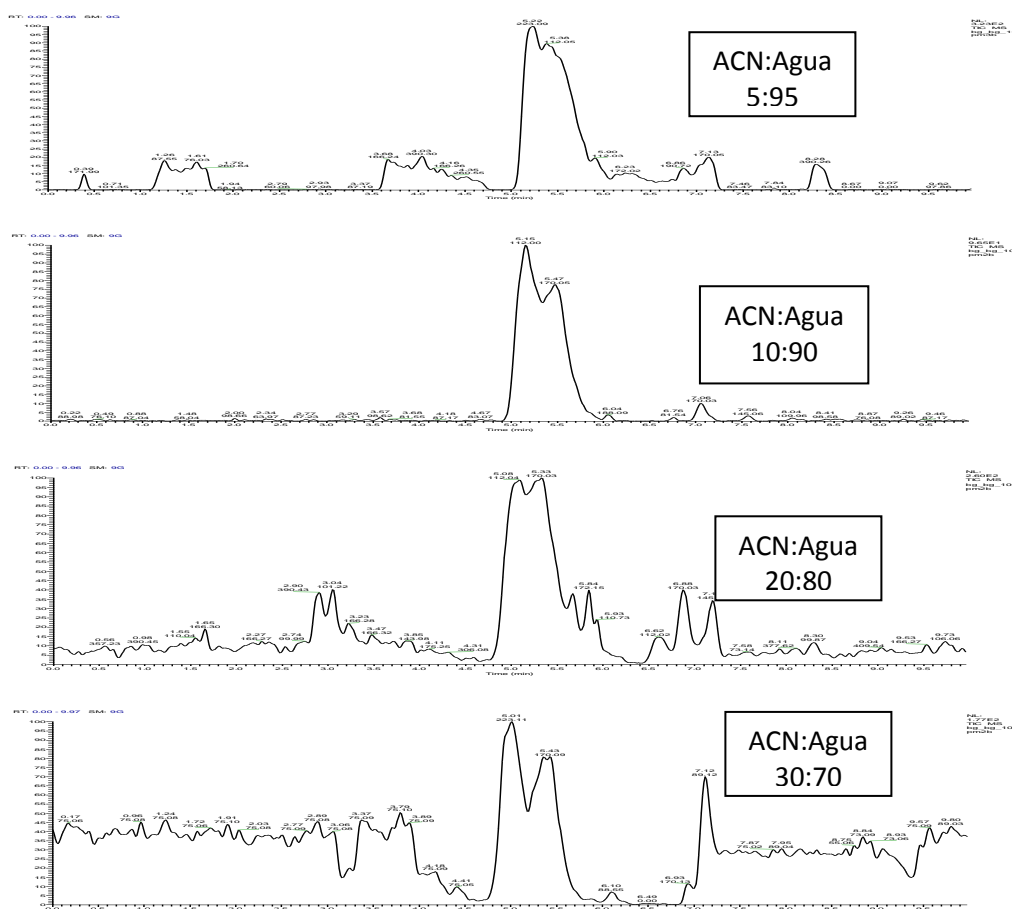
Al realizar la conexión en T (acople) UCLAR y EM se determinó que al aumentar el flujo de la fase móvil entre 0,05 – 0,1 mL/min no afecta de forma significativa la identificación del analito dado que el nivel de normalización e intensidad de los picos no disminuyo con el aumento del flujo. Es importante resaltar que al realizar el acople UCLAR-EM-TI hay flujos más altos de solvente, por lo cual se requiere mayor flujo de gas para que se dé la formación del electrospray, es decir promover la nebulización de la solución estándar que se inyecta directamente por la sonda al EM. Por tanto el flujo de los gases que están implícitos en el desempeño de la formación del spray, tales como flujo de gas envolvente y auxiliar son ajustados en el momento de la conexión en T donde entra en contacto con la fase móvil. Los valores finales optimizados de gas envolvente y auxiliar son 35 y 10 (arb) respectivamente, con estos valores se fijó un método para la detección de Gly y AMPA por UCLAR-EM-IT.

5.2.1 Determinación de parámetros en la separación cromatográfica

Separación cromatográfica

Al realizar la separación de los picos cromatógrafos a partir de la variación de la composición de la fase móvil desde 95 % a 5 % de acetonitrilo aumentando la

relación de agua a un flujo constante de 0,1 mL/min, se observa una leve separación del glifosato y AMPA, al incrementar el porcentaje de agua la cual parece mantenerse hasta la proporción 50:50 acetonitrilo: agua. A partir de este punto se evidenció la pérdida completa de la gaussianidad de los picos al ir aumentado la cantidad de acetonitrilo y el pico cromatográfico se desplaza a un mayor tiempo de retención, permitiendo que los fenómenos de difusión gobiernen el perfil cromatográfico y afecten la resolución (Figura 15); es así que los cromatogramas obtenidos no serían útiles o adecuados para la cuantificación de los analitos. Esto se pone en evidencia evaluando el factor de capacidad el cual se emplea para evaluar el tiempo de retención y en este proceso para ajustar la separación de los dos analitos.



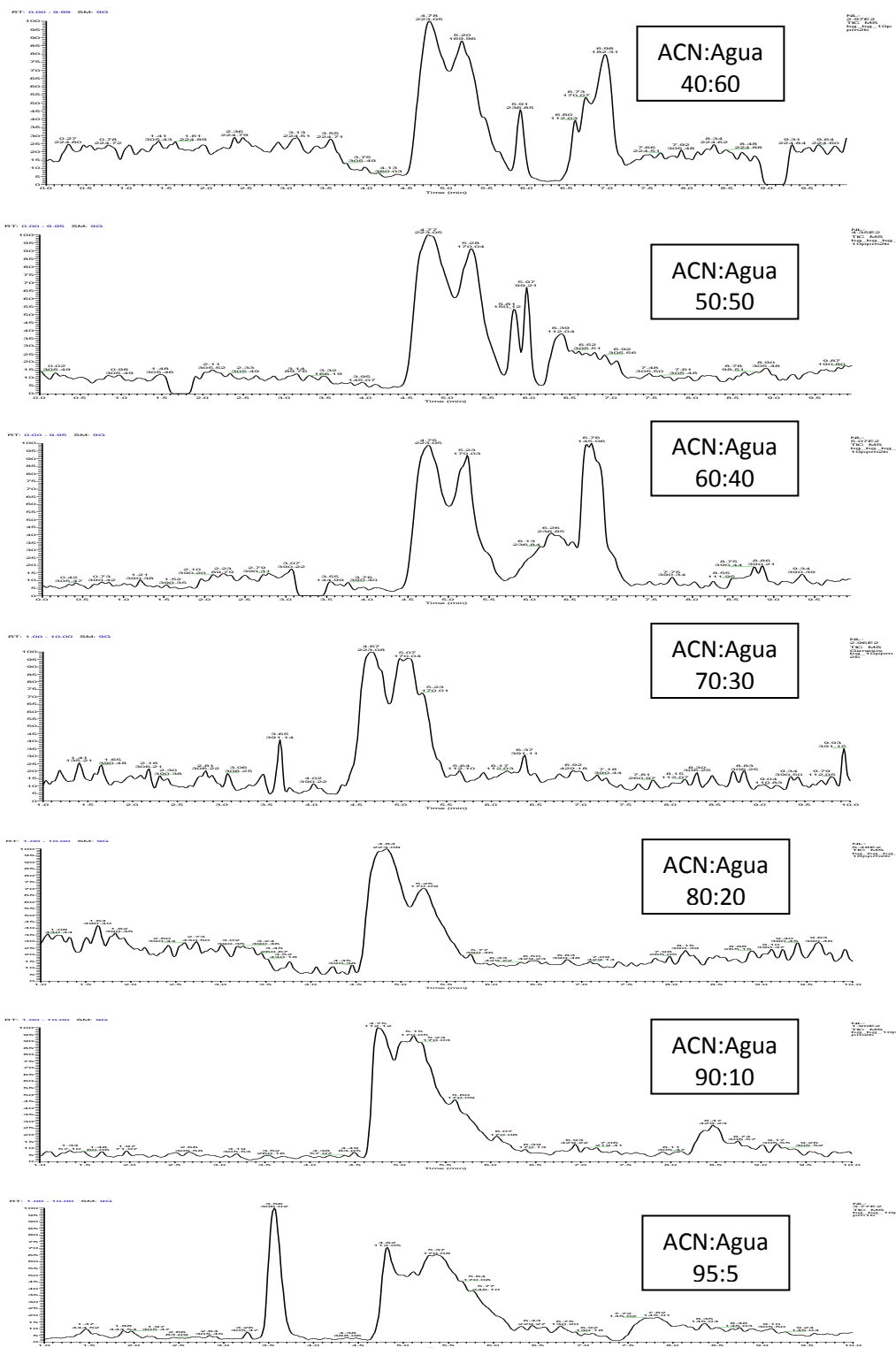


Figura 15. Perfiles cromatográficos para el cambio de fase móvi aumento de la proporción de acetonitrilo

La medida del factor de capacidad (k') se determinó directamente de los tiempo de retención en los cromatogramas (Figura 15). Con la inyección de aire a través del cromatógrafo se determinó que el tiempo muerto equivale a 0.11 min, y se graficó el logaritmo de del factor de capacidad para cada cambio en la proporción de acetonitrilo: agua (Figura 16).

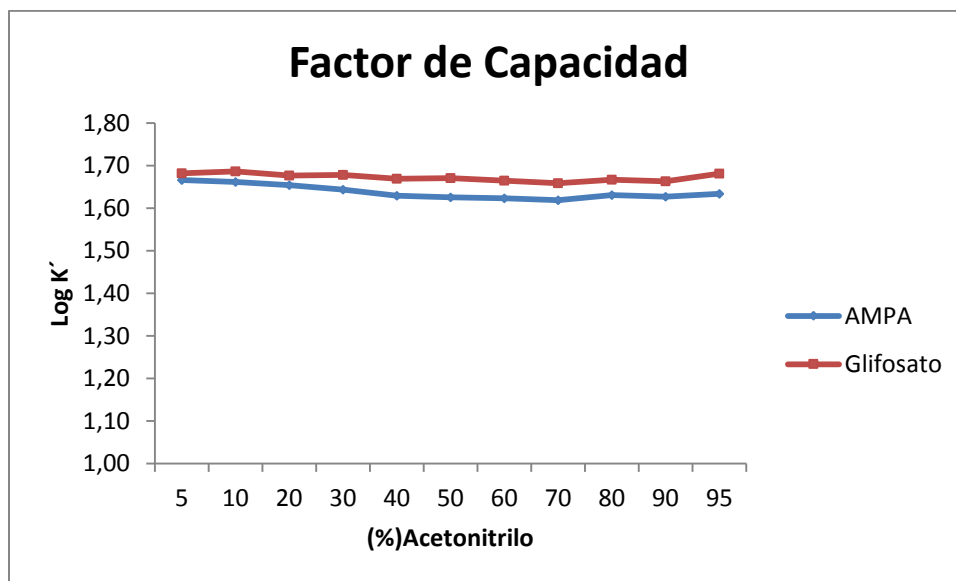


Figura 16. Gráfica log k' vs proporción acetonitrilo: agua

Según los resultados del factor de capacidad se concluyó que ninguna de las proporciones de acetonitrilo: agua es útil para la separación de glifosato y AMPA; ya que al modificar la fuerza de elución de la fase móvil, al aumentar la proporción apolar, lo que conlleva a un desplazamiento en el tiempo de retención, ensanchamiento y pérdida de la resolución de los picos.

Se evaluaron otras variables para lograr la separación de los analitos, una de ellas fue el aumentando la temperatura de la columna a 40 °C y 50 °C (anexo 4 y 5 respectivamente) empleando un flujo de 0,05 mL/min (menor al empleado inicialmente) pero ninguna de las temperaturas aplicadas fueron adecuadas para la consecución de la resolución necesaria y la velocidad de la separación. También se

realizó diferentes gradientes (anexo 6) variando la relación acetonitrilo: agua aplicando temperaturas entre 20 y 50 °C y flujos de 0,03 y 0,05 mL/min sin embargo la separación del gly y AMPA no se dio. Otra variable que se estudio fue la fase móvil utilizando relaciones de solventes como el butanol: agua e isopropanol: agua (anexo 7 y 8 respectivamente) pero no se obtuvieron los resultados esperados para la separación de los compuestos.

Teniendo en cuenta el factor de capacidad (k') y después del estudio de optimización, la fase móvil seleccionada fue A: agua y B: acetonitrilo que contenían ácido fórmico al 0,1 %. La elución se realizó con una relación 50:50 acetonitrilo: agua en modo isocrático durante 5 min. La columna se re-equilibró durante 5 minutos antes de la siguiente inyección. En la Tabla 10 se resume en su totalidad todos los parámetros establecidos para el análisis cromatográfico.

Tabla 10. Condiciones para la determinación de glifosato y AMPA por UCLAR

Condiciones cromatográficas	
Columna	Hypersil GOLD (C ₁₈) tamaño de partícula 1,9 µm (100 X 2,1mm)
Fase móvil	50:50 acetonitrilo: agua + ácido fórmico 0,1 % Modo:isocrático
Temperatura de la columna	20°C
Flujo fase móvil	0,1 mL/min
Tiempo de corrida	5 min
Volumen de muestra	20 µL

Se escogió como fase móvil acetonitrilo:agua 50:50 al cual se le adicionó 0,1 % de ácido fórmico como agente ionizante para el proceso, se observó que no es útil trabajar a flujos bajos de fase móvil puesto que el tiempo de análisis llega a durar 10 min y se da el ensanchamiento del pico cromatográfico y a flujos altos no mayores de 0,2 mL/min el pico eluye a un tiempo menor a 1 min muy cerca al t_m de la

columna; de modo que se determinó que el flujo óptimo de fase móvil era 0,1 mL/min, permitiendo un análisis en tan solo 5 min.

5.3 Implementación de la metodología analítica para determinar glifosato y AMPA por UCLAR-EM-TI

Se evaluaron los parámetros descritos en la metodología del ítem 4.3, se prepararon curvas de calibración por patrón externo (para comparar de las señales de la muestra con las correspondientes a las del calibrado (disoluciones patrón) para Gly y AMPA en un rango entre 0,5 a 10 mg L⁻¹ a partir de una solución estándar de 250 mg L⁻¹, teniendo como blanco agua + NH₄OH 0,1%, esto con el fin de estandarizar el método analítico y que éste conduzca con un alto grado de seguridad, a la obtención de resultados precisos y exactos dentro de las especificaciones previamente establecidas.

5.3.1 Linealidad Instrumental

La linealidad instrumental es aquel grado de proporcionalidad directa entre un par de variables de un método analítico. Para medirse se realiza una “curva de calibración” con la cual se establece la proporcionalidad existente entre la concentración y la respuesta del método analítico³⁵.

Para el proceso se evaluaron (7 niveles de concentración) durante 5 días. Se preparó una curva de calibración por día, la cual se sometió al método descrito en la metodología para Gly y AMPA. Los resultados se presentan en la tabla 11 y 12 respectivamente.

Tabla 11. Evaluación de la normalidad de los datos obtenidos en función del tiempo para Gly (Días consecutivos)

Concentración (mg L ⁻¹)	Área glifosato				
	Día 1	Día2	Día 3	Día 4	Día 5
0.5	1772,3	1600,3	1423,3	1628,3	2382,7
1.0	3562	3308,7	3892,0	3195,7	3286,0
2.0	10290	8863,0	9761,0	9761,7	10144,3
3.0	14457	14233,7	14255,0	13675,0	14199,0
5.0	20489	18379,7	19962,7	18619,0	19124,3
7.0	28026	28994,3	29210,7	27240,3	27954,0
10.0	32733,3	34483,0	34511,7	34197,3	34876,7

Tabla 12. Evaluación de la normalidad de los datos obtenidos en función del tiempo para AMPA (Días consecutivos)

Concentración (mg L ⁻¹)	Área AMPA				
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
0.5	170,3	141,1	177,7	226,0	242,0
1.0	441	387,3	488,3	484,0	521,0
2.0	1820	2207,7	2492,0	2911,0	2973,3
3.0	2508,7	2944,7	3509,3	2955,7	3491,3
5.0	5081,7	4610,3	4322,7	4269,0	5145,3
7.0	7451,3	7429,0	7084,0	6689,0	7272,0
10.0	10887	10134,0	9632,7	9100,3	10326,0

Se aplican pruebas paramétricas de ANOVA con el fin de establecer si existen diferencias significativas en los valores de área en términos de linealidad instrumental. En la Tabla 13 y 14 se presentan los datos de los análisis ANOVA para Gly y AMPA respectivamente.

Tabla 13. ANOVA para área vs día (Gly)

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	5,806E+6	4	1,451E+6	0,011	1,000
Dentro de los grupos	1,345E+10	100	1,344E+8		
Total	1,345E+10	104			

Tabla 14. ANOVA para área vs día (AMPA)

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	2,515E+6	4	6,289E+5	0,054	0,995
Dentro de los grupos	1,169E+9	100	1,169E+7		
Total	1,171E+9	104			

El análisis ANOVA para los valores de área de los diferentes niveles de concentración en función del día, (Tabla 15 y 16) muestra que no existe diferencia significativa entre los valores de área ($p > 0,05$) en función del día, se encuentra que los resultados provienen de una población con distribución normal y el área de cada concentración no presenta variación con el tiempo, además sugiere que la metodología aplicada presenta repetibilidad en días consecutivos.

En las tablas 15 y 16 se muestran los resultados de la prueba ANOVA para conocer si existen diferencias significativas entre los valores de área en función del nivel de concentración.

Tabla 15. ANOVA para Área vs Nivel de concentración (Gly)

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	1,341E+10	6	2,235E+9	5007,285	0,000
Dentro de los grupos	4,374E+7	98	4,463E+5		
Total	1,345E+10	104			

Tabla 16. ANOVA para área vs nivel de concentración (AMPA)

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	1,154E+9	6	1,924E+8	1103,384	0,000
Dentro de los grupos	1,708E+7	98	1,743E+5		
Total	1,171E+9	104			

El resultado obtenido indica que las áreas difieren significativamente ($p < 0,05$) entre cada nivel de concentración, esto demuestra que existe una relación directamente proporcional del área con respecto a cada nivel de concentración. Para saber entre cuáles niveles de concentración hay diferencia significativa, se aplica la prueba de Tukey (o prueba de grupos) Tabla 17 y 18 para Gly y AMPA respectivamente, con un intervalo de confianza del 95 %.

Tabla 17. Prueba de Tukey (glifosato)

Nivel de concentración	N	Subconjunto $\alpha = 0,05$						
		1	2	3	4	5	6	7
0,5	15	1761,4						
1,0	15		3448,8					
2,0	15			9764,0				
3,0	15				14163,9			
5,0	15					19314,9		
7,0	15						28285,0	
10,0	15							34160,4
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

Tabla 18. Prueba de Tukey (AMPA)

Nivel de concentración	N	Subconjunto $\alpha = 0,05$					
		1	2	3	4	5	6
0,5	15	191,4					
1,0	15	464,3					
2,0	15		2480,8				
3,0	15			3081,9			
5,0	15				4685,8		
7,0	15					7185,0	
10,0	15						10016,0
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

En los resultados de la prueba de Tukey para el método analítico, se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos en donde cada área es significativamente diferente, lo que sugiere que el área de cada nivel de concentración tiene un valor de significancia de $p > 0,05$, es decir, el incremento en el nivel de concentración produce incremento significativo y proporcional en el valor del área, indicando que hay una relación lineal directa entre el área y la concentración en los niveles de las curvas de calibración para el glifosato.

Como los datos de área difieren significativamente para cada nivel de concentración y a medida que incrementa el nivel de concentración incrementa el área. Los datos se evaluaron a través del gráfico relacionando el área respecto a la concentración de Gly y AMPA (mg L^{-1}). Las gráficas obtenidas se muestran en la Figura 17 y 18 respectivamente.

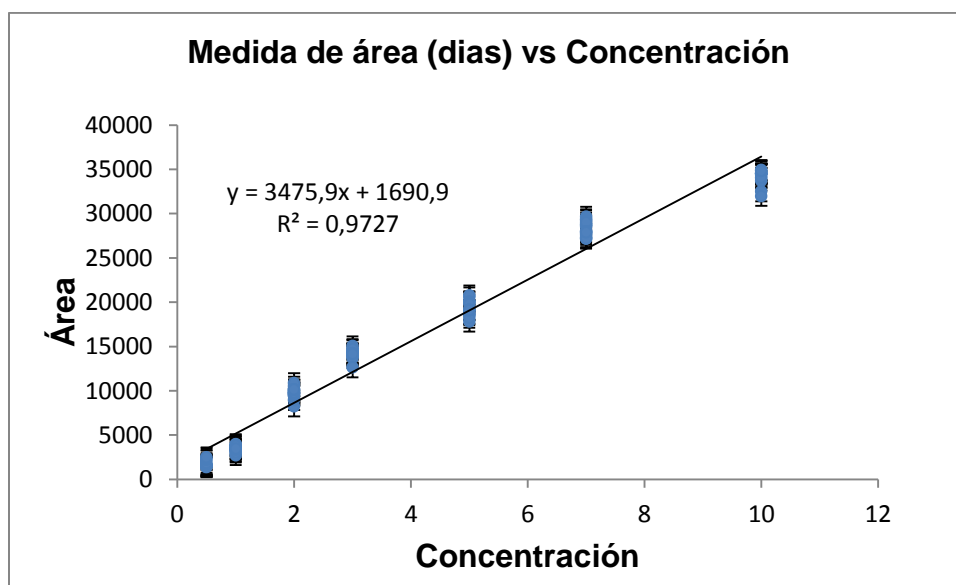


Figura 17. Gráfica respuesta lineal área vs concentración (mg L^{-1}) (Glifosato)

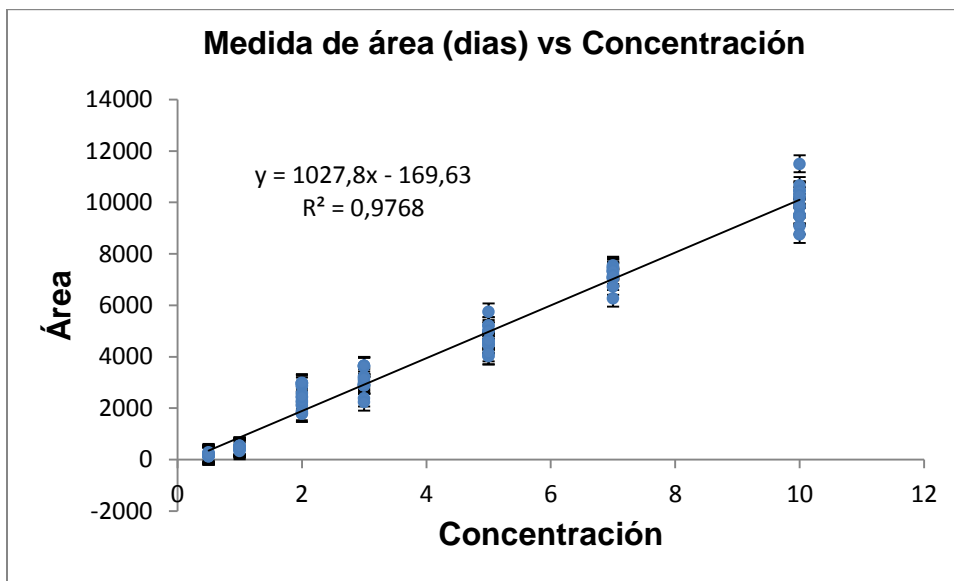


Figura 18. Gráfica respuesta lineal área vs concentración (mg L^{-1}) (AMPA)

En la Figura 17 y 18 se representa la tendencia de los datos presentados en las Tabla 11 y 12 respectivamente. Estos datos fueron evaluados a través de un gráfico donde se relaciona el área respecto a la concentración de Gly y AMPA (mg L^{-1}) en las gráficas se observa la tendencia lineal de los resultados y la ecuación lineal de las curvas de calibración.

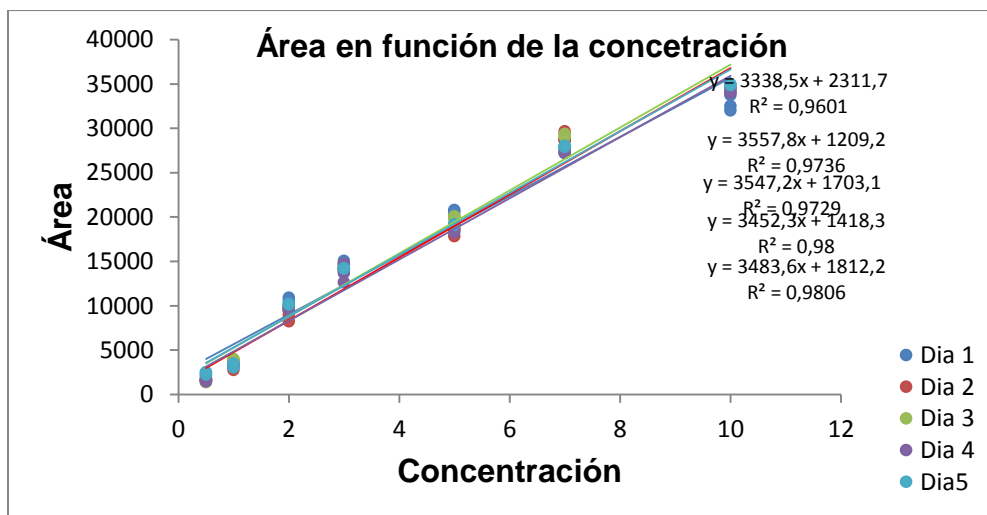


Figura 19. Gráficas de linealidad y repetibilidad de las curvas de calibración en los 5 días consecutivos (glifosato)

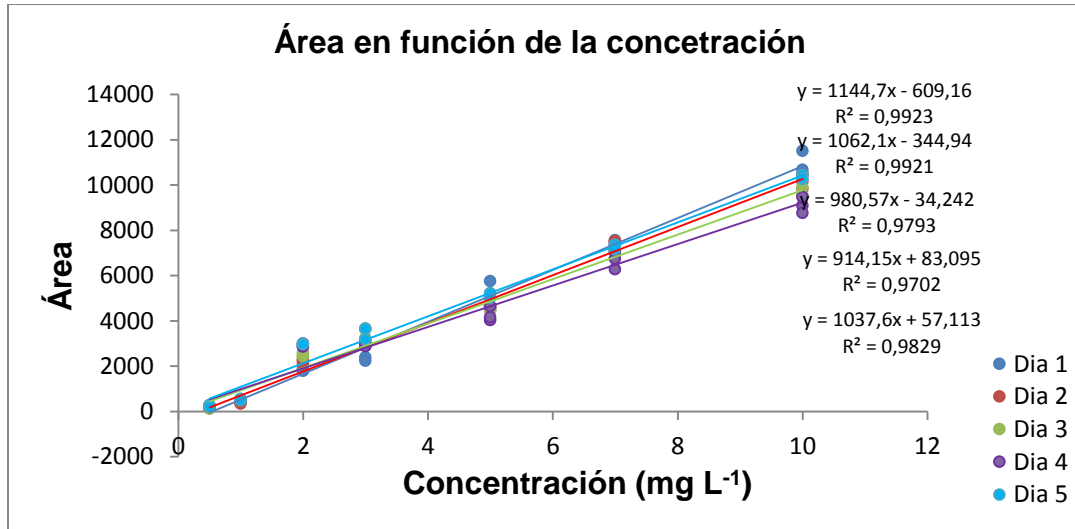


Figura 20. Gráficas de linealidad y repetibilidad de las curvas de calibración en los 5 días consecutivos (AMPA)

El coeficiente de correlación se evaluó estadísticamente mediante Correlación de Pearson teniendo como hipótesis nula H_0 : “*No existe correlación significativa entre y e x*”. Como se observa en la Tabla 19 la prueba es significativa ($\text{Sig. } 0,000 < 0,01$), por lo que se rechaza la hipótesis nula y se concluye que existe correlación altamente significativa entre el área y la concentración; la respuesta brindada por el equipo es adecuada puesto que se obtuvo un r mayor a 0,7 indicando que existe linealidad. R^2 indica que el 97 % de la variación del área esta explicada por la variación en la concentración

Tabla 19. Coeficientes de correlación. (Evaluación de la linealidad instrumental)

Parámetro	Valor
Coeficiente de correlación	0,986
Coeficiente de correlación²	0,973
Sig. Cambio en F	0,000

Mediante análisis de varianza (ANOVA) se evaluó estadísticamente la regresión en las curvas de calibración de la Tabla 11, los resultados se muestran en la Tabla 20.

Tabla 20. ANOVA para evaluar la regresión lineal en la curva de calibración (glifosato)

Modelo	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Regresión	1,309E+10	1	1,309E+10	3666,306	0,000
Residuo	3,676E+8	103	3,569E+6		
Total	1,345E+10	104			

Para evaluar la regresión se tiene como hipótesis nula: “*No hay regresión significativa en la curva de calibración ($R^2 = 0$)*”, y como hipótesis alternativa “*Hay regresión significativa en la curva de calibración ($R^2 \neq 0$)*”. Se observa que la significancia para la regresión es menor de 0,05 por lo que se rechaza la hipótesis nula y se acepta la alternativa, concluyendo que existe regresión significativa en la curva de calibración. Los resultados que se obtuvieron en las pruebas estadísticas para la evaluación de linealidad, permiten concluir que el método instrumental empleado para determinación de glifosato es lineal en el rango de 0,5 a 10 mg.L⁻¹, con un coeficiente de correlación superior a 0,95 (El valor del coeficiente de correlación oscila entre 0 y ± 1 ; una correlación igual a 0 significa ausencia de relación).⁴⁸

5.3.2 Límite de cuantificación y detección

Se estableció el límite de detección (LD) en una concentración de 0,1 mg L⁻¹ de glifosato (anexo 9A) y 0,2 mg L⁻¹ AMPA (anexo 9B) con una relación señal/ruido de 3, donde la señal fue distinguible del ruido para el límite de cuantificación (LC) se tiene en consideración un cociente S/N de 10 en el equipo. Analizando en orden decreciente de 5,0, 2,0, 1,0 y 0,5 mg L⁻¹; se determinó el límite de cuantificación en 0,5 mg L⁻¹, para el Gly y AMPA (anexo 10A y 10B respectivamente). Esta es la concentración más baja a la cual el sistema de análisis de datos (Xcalibur) puede integrar el área bajo el pico.

5.4 Extracción de glifosato por dispersión de matriz en fase sólida-DMFS

Dentro de las variables clásicas que afectan el proceso de extracción por dispersión de matriz en fase sólida se encuentra: pH, volumen de elución y secado del cartucho. Mediante el software Statgraphics Centurion® XVII se elaboró un diseño de experimentos factorial aleatorizado con las tres variables independientes anteriormente mencionadas y como variable respuesta el porcentaje de extracción de los analitos Gly y AMPA.

Variable	Nivel alto	Nivel medio	Nivel bajo
pH	8,5	5,5	2,5
Volumen	10 mL	6 mL	3 mL
Secado	Con secado	-	Sin secado

El diseño experimental arrojando 18 experimentos los cuales se efectúan acorde con la matriz de diseño experimental factorial $3^2 \times 2 = 18$, puntos estrella y punto central en el cuerpo

ANOVA particiona la variabilidad de porcentaje de recobro de AMPA (Anexo 11) en piezas separadas para cada uno de los efectos. Entonces prueba la significancia estadística de cada efecto comparando su cuadrado medio contra un estimado del error experimental. En este caso, un efecto tiene un valor-P menor que 0,05, indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95,0 %.

El estadístico r^2 indica que el modelo, así ajustado, explica 77,26 % de la variabilidad en % recobro de AMPA. El estadístico r^2 ajustada, que es más adecuado para comparar modelos con diferente número de variables independientes, es 57,04 %. El error estándar del estimado muestra que la desviación estándar de los residuos es 9,96. El error medio absoluto (MAE) de 5,85 es el valor promedio de los residuos. El estadístico de Durbin-Watson (DW) prueba los residuos para determinar si haya alguna correlación significativa basada en el orden en que se presentan los datos

en el archivo. Puesto que el valor-P es mayor que 5,0 %, no hay indicación de autocorrelación serial en los residuos con un nivel de significancia del 5,0 %.

Para Gly (anexo 12) el valor de $r^2=88,65$ %, r^2 (ajustada por g.l.) = 78,56 %, Error estándar del estimado= 13,48, Error absoluto medio = 7,99, Estadístico Durbin-Watson = 1,64 (P=0,1789), autocorrelación residual de Lag 1 = 0,11.

Tabla 21. Puntos de diseño experimental para DMFS

pH	Volumen (mL)	Secado	% Recobro AMPA	%Recobro Gly
8,5	10	sin secado	44	78
8,5	6	sin secado	27	85
8,5	3	sin secado	31	34
8,5	10	con secado	18	85
8,5	6	con secado	42	62
8,5	3	con secado	14	47
5,5	10	sin secado	16	32
5,5	6	sin secado	22	56
5,5	3	sin secado	36	51
5,5	10	con secado	9	37
5,5	6	con secado	28	44
5,5	3	con secado	18	44
2,5	10	sin secado	0	0
2,5	6	sin secado	0	8,6
2,5	3	sin secado	0	0
2,5	10	con secado	1	16
2,5	6	con secado	0	0
2,5	3	con secado	0	0

Los resultados obtenidos del análisis ANOVA del diseño factorial $3^k \times 2$ indicaron que la variable altamente significativa es el pH. Sobre el recobro de los dos analitos. La influencia en la respuesta del sistema ante cambios en las variables pueden ser observadas claramente y de manera estandarizada en el diagrama de Pareto (Figura 21), en el cual, se confirma el efecto del pH sobre la variable respuesta. Donde a pH ácido se reduce considerablemente el porcentaje de recobro y a pH

básico (8,5) se logra obtener un porcentaje recobro de 85 % para el glifosato y del 44 % para el AMPA. La diferencia en el comportamiento de extracción entre el Gly y AMPA se debería a procesos de adsorción alta, comportamiento similar que presenta AMPA el cual se adsorbe fuertemente a las partículas del suelo ²⁵. Las variables e interacciones que no sobrepasan el límite estadístico del valor t representan un aporte insignificante.

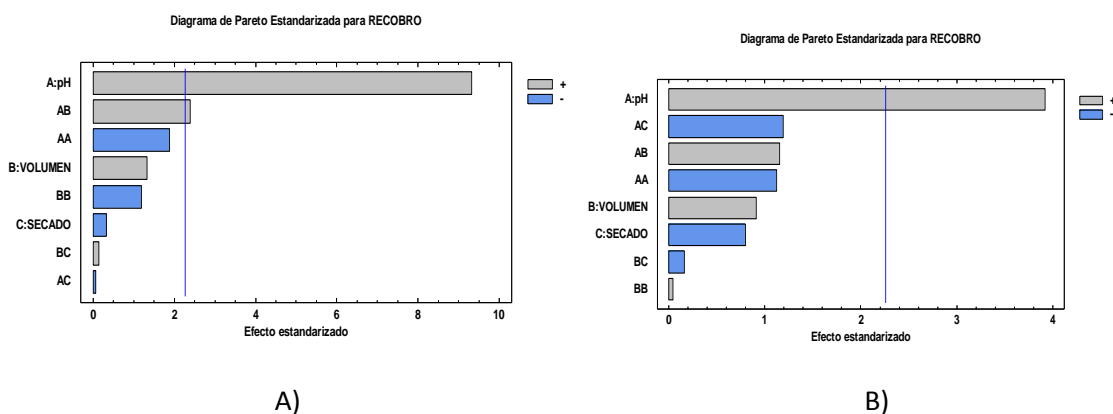


Figura 21. Diagrama de pareto A) para el Gly B) para el AMPA

Mediante el método de superficie de respuesta fue posible establecer los valores de los factores que mejoran los recobros. Así el punto óptimo para el Gly y AMPA se estable en un pH de 8,5, 6 mL de solvente de elución y sin secado del cartucho de DMFS. La superficie de respuesta resulta útil para visualizar la interacción de los factores en los que un cambio en la forma o altura de la superficie de respuesta. La información que este proporciona se utiliza para determinar una dirección en la cual se espere observar mayores valores de la variable respuesta.

A medida que se avanza sobre la superficie y se acerca a zonas de color amarillo-rojo, se encuentran los valores de mayor recobro el incremento en la respuesta se estabilizara en el punto más alto de la superficie ajustada. Mostrando que el pH del agua posee un efecto positivo imponente sobre el proceso Figuras 22 y 23, seguida por el volumen, mientras el secado no presentó la significancia

Al no lograrse un punto máximo se debió llevar a cabo un nuevo conjunto de experimentos y se ajusta de nuevo el modelo de primer orden. Se determina una nueva dirección hacia valores crecientes de la respuesta y se ejecuta otra secuencia de experimentos en la dirección determinada. Este proceso continúa hasta que se hace evidente que a partir del método no se puede obtener un incremento en la respuesta o éste es muy pequeño.

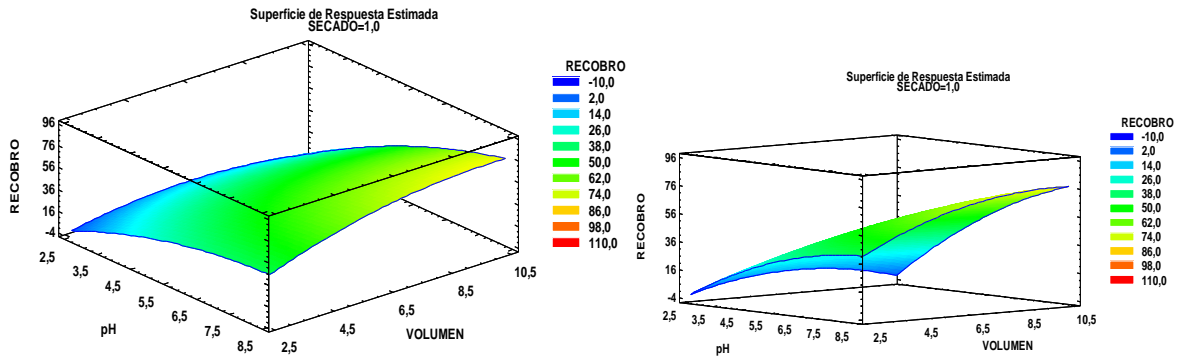


Figura 22. Superficie de respuesta para la extracción del glifosato

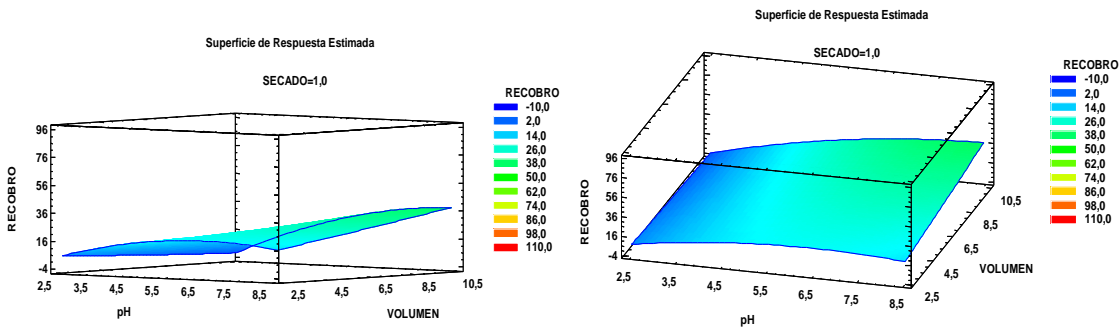


Figura 23. Superficie de respuesta para la extracción del AMPA

5.5 Comportamiento de glifosato en la extracción por dispersión de matriz en fase sólida

5.5.1 Efecto del pH

El primer efecto evaluado sobre la estabilidad del plaguicida glifosato en soluciones acuosas fue el pH. Los resultados obtenidos a partir del diseño experimental nos indicaban que era el pH un factor importante en el momento de obtener un buen porcentaje recobro, teniendo en cuenta el carácter ácido-base de los analitos. Por lo anterior se estudió el pH de mayor estabilidad del organofosforado en soluciones acuosas. En la tabla 22 se puede observar los resultados obtenidos a diferentes valores de pH (de 2,5, 5,5, 7,4 y 8,5) en función del tiempo de preparación de las soluciones estándar. Es evidente una mayor degradación del Gly a pH de 2,5 a lo largo de las 2,5 horas de preparada la muestra. Además se aprecia una menor degradación del glifosato a medida que se aumenta el pH de la solución acuosa. Concluyéndose que a pH 8,5 la estabilidad del Gly a tiempos largos se mantiene constante. (Figura 24).

Tabla 22. Estabilidad del glifosato a diferente pH durante 2,5 horas

Tiempo (min)	Área glifosato pH 2,5	Área glifosato pH 5,5	Área glifosato pH 7,4	Área glifosato pH 8,5
0	2622	2822,5	2446	2046
30	1450,5	2561,5	2696	2277,5
60	1216,5	2449	2688,5	2238
120	1245	2423	2556	2423,5
150	994	2384,5	2393,5	2549,5
180	820,5	2298	2343	2549

Condiciones: Temperatura 20°C, pH 8,5, estándar de chequeo 3,0 mg L⁻¹

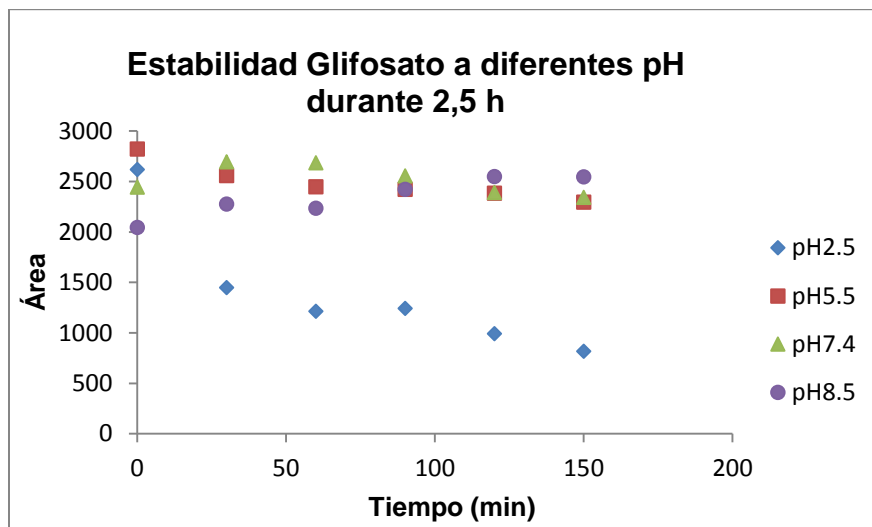


Figura 24. Estabilidad del glifosato a diferente pH.

Condiciones: Temperatura 20 °C, estándar de chequeo 3,0 mg L⁻¹

5.5.2. Efecto temperatura

Un segundo factor que se consideró importante a evaluar fue la temperatura de las soluciones preparadas y extracción como puntos concretos de análisis 10, 20, 35 y 40 ± 1 °C Se prepararon soluciones estándar de 3,0 mg L⁻¹ que fueron mantenidas a las temperaturas de análisis y posteriormente inyectadas al UCLAR-EM. Se realiza el monitoreo durante cuatro horas haciendo inyecciones cada 30 min. Del estándar y del primer mililitro de elución empleando DMFS. Para lo cual se fortifica 200 mg de C₁₈ con 60 µL de glifosato realizándose una extracción en t=0, 30, 60,90, 120, 150,180, 210 y 240 min

A partir de los deltas obtenidos (Delta 1 nos muestra la pérdida respecto al patrón inyectado cada 30 min y delta 2 nos muestra la pérdida respecto al estándar en t= 0) se aprecia como la perdida respecto al patrón es mayor a 20, 35 y 40 (tablas 24, 25 y 26) en comparación a 10 °C (tabla 23). Se observó que a las temperaturas 20 y 40 °C se presenta menor estabilidad del glifosato a lo largo del tiempo figuras 26 y 28 respectivamente para el caso de 20 °C se observa que alrededor de los 120 a 180 min empieza una pérdida considerable de glifosato. Al realizar la extracción a

40 °C se presenta una pérdida de aproximadamente el 50 % desde el t=0 min la cual se mantiene a lo largo de las 4 horas (figura 28). Finalmente la extracción realizada a 10 °C se obtuvo una mayor estabilidad para la extracción incluso después de 4 horas (figura 25), estos hallazgos proporcionaron información adicional referente al efecto de la temperatura sobre el proceso de extracción del Gly en DMFS, lo cual afecta significativamente los valores de recobro. Este estudio nos permitió concluir que la temperatura más adecuada de acuerdo a los valores analizados para la realización de los ensayos es 10 °C.

Tabla 23. Estabilidad de glifosato a 10 °C (pH 8,5)

Tiempo	Área glifosato 3,0 mg L ⁻¹	Área glifosato Agua (1 mL)	Delta 1*	Delta 2*
0	5241,5	3065	2176,5	2176,5
30	5140	3058	2082	2183,5
60	5104,5	2965,5	2139	2276
90	4923,5	3170,5	1753	2071
120	4786,5	3272	1514,5	1969,5
150	4699,5	3501	1198,5	1740,5
180	5305,5	2398	2907,5	2843,5
210	5478	2633,5	2844,5	2608
240	4838,5	3040,5	1798	2201

* Delta 1 nos muestra la pérdida respecto al patrón inyectado cada 30 min y delta 2 nos muestra la pérdida respecto al estándar en t= 0 min

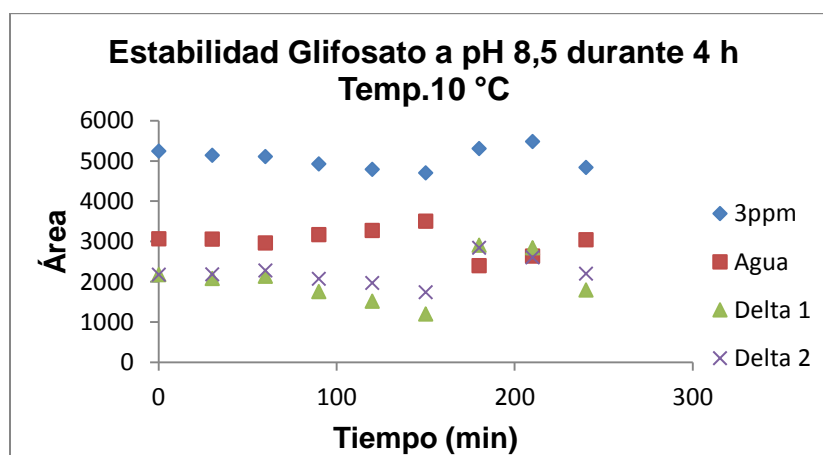


Figura 25. Estabilidad glifosato a 10°C (pH 8,5)

Tabla 24. Estabilidad de glifosato a 20 °C (pH 8,5)

Tiempo	Área glifosato 3,0 mg L ⁻¹	Área glifosato Agua (1 mL)	Delta 1	Delta 2
0	7642,5	5370	2272,5	2272,5
30	6660,5	4440	2220,5	3202,5
60	6990,5	6179	811,5	1463,5
90	7269,5	4749,5	2520	2893
120	7338,5	1644	5694,5	5998,5
150	7552	1615,5	5936,5	6027
180	5985,5	788	5197,5	6854,5
210	5990	641	5349	7001,5
240	5932	734	5198	6908,5

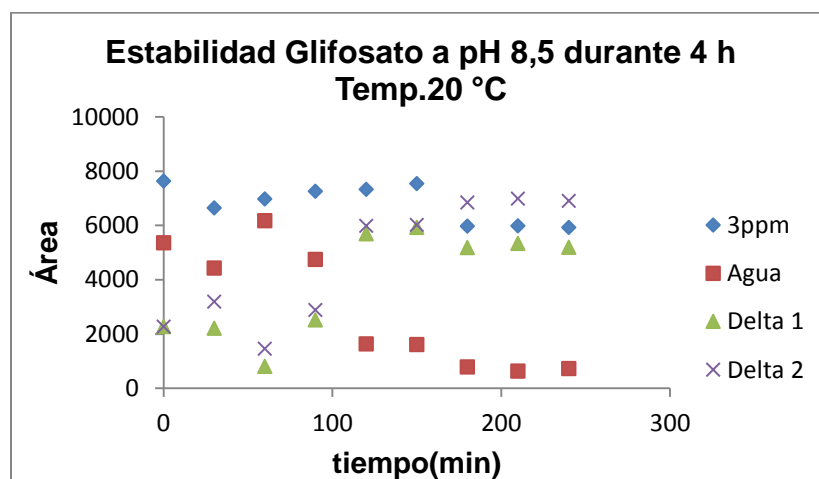


Figura. 26. Estabilidad de glifosato a 20 °C (pH 8,5)

Tabla 25. Estabilidad de glifosato a 35 °C (pH 8,5)

Tiempo (min)	Área glifosato 3,0 mg L ⁻¹	Área glifosato Agua (1mL)	Delta 1	Delta 2
0	5951,5	5873	78,5	78,5
30	5169	2167	3002	3784,5
60	4947	3342	1605	2609,5
90	5652,5	1705	3947,5	4246,5
120	5512	4426,5	1085,5	1525
150	5781	3734,5	2046,5	2217
180	5554	3854,5	1699,5	2097
210	5419,5	3195,5	2224	2756
240	5120,5	3047	2073,5	2904,5

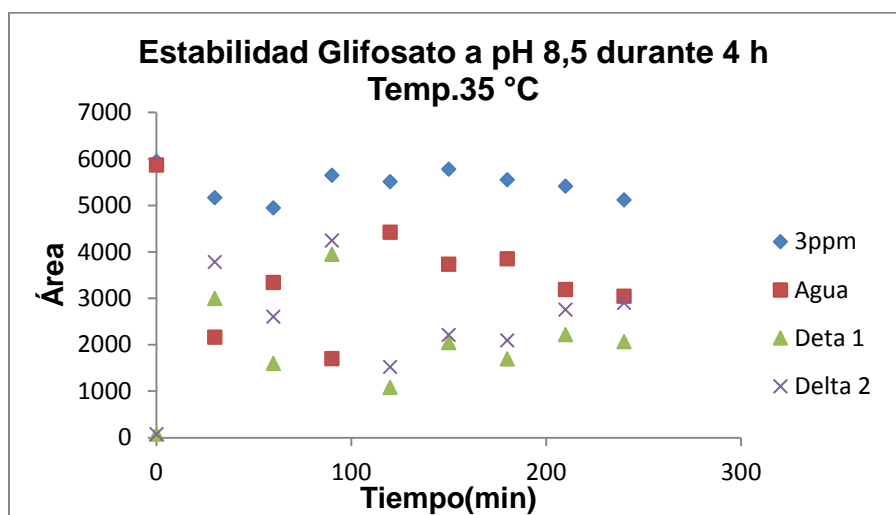


Figura 27. Estabilidad de glifosato a 35 °C (pH 8,5)

Tabla 26. Estabilidad de glifosato a 40 °C (pH 8,5)

Tiempo (min)	Área glifosato 3.0 mg L ⁻¹	Área glifosato Agua (1 mL)	Delta 1	Delta 2
0	6840,5	3561	3279,5	3279,5
30	6627	5210	1417	1630,5
60	6337	3580,5	2756,5	3260
90	6605,5	5486	1119,5	1354,5
120	6330	4132,5	2197,5	2708
150	6204,5	3520	2684,5	3320,5
180	6063	4543,5	1519,5	2297
210	6792,5	3408	3384,5	3432,5
240	5812	4525,5	1286,5	2315

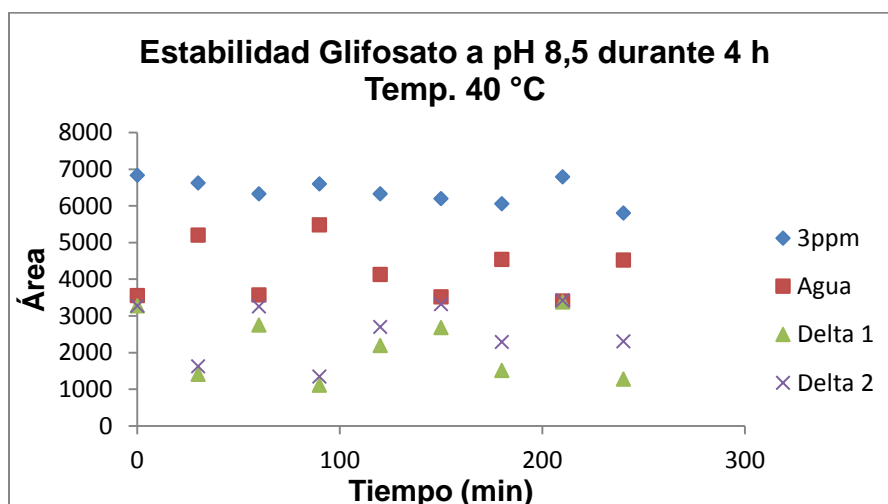


Figura 28. Estabilidad de glifosato a 40 °C (pH 8,5)

5.5.3 Proceso de Limpieza en la DMFS

Para conocer el efecto del proceso de limpieza en la extracción primero se realizó la extracción del Gly sin limpieza donde se aplica las condiciones de pH y temperatura establecidas como adecuadas en las secciones 5.5.1 y 5.5.2 respectivamente. Después de realizada la extracción sin un previo proceso de limpieza empleando un pH de 8,5 y temperatura de 10 °C nos arroja un porcentaje de recobro de 101 % (Tabla 27)

Tabla 27. Extracción sin proceso de limpieza

Solvente (mL)	Área glifosato		
1.Agua	5488	5692	5995
2.Agua	2537	2163	1856
3.Agua	561	564	615
4.Agua	367	468	320
5.Agua	163	145	181
TOTAL	9116	9032	8967
3 mg L⁻¹	8862	8572	9459
% recobro	102,9	105,4	94,8

Condiciones: Temperatura 10 °C, pH= 8,5, área en 1mL.

A pesar de obtener un porcentaje de recobro óptimo sin previa limpieza se estudió el efecto de una secuencia de eliminación de interferentes con el objetivo de aplicar la extracción del glifosato a matrices complejas como por ejemplo la sangre.

A causa de la presencia de proteínas y demás moléculas en la sangre estas generaron interferencia en la determinación realizada por UCLAR. Por tanto para retirar estos compuestos presentes en la matriz se realizó un previo lavado con acetonitrilo para la desnaturalización de las proteínas y otro con ácido trifluoroacético-acetonitrilo para aumentar la hidrofobicidad de las proteínas²⁹

Al realizar la secuencia de limpieza con acetonitrilo en el proceso de extracción se presentan fugas del analito en los primeros 4 mL de $11,4 \pm 2$ % (tabla 28) con un recobro total de 95 %. Evidentemente el acetonitrilo como solvente de limpieza incide en el perfil de extracción del Gly desplazando el frente de elución.

Tabla 28. Extracción con limpieza empleando acetonitrilo

Solvente (mL)	Área glifosato		
1.Acetonitrilo	131	296	149
2.Acetonitrilo	149	282	142
3.Acetonitrilo	122	267	228
4.Acetonitrilo	318	142	235
1.Agua	497	3276	3528
2.Agua	3921	2116	1620
3.Agua	908	468	518
4.Agua	319	334	190
5.Agua	221	114	142
TOTAL	6586	7295	6752
3 mg.L⁻¹	7313	7442	6870
% Recobro	90,1	98,0	98,3

Condiciones: Temperatura 10 °C, pH= 8,5, área en 1mL.

Para la limpieza con acetonitrilo + ácido trifluoroacético 0,5 % No se detectaron fugas en los 4 mL empleados sin embargo el recobro se redujo a un 60 % (tabla 29). Una de las posibles causas de la disminución del porcentaje de recobro es la incidencia del pH en el proceso de estabilidad del analito, previos ensayos han demostrado reacciones con derivados fluoroacetilados (Figura 29).⁴⁹

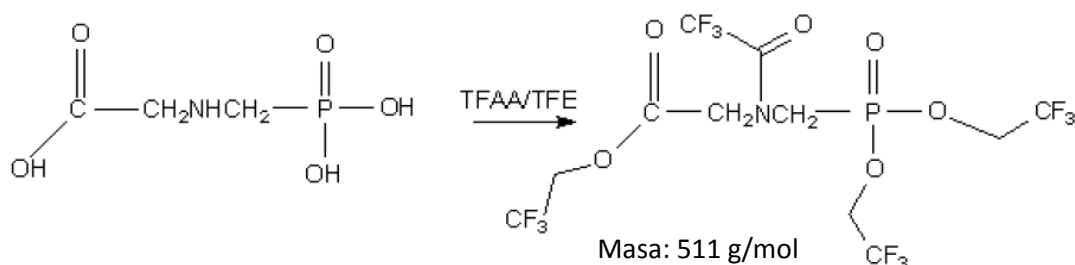


Figura 29 . Reacción de formación del derivado fluoroacetilado -fluoroetilesterificado del glifosato.

Fuente : Adaptada de (Herrera,M. 2011p.63)⁴⁹

Tabla 29. Extracción con limpieza empleando acetonitrilo + ácido trifluoroacético 0,5 %

Solvente (mL)	Área glifosato		
1. Acetonitrilo + Ac. Trifluoroacético 0,5 %	0	0	0
2. Acetonitrilo + Ac. Trifluoroacético 0,5 %	458	0	0
3. Acetonitrilo + Ac. Trifluoroacético 0,5 %	0	0	0
4. Acetonitrilo + Ac. Trifluoroacético 0,5 %	0	0	0
1. Agua	1719	1436	2290
2. Agua	2243	1947	1674
3. Agua	532	601	408
4. Agua	319	176	249
5. Agua	241	100	0
TOTAL	5054	4260	4621
3 mg L⁻¹	7715	7532	8170
% recobro	65,5	56,6	56,6

Condiciones: Temperatura 10 °C, pH= 8,5, área en 1 mL

5.5.4 Modificador de matriz en DMFS

Con el fin de aumentar la fuerza iónica en el proceso de extracción y la desnaturalización de las proteínas por medio del efecto salino, pues la mayoría de las proteínas son menos solubles a concentraciones elevadas de sal se experimentó adicionar 50 mg de cloruro de sodio (NaCl) al adsorbente C₁₈ durante el proceso de maceración en muestras reales. Los resultados indicaron disminución en el porcentaje de recobro del Gly. Se han reportado estudios de un efecto antagónico entre sales y el glifosato por lo cual una posible causa de la disminución en el porcentaje de extracción; se puede atribuir a un antagonismo entre el catión Na⁺ frente al glifosato ya que este es un anión multivalente que origina sales de glifosato de baja solubilidad. ^{50,51,52}

Tabla 30. Extracción con modificador de matriz (NaCl)

Solvente (mL)	Área glifosato	
1 Agua	N.D	N.D
2 Agua	585	N.D
3 Agua	336	1119
4 Agua	354	207
5 Agua	199	162
6 Agua	165	237
7 Agua	87,29	168
8 Agua	71,78	55,17
9 Agua	72,05	65,2
10 Agua	96,35	59,75
11 Agua	69,3	58,51
12 Agua	23,24	23,57
13 Agua	73,3	38,03
14 Agua	59,47	46,73
15 Agua	167	45,34
16 Agua	50,22	31,13
Total	2409	2316,43
3mg L⁻¹	7613	7108
% Recobro	31,6	32,6

Condiciones: Temperatura 10 °C, pH= 8,5, área en 1mL

5.6 Extracción de glifosato en muestras de sangre por DMFS

Para la extracción del glifosato en sangre total se evaluaron los siguientes parámetros: tipo de dispersante, solventes de elución y secuencia de limpieza.

Tipo de dispersante

Para seleccionar el adsorbente de dispersión óptimo, se estudiaron el gel de sílice, la tierra de diatomeas, la alúmina y el C₁₈. Las muestras de sangre humana enriquecida a un nivel de concentración del analito de 3 mg L⁻¹ temperatura 20 °C pH 8,5 se preparan para este propósito. Las recuperaciones con C₁₈ como

dispersantes fueron de 68 % Gly por lo cual se opta por la C₁₈ como adsorbente de dispersión en experimentos adicionales. Con los demás absorbentes se obtuvieron recobros entre el 5 y 60 %.

Solventes de elución

Al mismo tiempo, la eficiencia de la extracción es relevante para el tipo de disolvente de elución. En el caso de la sangre se compone de agua, proteínas, carbohidratos, grasas y varias especies inorgánicas. Por lo tanto, el solvente de elución seleccionado debe tener polaridad similar al del analito objetivo. Las biomoléculas, como las proteínas, los carbohidratos y las grasas, pueden dañar la columna de UCLAR, por tanto se debe realizar un proceso de limpieza previo a la extracción.

Se utilizaron, acetona, acetonitrilo, metanol y agua desionizada como disolventes de elución. Los resultados experimentales mostraron que acetona, acetonitrilo, metanol no pueden eluir los analitos de interés. Debido a la alta solubilidad del glifosato en agua (1,01 g/100 mL (20 °C)) se usa como solvente de elución.

Con el fin de observar el comportamiento del glifosato y su estabilidad en la sangre humana además de la viabilidad de su extracción por DMFS se aplican las condiciones estudiadas en las secciones 5.5.1 a 5.5.4 tomando los puntos más adecuados como el pH a 8,5 y temperatura de 10 °C (cromatograma anexo 13). Además de las técnicas de desnaturalización de proteínas usando acetonitrilo, ácido trifluoroacético y cloruro de sodio

En la tabla 31 se indican los resultados obtenidos con las condiciones establecidas previamente. Los porcentajes de recuperación para el Gly fueron de solo el 37,5 %, lo cual se atribuye a que esta concentración la sangre se encargaría de degradar la molécula del glifosato y al efecto matriz. De modo que estimar la dosis interna de exposición a plaguicidas organofosforados en muestras biológicas es

particularmente difícil porque los plaguicidas organofosforados tienen vidas medias relativamente cortas y se metabolizan y excretan rápidamente del cuerpo²³.

Metabolitos organofosforados, incluidos los fosfatos de dialquilo, en la orina se han usado como biomarcadores de la exposición a plaguicidas organofosforados en muchos estudios²³. Por esta razón la detección de organofosforados intactos en la sangre generalmente no es posible, excepto durante o poco después de la absorción de una cantidad sustancial. En general, los organofosforados no permanecen sin hidrolizar en la sangre más de unos pocos minutos u horas, a menos que la cantidad absorbida sea grande o se inhiban las enzimas hepáticas hidrolizantes.⁵³

Tabla 31. Extracción del glifosato a partir de muestras de sangre sin limpieza

Solvente (mL)	Área glifosato
1 Agua	N.D
2 Agua	841
3 Agua	243
4 Agua	270
5 Agua	304
6 Agua	337
7 Agua	227
8 Agua	58.41
9 Agua	267
10 Agua	72,05
11 Agua	77.50
Total	2742
3 mg L⁻¹	7315
% Recobro	37,49

Condiciones: 50 mg de sangre total, pH 8,5, temperatura 10 °C.

Secuencia de limpieza

Los disolventes de lavado a menudo se requieren antes de la elución para eliminar las sustancias interferentes. Se utilizaron acetonitrilo (tabla 32) y acetonitrilo con ácido trifluorocético 0,5 % (tabla 33) porque permiten la desnaturalización de proteínas presentes en la sangre que causan interferencias en el proceso de extracción. Sin embargo los resultados obtenidos indican que cuando se utilizaron los disolventes de lavado, se obtuvo menor porcentaje de recobro ($27 \pm 4 \%$). Los resultados indican que se pueden eliminar muy pocos compuestos interferentes utilizando el disolvente de lavado y generar cambios estructurales en el analito objetivo. Teniendo en cuenta esto, las extracciones posteriores se realizaron sin una secuencia de limpieza.

Tabla 32. Extracción del Gly a partir de sangre y limpieza con acetonitrilo

Solvente (mL)	Área glifosato
1.Acetonitrilo	36,61
2.Acetonitrilo	42,73
3.Acetonitrilo	40,73
4.Acetonitrilo	16,06
1.Agua	211
2.Agua	925
3.Agua	94,48
4.Agua	49,48
5.Agua	49,85
6. Agua	102
7. Agua	82,02
8. Agua	61,43
9. Agua	63,83
TOTAL	1775,22
3 mg L⁻¹	6419
% recobro	27,65 %

Condiciones: 50 mg de sangre total, pH 8,5, temperatura 10 °C

Los resultados experimentales muestran que la adición de acetonitrilo no garantiza por completo la desnaturalización de las proteínas en el proceso de extracción por

DMFS, también es evidente como acetonitrilo como solvente de limpieza incide en el perfil de extracción del Gly desplazando el frente de elución. Además de presentarse fugas del analito en estudio durante la elución del solvente de tal forma que no es conveniente realizar el proceso de limpieza con acetonitrilo.

La limpieza con acetonitrilo + ac.trifluoroacético 0,5 % no arrojó resultados satisfactorios con un porcentaje de recobro de solo el 23 % lo cual se atribuye a el pH de la muestra dado que el glifosato presentan un carácter zwitterionico por la presencia de grupos funcionales amino y ácidos fosfónico y carboxílico generando cargas positivas a pH ácidos (2,5) donde el analito es inestable. Además se consideran reacciones con derivados fluoroacetilados (figura 29).

Tabla 33. Extracción del Gly a partir de sangre y limpieza con acetonitrilo + ácido trifluoroacético 0,5 %

Solvente (mL)	Área glifosato
1. Acetonitrilo *+ Ac. Trifluoroacético 0,5 %	N.D
2. Acetonitrilo *+ Ac. Trifluoroacético 0,5 %	N.D
3. Acetonitrilo *+ Ac. Trifluoroacético 0,5 %	N.D
4. Acetonitrilo *+ Ac. Trifluoroacético 0,5 %	N.D
1. Agua	551
2. Agua	584
3. Agua	108
4. Agua	90.98
5. Agua	101
6. Agua	100
TOTAL	1553,13
3 mg L⁻¹	6705
% recobro	23

Condiciones: 50 mg de sangre total, pH 8,5, temperatura 10 °C.

La adición de cloruro de sodio (tabla 34) también generó un efecto negativo en el proceso de extracción del glifosato a partir de las muestras de sangre a causa del

antagonismos entre el catión Na^+ frente al glifosato ya que este es un anión multivalente que se origina de sales de glifosato de baja solubilidad omitiéndose también de la DMFS en posteriores pruebas.

Tabla 34. Extracción del Gly a partir de sangre con adición de NaCl

Solvente (mL)	Área glifosato
1 Agua	N.D
2 Agua	370
3 Agua	N.D
4 Agua	154
5 Agua	120
6 Agua	165
7 Agua	33,60
Total	842,6
3 mg L⁻¹	6549
% Recobro	12,87

Condiciones: 50 mg de sangre total, pH 8,5, temperatura 10 °C, sin limpieza.

La sangre como fuente de análisis de los niveles de plaguicidas organofosforados nos permite una medición directa de los compuestos parentales en lugar de los metabolitos y puede representar con mayor precisión la dosis que llega al tejido objetivo sin embargo se pudo apreciar que la velocidad de depuración de la sangre es inicialmente bastante rápida. Además las concentraciones de plaguicidas organofosforados en la sangre son mucho más bajas en comparación con otras matrices biológicas por ejemplo en la orina. De ahí la importancia de implementar métodos analíticos muy sensibles para la medición de plaguicidas organofosforados en la sangre.

6. Conclusiones

Por medio de variables como pH, temperatura, secuencia de limpieza y modificador de matriz, se estableció el comportamiento y estabilidad del plaguicida glifosato durante su extracción por dispersión de matriz en fase sólida y posterior análisis por cromatografía de líquidos.

El estudio del efecto del pH sobre el glifosato permitió establecer que a condiciones básicas con un pH de 8,5 se logró una mayor estabilidad siendo este adecuado para el proceso de extracción con soluciones acuosas por dispersión de matriz en fase sólida, así mismo se estableció que la temperatura adecuada para realizar la DMFS y preservar la concentración inicial del a través de tiempo fue 10 °C.

El análisis de otros puntos de influencia en el momento de realizar la extracción del glifosato presentó un efecto antagónico como es el proceso de limpieza con acetonitrilo y ácido trifluoroacético y la adición de cloruro de sodio como modificador de matriz.

Las mejores condiciones de extracción encontradas que permitieron la extracción de glifosato se establecieron con sílice-C₁₈ como adsorbente en una relación 1:4 muestra/adsorbente, 5 mL de agua a pH 8,5 como solvente de elución a una temperatura de 10 °C sin proceso de limpieza.

El control selectivo de reacción (SRM) (*selected reaction monitoring*) permitió detectar y cuantificar con un alto grado de sensibilidad y selectividad los iones fragmentos característicos del glifosato y ácido aminometilfosfónico lo cual posibilita que sean monitoreados en una matriz compleja como la sangre ya que minimiza al máximo la presencia de otros interferentes, con la desventaja que al sufrir algún cambio estructural en el proceso de extracción o en contacto con la matriz esta no sea detectada.

La extracción del glifosato a partir muestras de sangre se obtuvo un recobro del 37 % a una concentración de 3 mg L⁻¹ posiblemente a esta concentración las enzimas presentes en la sangre lograría degradar la molécula de glifosato.

7. Recomendaciones

- Para profundizar en la versatilidad y eficiencia de la técnica de extracción por DMFS de glifosato es importante realizar un estudio en otras matrices sobre la extracción del glifosato.
- Realizar pruebas de estabilidad del glifosato en sangre empleando varias concentraciones del mismo. Además de monitorear los compuestos resultantes de la hidrolisis de organofosforados en la sangre.
- Emplear e investigar otros procesos de limpieza que permitan una eficiente eliminación de interferencias sin efectos antagónicos en el proceso de extracción del glifosato.

8. Bibliografía

1. Bolognesi, C., Bonatti, S., Degan, P., Gallerani, E., Rabboni, R. & Roggieri, P. Genotoxic Activity of Glyphosate and Its Technical Formulation Roundup. *J. Agric. Food Chem.* **45**, 1957–1962 (1997).
2. Mink, P. J., Mandel, J. S., Sceurman, B. K. & Lundin, J. I. Epidemiologic studies of glyphosate and cancer: A review. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* (2012).
3. Barker, S. A. Matrix solid-phase dispersion. **885**, 115–127 (2000).
4. Picó, J.A. & Font, G. Revisión de los métodos de determinación de residuos de plaguicidas organofosforados en alimentos. *Rev. Toxicol.* **20**, 166–175 (2003).
5. Agudelo M. Identificación del herbicida glifosato propiedades y toxicidad. 1–51 (2000).
6. Hao, C. Morse, D., Morra, F., Zhao, X. & Yang, P. Direct aqueous determination of glyphosate and related compounds by liquid chromatography / tandem mass spectrometry using reversed-phase and weak anion-exchange

- mixed-mode column. *J. Chromatogr. A* **1218**, 5638–5643 (2011).
7. Martínez, M. A. Development and validation of a liquid chromatography – fluorescence – mass spectrometry method to measure glyphosate and aminomethylphosphonic acid in rat plasma. **878**, 3290–3296 (2010).
 8. Islas G. Determinación de glifosato y ácido aminometilfosfónico en suelos mediante HPLC con derivatización pre-columna (Tesis de maestría). Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Pachuca de Soto (2013).
 9. Chen, M., Cao, Z., Jiang, Y. & Zhu, Z. Direct determination of glyphosate and its major metabolite , aminomethylphosphonic acid , in fruits and vegetables by mixed-mode hydrophilic interaction / weak anion-exchange liquid chromatography coupled with electrospray tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1272**, 90–99 (2013).
 10. Yoshioka, N., Asano, M., Kuse, A., Mitsuhashi, T., Nagasaki, Y. & Ueno, Y. Rapid determination of glyphosate, glufosinate, bialaphos, and their major metabolites in serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using hydrophilic interaction chromatography. *J. Chromatogr. A* (2011).
 11. Sadi, B.B, Vonderheide, A. P. & Caruso, J. A. Analysis of phosphorus herbicides by ion-pairing reversed-phase liquid chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry with octapole reaction cell. **1050**, 95–101 (2004).
 12. Mesnage, R., Defarge, N., Spiroux de Vendômois, J. & Séralini, G. E. Potential toxic effects of glyphosate and its commercial formulations below regulatory limits. *Food and Chemical Toxicology* (2015).
 13. Martínez, M., Ares, I., Rodríguez, J., Martínez, M. & Anadón, A. Neurotransmitter changes in rat brain regions following glyphosate exposure. *Environ. Res.* **161**, 212–219 (2018).
 14. Zouaoui, K., Dulaurent, S., Gaulier, J. M., Moesch, C. & Lachâtre, G. Determination of glyphosate and AMPA in blood and urine from humans: About 13 cases of acute intoxication. *Forensic Sci. Int.* (2013).
 15. Cárdenas, O., Silva, E., Morales, L. & Ortiz, J. Estudio epidemiológico de exposición a plaguicidas organofosforados y carbamatos en siete departamentos colombianos. *Biomédica* **25**, 170–80 (2005).
 16. Lotti, M. Cholinesterase inhibition:Complexities in interpretation. *Clin. Chem.* **41**, 1814–1818 (1995).
 17. Carmona J, Henao S, G. R. Valores de referencia de actividad colinesterasa sanguínea en población laboral activa no expuesta a plaguicidas inhibidores de colinesterasa. *Rev. Fac. Nac. Salud Pública* **18**, 55–72 (2000).

18. Carmona J. Valores de referencia de colinesterasa plasmática con los métodos de Michel, EQM y Monotest en población laboral activa del departamento de Antioquia, Colombia. *Biomédica* **23**, 437–455 (2003).
19. Silvia E, Morales L, O. J. Evaluación epidemiológica de paguicidas inhibidores de acetilcolinesterasa en Colombia. *Biomédica* **20**, 200–209 (2000).
20. O'Malley, M. Clinical evaluation of pesticide exposure and poisonings. *Lancet* **349**, 1161–1166 (1997).
21. Kuklennyik, P. Detection and Quantification of Organophosphate Pesticides in Human Serum. (2009).
22. Wang, S., Seiwert, B., Kästner, M., Miltner, A., Schäffer, A., Reemtsma, T., Yang, Q., Nowak, KM. (Bio) degradation of glyphosate in water-sediment microcosms e A stable isotope co-labeling approach. **99**, (2016).
23. Mathur, H.B., Agarwal, H.C., Johnson, S. & Saikia, N. Analysis Of Pesticide Residues In Blood Samples From Villages Of Punjab. (2005).
24. Cecilia, D. & Maggi, F. Analysis of glyphosate degradation in a soil microcosm *. *Environ. Pollut.* **233**, 201–207 (2018).
25. Grandcoin, A., Piel, S., Baurès, E. AminoMethylPhosphonic acid (AMPA) in natural waters : Its sources , behavior and environmental fate. **117**, (2017).
26. Arkan, T. The role of derivatization techniques in the analysis of glyphosate and aminomethyl-phosphonic acid by chromatography. *Microchem. J.* **121**, 99–106 (2015).
27. Khrolenko, M.V. Determination of glyphosate and its metabolite aminomethylphosphonic acid in fruit juices using supported- liquid membrane preconcentration method with high-performance liquid chromatography and UV detection after derivatization with p-toluenesul- phonyl . *J. Chromatogr. A* **1093**, 111–117 (2005).
28. Iwamuro, Y. , Iio-Ishimaru, R. , S. Chinaka ,Takayama, N. & Kodama, S. Analysis of phosphorus-containing amino acid-type herbicides by capillary electrophoresis/mass spectrometry using a chemically modified capillary having amino groups. *J. Heal. Sci.* **56**, 606–612 (2010).
29. Motojyuku, M. Saito, T., Akieda, K., Otsuka, H., Yamamoto, I. & Inokuchi, S. Determination of glyphosate, glyphosate metabolites, and glufosinate in human serum by gas chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* (2008).
30. Hsu, C. W. Microscale solid phase extraction of glyphosate and amino methylphosphonic acid in water and guava fruit extract using alumina-coated

- iron oxide nanoparticles followed by capillary electrophoresis and electrochemiluminescence detection. *J. Chromatogr. A* **1216**, 8575–8580 (2009).
31. Stalikas, C. D. & Konidari, C. N. Analytical methods to determine phosphonic and amino acid group-containing pesticides. **907**, 1–19 (2001).
 32. Khrolenko, M.V., Wieczorek, P.P. Determination of glyphosate and its metabolite aminomethylphosphonic acid in fruit juices using supported- liquid membrane preconcentration method with high-performance liquid chromatography and UV detection after derivatization with p-toluenesulphonyl . *J. Chromatogr. A* **1093**, 111–11 (2005).
 33. Anastassiades, M., Kolberg, D. I., Mack, D., Sigalova, I., Roux, D. & Fügél, D. Quick Method for the Analysis of Residues of numerous Highly Polar Pesticides in Food Commodities involving Simultaneous Extraction with Methanol and Determination via LC-MS / MS II . *Food of Animal Origin*. 1–16 (2016).
 34. Bruins, A. P., Covey, T. R. & Henion, J. D. Ion spray interface for combined liquid chromatography/atmospheric pressure ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.* **59**, 2642–2646 (1987).
 35. Vreeken, R. J., Speksnijder, P. & Noij, T. H. M. Selective analysis of the herbicides glyphosate and aminomethylphosphonic acid in water by on-line solid-phase extraction – high-performance liquid chromatography – electrospray ionization mass spectrometry. **794**, 187–199 (1998).
 36. Frenich, A. G., Bola, P. P. & Mart, L. Multiresidue analysis of pesticides in animal liver by gas chromatography using triple quadrupole tandem mass spectrometry. **1153**, 194–202 (2007).
 37. Conrad, A. Schröter-Kermani, C., Hoppe, H., Rüter, M., Pieper, S. & Kolossa-Gehring, M. Glyphosate in German adults Time trend (2001 to 2015) of human exposure to a widely used herbicide. *Int. J. Hyg. Environ. Health* (2017).
 38. Ramos, J. J., Rial-otero, R., Ramos, L. & Capelo, J. L. Ultrasonic-assisted matrix solid-phase dispersion as an improved methodology for the determination of pesticides in fruits. **1212**, 145–149 (2008).
 39. García de Llasera, M., Gómez, L., Vera, L. & Peña, A. Matrix solid-phase dispersion extraction and determination by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection of residues of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in tomato fruit. **1093**, 139–146 (2005).
 40. Han, J. Moon, H., Hong, Y., Yang, S., Jeong, W., Lee, K. & Chung, H.

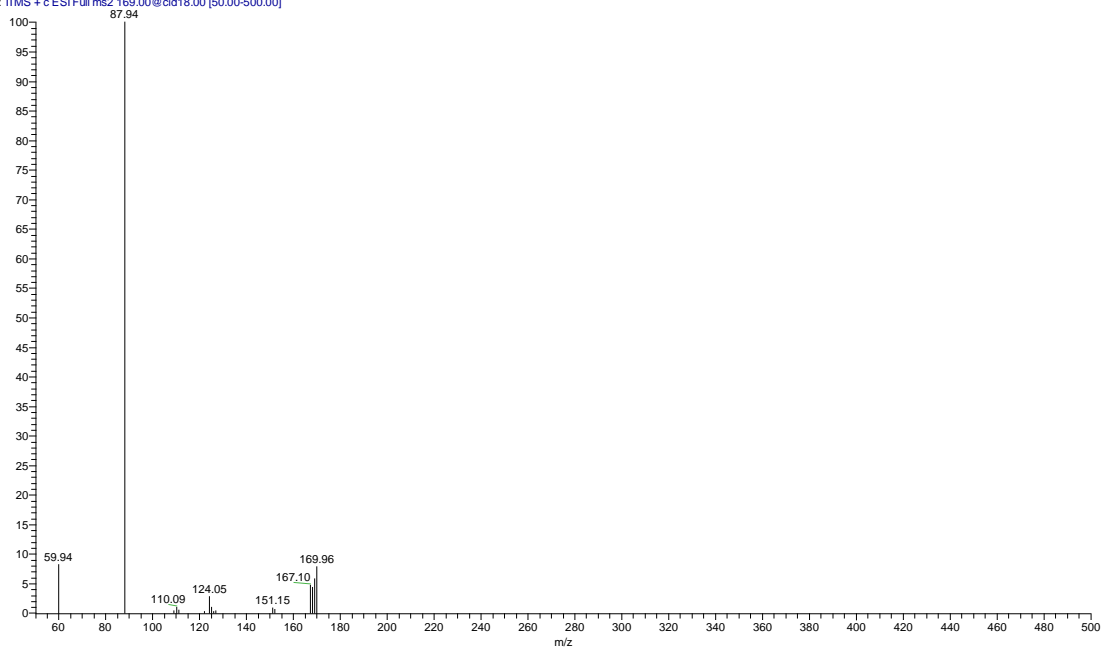
- Determination of glyphosate and its metabolite in emergency room in Korea. *Forensic Sci. Int.* (2016).
41. Guo, H. Wang, H., Zheng, J., Liu, W., Zhong, J. & Zhao, Q. Sensitive and rapid determination of glyphosate , glufosinate , bialaphos and metabolites by UPLC – MS / MS using a modified Quick Polar Pesticides Extraction method. *Forensic Sci. Int.* **283**, 111–117 (2018).
 42. Valencia, T. M. G. & Llasera, M. P. G. De. Determination of organophosphorus pesticides in bovine tissue by an on-line coupled matrix solid-phase dispersion – solid phase Extraction – high performance liquid chromatography with diode array detection method. **1218**, 6869–6877 (2011).
 43. Skoog, D. A., Holler, F. J. & Crouch, S. R. *Principios de análisis instrumental*.
 44. Carmen, M., Gómez, M. & González, M. B. Espectrometría de masas y análisis de biomarcadores. 113–168
 45. Brea, S. G. Nuevas aportaciones de LC-MS con analizadores de triple cuadrupolo y tiempo de vuelo en el análisis de residuos de plaguicidas y metabolitos en alimentos de origen vegetal Tesis Doctoral. (2009).
 46. Capriotti, A. L., Cavaliere, C., Giansanti, P., Gubbiotti, R., Samperi, R. & Laganà, A. Recent developments in matrix solid-phase dispersion extraction. **1217**, 2521–2532 (2010).
 47. Pozo, J., Sancho, J. V & Francisco, J. L. Residue determination of glyphosate , glufosinate and aminomethylphosphonic acid in water and soil samples by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry. **1081**, 145–155 (2005).
 48. Espinoza, J. El coeficiente de correlación. 1–8 (2011).
 49. Herrera, M. Implementación de una metodología para la determinación de glifosato en muestras de agua. (2011).
 50. Zhu, Y., Zhang, F., Tong, C. & Liu, W. Determination of glyphosate by ion chromatography. **850**, 297–301 (1999).
 51. Matysiak, R. & Nalewaja, J. D. Optimizing Adjuvants to Overcome Glyphosate Antagonistic Salts1. **7**, 337–342 (2015).
 52. Hall, G. J., Hart, C. A. & Jones, C. A. Plants as sources of cations antagonistic to glyphosate activity †. **358**, 351–358 (2000).
 53. Robb, E. & Baker, M. Organophosphate Insecticides. 43–55 (2019)

ANEXOS

Anexo 1

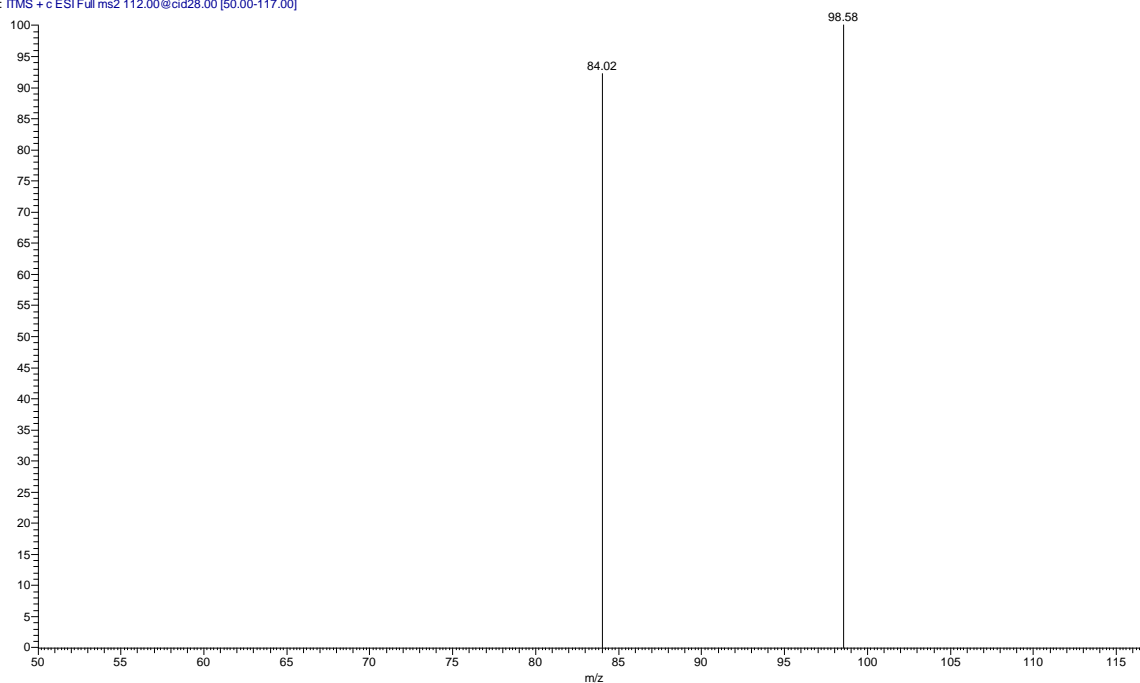
A) Espectro de masas ms^n de glifosato + NH_4OH 0,1 % ms^2 de 170

gly 5 ppm HA 0.1% MS2 #21 RT: 0.30 AV: 1 NL: 3.14E2
T: ITMS + c ESI Full ms2 169.00@cid18.00 [50.00-500.00]



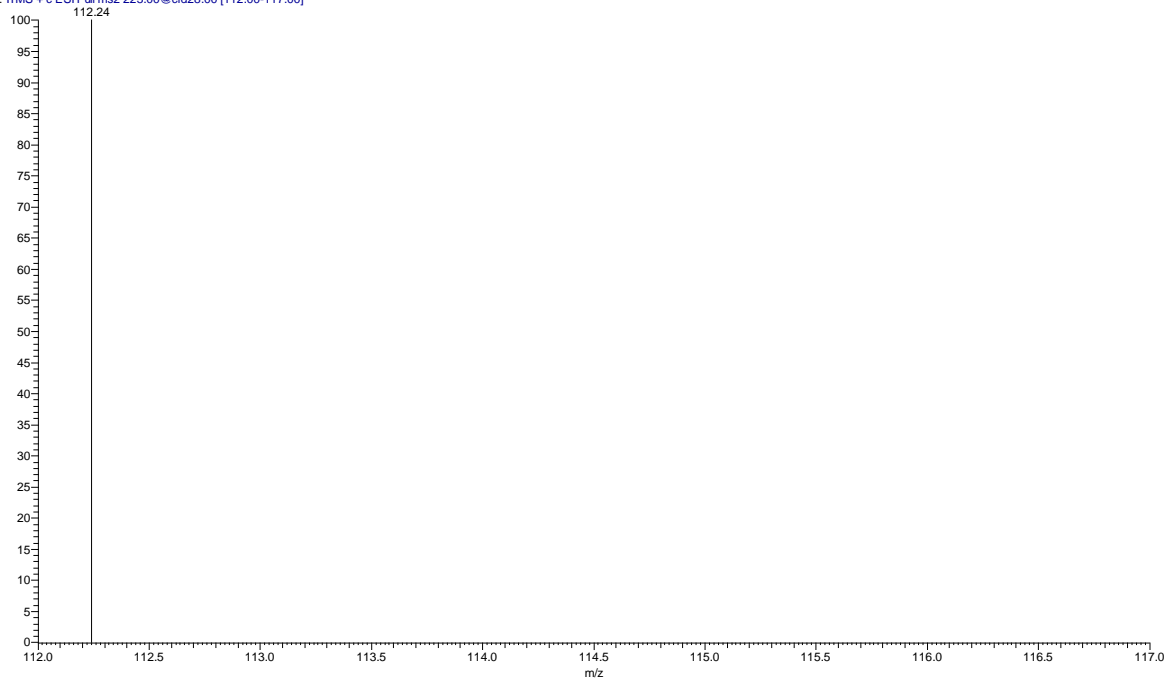
B) Espectro de masas ms^n de AMPA+ NH_4OH 0,1 % ms^2 de 112

AMPA 112 #12 RT: 0.31 AV: 1 NL: 5.71E-1
T: ITMS + c ESI Full ms2 112.00@cid28.00 [50.00-117.00]



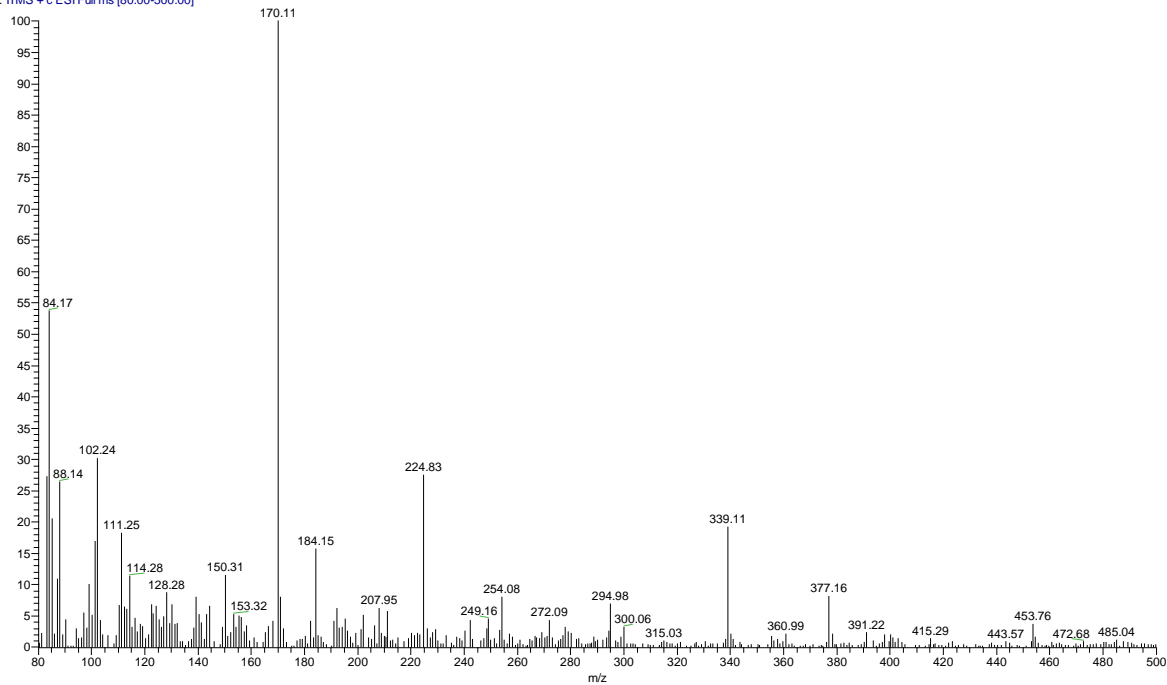
C) Espectro de masas ms^n de AMPA+ NH_4OH 0,1% ms^2 de 223

AMPA #12 RT: 0.31 AV: 1 NL: 8.02
T: ITMS + c ESI Full ms2 223.00@cid28.00 [112.00-117.00]



Anexo 2 Espectro de masas glifosato + agente ionizante ácido fórmico 0,1 %

BG_gly5ppmAF0.1%FULL #22 RT: 0.30 AV: 1 NL: 8.03E2
T: ITMS + c ESI Full ms [80.00-500.00]

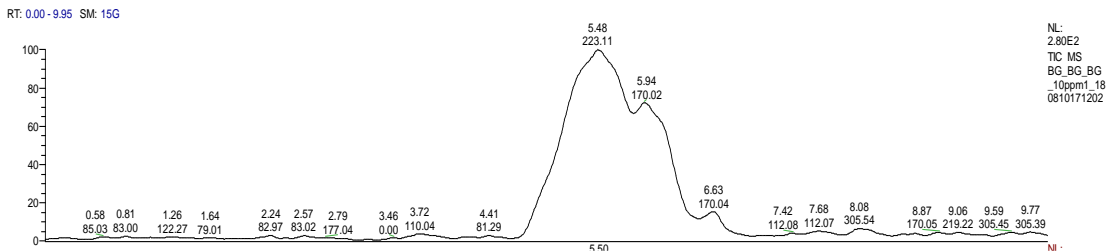


Anexo 3.

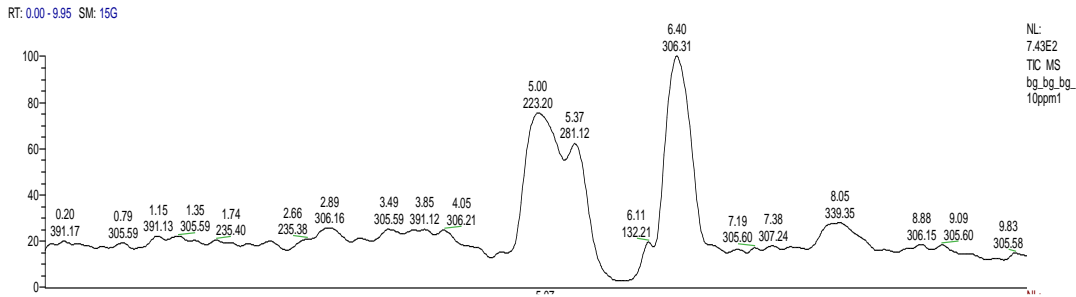
Tabla 1. Niveles de concentración vs áreas días curvas de calibración

Día	Estándares						
	0,5	1,0	2,0	3,0	5,0	7,0	10
1	2150	3701	9502	14327	20112	27579	32505
	1468	3551	10496	13998	20573	27791	31979
	1699	3434	10872	15046	20782	28708	33716
2	1611	3419	8225	13977	17812	29650	34362
	1688	2722	8946	14135	18653	28785	34585
	1688	3785	9418	14589	18674	28548	34502
3	1507	3933	9665	14212	20024	29368	34543
	1354	3971	9745	14671	20060	29257	34478
	1409	3772	9873	13882	19804	29007	34514
4	1448	3133	9592	14724	18513	27338	34516
	1585	3321	9896	13670	19103	27180	34021
	1852	3133	9797	12631	18241	27203	34055
5	2216	3038	10165	14207	19141	27989	34869
	2441	3371	10125	14215	19112	27997	34934
	2491	3449	10143	14175	19120	27876	34827

Anexo 4. Perfil cromatográfico para 50:50 acetonitrilo: agua temperatura 40 °C flujo 0,05 mL/min

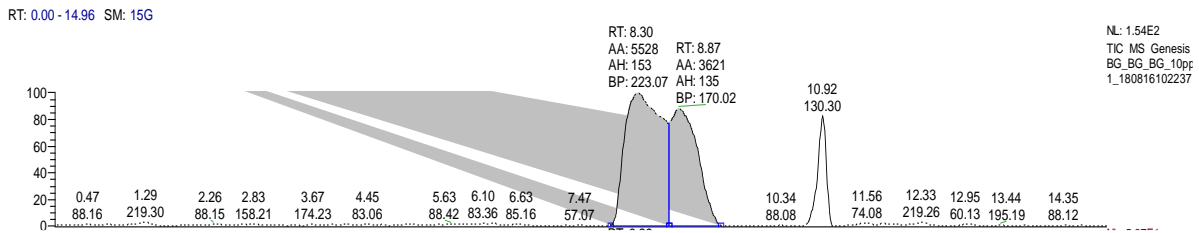


Anexo 5. Perfil cromatográfico para 50:50 acetonitrilo: agua temperatura 50 °C flujo 0,05 mL/min

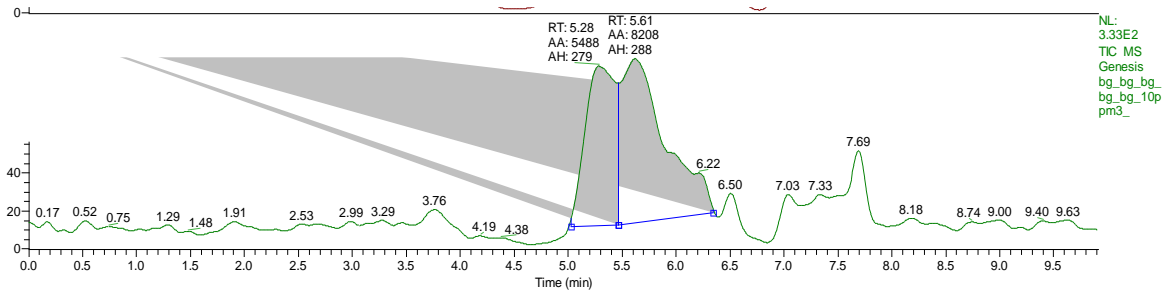


Anexo 6. Perfiles cromatográficos para gradientes

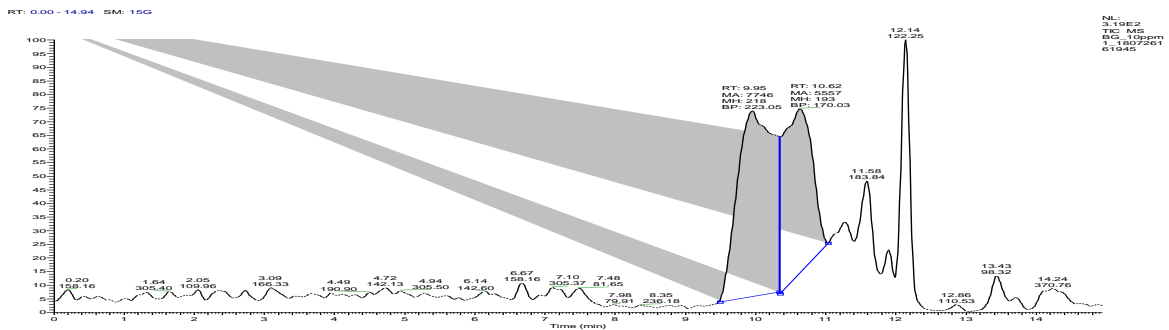
Gradiente 0-15 min 50:50 a 30:70 acetonitrilo: agua flujo 0,03 mL/min temperatura 50 °C.



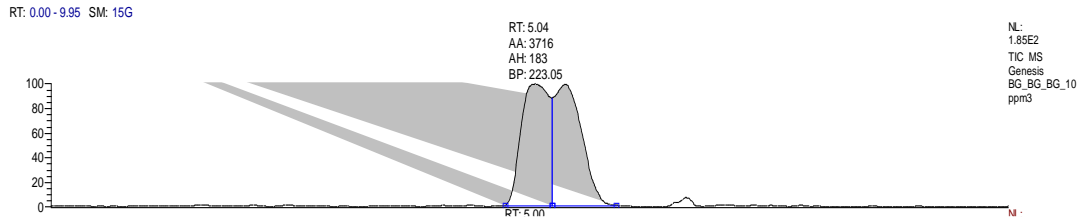
Gradiente 0-10 min 50:50 -40:60 acetonitrilo: agua flujo 0,05 mL/min temperatura 50 °C.



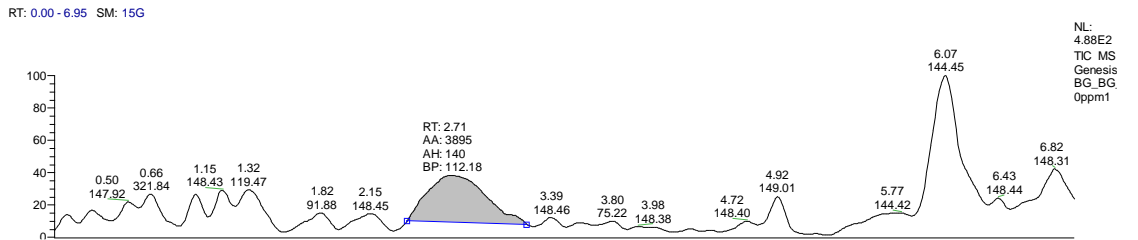
Gradiente 0-15 min 40:60 -30:70 acetonitrilo: agua flujo 0,025 mL/min temperatura 20 °C.



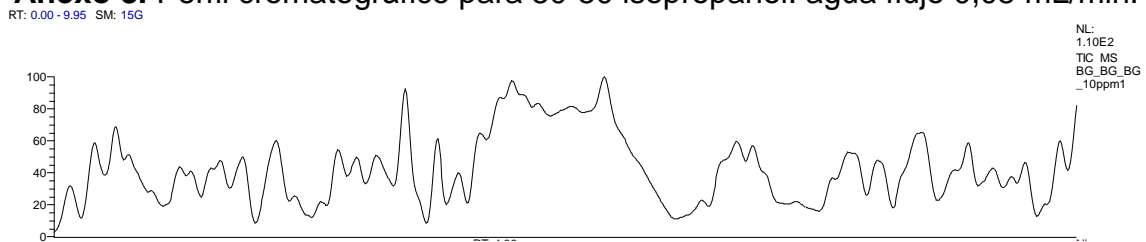
Gradiente 0-10 min 50:50 a 30:70 acetonitrilo: agua flujo 0,025 mL/min temperatura 20 °C.



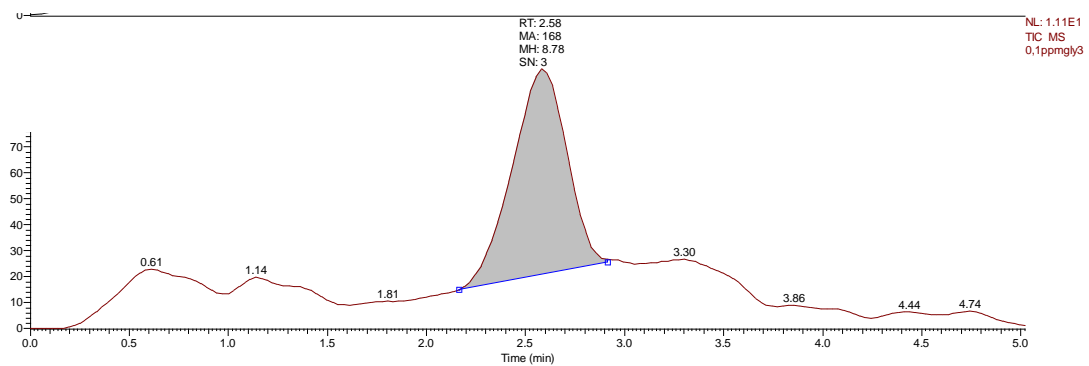
Anexo 7. Perfil cromatográfico para 50-50 butanol-agua flujo 0,05 mL/min temperatura 40 °C.



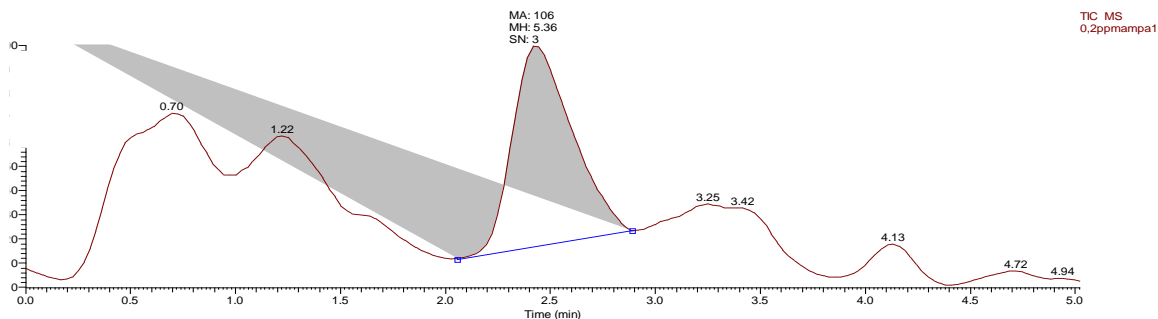
Anexo 8. Perfil cromatográfico para 50-50 isopropanol: agua flujo 0,05 mL/min.



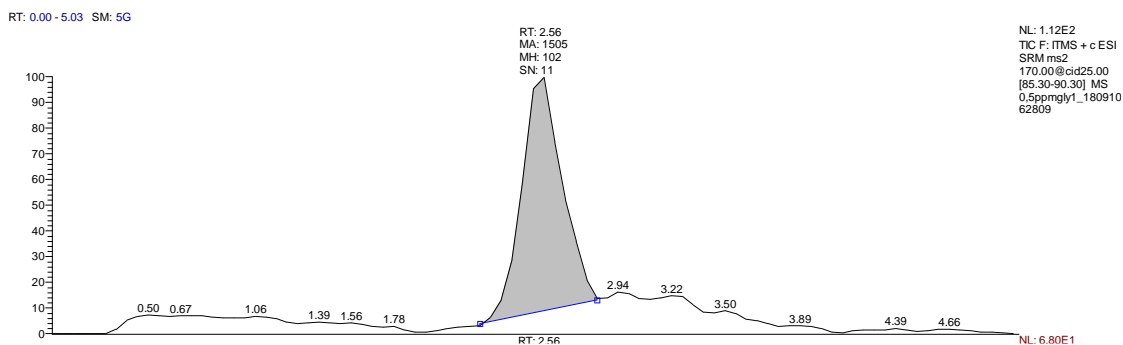
Anexo 9A. Cromatograma del límite de detección del Glifosato, pico base de 170.



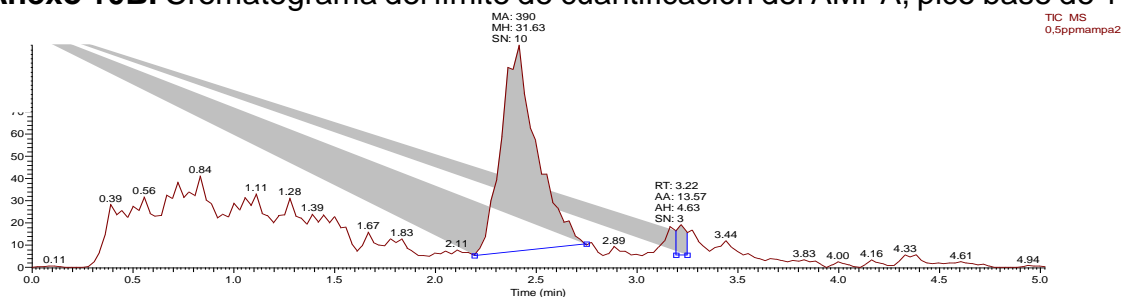
Anexo 9B. Cromatograma del límite de detección del AMPA, pico base de 112.



Anexo 10A. Cromatograma del límite de cuantificación del Glifosato, pico base 170.



Anexo 10B. Cromatograma del límite de cuantificación del AMPA, pico base de 112.



Anexo 11. Análisis de Varianza para AMPA

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:pH	2552,08	1	2552,08	25,70	0,0007
B:VOLUMEN	9,72	1	9,72	0,10	0,7615
C:SECADO	116,536	1	116,536	1,17	0,3069
AA	184,054	1	184,054	1,85	0,2065
AB	32,0	1	32,0	0,32	0,5842
AC	70,0833	1	70,0833	0,71	0,4226
BB	71,6844	1	71,6844	0,72	0,4176
BC	0,853333	1	0,853333	0,01	0,9282
Error total	893,823	9	99,3137		
Total (corr.)	3930,84	17			

Anexo 12. Análisis de Varianza para Gly

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:pH	11187,4	1	11187,4	61,55	0,0000
B:VOLUMEN	432,0	1	432,0	2,38	0,1575
C:SECADO	5,12	1	5,12	0,03	0,8704
AA	350,938	1	350,938	1,93	0,1981
AB	544,5	1	544,5	3,00	0,1175
AC	9,01333	1	9,01333	0,05	0,8287
BB	211,218	1	211,218	1,16	0,3091
BC	40,3333	1	40,3333	0,22	0,6488
Error total	1635,75	9	181,75		
Total (corr.)	14416,3	17			

Anexo 13. Cromatograma 1mL de extracción de glifosato en sangre total. Condiciones temperatura 10 °C, pH 8,5, sin proceso de limpieza

