



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO**

---

---

---

**INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA**

**ÁREA ACADÉMICA DE QUÍMICA**

**DETERMINACIÓN DE GLIFOSATO Y ÁCIDO  
AMINOMETILFOSFÓNICO EN SUELOS MEDIANTE HPLC CON  
DERIVATIZACIÓN PRE-COLUMNA**

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRA EN QUIMICA**

PRESENTA:

**Q. GABRIELA ISLAS GUERRERO**

DIRECTOR DE TESIS:

**DR. JOSÉ ANTONIO RODRÍGUEZ ÁVILA**

PACHUCA DE SOTO HGO

ENERO, 2013



# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

## Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería

### Dirección

#### M. en C. Julio César Leines Medécigo

Director de Administración Escolar  
Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo  
P R E S E N T E

Por este conducto le comunico que el jurado asignado a la Candidata a Maestro en Química, **Q. Gabriela Islas Guerrero**, quien presenta el trabajo **"Determinación de glifosato y ácido aminometilfosfónico en suelos mediante HPLC con derivatización pre-columna"**, después de revisar el trabajo en reunión de sinodales, ha decidido **autorizar la impresión** del mismo, una vez realizadas las correcciones que fueron acordadas.

A continuación se anotan las firmas de conformidad de los integrantes del jurado:

PRESIDENTE: Dra. María Elena Páez Hernández (AAQ)  
SECRETARIO: Dra. Eugenia Gabriela Carrillo Cedillo (UABC)  
VOCAL: Dr. Luis Humberto Mendoza Huizar (AAQ)  
SUPLENTE: Dr. José Antonio Rodríguez Ávila (AAQ)

Sin otro particular, reitero a Usted la seguridad de mi atenta consideración.

ATENTAMENTE

"Amor, Orden y Progreso"

Mineral de la Reforma, Hgo., a 7 de enero de 2013

Dr. Orlando Ávila Pozos  
Director del ICBI

Ciudad del Conocimiento Carretera Pachuca – Tulancingo  
Km. 4.5. s/n Col. Carboneras C.P. 42184  
Mineral de la Reforma, Hidalgo. México.  
Tel: (771)7172000 ext. 2230, 2231





Este trabajo de investigación se realizó en los laboratorios 1 y 2 del Área Académica de Química y el laboratorio de cromatografía del Área Académica de Ciencias de la Tierra y Materiales de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

La investigación se realizó gracias al financiamiento del proyecto CONACYT CB-2006-61310 *“Diseño y validación de sistemas automatizados de separación magnética en flujo”*

Parte de este trabajo ha sido enviado para su publicación en:

Gabriela Islas, José A. Rodríguez, Luis H. Mendoza-Huizar, Fidel Pérez-Moreno, E. Gabriela Carrillo, *“Determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in soils by HPLC with pre-column derivatization using 1,2-naphthoquinone-4-sulfonate”*, Journal of Liquid chromatography Related Technologies., (2012).

Parte de este trabajo ha sido presentado en:

XXV Congreso Nacional de Química Analítica (2012), con el trabajo:

*“Evaluación de agentes cromóforos para la determinación espectrofotométrica de glifosato en suelos.”*

Cátedra Nacional de Química CUMex Dr. Mario Molina (2012), con el trabajo:

*“Determinación de glifosato y ácido aminometilfosfónico en suelos mediante HPLC con derivatización pre-columna.”*

*Lo importante en la vida no es el triunfo sino la lucha.  
Lo esencial no es haber vencido, sino haber luchado bien  
(Barón Pierre de Coubertín)*

## *Agradecimientos*

*Agradezco a Dios, por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor.*

*Agradezco a mis padres, Gloria y Heriberto por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, en toda mi educación, tanto académica, como en la vida, por brindarme con sus manos abiertas su incondicional apoyo perfectamente mantenido a través del tiempo. Gracias por haber formado en mí el deseo de superación y el anhelo de triunfo en la vida.*

*Agradezco a mis hermanos Valeria y Heriberto, que con su amor me han enseñado a salir adelante, por preocuparse por su hermana mayor, pero sobre todo, gracias por estar en otro momento tan importante en mi vida.*

*De todo corazón quiero agradecer aquel hombre muy especial, a quien amo mucho, mi flako, Israel Samuel Ibarra, que con su valor y entrega ha sido una persona incondicional en mi vida, ha sido mi soporte, mi mejor amigo, mi consejero, mi apoyo para seguir adelante y no bajar los brazos en los momentos difíciles. Gracias por tu infinita paciencia, por tu tierna compañía y tu inagotable apoyo. Pero sobre todo gracias por enseñarme a confiar en mí.*

*Debo agradecer de manera especial y sincera al Dr. José Antonio Rodríguez Ávila por aceptarme para realizar esta tesis de Maestría bajo su dirección. Su apoyo y confianza en mi trabajo y su capacidad para guiar mis ideas ha sido un aporte invaluable, no solamente en el desarrollo*

*de esta tesis, sino también en mi formación como investigadora. Pero sobre todo gracias por brindarme tu apoyo y amistad.*

*A mis sinodales: Dra. María Elena Páez Hernández, por la orientación, el seguimiento, el apoyo y el ánimo que me brindó. Al la Dra. Eugenia Gabriela Carrillo Cedillo, por formar parte de este comité y apoyo brindado en todo momento, al Dr. Luis Humberto Mendoza Huizar, Por su participación en la orientación y evaluación de mi trabajo de tesis. Gracias a todos por sus consejos, su tiempo invertido en la revisión de esta tesis.*

*Quiero agradecer al Dr. Fidel Pérez Moreno, por el haberme facilitado siempre los medios suficientes para llevar a cabo todas las actividades propuestas durante el desarrollo de esta tesis pero sobre todo por su amistad.*

*A la Dra. Araceli Castañeda Ovando, por su importante aporte y participación en el desarrollo de esta tesis.*

*A mi amigo Prisciliano, por ofrecerme siempre una mano amiga en los momentos más difíciles de mi vida tanto personal como profesional.*

*Gracias también a mis queridos compañeros, que me apoyaron y me permitieron entrar en su vida durante estos dos años de convivir dentro y fuera del laboratorio. Irma, Evelyn, Yu, Erika, Lupita, Iris, Tere, Karina, Nacho, Charly, Julio, Juan Manuel,*

*Y a todas aquellas personas que de una u otra forma, colaboraron o participaron en la realización de esta investigación, hago extensivo mi más sincero agradecimiento.*

# ÍNDICE

Índice de Figuras	<i>i</i>
Índice de Tablas	<i>iii</i>

## ***1.- ANTECEDENTES***

1.1 Uso de los herbicidas	2
1.1.1 Efectos sobre el suelo	3
1.2 Clasificación de los herbicidas por su modo de acción	3
1.2.1 Época de aplicación	3
1.2.2 Selectividad	4
1.2.3 Tipo y modo de acción	4
1.2.4 Persistencia	5
1.2.5 Toxicidad	6
1.3 Uso de herbicidas en México	7
1.4 Glifosato	8
1.4.1 Características del glifosato	9
1.4.2 Modo de acción y metabolismo de glifosato	12
1.4.3 Toxicidad	13
1.5 Comportamiento y persistencia del glifosato en suelos	14
1.5.1 Adsorción en suelos	15
1.6 Métodos de extracción de glifosato y AMPA en muestras de suelo	17
1.7 Métodos de análisis para la determinación de glifosato y AMPA	19
1.7.1 Electroforesis capilar	19
1.7.2 Métodos cromatográficos	20
1.7.2.1 Cromatografía de gases	20
1.7.2.2 Cromatografía líquida de alta resolución	22

1.8 Derivatización	23
1.8.1 Derivatización post-columna	24
1.8.2 Derivatización pre-columna	26

## **2.- OBJETIVOS**

2.1 Objetivo general	29
2.2 Objetivos específicos	29

## **3.- METODOLOGIA EXPERIMENTAL**

3.1 Reactivos	31
3.2 Equipos y materiales	31
3.3 Desarrollo experimental	32
3.3.1 Espectroscopia UV-Vis	32
3.3.1.1 Soluciones	32
3.3.1.2 Derivatización	33
3.3.2 HPLC-UV	33
3.3.2.1 Soluciones	33
3.3.2.2 Tratamiento de muestras	34
3.3.2.2.1 Análisis de muestras	34
3.3.2.2.2 Isotermas de adsorción	34
3.3.2.3 Derivatización	35
3.3.2.4 Procedimiento cromatográfico	35
3.3.3 HPLC-Fluorescencia	35
3.3.3.1 Soluciones	35
3.3.3.2 Tratamiento de muestras	36
3.3.3.3 Derivatización	36
3.3.3.4 Procedimiento cromatográfico	37



<b>4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	
4.1 Selección del agente derivatizante	39
4.1.1 Derivatización utilizando ninhidrina	39
4.1.2 Derivatización utilizando NQS	42
4.2 Análisis de glifosato y AMPA mediante HPLC-UV	44
4.2.1 Parámetros analíticos	49
4.3 Análisis de glifosato y AMPA mediante HPLC-Fluorescencia	50
4.3.1 Parámetros analíticos	51
4.4 Comparación de los métodos cromatográficos	52
4.5 Evaluación del sistema de extracción	53
4.5.1 Validación de sistema de extracción y análisis	56
4.6 Estudio de degradación	57
<b>5.- CONCLUSIONES</b>	60
<b>6.- REFERENCIAS</b>	63

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Estructuras y reacciones de disociación ácido-base de glifosato y AMPA	11
<b>Figura 2.</b>	Biosíntesis de aminoácidos aromáticos (Nelson D, 2005)	12
<b>Figura 3.</b>	Vías de degradación de glifosato (Schuette J, 1998)	15
<b>Figura 4.</b>	Esquema de mecanismos (interacción electrostática, fuerzas de Van der Waals, puentes de hidrógeno y enlace covalente) involucrados en la adsorción del glifosato en el suelo (Prata F, 2003)	16
<b>Figura 5 a.</b>	Reacción de oxidación del glifosato	25
<b>Figura 5 b.</b>	Reacción de derivatización post-columna de glifosato y AMPA con OPA/2-MER	25
<b>Figura 6.</b>	Reacción de derivatización pre-columna entre glifosato y FMOC-Cl	26
<b>Figura 7.</b>	Reacción de derivatización pre-columna entre amino-compuestos y NQS	27
<b>Figura 8.</b>	Reacción de oxidación de glifosato a glicina	39
<b>Figura 9.</b>	Derivatización de glicina y AMPA con Ninhidrina	40
<b>Figura 10.</b>	Espectro en la zona visible de glifosato ( $10 \text{ mg l}^{-1}$ ) y AMPA ( $10 \text{ mg l}^{-1}$ ). Condiciones óptimas: Ninhidrina (0.5%), molibdato de sodio (0.5%), solución buffer de fosfatos ( $0.1 \text{ mol l}^{-1}$ , pH 7) y $\lambda$ 567 nm	41
<b>Figura 11.</b>	Derivatización de glifosato y AMPA con NQS	42
<b>Figura 12.</b>	Espectros en la zona visible de glifosato ( $10 \text{ mg l}^{-1}$ ) y AMPA ( $10 \text{ mg l}^{-1}$ ). Condiciones óptimas: NQS (0.06%), solución buffer de boratos ( $0.05 \text{ mol l}^{-1}$ , pH 9.4) y $\lambda$ 475 nm	43
<b>Figura 13.</b>	Diseño central compuesto para dos factores. (a) representación del diseño, (b) valores rotatorios con precisión uniforme	45

- Figura 14.** Efecto de temperatura y concentración de NQS. 48  
 Condiciones de derivatización: solución de reactivos, 0.03 mol l<sup>-1</sup> NQS + 0.1 mol l<sup>-1</sup> HCl; solución de tetraboratos de sodio 0.05 mol l<sup>-1</sup>; 20 mg kg<sup>-1</sup> de glifosato y AMPA
- Figura 15.** Cromatogramas obtenidos para el análisis de los 49  
 experimentos de herbicidas: A) 7, 20°C, B) condiciones óptimas, 60 °C, C) 8, 80°C. GLYPH, glifosato; AMPA, ácido aminometilfosfónico; E.I, Estándar interno (4-aminoantipirina)
- Figura 16.** Espectros de excitación y emisión de los productos de 51  
 reacción formados con (10 mg kg<sup>-1</sup>) glifosato y AMPA, con NQS (0.0015 mg l<sup>-1</sup>) en una solución de tetraboratos de sodio (pH 9.4)
- Figura 17.** Cromatograma obtenido del análisis de una muestra de 52  
 suelo fortificado con 20 mg kg<sup>-1</sup> de ambos herbicidas. GLYPH, glifosato; AMPA, ácido aminometilfosfónico; E.I, Estándar interno (Ampicilina)
- Figura 18.** Representación de Isotermas de Freundlich en diferentes 55  
 concentraciones de suelos: (A) arenoso; (B) arcilloso; (C) franco arenoso
- Figura 19.** Degradación de glifosato y AMPA. El termino C/Co se 58  
 refiere a la relación de la concentración entre la concentración inicial

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b>	Ejemplos de herbicidas de acuerdo a su persistencia	6
<b>Tabla 2.</b>	Categorías de toxicidad de herbicidas	7
<b>Tabla 3.</b>	Propiedades fisicoquímicas de glifosato (datos generales*)	10
<b>Tabla 4.</b>	Propiedades fisicoquímicas de AMPA (datos generales*)	10
<b>Tabla 5.</b>	Determinación de glifosato en muestras de suelo por CG	21
<b>Tabla 6.</b>	Determinación de glifosato en muestras de suelo por HPLC	23
<b>Tabla 7.</b>	Agentes derivatizantes utilizados para la derivatización de glifosato	24
<b>Tabla 8.</b>	Variables de derivatización óptimas con ninhidrina	40
<b>Tabla 9.</b>	Parámetros de regresión de las líneas de calibrado utilizando ninhidrina, absorbancia vs concentración de herbicida ( $\text{mg l}^{-1}$ )	41
<b>Tabla 10.</b>	Variables de derivatización óptimas con NQS	42
<b>Tabla 11.</b>	Parámetros de regresión de las líneas de calibrado utilizando NQS, absorbancia vs concentración de herbicida ( $\text{mg l}^{-1}$ )	43
<b>Tabla 12.</b>	Coordenadas del diseño central compuesto	45
<b>Tabla 13.</b>	Niveles utilizados en el diseño experimental para la metodología de superficie de respuesta	46
<b>Tabla 14.</b>	Matriz de CCD para dos variables ( $2^2$ ): $X_1$ = Concentración de NQS ( $\text{mmol l}^{-1}$ ), $X_2$ = Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) y Respuesta ( $\Sigma$ área/E.I en UA)	46
<b>Tabla 15.</b>	Parámetros de regresión de las líneas de calibrado obtenidas en muestras de suelo dopado. área analito: área E.I vs [analito]: [E.I.] en concentración ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	50
<b>Tabla 16.</b>	Parámetros de regresión de las líneas de calibrado, área analito: área E.I. vs [analito]: [E.I.], en concentración ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	52
<b>Tabla 17.</b>	Análisis de residuos de glifosato y AMPA en muestras de suelo	53

<b>Tabla 18.</b>	Coeficientes de adsorción de glifosato en los suelos arenoso y arcilloso tras el ajuste a la ecuación de Freundlich	56
<b>Tabla 19.</b>	Recuperaciones de glifosato y % DER (n=3) en muestras de suelo fortificadas	57



*ANTECEDENTES*

# 1.- Antecedentes

---

## 1.1 Uso de los herbicidas

La disminución en las expectativas de producción debido a la incidencia de plagas y enfermedades provocó un incremento en la aplicación de herbicidas con la finalidad de aumentar la capacidad agrícola.

La interferencia de la maleza en los cultivos ocasiona pérdidas en el rendimiento y calidad de los productos cosechados. Las prácticas realizadas para su control incrementan los costos de producción. La maleza puede ser controlada en forma mecánica, biológica o química. El control mecánico consiste en la eliminación de las mismas con algún elemento que las dañe o extraiga, el control biológico es un método de control basado en principios ecológicos que usa enemigos naturales específicos de una planta (Rosenthal S.S, 1984). El control químico se realiza por medio de la aplicación de herbicidas, que inhiben o interrumpen el crecimiento y desarrollo de una planta. En la actualidad el control químico es una de las principales herramientas en la agricultura moderna (Anderson W.P, 1996).

Los herbicidas son usados extensivamente en la agricultura, zonas industriales y urbanas, debido a que si son utilizados adecuadamente controlan eficientemente a la maleza a un bajo costo (Peterson D.E, 2001). No obstante, si no son aplicados correctamente, los herbicidas pueden causar daños a las plantas cultivadas, al medio ambiente, e incluso a las personas que los aplican.

En la agricultura, los herbicidas han sido una herramienta importante para el manejo de maleza por muchos años. Desde 1940 los herbicidas han sido cada vez más sofisticados en el espectro de control de maleza, duración del período de control y selectividad a los cultivos. Aunque los herbicidas son aplicados extensivamente, son probablemente el componente menos entendido de un sistema de manejo integrado de maleza (Peterson D.E, 2001).

### **1.1.1 Efectos sobre el suelo**

El suelo es el principal receptor de herbicidas, ya sea directamente o bien tras su aplicación a las plantas. Los herbicidas pueden quedar retenidos en la arcilla y en la materia orgánica, actuando como intercambiadores catiónicos, de forma que si se produce algún cambio en el equilibrio iónico los productos pueden pasar a la solución del suelo para su posterior utilización. Puede ocurrir, si el producto queda fuertemente retenido en el suelo, que la capacidad total de intercambio puede verse reducida con el tiempo, lo que conlleva a la disminución de la fertilidad natural del suelo e impide la utilización de los elementos nutritivos por parte de las plantas. Estos efectos son más atribuidos en los suelos cuyas capacidad de intercambio catiónico es menor, esto es en suelos con poca materia orgánica y arcilla. Además algunos microorganismos son susceptibles de acumular determinados compuestos, produciéndose así bioacumulación en la cadena trófica.

### **1.2 Clasificación de los herbicidas por su modo de acción**

Los herbicidas pueden ser clasificados de acuerdo a su época de aplicación, selectividad, tipo y modo de acción.

#### **1.2.1 Época de aplicación**

De acuerdo a su época de aplicación los herbicidas pueden clasificarse en forma general como pre-emergentes y post-emergentes. Por lo general, los herbicidas pre-emergentes se aplican después de la siembra, pero antes de que emerjan la maleza y el cultivo. Este tipo de herbicidas elimina las malas hierbas en germinación o recién emergidas, lo que evita la competencia temprana con el cultivo.

Los herbicidas pre-emergentes presentan una gran interacción con algunas características del suelo como son: textura, pH y materia orgánica que pueden afectar la cantidad de herbicida disponible en el suelo para controlar la maleza. Por lo general la dosis de este tipo de herbicidas se ajusta según el tipo de suelo y



materia orgánica, requiriendo una mayor dosis en suelos arcillosos y con alto contenido de materia orgánica (Anderson W.P, 1996). Algunos ejemplos de herbicidas pre-emergentes son la atrazina, el metolaclor y la metribuzina.

Los herbicidas post-emergentes se aplican después de que emerge el cultivo y la maleza. En la mayoría de los casos, la aplicación debe realizarse sobre malezas en sus primeros estados de desarrollo cuando son más susceptibles y su competencia con el cultivo es mínima. La actividad de los herbicidas post-emergentes depende de factores como su grupo químico, especies de malezas presentes y condiciones de clima como velocidad del viento, temperatura del aire y presencia de lluvia (Buhler D.D, 1998). Algunos ejemplos de herbicidas post-emergentes son el glifosato, el nicosulfuron y el paraquat.

### **1.2.2 Selectividad**

De acuerdo a su selectividad los herbicidas pueden ser clasificados como selectivos y no selectivos. Los herbicidas selectivos, son aquellos que en ciertas dosis, formas y épocas de aplicación eliminan a algunas plantas sin dañar significativamente a otras, por ejemplo, la atrazina es un herbicida selectivo en maíz y sorgo.

Los herbicidas no selectivos son los que ejercen su toxicidad sobre toda clase de vegetación y deben utilizarse en terrenos sin cultivo o bien evitando el contacto con las plantas cultivadas. El glifosato es un ejemplo de herbicida no selectivo.

### **1.2.3 Tipo y modo de acción**

Por su tipo de acción los herbicidas pueden ser de contacto, es decir eliminan sólo las partes de la planta con las que entran en contacto por lo que requieren de un buen cubrimiento de malezas para controlarla y tienen un transporte limitado dentro de la planta, por lo que se recomienda para el control de maleza anual. Algunos ejemplos de herbicidas de contacto son el paraquat, lactofen y bromoxinil. Los herbicidas sistémicos se aplican al suelo o al follaje, son absorbidos y transportados a toda la planta incluyendo sus raíces y otros órganos subterráneos, produciéndose la inhibición del metabolismo de crecimiento de la planta que trae

como resultado la eliminación de la misma (Ross M.A, 1985). Algunos ejemplos de herbicidas sistemáticos son el glifosato, setoxydim, y el cletodín.

La forma más útil de clasificación de los herbicidas es de acuerdo a su modo de acción (Duke S.O, 2001). El modo de acción es la secuencia de eventos que ocurren desde la absorción del herbicida hasta la muerte de la planta. Los herbicidas con el mismo modo de acción tienen el mismo comportamiento de absorción y transporte y producen síntomas similares en las plantas tratadas. Además la clasificación de los herbicidas por su modo de acción permite predecir, en forma general, su espectro de control de maleza, época de aplicación, selectividad a cultivos y persistencia en el suelo (Ashton F.M, 1981). Algunos ejemplos incluyen a los inhibidores de la fotosíntesis, como metribuzina, diurón y triazinas; los inhibidores de la síntesis de lípidos como trialato, etofumesato y el ácido 2,4-diclorofenoxiacético; y los inhibidores de la síntesis de aminoácidos como el glifosato y sulfosato.

Este tipo de clasificación permite diseñar los programas de control químico de maleza más eficientes y evitar los posibles efectos negativos del uso de herbicidas como son la obtención de residuos en el suelo, el cambio de especies de maleza y el desarrollo de biotipos de maleza resistentes a herbicidas (Heap I, 2001). Aunque es común que los términos modo y mecanismo de acción de los herbicidas sean usados como sinónimos, existen claras diferencias entre estos términos. El modo de acción se refiere a los eventos que provocan los herbicidas y el mecanismo de acción al sitio o proceso bioquímico específico que es afectado (Baumann P.A, 1998; Gunsolus J.L, 1996).

#### **1.2.4 Persistencia**

Es la capacidad de cualquier herbicida para retener sus características físicas, químicas y funcionales en el medio en el cual es transportado o distribuido, durante un periodo limitado después de su emisión. Los herbicidas que persisten más tiempo en el ambiente, tienen mayor probabilidad de interactuar con los diversos elementos que conforman los ecosistemas (Tabla 1).

**Tabla 1.** Ejemplos de herbicidas de acuerdo a su persistencia.

<b>Herbicidas</b>	<b>Tiempo en el suelo (semanas)</b>	<b>Persistencia</b>
Organoclorados		
Aldrín	530	Moderadamente
Endrín	624	persistentes
Hexaclorobenceno	208	
Organofosforados		
Malatión	2	Ligeramente persistente
Paratión	8	Poco persistentes
Glifosato	8-9	Poco persistentes
Carbamatos		
Carbaryl	2	Ligeramente persistente
Carbofuran	8-19	Poco persistentes

Fuente: Catalogo de plaguicidas de la Comisión intersecretarial para el control del proceso y uso de plaguicidas, fertilizantes y sustancias toxicas (CICOPLAFEST), 2004.

Si su vida media y su persistencia es mayor a la frecuencia con la que se aplican, los herbicidas tienden a acumularse tanto en los suelos como en la biota (Volke S.T, 2002) y con el tiempo, la mayoría de los herbicidas sufren una degradación como resultado de reacciones químicas y microbiológicas en el suelo o agua.

### 1.2.5 Toxicidad

Por mucho tiempo se ha intentado desarrollar un sistema práctico para evaluar la toxicidad aguda y crónica de las sustancias químicas, incluyendo a los plaguicidas. El método más comúnmente empleado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para medir la toxicidad es la Dosis Letal 50,  $DL_{50}$ , que se define como la cantidad mínima de una sustancia, expresada en  $mg\ kg^{-1}$ , que es capaz de matar el 50% de una población de animales de prueba. Los resultados de  $DL_{50}$  obtenidos para una sustancia dada se extrapolan a los humanos y sirven de base para los sistemas de clasificación de toxicidad.

El catalogo de plaguicidas de la Comisión intersecretarial para el control del proceso y uso de plaguicidas, fertilizantes y sustancias toxicas (CICOPLAFEST),

adopta la clasificación de la toxicidad recomendada para la OMS, con base en la DL<sub>50</sub> obtenida en ratas cuando el plaguicida se administra por vía oral en forma aguda. En la Tabla 2 se reportan los valores que indican la categoría de toxicidad (CICOPLAFEST, 2004).

**Tabla 2.** Categorías de toxicidad de herbicidas.

<b>Categoría</b>	<b>Tipo toxicológico</b>	<b>DL<sub>50</sub> Oral (mg kg<sup>-1</sup>)</b>	<b>DL<sub>50</sub> Dérmico (mg kg<sup>-1</sup>)</b>	<b>Herbicidas</b>
Extremadamente tóxico	I	< 5	< 20	Terbufos, Oxamil
Altamente tóxico	II	5-50	20-200	Paraquat, Ometoato
Moderadamente tóxico	III	50-500	200-2000	Acetoclor, Bromoxinil
Ligeramente tóxico	IV	> 500	> 2000	Glifosato, Atrazina

Fuente: Catálogo CICOPLAFEST, 2004.

### **1.3 Uso de herbicidas en México**

Entre los factores que limitan la producción agrícola y la calidad de las cosechas están las enfermedades y las plagas, las cuales pueden atacar a los cultivos desde que las plantas inician su crecimiento, hasta la cosecha y aún en el almacenamiento. Por otra parte, las enfermedades transmitidas por plagas son un problema importante de salud pública en el país. Los plaguicidas permiten controlar la proliferación de plagas y enfermedades de los cultivos, así como reducir o evitar las pérdidas en la producción de alimentos.

Actualmente se calcula que alrededor del 65% del consumo nacional de plaguicidas se aplica en los cultivos de maíz, sorgo, soya, caña de azúcar, arroz, hortalizas y pastos. No obstante la importancia económica de estos productos, es necesario destacar que su aplicación indiscriminada y sin control puede ocasionar daños en el ambiente.

En México, en 1995, la Asociación Mexicana de la Industria de los Plaguicidas y Fertilizantes, señalan que el volumen de plaguicidas utilizados ascendió a 54,678 ton, de las cuales el 29 % corresponde a herbicidas (Bernal G.M, 2000), de ahí, la

probabilidad de que sus residuos estén presentes en la superficie del suelo que se cultivan. Actualmente existen un sin número de sitios contaminados con todo tipo de compuestos, ya sean orgánicos o inorgánicos, debido a la falta de supervisión en las principales tareas de desarrollo económico que se practican en nuestro país como la industria minera, petroquímica y la agricultura, además de no tener un control en el manejo de residuos y derrames peligrosos (Volke S.T, 2002).

Los datos básicos del Sistema Nacional de Información Agropecuario de la SAGARPA muestran que, con base en la producción y en el rendimiento, el cultivo de vegetales es el más importante en México. Esta producción requiere obligatoriamente del uso de plaguicidas y, por tanto, la necesidad de un control de los mismos.

En México la Comisión Nacional de Sanidad Agropecuaria menciona en el catálogo de plaguicidas de uso agrícola, alrededor de 40 compuestos autorizados para uso como herbicidas. Dichos compuestos incluyen familias de triazinas, fenilureas y organofosforados de estos últimos destaca el glifosato el cual es uno de los herbicidas más utilizados en el sector agropecuario.

#### **1.4 Glifosato**

El herbicida glifosato fue descubierto en el año 1970. Pertenece al grupo químico de las glicinas sustituidas. Es un herbicida 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 en zonas no cultivadas. Es el herbicida más usado en el mundo (Baylis A.D, 2000) ya que está considerado como relativamente “sano” debido a su rápida degradación en suelos (Quinn J.P, 1988).

Su uso ha aumentado en los últimos años debido a la siembra de cultivos tolerantes a este compuesto (Koger C.H, 2004). Se emplea también como desecante en sorgo, madurante de caña de azúcar y para renovación de praderas. Con fines no agrícolas, se usa para limpieza de zonas industriales, de estacionamiento y almacenamiento, parques y jardines (Franz J.E, 1997).

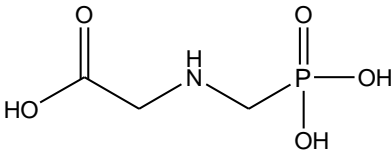
La formulación de glifosato más conocida es la sal isopropilamina con tres componentes básicos: el ingrediente activo, un agente tenso-activo y agua (Giesy J.P, 2000). Inició su comercialización en 1974; normalmente se distribuye como concentrados solubles en agua y polvos, debido a que estas sales son iónicas y altamente polares. Entre diferentes formulaciones las sales catiónicas son más tóxicas que las aniónicas. Cuando se usa de acuerdo a las indicaciones puede ser seguro a la salud humana (William G.M, 2000).

#### **1.4.1 Características del glifosato**

El glifosato [(N-(fosfonometil) glicina)] se degrada a ácido aminometilfosfónico (AMPA), principal producto de degradación en agua, plantas y suelos (Jan M.R, 2009). El glifosato también se adsorbe a los suelos, sin embargo su comportamiento en suelos puede variar en función de las características del suelo como contenido de óxidos de hierro y aluminio, materia orgánica, arcilla y pH del suelo (Cesare A, 2005; Miles C.J, 1988; Morillo E, 2000). La degradación microbológica es la causa principal de su pérdida con la liberación de dióxido de carbono.

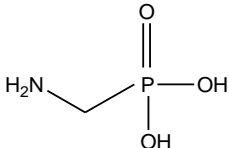
Las propiedades fisicoquímicas del glifosato y su principal producto de degradación AMPA se resumen en las Tablas 3 y 4. Se observa que ambos compuestos son extremadamente polares, ya que respectivamente el logaritmo de su coeficiente de reparto octanol/agua ( $k_{ow}$ ) es negativo. Son solubles en agua, poseen propiedades ácido-base como se representa en la Figura 1 (You J, 2003).

**Tabla 3.** Propiedades fisicoquímicas de glifosato (datos generales\*).

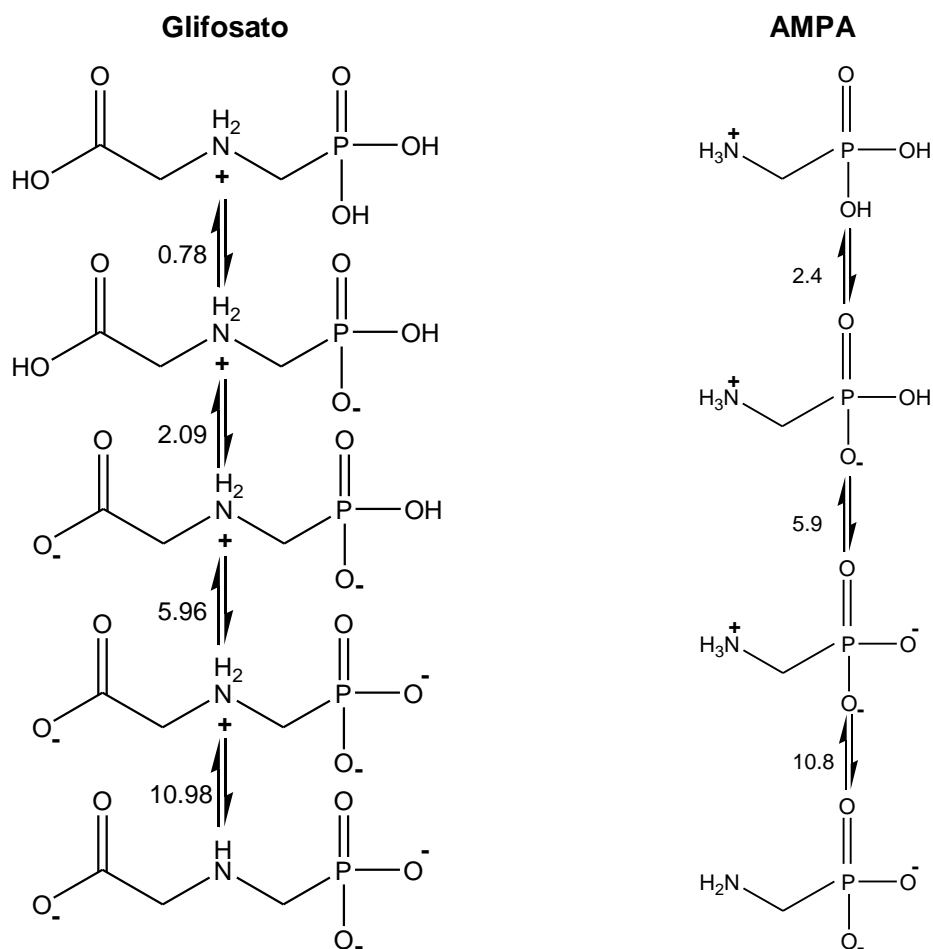
Nombre IUPAC	N-(fosfometil)glicina
Nombre común	Glifosato
Formula molecular	$C_3H_8NO_5P$
Peso molecular	$169.1 \text{ g mol}^{-1}$
Formula estructural	
Forma	Cristales incoloros
Punto de fusión	$200 \text{ }^\circ\text{C}$
Densidad	$1.7 \text{ g cm}^{-3}$
Log $K_{ow}$	-3.2 a $25 \text{ }^\circ\text{C}$
Solubilidad	$12 \text{ g l}^{-1}$ a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ en agua, y es prácticamente insoluble en disolventes orgánicos
Características físicas	Incoloro, inodoro, solido cristalino
Estabilidad	Se mantiene estable hasta $60 \text{ }^\circ\text{C}$
Vida media en los campos del suelo	$DT_{50}$ 3-174 días
Vida media en agua	$DT_{50}$ 5-91 días
pKa	0.78, 2.09, 5.96, 10.98

\*(Mensink H, 1994; Hogendoorn E.A, 1999; WHO, 1994; FOA, 2000).

**Tabla 4.** Propiedades fisicoquímicas de AMPA (datos generales\*).

Nombre IUPAC	Ácido aminometilfosfónico
Nombre común	AMPA
Formula molecular	$CH_6NO_3P$
Peso molecular	$111.04 \text{ g mol}^{-1}$
Formula estructural	
Log $K_{ow}$	-2.36
pKa	2.4, 5.9, 10.8

\*(Hogendoorn E.A, 1999; WHO, 1994; FOA, 2000).



**Figura 1.** Estructuras y reacciones de disociación ácido-base de glifosato y AMPA (You J, 2003).

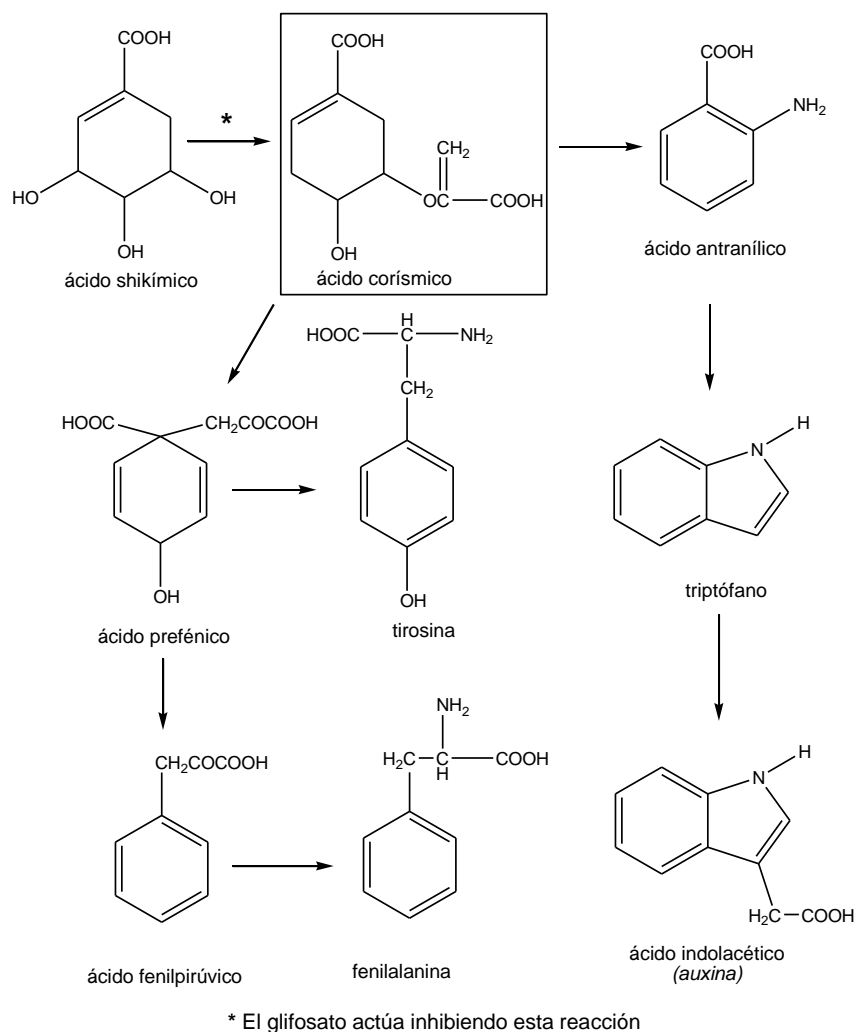
El glifosato es un ácido débil que presenta cuatro constantes de acidez: para el grupo fosfónico ( $\text{pK}_{\text{a}1}$ ,  $\text{pK}_{\text{a}3}$ ), amino ( $\text{pK}_{\text{a}4}$ ), y carboxilo ( $\text{pK}_{\text{a}2}$ ) (Hogendoorn E.A, 1999).

El glifosato es una molécula zwitteriónica que tiene la capacidad de formar compuestos quelantes y estructuras de puente con iones metálicos. Las estructuras de los complejos metálicos comúnmente consisten en dos anillos quelantes donde la fosfonometil glicina, se coordina a través del grupo fosfónico, amina y carboxilo de la estructura del glifosato (Sheals J, 2002; Ramstedt M, 2004; Appleton T.J, 1986; Heineke D, 1994).



### 1.4.2 Modo de acción y metabolismo de glifosato

El glifosato ejerce su acción herbicida a través de la inhibición de la enzima 5-enolpiruvil-shikímato-3-fosfato sintetasa (EPSPS) (Della-Cioppa G, 1986), impidiendo que las plantas elaboren tres aminoácidos aromáticos esenciales (fenilalanina, tirosina y triptófano) para su crecimiento, como se muestra en la Figura 2.



**Figura 2.** Biosíntesis de aminoácidos aromáticos (Nelson D, 2005).

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.

### **1.4.3 Toxicidad**

La toxicidad del glifosato, con base en la cual se ha establecido que no es tóxico para los mamíferos, se resumen en los siguientes puntos (Pesticide Manual, 1995):

- DL<sub>50</sub> oral aguda igual a 56,000 mg kg<sup>-1</sup> en ratas y 11,300 mg kg<sup>-1</sup> en ratones
- DL<sub>50</sub> percutánea aguda en piel y ojos mayor a 5,000 mg kg<sup>-1</sup>
- Irritación moderada en ojos, no irritante en la piel (en conejos)
- CL<sub>50</sub> de inhalación mayor a 12.2 mg l<sup>-1</sup> de aire (4h)

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

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.

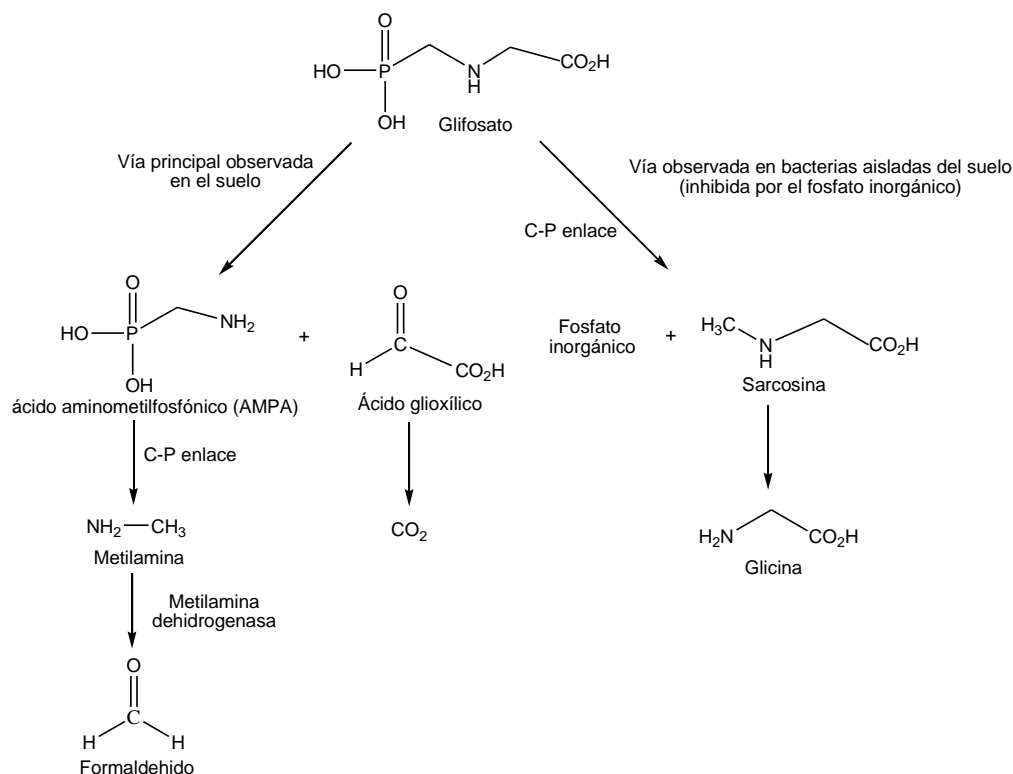
## **1.5 Comportamiento y persistencia de glifosato en suelos**

El glifosato no está recomendado para la aplicación directa en el suelo, por lo que su aplicación se realiza rociando soluciones diluidas del herbicida durante la estación temprana del crecimiento del cultivo. Una cantidad significativa del éste puede quedar adsorbida a través de varios mecanismos. (Honey R, 2000).

Los impactos del glifosato en los organismos que comparten el sistema parecen ser insignificantes porque éste se adsorbe rápidamente a las partículas del suelo donde su actividad es limitada, mientras que el glifosato libre es rápidamente degradado por los microorganismos (Glass R.L, 1987). Inicialmente los procesos de retención explican su inactivación (Piccolo A, 1994) y la degradación por los microorganismos del suelo es considerada una forma importante de reducción del herbicida (Araújo A, 2003).

El glifosato se considera que es un herbicida moderadamente persistente con un tiempo de vida media,  $t_{1/2}$ , que oscila entre 10 a 100 días (media de 47 días) (Hornsby A.G, 1996), depende principalmente de la actividad microbiana y no de la descomposición química o foto-descomposición (Carlisle S.M, 1988). Si bien el AMPA es también degradado en el suelo, su degradación es generalmente más lenta que la de glifosato debido a que su absorción a partículas de suelo posiblemente es más fuerte que con glifosato y/o por lo menos la posibilidad de penetrar las paredes celulares o membranas de los microorganismos del suelo (USDA, 1984).

La principal vía de biodegradación del glifosato se encuentra mediante la ruptura del enlace C-N para producir glioxilato y AMPA que eventualmente se degrada a agua, dióxido de carbono, formaldehído y fosfato (Figura 3). Una segunda ruta que también puede ocurrir es ruptura a través del enlace C-P que da lugar a la formación de fosfato y glicina. Ambos procesos de degradación se realizan bajo condiciones aerobias y anaerobias (Torstensson L, 1985).



**Figura 3.** Vías de degradación de glifosato (Schuette J, 1998).

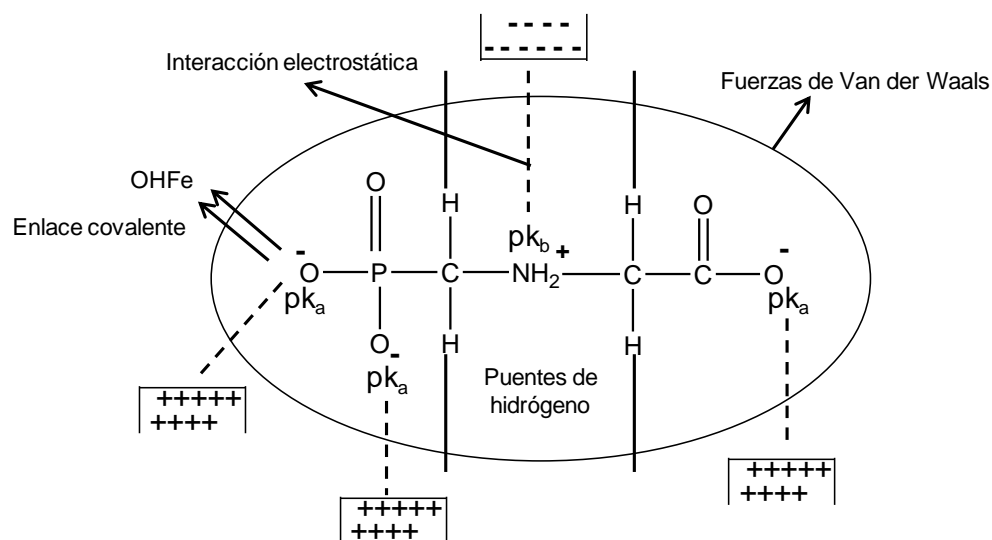
### 1.5.1 Adsorción en suelos

El glifosato es fuertemente adsorbido después de la aplicación al suelo (Piccolo A, 1994), es una molécula pequeña con tres grupos funcionales (grupo fosfónico, amino y carboxilo). Es fuertemente adsorbido por los minerales del suelo (Gimsing A.L, 2004; Gimising A.L, 2002).

La principal adsorción del glifosato en el suelo se produce a través del ácido fosfónico (compuestos orgánicos que contienen C-PO(OH)<sub>2</sub> o C-PO(OR)<sub>2</sub>) (Sprankle P, 1975; Piccolo A, 1994; Gerritse R.G, 1996; Gimsing A.L, 2001; Wang Y.J, 2005), a pesar de que el grupo carboxilo también puede participar en estos procesos. El intercambio de iones y el enlace de hidrógeno pueden explicar la adsorción del glifosato en el suelo (Miles C.J, 1988).

Se han sugerido varios mecanismos de unión, en la adsorción de este herbicida, como son enlaces electrostáticos en medios extremadamente ácidos (Miles C.J, 1988), puentes de hidrógeno con las sustancias húmicas (Piccolo A, 1996) y

especialmente, enlaces covalentes con los óxidos de hierro y aluminio (Piccolo A, 1994; Prata F, 2003) (Figura 4).



**Figura 4.** Esquema de mecanismos (interacción electrostática, fuerzas de Van der Waals, puentes de hidrógeno y enlace covalente) involucrados en la adsorción del glifosato en el suelo (Prata F, 2003).

En la literatura, hay varios trabajos que describen la adsorción del glifosato en los suelos arcillosos que depende de la capacidad de intercambio catiónico (CIC). La CIC se utiliza como una medida de fertilidad, capacidad de retención de nutrientes y la capacidad para proteger el agua subterránea de la contaminación de cationes), contenido de arcilla (Glass R.L, 1987), materia orgánica y óxidos amorfos de hierro y aluminio (Morillo E, 2000). El glifosato forma aniones mono- y divalentes con alta afinidad por cationes trivalentes como  $Al^{3+}$  y  $Fe^{3+}$  dentro de un intervalo de pH 4-8. Estas condiciones favorecen la adsorción en la mayoría de los suelos (Sheals J, 2002; Barja B.C, 2005).

El fosfato presentan una estructura similar al ión fosfonato presente en el glifosato, por lo que puede competir en la adsorción del glifosato en los sitios de la superficie del suelo, lo que puede afectar su adsorción y movilidad en suelos con contenido elevado de fosfato (Gimsing A.L, 2004; De Jonge H, 2001; Hill H.H, 2001).

Algunos estudios han reportado que el aumento del pH del suelo afecta negativamente la adsorción de glifosato (Nomura N.S, 1997; McConnell J.S, 1985;

Morillo E, 2000; Sheals J, 2002). Sin embargo, incrementa cuando el contenido de óxidos de aluminio y hierro aumenta (De Jonge H, 1999).

La inmovilización en suelos puede ocurrir por adsorción (Piccolo A, 1994; Gerritse R.G, 1996; Morillo E, 2002; Gimsing A.L, 2004;) a través de formación de compuestos de coordinación glifosato - ión metálico en la superficie del suelo complejos superficiales (Subbramaniam V, 1988; Tsuji M.T, 2005). La formación de estos complejos conduce a una reducción en la actividad del herbicida, afectando su biodisponibilidad (Hall G.J, 2000; Tsui M.T, 2005).

Debido al efecto que presentan las diferentes variables mencionadas, se utilizan isotermas de adsorción para evaluar el comportamiento en distintos tipos de suelo. Los datos se ajustan de manera convencional a los modelos de Freundlich (Dion H.M, 2001; Glass R.L, 1987; Waiman C.V, 2012; Mamy L, 2005), Freundlich extendido (De Jonge H, 2001) o Langmuir (Piccolo A, 1994; Pessagno R.C, 2005).

### **1.6 Métodos de extracción de glifosato y AMPA en muestras de suelo**

Debido a la alta polaridad del glifosato y su tendencia a formar especies iónicas, la mayoría de los procedimientos de extracción de los herbicidas se basan en reacciones ácido-base, donde el compuesto se encuentra ligado a especies iónicas del suelo a través del grupo fosfonato (Carlisle S.M, 1988). Los procedimientos de extracción utilizados se basan en el uso de soluciones de bases fuertes (KOH, NaOH), sales básicas fuertes ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), bases débiles (trietilamina,  $\text{NH}_3$ ) o ácido débil. De manera convencional, en la mayoría de los casos, es seguido de una etapa de limpieza de la muestra mediante intercambio iónico.

Las diferencias en los procesos de extracción de glifosato y AMPA están directamente relacionadas con el tipo de suelo. En general se observaron mejores recuperaciones para suelos que contengan >20% de materia orgánica en su composición. Para los suelos arcillosos, la eficiencia en el proceso de extracción está comprometida debido a su alta competitividad por los grupos iónicos del suelo, lo que produce una disminución en el tanto por ciento de recuperación (Thompson D.G, 1989).

Cuando se utiliza KOH ( $0.6 \text{ mol l}^{-1}$ ), se obtienen recuperaciones de 88-109% y 73-103% para glifosato y AMPA, respectivamente. El método incluye una purificación seguido de la extracción alcalina con la finalidad de eliminar los ácidos húmicos co-extraídos a través de la precipitación con HCl (Sancho J.V, 1996).

Friestad, H.O en 1985, utilizó una solución de KOH ( $1 \text{ mol l}^{-1}$ ), con dos extracciones, seguido de una purificación con resina de intercambio aniónico en la forma  $[\text{OH}^-]$ . La elución de los analitos se realiza con HCl ( $1 \text{ mol l}^{-1}$ ). Las recuperaciones reportadas son mayores del 60%. Una modificación de éste procedimiento de extracción incluye el uso de con una solución que contiene  $\text{NH}_3$  y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , seguida de una etapa de purificación con resina catiónica en forma de  $\text{H}^+$ . Las recuperaciones obtenidas se encuentran entre 90-100% para glifosato y 89-103% para AMPA (Alferness P.L, 1994).

Thompson D.G en 1989, realizó extracciones con  $\text{NH}_3$ , seguida de una purificación mediante intercambio aniónico, seguido de una elución con  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  ( $1 \text{ mol l}^{-1}$ ), el ión carbonato ácido se elimina por repetidas evaporaciones y redisoluciones con agua desionizada. La muestra reconstituida se purifica mediante intercambio catiónico, Las recuperaciones reportadas están alrededor del 79.0% y 68.5% para glifosato y AMPA respectivamente.

El glifosato también fue extraído a partir de cuatro tipos de suelos utilizando trietilamina ( $0.1 \text{ mol l}^{-1}$ ), seguido por la purificación mediante intercambio aniónico y catiónico, encontrando recuperaciones entre 88% y 104% para ambos analitos (Eberbach P.L, 1991). De este estudio, se puede concluir que la trietilamina es eficiente para extraer el herbicida soluble, pero no cuando el glifosato se adsorbe fuertemente por los constituyentes del suelo.

## **1.7 Métodos de análisis para la determinación de glifosato y AMPA**

La importancia ambiental y agronómica del glifosato y AMPA, ha generado la necesidad de desarrollar metodologías analíticas, capaces de detectar los analitos a diferentes intervalos de concentración. Los sistemas que se han propuesto aportan una serie de ventajas e inconvenientes para su determinación en diferentes matrices. Las metodologías más reportadas para el análisis de estas especies son las técnicas de separación instrumentales como electroforesis capilar, cromatografía de gases y cromatografía de líquidos de alta resolución.

### **1.7.1 Electroforesis capilar (CE)**

Es una técnica de separación basada en las diferencias en la velocidad de migración de las distintas especies cargadas bajo la acción de un campo eléctrico en el interior de una columna capilar, la cual ha sido empleada para la determinación de herbicidas.

Entre los sistemas de detección más reportados se pueden encontrar detectores con UV-Vis, fluorescencia y espectroscopia de masas (MS), requiriéndose de una derivatización previa o de detección indirecta (Goodwin L, 2003). Para llevar a cabo la derivatización del glifosato, se han utilizado reactivos como el naftaleno-2-3-dicarboxaldehído (NDA) (Jiang J, 2007), 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol (NBD-F) (Zhou L, 2007).

Jiang J, en 2007 desarrolló un método utilizando un capilar de sílice fundida que contenía un electrolito soporte formado por borato de sodio y dodecilsulfato de sodio (SDS) a un pH 9.3, un voltaje de separación de 12 kV con un detector a 415 nm. Este método se aplicó a muestras de agua. La derivatización el glifosato se realiza en varias etapas que consisten en la obtención de glicina utilizando hipoclorito y su posterior derivatización con NDA. Las recuperaciones reportadas se encuentran en el intervalo de 55 -88%. Los límites de detección encontrados para glifosato y AMPA son de 1.6 nM para ambos analitos.



Zhou L, en 2007 desarrolló un método para la determinación de glifosato y AMPA, utilizando un capilar de sílice fundida y como electrolito soporte una mezcla tetraborato de sodio, SDS y acetonitrilo a un pH 9.9. El voltaje de separación fue de 25 kV con un detector de fluorescencia a  $\lambda_{\text{ex}}$  488nm y  $\lambda_{\text{em}}$  520 nm. El método se aplicó a muestras de agua, utilizando como agente derivatizante la NBD-F, obteniendo recuperaciones del 99.9 % para glifosato y 103.6 % para AMPA. Los límites de detección reportados fueron de 32.2 ng ml<sup>-1</sup> y 3.6 ng ml<sup>-1</sup> para glifosato y AMPA, respectivamente.

### **1.7.2 Métodos cromatográficos**

Las técnicas cromatográficas son las más utilizadas para la determinación de este herbicida, sin embargo se requiere utilizar reacciones de derivatización ya que las estructuras de los analitos no son volátiles y no presentan grupos cromóforos o fluoróforos en su estructura (Sahasrabuddhey B, 1999; Kun T, 2009). A continuación se describen algunos ejemplos representativos de estas técnicas.

#### **1.7.2.1 Cromatografía de gases (CG)**

El análisis por CG requiere obligatoriamente de reacciones de derivatización para la preparación de derivados volátiles y estables, que se puedan detectar con sensibilidad y selectividad elevadas.

Las mezclas de reactivos que más se utilizan para la derivatización son los siguientes: anhídrido heptafluorobutírico-BCl<sub>3</sub>-2-cloroetanol (Guinivan R.A, 1982), anhídrido trifluoroacético (TFAA)-diazometano (Seiber J.N, 1984), TFAA-trifluoroetanol (TFE) (Konar S.K, 1990), TFAA-heptafluorobutanol (HFB) (Alferness P.L, 1994; Royer A, 2000), ácido acético-ortoacetato de trimetilo (TMOA) (Tsuji M.T, 1997), isopropilcloroformato- diazometano (Kataoka H, 1996).

Los procedimientos de derivatización con anhídridos tienen el inconveniente de que la reacción es exotérmica. La adición del reactivo se lleva a cabo a temperaturas de -50 a -60 °C, que se logran con corrientes de N<sub>2</sub>. Por otra parte, los tiempos requeridos para realizar estas reacciones son muy extensos ya que, también se debe considerar el tiempo necesario para que la mezcla de reacción

alcance la temperatura ambiente. Las condiciones para el análisis por CG para glifosato y AMPA en muestras de suelo se presentan en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Determinación de glifosato en muestras de suelo por CG.

Detector	Condiciones CG	Derivatizante	Límites de Detección	Ref.
Nitrógeno-fosforo	SE-20., 1.8m X 2mm T <sub>c</sub> : 150 °C	TFAA-TFE	0.05 mg kg <sup>-1</sup> glifosato 0.01 mg kg <sup>-1</sup> AMPA	Roy D.N, 1989
Captura de electrones	DC-200., 2.2m X 4.4mm T <sub>c</sub> : 160 °C	TFAA-TFE	No Reportado	Eberbach, P.L,1991
Fotométrico de flama	DB-17., 15m X 0.53mm T <sub>c</sub> : 170 °C-10 °C min <sup>-1</sup> -270 °C	Isopropilcloroformato-diazometano	1.2 mg kg <sup>-1</sup> glifosato 0.8 mg kg <sup>-1</sup> AMPA	Kataoka H, 1996
Fotométrico de flama-Masas (IE)	HP-5., 30m X 0.25mm T <sub>c</sub> : 50 °C (1min)-30 °C min <sup>-1</sup> -170 °C (1 min)-10 °C min <sup>-1</sup> -250 °C (10 min)	Ácido acético-TMOA	0.02 mg kg <sup>-1</sup> glifosato 0.02 mg kg <sup>-1</sup> AMPA	Tsuji M.T, 1997
Masas (IE)	HP-5., 30m X 0.32mm T <sub>c</sub> : 70 °C (2min)-30 °C min <sup>-1</sup> -170 °C-120 °C min <sup>-1</sup> - 270 °C	TFAA-TFE	0.003 µg g <sup>-1</sup> glifosato 0.05 µg l <sup>-1</sup> AMPA	Boerjesson E, 2000
Masas-masas	VA-SM5., 30m X 0.25mm T <sub>c</sub> : 80 °C (1.5min)-260 °C (1min)-30 °C min <sup>-1</sup> -300°C	TFAA-HFB	0.05 µg g <sup>-1</sup> glifosato 0.05 µg g <sup>-1</sup> AMPA	Royer A, 2000

T<sub>c</sub>:= Temperatura de columna; I E= Ionización por impacto de electrones.

### **1.7.2.2 Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)**

La naturaleza zwitteriónica y polar de los analitos hace que la HPLC sea una técnica de análisis adecuada. La derivatización en cromatografía de líquidos es necesaria para aumentar la sensibilidad analítica hacia los analitos. Los sistemas de detección más utilizados en cromatografía líquida son UV-Vis y fluorescencia.

La absorción UV-Vis proporciona una sensibilidad adecuada, tiene un rango lineal amplio, es adecuado para la elución por gradientes, no es sensible a los cambios de temperatura y es relativamente barato, sin embargo una de sus limitaciones es que no permite obtener información estructural y está sujeta a múltiples interferencias, lo que hace necesario una etapa previa de limpieza de muestras o bien, una derivatización de los compuestos (Hogendoorn E.A, 2001).

La detección mediante espectroscopia de fluorescencia es un de las estrategias más aplicadas en el análisis cromatográfico de glifosato y AMPA debido a su elevada sensibilidad y selectividad, en comparación con la detección por absorción en UV-Vis. El glifosato y su producto de degradación se pueden transformar en compuestos fluorescentes por derivatización.

Las condiciones para el análisis por HPLC para glifosato y su producto de degradación, en muestras de suelo se presentan en la Tabla 6 donde se reportan las características principales de los métodos más comunes que aparecen en la literatura.

**Tabla 6.** Determinación de glifosato en muestras de suelo por HPLC.

Detector	Condiciones HPLC	Derivatizante	Limites de detección	Ref.
UV (240 nm)	Columna: C18 FM: Fosfatos 0.02M, pH 2.3-ACN (85:15, v/v)	TsCl	10 $\mu\text{g g}^{-1}$ glifosato 8 $\mu\text{g g}^{-1}$ AMPA	Khrolenko M.V, 2005
UV (405 nm)	Columna: C18 FM: 0.02 M bromuro de tetraetilamonio, 0.05 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 3.2-ACN (5:1) por 7 min-(1:5) en 8 min	DNP	0.05 $\text{mg kg}^{-1}$ glifosato 0.1 $\text{mg kg}^{-1}$ AMPA	Lundgren L.N, 1986
UV (570 nm)	Columna: Catiónica FM: Fosfatos, pH 1.9	Ninhidrina	0.01 $\mu\text{g g}^{-1}$ glifosato	Thompson D.G, 1989
FL (254 nm, 313 nm)	Columna: $\text{NH}_2$ FM: 0.01 M $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 5.4-ACN (15:85, v/v)	FMOC-Cl	5 $\text{mg kg}^{-1}$ glifosato	Glass R.L, 1983
FL (270 nm, 315 nm)	Columna: $\text{NH}_2$ FM: 0.05 M $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 6.0-ACN (75:25, v/v)	FMOC-Cl	0.5 $\text{mg kg}^{-1}$ glifosato	Miles C.J, 1988
FL (360 nm, 400 nm)	Columna: $\text{NH}_2$ FM: Fosfatos, pH 2.1	OPA-MER	0.05 $\text{mg kg}^{-1}$ glifosato	Tuinstra L.G.M, 1987

FL= Fluorescencia; FM= Fase móvil; ACN= Acetonitrilo; TsCl= Cloruro *p*-toluenosulfonilo; DNP= 1-fluoro-2,4-dinitrobenceno; FMOC-Cl= 9-fluorenilmetilcloroformiato; OPA-MER= *o*-ftalaldehído-mercaptoetanol.

## 1.8 Derivatización

La derivatización es una técnica que implica una reacción química entre el analito y un reactivo para cambiar las propiedades químicas y físicas del mismo. Los usos principales de la derivatización en HPLC están sujetos a una mejor detección, cambios en la estructura molecular o polaridad del analito para mejorar la separación y la estabilización de analitos lábiles. La reacción utilizada para la derivatización debe ser rápida, cuantitativa y que produzca un mínimo de subproductos. El exceso de reactivo no debe interferir con el análisis o debe ser

fácilmente extraíble de la matriz de reacción. En la Tabla 7 se reportan algunos de los agentes derivatizantes más utilizados en HPLC.

**Tabla 7.** Agentes derivatizantes utilizados para de derivatización de glifosato.

Derivatización	Reactivo	Referencia
Post-Columna	4-cloro-7-nitrobenzofurano (NBC-Cl)	Meras I.D, 2005
	2,2-dihidroxi-1,3-indanodiona (ninhidrina)	Sundaram K.M.S, 1997; Bhaskara B.L, 2006
	4-cloro-3,5-dinitrobenzotrifluoruro (CNBF)	Qian K, 2009
	o-ftalaldehído -mercaptoetanol (OPA-MER)	Sundaram K.M.S, 1997; EPA method 547, 1990; Span K.P, 1994; Tuinstra L.G.M.Th, 1987
Pre-Columna	1-fluoro-2,4-dinitrobencono (DNP)	Lundgren L.N, 1986
	Cloruro <i>p</i> -toluenosulfonilo (TsCl)	Khrolenko M.V, 2005
	4-metoxibencenosulfonil fluoruro (MOBS-F)	Sun Y, 2010
	9-fluorenilmetilcloroformiato (FMOC-Cl)	Miles C.J, 1986; Miles C.J, 1988; Pablo J.P; 2008

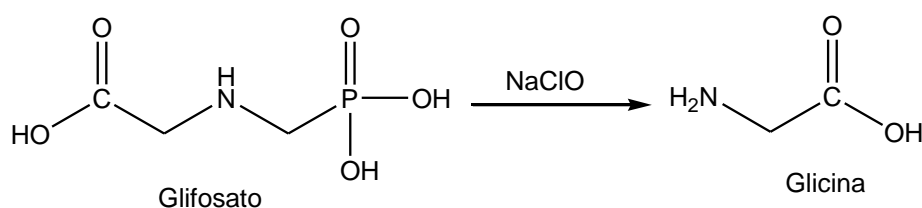
En CG la derivatización se utiliza para mejorar la volatilidad o para cambiar la polaridad de los analitos. En HPLC la derivatización se utiliza para la introducción de un compuesto cromóforo. Existen dos procedimientos de derivatización para la detección de glifosato en diferentes matrices por HPLC la post-columna y pre-columna.

### 1.8.1 Derivatización post-columna

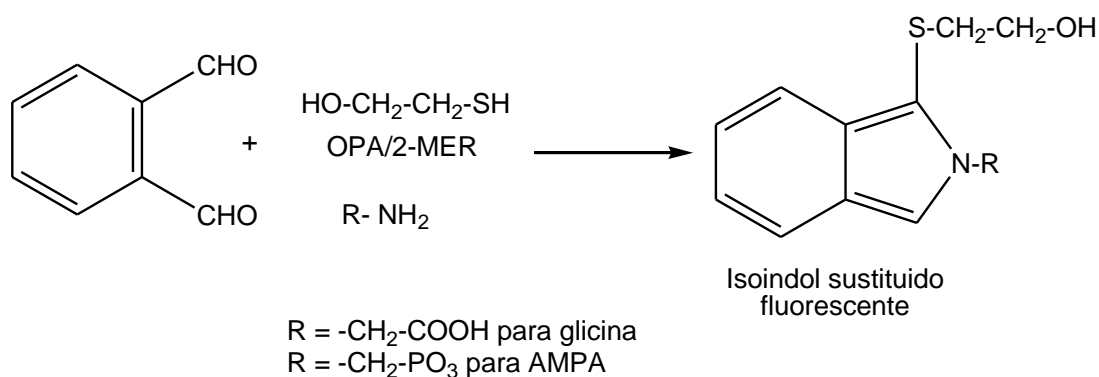
La derivatización post-columna se lleva a cabo después de la separación cromatográfica, pero antes de la detección, la principal ventaja que presenta es que la cromatografía de los analitos no se ve afectada por la derivatización.

El método propuesto por la EPA para la determinación de glifosato en agua se fundamenta en la derivatización post-columna con OPA, posterior a la separación de una columna de intercambio catiónico.

En este método, las muestras de agua se inyectan en una columna de intercambio de cationes con temperatura controlada (50-60 °C), para que los analitos se separen isocráticamente, y después de la elución de las mismas, se hacen reaccionar con complejo OPA/2-MER para que se obtenga un fluoróforo, previa oxidación del glifosato a glicina utilizando hipoclorito de sodio a 40 °C. La detección del AMPA se logra debido a que éste no reacciona con el hipoclorito pero si forma un fluoróforo con el complejo OPA/2-MER (EPA method 547, 1990). En la Figura 5 (a) y (b) se representan estas reacciones.



**Figura 5 (a).** Reacción de oxidación del glifosato.



**Figura 5 (b).** Reacción de derivatización post-columna de glifosato y AMPA con OPA/2-MER.

También se han utilizado otras reacciones en post-columna como la reacción con ninhidrina (Sundaram K.M.S, 1997), para formar, en un solo paso, un derivado coloreado a una temperatura de 100 °C que se detecta por UV-Vis a 570 nm.

La derivatización post-columna presenta ciertas desventajas como son: a) requiere la obtención de glicina a partir del glifosato, lo que implica realizar dos reacciones para lograr la detección fluorescente. El reactivo OPA/2-MER se oxida con el aire degradándose rápidamente. (b).

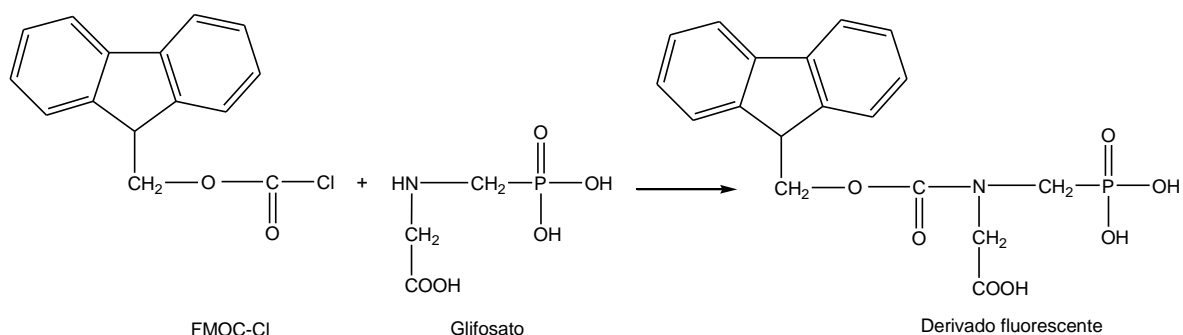
El equipo que se requiere es complejo; se compone de una bomba binaria, dos reactores, y dos termostatos (para la columna analítica y el reactor).

### 1.8.2 Derivatización pre-columna

La derivatización pre-columna no necesita de equipos complicados y tienen menos restricciones, se puede utilizar de forma manual o automatizada. Las principales ventajas que presentan son una velocidad de tratamiento rápida, simplicidad y alta sensibilidad.

Por lo que respecta al glifosato, se han utilizado diferentes reactivos derivatizantes, todos ellos de modo *off-line*, ya que los aductos formados presentan buena estabilidad. El reactivo más utilizado ha sido, sin duda, el FMOC-Cl que reacciona a temperatura ambiente con aminas primarias (al igual que OPA/2MER) como con secundarias, por lo que presentan la ventaja de no requiere la oxidación previa para la determinación de glifosato.

La reacción se lleva a cabo en medio buffer de boratos, con tiempos de reacción entre 20-30 min (Figura 6). La principal desventaja es la señal que proporciona el reactivo, por lo que se elimina el exceso mediante extracción líquido-líquido con éter etílico o acetato de etilo previamente a la inyección del derivado obtenido en el sistema cromatográfico (Miles C.J 1988; Miles C.J 1986; Pablo J.P, 2008; Ibáñez M, 2005; Glass R.L, 1983).



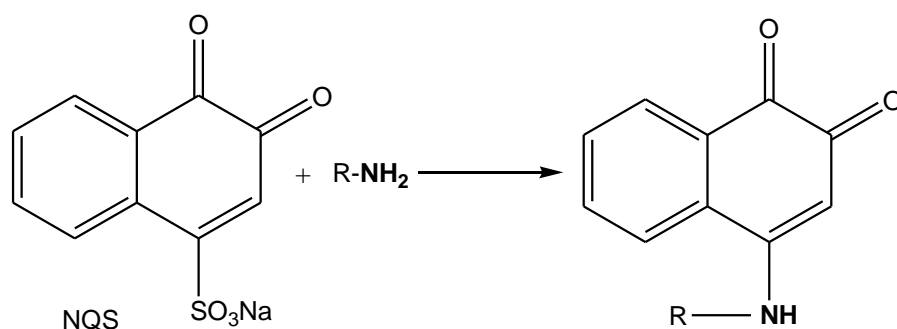
**Figura 6.** Reacción de derivatización pre-columna entre glifosato y FMOC-Cl.

La separación de los derivados formados se lleva a cabo, generalmente, mediante una columna de intercambio aniónico débil (tipo amino) (Miles C.J, 1988; Miles

C.J, 1986; Glass R.L, 1983), aunque también se ha utilizado fase reversa C18 (Schuster R, 1992).

Recientemente se ha descrito a la 1,2-naftoquinona-4-sulfonato (NQS) como un reactivo químico que produce derivados estables con amino compuestos en soluciones alcalinas (Figura 7). Las principales ventajas que presenta el uso de este reactivo es que los procesos de derivatización se realizan en medio acuoso, reacciona con aminas primarias y secundarias, forma compuestos estables y presenta una elevada absorptividad molar y fluorescencia nativa (Niveen A.M, 2011; Kobayashi Y, 1987).

Principalmente se ha utilizado para el análisis de aminoácidos y anilina en alimentos (Hernando D, 1999; Saurina J, 1996). La presencia de grupos amino en las estructuras del glifosato y AMPA aunado a las características de la NQS presentan características adecuadas para su aplicación en sistemas de derivatización de los analitos de interés, la cual no ha sido descrita en la literatura.



**Figura 7.** Reacción de derivatización pre-columna entre amino-compuestos y NQS.

La aparente baja toxicidad que presenta éste herbicida aunado al uso de semillas modificadas genéticamente que son resistentes al glifosato, ha promovido la aplicación desmedida de éste compuesto en suelos de cultivo. En México no existe una norma que regule el contenido de glifosato y AMPA en suelos. El presente trabajo plantea la evaluación de diferentes agentes cromóforos para su aplicación en sistemas de derivatización pre-columna que permitan una reducción del tiempo de tratamiento y análisis de glifosato y AMPA en suelos, comparado con otras metodologías reportadas.





## 2.- Objetivos

---

### 2.1 Objetivo general

Desarrollar una metodología de extracción y cuantificación de glifosato y ácido aminometilfosfónico en suelos de cultivo de maíz mediante HPLC con derivatización pre-columna.

### 2.2 Objetivos específicos

1. Establecer las condiciones de derivatización para glifosato y AMPA
2. Optimizar las condiciones cromatográficas para la separación y derivatización pre-columna de los analitos en suelos
3. Evaluar métodos de extracción de los analitos en suelos
4. Evaluar la degradación de glifosato en suelos de cultivo de maíz del Estado de Hidalgo



*METODOLOGÍA EXPERIMENTAL*

## 3.- Metodología experimental

---

### 3.1 Reactivos

- 4-aminoantipirina, Sigma Aldrich
- 1,2-naftoquinona-4-sulfonato, Sigma Aldrich, 97%
- Ácido acético, J.T Baker, 99%
- Ácido aminometilfosfónico, Sigma Aldrich, 99%
- Acido clorhídrico, J.T Baker, 96%
- Agua desionizada y purificada (18 M $\Omega$ , Mili-Q)
- Ampicilina, Sigma Aldrich
- Cloruro de calcio, sigma Aldrich
- Fosfato de sodio monobásico, J.T Baker, 99%
- Glifosato, Sigma Aldrich, 96%
- Hipoclorito de sodio, Solución 10%, J.T Baker, 95%
- Metanol, J.T Baker, 99%
- Molibdato de sodio, Sigma Aldrich, 99%
- Ninhidrina, J.T Baker, 98%
- Tetraborato de sodio, Sigma Aldrich, 99%

### 3.2 Equipos y materiales

Los equipos y materiales utilizados en este trabajo fueron los siguientes:

- Agitador mecánico, LAB-LINE Instruments, modelo 3589
- Balanza analítica Sartorius modelo BP221S de precisión  $\pm 0.0001$  g
- Baño ultrasónico, Branson, Modelo 3510
- Centrifuga, ROLCO, modelo 3070
- Columna analítica de sílice C<sub>18</sub> (Zorbax eclipse plus C18, Agilen Technologies) 150 x 4.6 mm, 5  $\mu$ m de diámetro de partícula
- Cromatógrafo de líquidos con bomba cuaternaria, Perkin Elmer, Series 200

- Detector de fluorescencia Perkin Elmer modelo LC 240
- Detector de UV-Vis Perkin Elmer modelo Series 200
- Espectrofotómetro UV-Vis Perkin Elmer modelo Lambda 40 utilizando una celda de cuarzo de 1 cm de paso óptico
- Micropipetas, Eppendorf de volumen variable 100-1000  $\mu\text{l}$
- Potenciómetro CORNING modelo 450
- Purificador y desionizador de agua Milli-Q
- Software de control y procesamiento de datos TotalChrom versión 6.3.1

### **3.3 Desarrollo experimental**

La metodología propuesta se desarrolló en tres etapas, la primera corresponde a la evaluación de las condiciones de derivatización mediante espectrofotometría UV-Vis, seguida del análisis mediante HPLC-UV y HPLC-Fluorescencia utilizando la NQS como agente de derivatización.

#### **3.3.1 Espectroscopia UV-Vis**

##### **3.3.1.1 Soluciones**

Todas las soluciones se prepararon utilizando el reactivo de grado analítico en agua desionizada con una resistividad de 18.0 M $\Omega$  cm.

- \* Solución patrón de 1000 mg l<sup>-1</sup> de glifosato y AMPA, esta solución se almacena en la oscuridad a una temperatura de 4 °C y se renueva semanalmente. Las distintas soluciones estándar fueron preparadas diariamente mediante dilución de la solución patrón.
- \* Para la obtención de glicina a partir de glifosato se utilizaron soluciones de hipoclorito de sodio 0.1 % (p/v) (Patsias J, 2001) y molibdato de sodio 0.5 % (p/v) (Bhaskara B.L, 2006).

- \* Para ajustar el pH de reacción se utilizaron soluciones tampón de tetraborato de sodio  $0.05 \text{ mol l}^{-1}$  pH 9.4 y fosfato de sodio  $0.1 \text{ mol l}^{-1}$ , pH 7.0 (el pH se ajustó con NaOH  $2 \text{ mol l}^{-1}$ ).
- \* Solución de ninhidrina, se preparó a una concentración de 0.5 % (p/v), la cual se disolvió con alcohol etílico.
- \* Solución de 1,2-naftoquinona-4-sulfonato  $0.03 \text{ mol l}^{-1}$  en HCl  $0.1 \text{ mol l}^{-1}$ .

### **3.3.1.2 Derivatización**

Derivatización con ninhidrina: Se toman 4 ml de la solución estándar, se añaden 100  $\mu\text{l}$  de hipoclorito de sodio 0.1 % (p/v), 1 ml de ninhidrina 0.5 % (p/v) y 3 ml de una solución amortiguadora de fosfatos  $0.1 \text{ mol l}^{-1}$ , pH 7. Cuando se utiliza molibdato como catalizador se utilizan los mismos volúmenes de soluciones sustituyendo el hipoclorito por 1 ml de molibdato de sodio 0.5 % (p/v). El compuesto cromóforo formado se detectó a 567 nm.

Derivatización con NQS: Se toman 4 ml de la solución estándar, 300  $\mu\text{l}$  de NQS 0.06 % (p/v) y 3 ml de una solución amortiguadora de boratos  $0.05 \text{ mol l}^{-1}$  ajustada a un pH 9.4. El compuesto cromóforo formado se detectó a 475 nm.

Todas las soluciones se aforaron a 10 ml y se calentaron en un baño termostático (80 °C) durante 5 min. Las soluciones obtenidas fueron analizadas mediante espectrofotometría UV-Vis.

### **3.3.2 HPLC-UV**

#### **3.3.2.1 Soluciones**

- \* Solución patrón de  $150 \text{ mg l}^{-1}$  de glifosato y AMPA, esta solución se almacena en la oscuridad a una temperatura de 4 °C y se renueva semanalmente. Las distintas soluciones estándar fueron preparadas diariamente mediante dilución de la solución patrón.
- \* Solución extractante de tetraborato de sodio  $0.05 \text{ mol l}^{-1}$ .

- \* Solución de 1,2-naftoquinona-4-sulfonato  $0.03 \text{ mol l}^{-1}$  en HCl  $0.1 \text{ mol l}^{-1}$ .
- \* Solución de HCl  $0.25 \text{ mol l}^{-1}$ .
- \* Solución de 4-aminoantipirina  $100 \text{ mg l}^{-1}$  utilizada como estándar interno (E.I).
- \* Solución de cloruro de calcio  $0.1 \text{ mol l}^{-1}$ .
- \* Fase móvil preparada mediante la mezcla de ácido acético 1% con metanol en una proporción de 60:40 (v/v).

### **3.3.2.2 Tratamiento de muestras**

Todas las muestras de suelo se tomaron aproximadamente a 30 cm de profundidad utilizando una pala de polipropileno. Las muestras fueron secadas a temperatura ambiente, posteriormente se homogenizan y tamizan para obtener un tamaño de partícula menor a 2 mm (malla número 10).

#### **3.3.2.2.1 Análisis de muestras**

La muestra de suelo se obtuvo de un campo de cultivo de maíz en el municipio de Actopan, Hgo, México. El suelo utilizado presenta una textura de tipo franco arenoso (16.5% arcilla, 40.9% limo, 45.4% arena) con un pH de 8.1. Las muestras fueron analizadas mezclando 0.1 g de suelo y 4 ml de una solución de tetraborato de sodio  $0.05 \text{ mol l}^{-1}$  en tubos de polipropileno de 15 ml. La mezcla se agita mecánicamente durante 1 hora y a continuación se centrifuga a 3200 rpm durante 15 min. La solución sobrenadante es la utilizada para la derivatización.

#### **3.3.2.2.2 Isotermas de adsorción**

Se utilizan tres tipos de muestras de suelo: arcilloso, arenoso y franco arenoso. Las isotermas se realizaron por experimentos en discontinuo, mezclando 0.1 g de suelo con 10 ml de una solución que contenía concentraciones conocidas de glifosato y  $\text{CaCl}_2$  para poder comparar la adsorción del herbicida en la presencia de  $\text{Ca}^{+2}$ . La mezcla se agita mecánicamente durante 2 horas, posteriormente se

centrifuga a 3200 rpm durante 15 min, se retira el sobrenadante y finalmente es derivatizado

Las muestras fueron preparadas y analizadas por triplicado el mismo día de su análisis, de este modo se garantiza la validez de los resultados.

### **3.3.2.3 Derivatización**

Se toman 300  $\mu\text{l}$  de la solución sobrenadante y se mezclan con 228  $\mu\text{l}$  de NQS ( $0.03 \text{ mol l}^{-1}$  en HCl  $0.1 \text{ mol l}^{-1}$ ), 60  $\mu\text{l}$  de estándar interno de 4-aminoantipirina ( $100 \text{ mg l}^{-1}$ ), aforado a 1 ml con una solución de tetraborato de sodio  $0.05 \text{ mol l}^{-1}$ , el pH de la mezcla fue de 9.4. La mezcla se coloca en un baño termostataado ( $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ) durante 5 min. Trascorrido el calentamiento se adicionan 60  $\mu\text{l}$  de HCl  $0.25 \text{ mol l}^{-1}$  con el fin de generar compuestos neutros de los productos derivatizados. La solución obtenida es filtrada (con acetato de celulosa  $0.45 \mu\text{m}$ ) y finalmente se inyecta en un sistema cromatográfico.

### **3.3.2.4 Procedimiento cromatográfico**

Las muestras fueron analizadas mediante cromatografía de líquidos (PerkinElmer MA, USA), equipado con un desgasificador, una bomba cuaternaria, un detector de UV-Vis (Modelo 200) a 217 nm, conectado a un inyector manual con un loop externo de 20  $\mu\text{l}$ , utilizando una columna  $\text{C}_{18}$  como fase estacionaria. La fase móvil utilizada consiste en 1% de ácido acético-metanol (60:40 v/v) a un flujo de  $1.0 \text{ ml min}^{-1}$ , estabilizado a temperatura constante de  $23\text{-}25 \text{ }^{\circ}\text{C}$  (Hernando D, 1999).



### **3.3.3 HPLC-Fluorescencia**

#### **3.3.3.1 Soluciones**

- \* Solución patrón de 100 mg l<sup>-1</sup> de glifosato y AMPA, esta solución se almacena en la oscuridad a una temperatura de 4 °C y se renueva semanalmente. Las distintas soluciones estándar fueron preparadas diariamente mediante dilución de la solución patrón.
- \* Solución extractante de tetraborato de sodio 0.05 mol l<sup>-1</sup>.
- \* Solución de 1,2-naftoquinona-4-sulfonato 0.0015 mol l<sup>-1</sup> en HCl 0.1 mol l<sup>-1</sup>.
- \* Solución de HCl 0.025 mol l<sup>-1</sup>.
- \* Solución de ampicilina de 100 mg l<sup>-1</sup> como E.I.
- \* La fase móvil utilizada fue preparada mediante la mezcla de ácido acético 1% con metanol en una proporción de 80:20 (v/v).

#### **3.3.3.2 Tratamientos de muestras**

Se mezclan en un tubo de propileno de 15 ml, 0.1 g de suelo y 4 ml de una solución de tetraborato de sodio 0.05 mol l<sup>-1</sup>. La mezcla se agita mecánicamente durante 1 hora y a continuación se centrifuga a 3200 rpm durante 15 min. La solución sobrenadante es la utilizada para la derivatización.

#### **3.3.3.3 Derivatización**

Se toman 300 µl de la solución sobrenadante y se mezclan con 228 µl de NQS (0.0015 mol l<sup>-1</sup> en HCl 0.1 mol l<sup>-1</sup>), 60 µl de estándar interno de ampicilina, completando un volumen de 1 ml con una solución de tetraborato de sodio. La mezcla se coloca en un baño termostático a 60 °C durante 5 min donde tiene lugar la reacción de derivatización. Transcurrido el calentamiento se adicionan 60 µl de HCl 0.025 mol l<sup>-1</sup>. La solución obtenida se filtra (con acetato de celulosa 0.45 µm) y finalmente se inyecta en un sistema cromatográfico.

#### **3.3.3.4 Procedimiento cromatográfico**

Las muestras fueron analizadas mediante un cromatografo de líquidos (PerkinElmer MA, USA), equipado con un desgasificador, una bomba cuaternaria, un detector de fluorescencia (Modelo LC 240) con una  $\lambda_{em}$  386 nm y  $\lambda_{ex}$  250 nm, conectado a un inyector manual con un loop externo de 20  $\mu$ l. La separación de los compuestos se realiza utilizando una columna C<sub>18</sub> como fase estacionaria. La fase móvil utilizada consiste en 1% de ácido acético-metanol (80:20 v/v) a un flujo de 1.0 ml min<sup>-1</sup>, estabilizado a temperatura constante 23-25 °C.



## *RESULTADOS Y DISCUSIÓN*

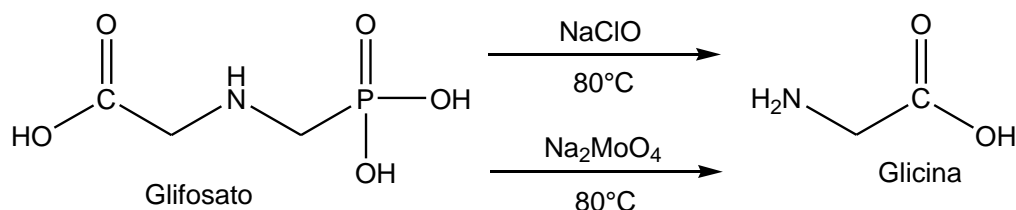
## 4.- Resultados y discusión

### 4.1 Selección del agente derivatizante

La primera etapa del presente trabajo es la selección del agente derivatizante, evaluándose ninhidrina y NQS. Las condiciones de análisis involucran la evaluación de las condiciones de reacción para su posterior aplicación en sistemas cromatográficos.

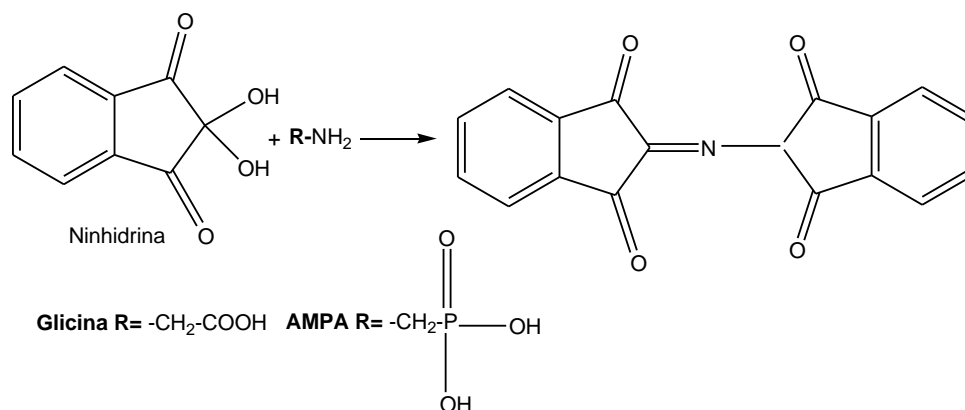
#### 4.1.1 Derivatización utilizando ninhidrina

Para el caso de la ninhidrina, la reacción ocurre en presencia de aminas primarias, por lo que se requiere de la oxidación de glifosato a glicina, utilizando hipoclorito de sodio (NaClO) (Patsias J, 2001) o molibdato de sodio (Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>) (Bhaskara B.L, 2006) como agentes catalizadores de acuerdo a la reacción mostrada en la Figura 8.



**Figura 8.** Reacción de oxidación de glifosato a glicina.

Posteriormente se lleva a cabo la derivatización mediante el empleo de ninhidrina (Sundaram K.M.S, 1997; Bhaskara B.L, 2006) para formar compuestos cromóforos, color púrpura, a través de la reacción presentada en la Figura 9.



**Figura 9.** Derivatización de glicina y AMPA con Ninhidrina.

Para la evaluación de oxidación de glifosato a glicina utilizando hipoclorito ( $\text{ClO}^-$ ), se observó que la reacción no se puede llevar a cabo debido a que el exceso de hipoclorito utilizado para oxidar al glifosato reacciona con el cromóforo formado, observándose una desaparición del color púrpura característico de la reacción con ninhidrina.

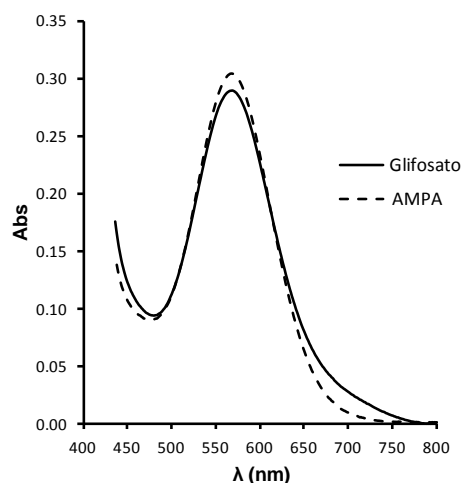
Como una segunda opción se usó molibdato de sodio ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ ) como un agente catalizador en medio acuoso neutro a 80 °C (Bhaskara B.L, 2006), observándose que la reacción procede de manera favorable. La concentración de cada uno de los reactivos involucrados se evaluó en los intervalos que se muestran en la Tabla 8. Los óptimos de cada variable se encuentran recopilados en la misma tabla.

**Tabla 8.** Variables de derivatización óptimas con ninhidrina.

Parámetro	Intervalo	Óptimo
Ninhidrina % (p/v)	0.1—0.7	0.5
pH	5.0—9.0	7.0
$\text{Na}_2\text{MoO}_4$ % (p/v)	0.1—0.7	0.5

Cabe resaltar que en las condiciones óptimas antes mencionadas la reacción presenta un producto estable con absorción máxima en 567 nm. No hubo un cambio apreciable en la absorbancia o el color del producto si el orden de adición de reactivos cambiaba.

En las condiciones óptimas el tiempo de reacción oscila en torno a 5 min. La Figura 10, muestra los espectros en la zona visible de los compuestos derivatizados obtenidos utilizando ambos analitos.



**Figura 10.** Espectro en la zona visible de glifosato ( $10 \text{ mg l}^{-1}$ ) y AMPA ( $10 \text{ mg l}^{-1}$ ).

Condiciones óptimas: Ninhidrina (0.5%), molibdato de sodio (0.5%), solución buffer de fosfatos ( $0.1 \text{ mol l}^{-1}$ , pH 7) y  $\lambda$  567 nm.

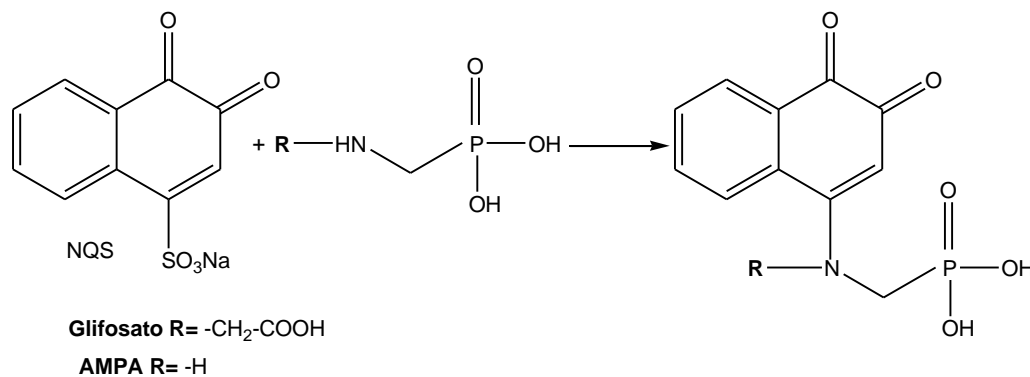
Bajo las condiciones descritas anteriormente, se realizaron líneas de calibrado utilizando soluciones estándar en un intervalo de concentraciones entre 2.7 y 20  $\text{mg l}^{-1}$ . La absorbancia fue medida por triplicado, construyéndose las líneas de calibrado a partir de las absorbancias medias. Los parámetros de regresión de las líneas de calibrado se muestran en la Tabla 9, respectivamente.

**Tabla 9.** Parámetros de regresión de las líneas de calibrado utilizando ninhidrina, absorbancia vs concentración de herbicida ( $\text{mg l}^{-1}$ ).

Parámetros		Glifosato	AMPA
Coeficiente de correlación, $r^2$		0.998	0.997
Ordenada en el origen, $b_0 \pm ts (b_0)$		$0.0545 \pm 0.0165$	$-0.0188 \pm 0.0164$
Pendiente, $b_1 \pm ts (b_1)$		$0.0412 \pm 0.0015$	$0.0373 \pm 0.0015$
Reproducibilidad	$5 \text{ mg l}^{-1}$	3.68	2.28
	$10 \text{ mg l}^{-1}$	4.97	1.94
Repetitividad	$5 \text{ mg l}^{-1}$	0.24	0.52
	$10 \text{ mg l}^{-1}$	0.14	0.20
Intervalo lineal ( $\text{mg l}^{-1}$ )		2.7-20.0	2.7-20.0
Limite de detección ( $\text{mg l}^{-1}$ )		0.9	0.9

#### 4.1.2 Derivatización utilizando NQS

Para la derivatización mediante NQS (Figura 11) el reactivo derivatizante reacciona tanto con grupos aminos primarios y secundarios, produciendo derivados color rojo o naranja que absorben entre 440-480 nm (Hernando D, 1999; Saurina J, 1996).



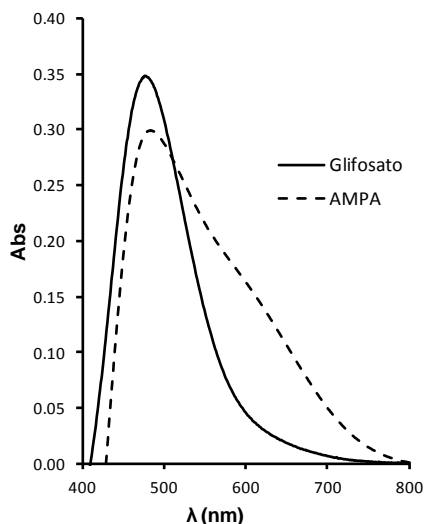
**Figura 11.** Derivatización de glifosato y AMPA con NQS.

Para la derivatización utilizando NQS no fue necesario el uso de oxidación del glifosato, debido a que este agente derivatizante reacciona con aminas primarias y secundarias. Se evaluaron los parámetros involucrados, encontrando las siguientes condiciones óptimas como se reportan en la Tabla 10.

**Tabla 10.** Variables de derivatización óptimas con NQS.

Parámetro	Intervalo	Óptimo
NQS % (p/v)	0.01—0.08	0.06
pH	7.0—9.0	9.0

Todos las reacciones se realizan utilizando soluciones de glifosato y AMPA de 10.0 mg l<sup>-1</sup> en discontinuo y calentando a 80°C. El tiempo necesario es de 5 minutos para NQS, el cual es menor al obtenido utilizando ninhidrina, pero sigue siendo lento para ser acoplado a sistemas de derivatización post-columna. La Figura 12 muestra el espectro en la zona visible de los complejos formados utilizando NQS como derivatizante que absorbe a 475 nm.



**Figura 12.** Espectros en la zona visible de glifosato ( $10 \text{ mg l}^{-1}$ ) y AMPA ( $10 \text{ mg l}^{-1}$ ). Condiciones óptimas: NQS (0.06%), solución buffer de boratos ( $0.05 \text{ mol l}^{-1}$ , pH 9.4) y  $\lambda$  475 nm.

Bajo las condiciones óptimas descritas anteriormente, se realizaron líneas de calibrado utilizando soluciones estándar de glifosato en un intervalo de concentraciones entre  $2.7$  y  $13 \text{ mg l}^{-1}$  y para AMPA en un intervalo de concentraciones entre  $2.7$  y  $20 \text{ mg l}^{-1}$ . La absorbancia se midió por triplicado, construyéndose las líneas de calibrado a partir de las absorbancias medias. Los parámetros de regresión de las líneas de calibrado se muestran en la Tabla 11, respectivamente.

**Tabla 11.** Parámetros de regresión de las líneas de calibrado utilizando NQS, absorbancia vs concentración de herbicida ( $\text{mg l}^{-1}$ ).

Parámetros		Glifosato	AMPA
Coeficiente de correlación, $r^2$		0.992	0.998
Ordenada en el origen, $b_0 \pm ts (b_0)$		$0.0105 \pm 0.0005$	$0.0371 \pm 0.0015$
Pendiente, $b_1 \pm ts (b_1)$		$0.0045 \pm 0.0015$	$0.0252 \pm 0.8415$
Reproducibilidad	$5 \text{ mg l}^{-1}$	4.38	3.45
	$10 \text{ mg l}^{-1}$	2.76	2.89
Repetitividad	$5 \text{ mg l}^{-1}$	1.90	0.16
	$10 \text{ mg l}^{-1}$	4.68	3.45
Intervalo lineal ( $\text{mg l}^{-1}$ )		3.9-13.0	6.0-20.0
Limite de detección ( $\text{mg l}^{-1}$ )		1.3	2.0



Una vez determinadas las condiciones óptimas de derivatización y los parámetros analíticos se evaluó el posible acoplamiento a un sistema de análisis por inyección en flujo (FIA). Sin embargo, la cinética y temperatura de reacción no permitieron el acoplamiento al sistema de análisis.

De acuerdo a los resultados obtenidos se concluye que el reactivo de derivatización más adecuado para el análisis de los herbicidas es la NQS, debido a que presenta compuestos cromóforos independientes de cada uno de los analitos, lo que permite su aplicación en sistemas de análisis de cromatografía de líquidos con derivatización pre-columna.

#### **4.2 Análisis de glifosato y AMPA mediante HPLC-UV**

Una vez elegido a la NQS como agente derivatizante, se procedió a optimizar las condiciones de la reacción de derivatización de glifosato y AMPA utilizando un diseño central compuesto (CCD). Éste tipo de diseño se basa en un diseño factorial convencional a dos niveles y permite estimar ecuaciones de la superficie de respuesta utilizando el modelo cuadrático.

Los CCD son diseños de tratamientos factoriales  $2^k$  con  $2k$  combinaciones adicionales, llamadas puntos axiales, a lo largo de los ejes coordinados de los niveles de factor codificados. Las coordenadas de los puntos axiales de los ejes del factor codificados son  $(\pm \alpha, 0, 0, \dots, 0)$ ,  $(0, \pm \alpha, 0, \dots, 0)$ ,  $(0, 0, 0, \pm \alpha)$  que permiten ampliar la superficie de respuesta a evaluar. En general, se agregan  $m$  réplicas al centro del diseño en las coordenadas  $(0, 0, \dots, 0)$ , con la finalidad de calcular la varianza residual.

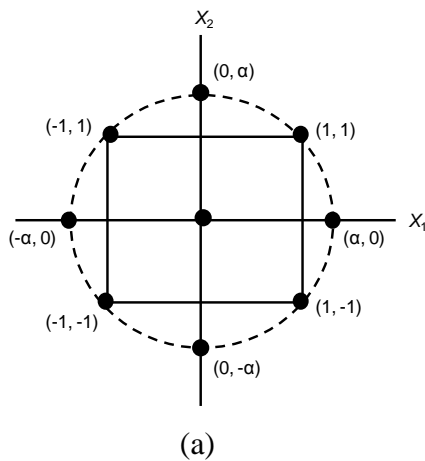
El número de experimentos a realizar se determina de acuerdo a la ecuación  $2^k + 2k + m$ , donde  $k$  es el número de factores estudiados,  $N_f = 2^k$  son las combinaciones de tratamientos del factorial,  $N_a = 2k$  son combinaciones de tratamientos en los puntos axiales del diseño a una distancia de  $\pm \alpha$  desde el centro y  $m$  son las réplicas en el centro para obtener un total de  $N = N_f + N_a + m$  observaciones (Kuehl R.O, 2001).

Las coordenadas en los ejes codificados  $x_1$  y  $x_2$  para el CCD con dos factores se muestran en la Tabla 12, y la Figura 13. Debido a que cada factor tiene cinco niveles, se puede estimar una ecuación cuadrática a partir de este diseño.

**Tabla 12.** Coordenadas del diseño central compuesto.

Diseño $2^2$		Axial		Central*	
$X_1$	$X_2$	$X_1$	$X_2$	$X_1$	$X_2$
-1	-1	$-\alpha$	0	0	0
+1	-1	$+\alpha$	0		
-1	+1	0	$-\alpha$		
+1	+1	0	$+\alpha$		

\*m réplicas



<b>Número de factores</b>	<b>2</b>
Factor $2^k$	1
$\alpha$	1.414
$N_f$	4
$N_a$	4
$m$	5
$N$	13

**Figura 13.** Diseño central compuesto para dos factores. (a) representación del diseño, (b) valores rotatorios con precisión uniforme.

La distancia de  $\alpha$  es calculada de manera que se obtenga rotabilidad, en un sistema de dos variables  $\alpha = \pm 1.41$  (Massart D.L, 1997). El número de experimentos llevados a cabo en el centro de la matriz experimental,  $m$ , los cuales permiten estimar el error experimental. Así, los diseños centrales compuestos son más económicos en cuanto al uso de recursos experimentales y proporcionan la capacidad de estimar las ecuaciones de la superficie de respuesta.

El proceso de derivatización utilizando NQS depende principalmente de la concentración del derivatizante y la temperatura de reacción. La Tabla 13 muestra los niveles seleccionados para la optimización, estos valores fueron elegidos de

acuerdo a experimentos previos. La matriz de diseño utilizada y las respuestas obtenidas se muestran en la Tabla 14. Se realizaron un total de trece experimentos ( $k=2$ ,  $m=5$ ,  $\alpha=\pm 1.41$ ), utilizando como variable de salida la  $\Sigma$  relativa de áreas, la cual debe ser máxima en condiciones óptimas. Todos los experimentos se realizaron de manera aleatoria analizando una muestra de suelo fortificado con glifosato y AMPA en una concentración de  $20 \text{ mg kg}^{-1}$  y  $12 \text{ mg kg}^{-1}$  para 4-aminoantipirina utilizado como E.I.

**Tabla 13.** Niveles utilizados en el diseño experimental para la metodología de superficie de respuesta.

Factores	Nivel bajo de punto axial (-1.41)	Nivel bajo factorial (-1)	Punto central (0)	Nivel alto factorial (+1)	Nivel alto de punto axial (1.41)
$X_1$ : NQS ( $\text{mmol l}^{-1}$ )	4.1	5.5	9.3	13.0	14.5
$X_2$ : Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	20	30	50	70	80

**Tabla 14.** Matriz de CCD para dos variables ( $2^2$ ):  $X_1$ = Concentración de NQS ( $\text{mmol l}^{-1}$ ),  $X_2$ = Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) y Respuesta ( $\Sigma$ área/E.I en UA).

Exp. No	$X_1$	$X_2$	Resp
1	-1	-1	1.08
2	1	-1	1.17
3	-1	1	0.61
4	1	1	1.43
5	-1.41	0	1.43
6	1.41	0	1.35
7	0	-1.41	1.33
8	0	1.41	1.17
9	0	0	1.14
10	0	0	1.15
11	0	0	1.44
12	0	0	1.03
13	0	0	1.46

Los resultados fueron analizados estadísticamente para ajustar cada variable a su óptimo con la menor variabilidad posible. Todos los cálculos se hicieron mediante MINITAB V15.1 software. La validación del modelo se llevó a cabo mediante un análisis de varianza (ANOVA).

Por lo cual los diferentes pasos de validación son:

- (i) El total de la suma de cuadrados ( $SS_T=0.66$ , con 12 grados de libertad) está compuesto por la suma de los cuadrados de la regresión ( $SS_{REG}=0.60$ , con 5 grados de libertad) y la suma de cuadrados residuales ( $SS_{RES}$ , 0.06 con 7 grados de libertad).

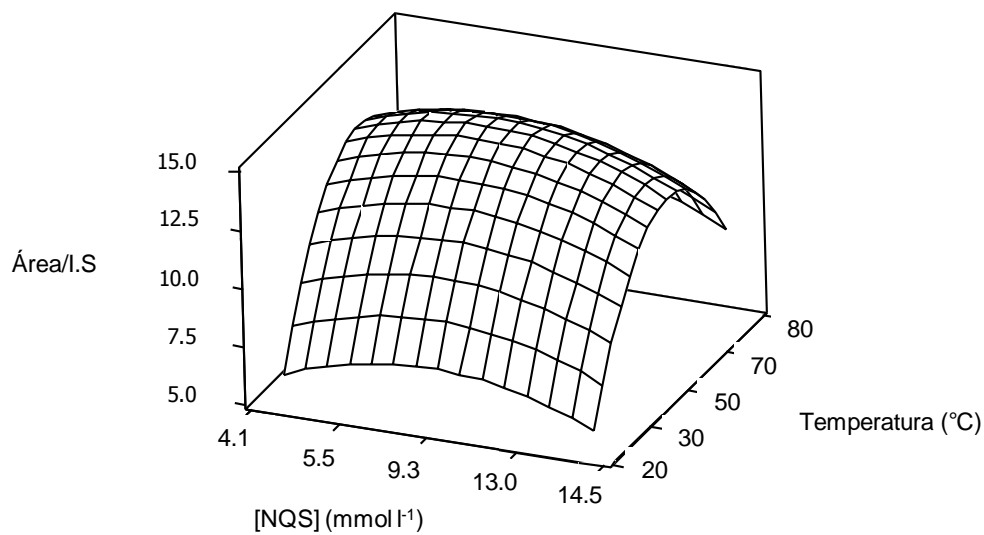
$$SS_T = SS_{REG} + SS_{RES}$$
$$\sum_i (y_i - \bar{y})^2 = \sum_i (\hat{y}_i - \bar{y})^2 + \sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2$$

- (ii) El modelo ajustado es aceptable debido a que el coeficiente de correlación ( $r^2$ ) es de 0.909, lo que indica que el 90.9% de la variabilidad en la respuesta se explica por el modelo propuesto. El valor de ajuste justifica una correlación entre las variables independientes evaluadas y la siguiente ecuación de la superficie de respuesta:

$$Y=1.42 - 0.03X_1 + 0.12X_2 - 0.07X_1^2 - 0.26X_2^2 - 0.01X_1X_2$$

Donde Y es la respuesta (suma áreas relativas),  $X_1$  es la concentración de NQS ( $\text{mmol l}^{-1}$ ) y  $X_2$  es la temperatura de reacción ( $^{\circ}\text{C}$ ). La Figura 14, muestra la representación gráfica de la superficie de respuesta encontrada.

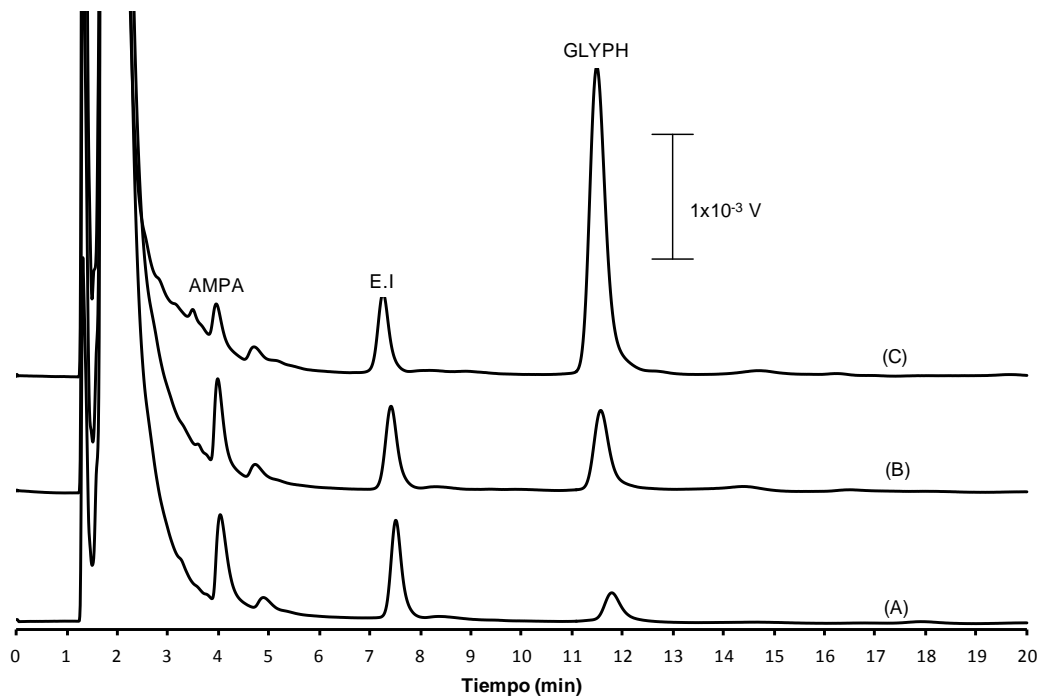
A partir de la expresión puede deducirse que la temperatura es la variable que ejerce una mayor influencia en la respuesta. Las condiciones óptimas seleccionadas a partir de ésta superficie de respuesta fueron: concentración de NQS de  $8.5 \text{ mmol l}^{-1}$  y temperatura de reacción de  $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . El tiempo de reacción para todos los experimentos fue de 5 min.



**Figura 14.** Efecto de temperatura y concentración de NQS. Condiciones de derivatización: solución de reactivos, 0.03 mol l<sup>-1</sup> NQS + 0.1 mol l<sup>-1</sup> HCl; solución de tetraboratos de sodio 0.05 mol l<sup>-1</sup>; 20 mg kg<sup>-1</sup> de glifosato y AMPA.

La importancia de la temperatura en el proceso de derivatización se presenta en la Figura 15. A bajas temperaturas el AMPA es derivatizado, pero el glifosato tiene una disminución en la señal (Fig. 14. A). La Figura 14. B muestra el cromatograma obtenido en condiciones óptimas.

Por otra parte, se puede observar que a altas temperaturas (Fig. 14. C) la señal de glifosato es mayor, pero la señal de AMPA comienza a disminuir. Una temperatura de 60 °C se seleccionó debido a que imparte una situación de compromiso entre una disminución de la señal de AMPA y un aumento de la señal de glifosato.



**Figura 15.** Cromatogramas obtenidos para el análisis de los experimentos de herbicidas: A) 7, 20°C, B) condiciones óptimas, 60 °C, C) 8, 80°C. GLYPH, glifosato; AMPA, ácido aminometilfosfónico; E.I, Estándar interno (4-aminoantipirina).

#### 4.2.1 Parámetros analíticos

Bajo las condiciones óptimas seleccionadas, se determinaron los parámetros analíticos utilizando una muestra de suelo fortificado con glifosato y AMPA. Cada estándar se preparó y se analizó por triplicado. Las áreas de los picos se midieron y se obtuvo una curva de calibrado construida a partir de la relación de la señal del analito a la señal del estándar interno. La curva de calibrado mostró una dependencia lineal de la relación de los picos y la concentración de los analitos en las muestras de suelo dopadas.

Los parámetros de regresión de las líneas de calibrado se muestran en la Tabla 15. Los límites de detección fueron calculados a partir de la relación  $3.29 S_e/b_1$  y el límite de cuantificación se determinó  $10 S_e/b_1$ , donde  $S_e$  es la raíz cuadrada de la varianza residual de la curva estándar, y  $b_1$  es la pendiente. De acuerdo con los criterios de la IUPAC (Currie L.A, 1995).

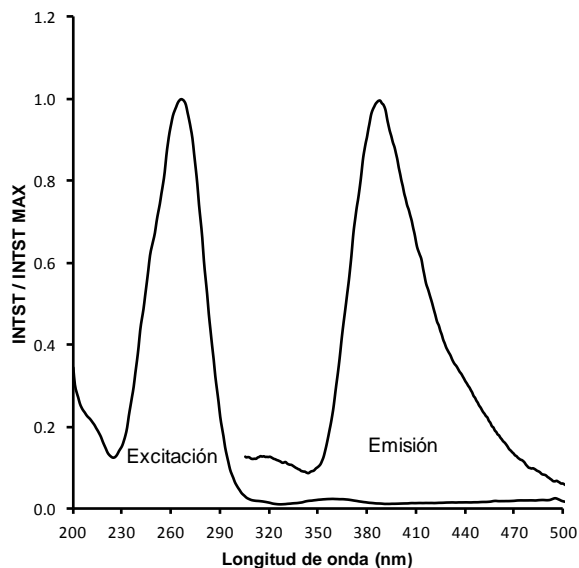
**Tabla 15.** Parámetros de regresión de las líneas de calibrado obtenidas en muestras de suelo dopado, área analito: área E.I vs [analito]: [E.I.] en concentración ( $\text{mg kg}^{-1}$ ).

Parámetros		Glifosato	AMPA
Coeficiente de correlación, $r^2$		0.998	0.999
Ordenada en el origen, $b_0 \pm ts(b_0)$		0.0134 $\pm$ 0.1846	-0.0028 $\pm$ 0.0302
Pendiente, $b_1 \pm ts(b_1)$		0.3543 $\pm$ 0.0592	0.2141 $\pm$ 0.0244
Repetitividad	15 $\text{mg kg}^{-1}$	2.3	2.5
(% DER, n=3)	30 $\text{mg kg}^{-1}$	1.8	1.2
Reproducibilidad	15 $\text{mg kg}^{-1}$	1.5	3.6
(% DER, n=3)	30 $\text{mg kg}^{-1}$	1.6	3.9
Intervalo lineal		0.2-350	0.3-152
Limite de detección ( $\text{mg kg}^{-1}$ )		0.06	0.09
Limite de cuantificación ( $\text{mg kg}^{-1}$ )		0.19	0.29

### 4.3 Análisis de glifosato y AMPA mediante HPLC-Fluorescencia

El agente derivatizante NQS es utilizado como reactivo de derivatización que presenta fluorescencia nativa en medio acuoso (Niveen A.M, 2011), por lo que se evaluó su aplicación en el análisis de glifosato y AMPA. Los resultados obtenidos demuestran que los productos de derivatización formados por la reacción entre el grupo amino (del glifosato y AMPA), con el reactivo NQS en medio alcalino (pH 9.4) son fluorescentes. Esta característica permite eliminar las etapas de extracción y reducción, lo que le confiere una ventaja adicional a la metodología propuesta en términos de tiempo de análisis (Niveen A.M, 2011; Kobayashi Y, 1987).

Los espectros de excitación y emisión de los productos formados de glifosato y AMPA utilizando NQS como se muestran en la Figura 16. Los productos de derivatización presentan máximos de emisión a  $\lambda_{em}$ = 386 nm con una excitación máxima  $\lambda_{ex}$ = 250 nm.



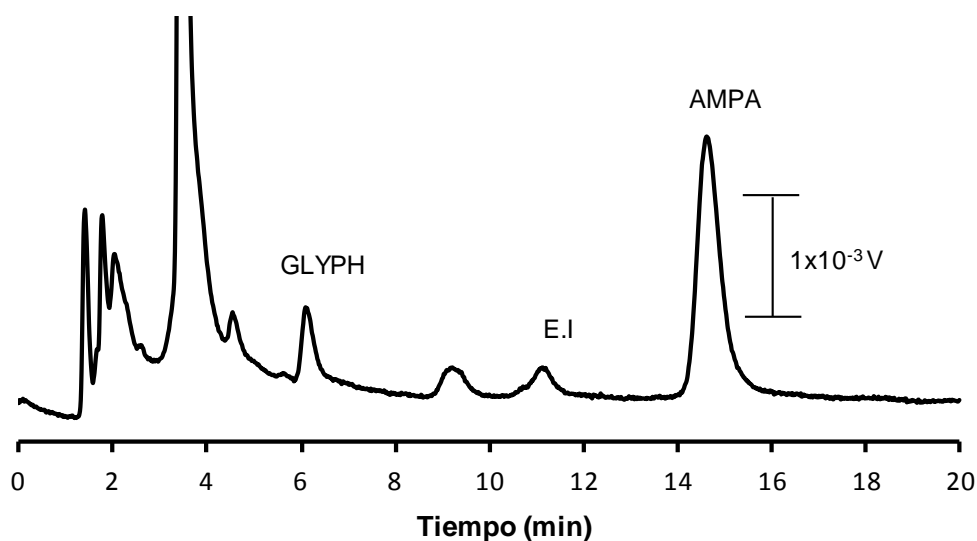
**Figura 16.** Espectros de excitación y emisión de los productos de reacción formados con ( $10 \text{ mg kg}^{-1}$ ) glifosato y AMPA, con NQS ( $0.0015 \text{ mg l}^{-1}$ ) en una solución de tetraboratos de sodio (pH 9.4).

#### 4.3.1 Parámetros analíticos

El cromatograma obtenido de la separación de herbicidas en las condiciones óptimas se muestra en la Figura 17. Los valores obtenidos del coeficiente de separación son mayores a 1.5, por lo que se tienen una separación adecuada de los analitos presentes.

Una vez identificados cada uno de los analitos y bajo las condiciones óptimas de trabajo seleccionadas, se determinaron los parámetros analíticos correspondientes utilizando una muestra de suelo fortificado con glifosato y AMPA. Se realizaron estándares por triplicado y se analizaron mediante la metodología propuesta. La curva de calibrado se construyó a partir de los cocientes promedio de áreas y concentraciones del analito y el estándar interno. La curva de calibración muestra una dependencia lineal entre el cociente de área de picos y la concentración de los analitos en la muestra de suelo enriquecida. La Tabla 16 muestra los parámetros de regresión de las líneas de calibrado.





**Figura 17.** Cromatograma obtenido del análisis de una muestra de suelo fortificado con  $20 \text{ mg kg}^{-1}$  de ambos herbicidas. GLYPH, glifosato; AMPA, ácido aminometilfosfónico; E.I., Estándar interno (Ampicilina).

**Tabla 16.** Parámetros de regresión de las líneas de calibrado, área analito: área E.I. vs [analito]: [E.I.], en concentración ( $\text{mg kg}^{-1}$ ).

Parámetros		Glifosato	AMPA
Coeficiente de correlación, $r^2$		0.999	0.999
Ordenada en el origen, $b_0 \pm ts(b_0)$		$-0.0032 \pm 0.0067$	$-0.0041 \pm 0.0057$
Pendiente, $b_1 \pm ts(b_1)$		$0.5928 \pm 0.0007$	$0.7858 \pm 0.0012$
Repetitividad	$20 \text{ mg kg}^{-1}$	2.9	3.5
(% DER, n=3)	$40 \text{ mg kg}^{-1}$	3.7	2.8
Reproducibilidad	$20 \text{ mg kg}^{-1}$	2.5	2.9
(% DER, n=3)	$40 \text{ mg kg}^{-1}$	2.2	3.4
Intervalo lineal		0.063-280	0.036-418
Límite de detección ( $\text{mg kg}^{-1}$ )		0.021	0.012
Límite de cuantificación ( $\text{mg kg}^{-1}$ )		0.063	0.036

#### 4.4 Comparación de los métodos cromatográficos

Los límites de detección alcanzados por la metodologías propuestas son competitivos con los reportados en la literatura, utilizando diferentes agentes derivatizantes como se muestra en la Tabla 17, la cual es una recopilación del análisis de residuos en muestras de suelo.

Los métodos citados requieren pasos adicionales tales como: extracciones líquido-líquido, el uso de disolventes orgánicos, limpieza de las muestras por intercambio iónico. Como una ventaja adicional del método propuesto implica un menor tiempo del tratamiento de la muestra y de análisis.

**Tabla 17.** Análisis de residuos de glifosato y AMPA en muestras de suelo.

Pre-tratamiento de la muestra	Derivatización	Detector	Analito	Limite de detección (mg kg <sup>-1</sup> )	Ref.
20-30 g de suelo con 50 ml NaOH 0.1 M, agitación por 60 min, limpieza con floculación CaCl <sub>2</sub> 0.1M, resina de intercambio aniónico (HCO <sub>3</sub> )	Pre-columna FMOC-Cl	Fluorescencia	Glifosato	5.0	Robert L.G, 1983
20 g de suelo con 2 x 150 ml KOH 0.1M, agitación durante 16 horas	Post-columna OPA/MER	Fluorescencia	Glifosato	0.04	Span K.P, 1994
15 g de suelo con 25 ml KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.1 M, agitación durante 15 min	Pre-columna FMOC-Cl	UV-Vis	Glifosato	0.10	Pablo J.P, 2008
5 g de suelo con 40 ml de agua, agitación durante 1 hora	Pre-columna FMOC-Cl	Fluorescencia	glifosato AMPA	0.103 0.016	Coline D, 2011
5 g de suelo con 250 ml KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.1 M, agitación durante 12 horas	Pre-columna FMOC-Cl	Fluorescencia	Glifosato AMPA	0.2 0.05	Accinelli C.C, 2004
3.5 g de suelo con 30 ml de trietilamina 0.1 M, agitación durante 15 min, limpieza con intercambio aniónico, concentración por evaporación	Pre-columna DNP	UV-Vis	Glifosato AMPA	0.05 0.1	Lundgren L.N, 1986
2 g de suelo con 3 x 10 ml KOH 0.1 M, agitación durante 24 horas	Pre-columna FMOC-Cl	Fluorescencia	Glifosato	1.0	Miles C. J, 1988
0.1 de suelo con 4 ml de Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> , agitación durante 1 hora	Pre-columna NQS	UV-Vis Fluorescencia	Glifosato AMPA Glifosato AMPA	0.06 0.09 0.021 0.012	En este trabajo

#### 4.5 Evaluación del sistema de extracción

Una vez establecidas las condiciones de separación de los analitos mediante HPLC con detección UV-Vis y fluorescencia, se seleccionó el método de HPLC-UV

para el análisis y extracción de glifosato, debido a que las concentraciones encontradas en las muestras reales son elevadas.

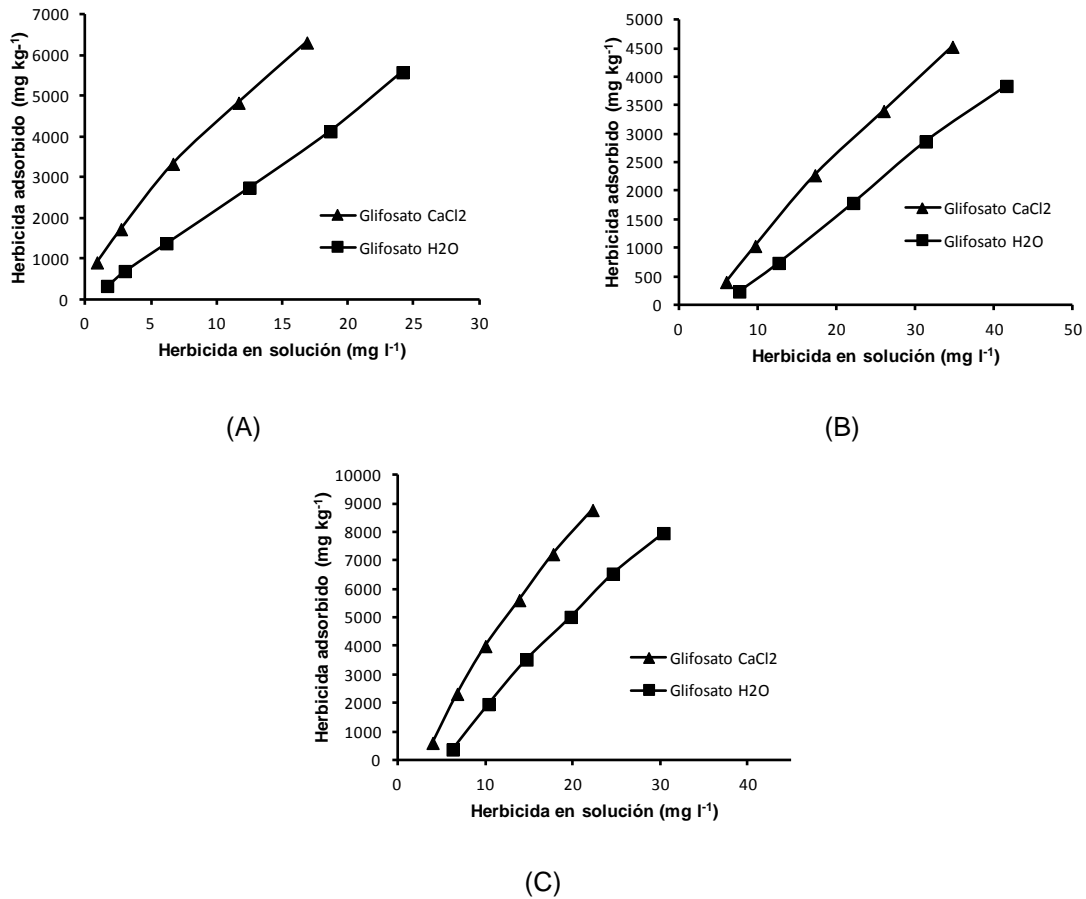
De manera convencional se requiere del uso de soluciones básicas para la extracción del glifosato del suelo. El uso de soluciones de NaOH y KOH favorecen la co-extracción de sustancias húmicas, lo que produce interferencia en el sistema cromatográfico. El presente trabajo propone el uso de una solución extractante más suave (tetraborato de sodio) con la finalidad de simplificar el procedimiento de extracción y derivatización.

La interacción del glifosato y el suelo se determinó a través de un estudio de adsorción del herbicida en muestras de suelo de textura variable, realizando isothermas de adsorción como se muestra en la Figura 18. Los experimentos se realizaron en sistemas en discontinuo, mezclando el suelo con una solución conocida del herbicida. La mezcla se agita y se determina la cantidad de glifosato no retenida por la fase sólida.

Los datos se evaluaron mediante los modelos de Freundlich y Langmuir, encontrando que los datos se ajustan mejor al modelo de Freundlich (Mamy L, 2005), definido por la siguiente expresión:

$$Q_s = K_f C_e^{1/n}$$

Donde  $Q_s$  ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) es la cantidad del herbicida adsorbido en el suelo,  $C_e$  ( $\text{mg l}^{-1}$ ) es la concentración del herbicida en solución de sobrenadante,  $K_f$  y  $n$  son constantes de la incorporación de los factores que afectan el proceso de adsorción, como la capacidad de adsorción y la intensidad de adsorción, respectivamente. Los valores de  $K_f$  y  $n$  se obtienen a partir de la intersección y la pendiente de la gráfica trazada entre  $\log Q_s$  contra  $\log C_e$ . Este modelo representa una adsorción física, por lo que la extracción se puede realizar utilizando soluciones extractantes poco agresivas.



**Figura 18.** Representación de Isotermas de Freundlich en diferentes concentraciones de suelos: (A) arenoso; (B) arcilloso; (C) franco arenoso.

La Tabla 18 muestra los valores calculados de las constantes del modelo. El valor de  $n$  (0.52-0.97) se encuentra entre 0 y 1, lo que indica una adsorción favorable de acuerdo al modelo de Freundlich. Los valores encontrados del coeficiente de adsorción  $K_f$  ( $l\text{ kg}^{-1}$ ) (Tabla 18) son consistentes con otros valores reportados en la literatura (Mamy L, 2005).

La presencia de  $\text{CaCl}_2$  en solución aumenta la adsorción de glifosato en comparación con el glifosato en agua desionizada, debido a la formación en solución de un complejo de Ca-glifosato (Scalla R, 1991).

**Tabla 18.** Coeficientes de adsorción de glifosato en los suelos arenoso y arcilloso tras el ajuste a la ecuación de Freundlich.

	Suelo		
	Arcilla	Arena	Franco arenoso
<b>Glifosato CaCl<sub>2</sub></b>			
K <sub>f</sub>	19.1	4.85	5.46
n	0.97	0.74	0.53
r <sup>2</sup>	0.99	0.96	0.98
<b>Glifosato H<sub>2</sub>O</b>			
K <sub>f</sub>	10.2	3.27	4.12
n	0.68	0.59	0.52
r <sup>2</sup>	0.99	0.96	0.98

#### 4.5.1 Validación del sistema de extracción y análisis

Debido a que la reacción de derivatización tiene lugar en medio de boratos se decidió evaluar esta misma disolución como extractante en los suelos. Las recuperaciones obtenidas en muestras fortificadas con el herbicida glifosato a tres niveles de concentración con tres repeticiones para cada nivel se muestran en la Tabla 19 junto con la desviación estándar relativa (DER).

Las recuperaciones promedio obtenidas para glifosato están en un intervalo de  $83.1 \pm 1.2\%$  a  $96.7 \pm 1.3\%$ , los cuales resultan apropiados para el análisis de trazas. El % DER es menor al 5% en todos los casos lo que habla de la precisión adecuada del método. Cabe resaltar que la muestra de suelo franco arenoso es la utilizada para la evaluación de la degradación del herbicida, por lo que los métodos de extracción y análisis son aplicables al análisis de esta muestra de interés.

El uso de esta disolución permite minimizar la co-extracción de algunos interferentes como las sustancias húmicas, minimizando la limpieza de la muestra por intercambio iónico.

**Tabla 19.** Recuperaciones de glifosato y % DER (n=3) en muestras de suelo fortificadas.

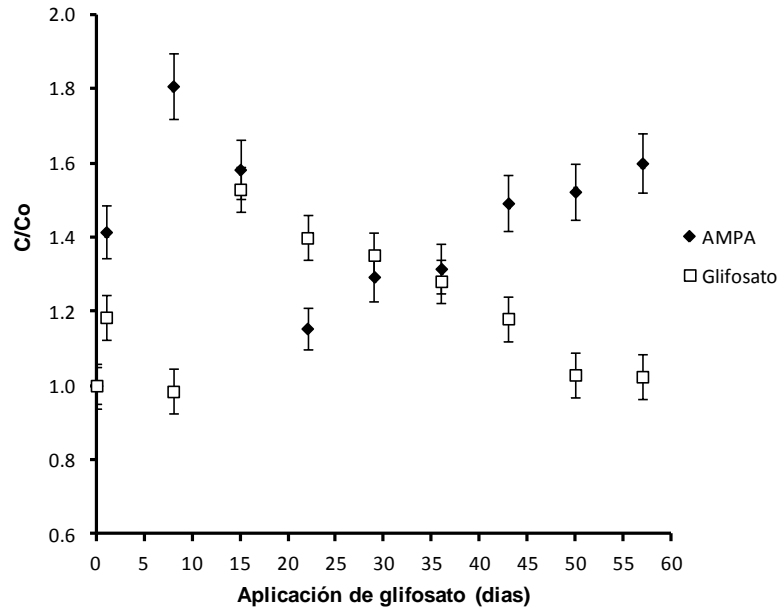
Suelo	Añadido [mg kg <sup>-1</sup> ]	Encontrado [mg kg <sup>-1</sup> ]			% Recuperación	DER %
Arcilloso	100	84.3	83.1	81.9	83.1	1.2
	150	127.6	124.5	128.2	84.5	1.3
	200	175.6	170.2	173.2	86.5	1.4
Arenoso	100	87.3	88.4	89.1	88.3	0.9
	150	134.8	131.2	132.4	88.5	1.2
	200	174.4	179.2	179.8	88.9	1.5
Franco arenoso	100	92.6	94.5	93.3	93.5	0.8
	150	143.2	139.6	144.9	95.1	1.7
	200	191.3	196.6	192.5	96.7	1.3

#### 4.6 Estudio de degradación

La metodología propuesta se aplicó en la determinación de glifosato y AMPA en un suelo proveniente de un cultivo de maíz rociado con herbicida. Cada una de las muestras se determinó por triplicado. El estudio de degradación de glifosato fue desarrollado durante 57 días en un suelo de cultivo de maíz, las muestras fueron tomadas semanalmente, extraídas, derivatizadas e inyectadas en el sistema cromatográfico.

En la Figura 19 se encuentran representados los residuos de glifosato y AMPA extraídos durante los meses junio-julio 2012. Las concentraciones iniciales de glifosato y AMPA fueron 497 y 40 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente. De manera inicial se observa un aumento y disminución de la concentración durante las tres primeras semanas, relacionadas con la aplicación y la irrigación por inmersión con aguas residuales de la zona de cultivo.

A partir del día 21 se observa un aumento en la concentración de AMPA y una tendencia inversa para el caso del glifosato. Este comportamiento es característico de sistemas de degradación. La concentración elevada de los analitos puede relacionarse con una aplicación excesiva del herbicida.



**Figura 19.** Degradación de glifosato y AMPA. El término  $C/C_0$  se refiere a la relación de la concentración entre la concentración inicial.

El principal mecanismo de degradación del glifosato es la transformación microbiana, generando intermediados fugaces como AMPA, sarcosina y formaldehído, que difieren en su solubilidad en agua y su reactividad con los constituyentes del suelo (Accinelli C.C, 2004; Rueppel M.L, 1977). La heterogeneidad del campo, la aplicación del herbicida y el riego utilizando aguas residuales, hace difícil obtener una conclusión clara del comportamiento de glifosato en condiciones reales.



*CONCLUSIONES*



## 5.- Conclusiones

---

- Se optimizaron las condiciones de derivatización para glifosato y AMPA mediante espectrofotometría utilizando como derivatizantes, ninhidrina y NQS. Los resultados obtenidos demostraron que al evaluar las condiciones de derivatización la NQS resulta adecuada, ya que este compuesto reacciona con aminas primarias y secundarias, de esta forma se ahorra tiempo en el análisis sin perder precisión, lo que hace que sea una alternativa respecto a otros agentes derivatizantes.
- Una de las principales ventajas en el uso de NQS durante la derivatización es la formación de productos de derivatización independientes que pueden ser detectados a la misma longitud de onda.
- Los métodos cromatográficos con detección espectrofotométrica y fluorimétrica, con derivatización pre-columna son una alternativa para la cuantificación de glifosato y AMPA en muestras de suelo.
- Los límites de detección alcanzados por el método de HPLC-UV son: 0.06 mg kg<sup>-1</sup> de glifosato y 0.09 mg kg<sup>-1</sup> de AMPA, para el método de HPLC-FL son: 0.012 mg kg<sup>-1</sup> de glifosato y 0.021 mg kg<sup>-1</sup> para AMPA, son factibles para el análisis de muestras reales proporcionando una mayor simplicidad y alta sensibilidad de análisis.
- Los métodos propuestos tienen como principal ventaja, que no requieren de medios básicos fuertes de extracción, tamaños de muestras grandes, procedimientos de limpieza laboriosos y etapas de pre-concentración, obteniendo límites de detección adecuados para glifosato y su metabolito.
- Una ventaja adicional de la metodología de análisis son las condiciones simples requeridas de extracción, en comparación con los métodos tradicionales en la que la co-extracción de las sustancias húmicas interfieren en la separación cromatográfica.
- La adsorción de glifosato en los suelos depende de distintas variables como el contenido de calcio en solución y la composición del suelo.

- La degradación de glifosato en suelos de cultivos reales se puede deber a una transformación microbiana donde muestra una tendencia inversa entre el contenido de glifosato y AMPA.
- La heterogeneidad de la zona de muestreo, la aplicación del herbicida de manera manual y el riego utilizando aguas residuales, hace difícil obtener una conclusión clara del comportamiento de glifosato en condiciones reales.



*REFERENCIAS*

## 6.- Referencias

---

**Accinelli, C.C;** Screpanti, C; Vicari, A; Catizone, P. 2004. Influence of insecticidal toxins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki* on the degradation of glyphosate and glufosinate-ammonium in soil samples. *Agriculture Ecosystems and Environment*. 103:497-507.

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

**Anderson, W.P.** 1996. *Weed Science: Principles*. 3rd edition. West Publishing Co, St. Paul, MN. 338

**Appleton, T.J;** Hall, J.R; McMahon, I.J. 1986. NMR-spectra of iminobis (methylenephosphonic acid),  $\text{HN}(\text{CH}_2\text{PO}_3\text{H}_2)_2$ , and related ligands and of their complex with platinum(II). *Inorganic Chemistry*. 25, 726-734.

**Araújo, A;** Monteiro, R; Abarkeli, R. 2003. Effect of glyphosate on microbial activity of two Brazilian soil. *Chemosphere*. 52, 799-804.

**Ashton, F.M;** Crafts A.S. 1981. *Mode of Action of Herbicides*. Wiley-Interscience, New York, NY. 525

**Barja, B.C;** Dos Santos Afonso, M. 2005. Aminomethylphosphonic acid and glyphosate adsorption onto goethite: a comparative study. *Environmental Science and Technology*. 39, 585-592.

**Baumann, P.A;** Dotray, P.A; Prostko, E.P. 1998. Herbicide mode of action and injury symptomology. Texas Agriculture Extension Service. The Texas University System. SCS-1998-07, 10.

**Baylis, A.D.** 2000. Why glyphosate is a global herbicide: strengths, weaknesses and prospects. *Pest Management Science*. 56, 299-308.

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

**Bhaskara, B.L;** Nagaraja, P. 2006. Direct sensitive spectrophotometric determination of glyphosate by using ninhydrin as a chromogenic reagent in formulations and environmental water samples. *Helvetica Chimica Acta*. 89, 2686-2693.

**Boerjesson, E;** Torstensson, L. 2000. New method for determination of glyphosate and (aminomethyl)phosphonic acid in water and soil, *Journal of Chromatography A*. 886, 207-216.

**Buhler, D.D.** 1998. Tillage systems and weed population dynamics and management. pp:223-246. In: J.L. Hatfield, D.D. Buhler and B.A Stewart, eds. *Integrated Weed and Soil Management*. Ann Arbor Press. Chelsea, MI.

**Carlisle, S.M;** Trevors, J.T. 1988. Glyphosate in the environmental. *Water, Air, and Soil Pollution*. 39, 409-420.

**Cesare, A;** Willian, C; Koskinen, Jeffrey, D; Seebinger, A. V: Michael I; Sadowsky. 2005. Effects of incorporated corn residues on glyphosate mineralization and sorption in soil. *Journal Agriculture Food Chemistry*. 53 (10), 4110-4117.

**CICOPLAFEST, 1998.** Catalogo oficial de plaguicidas. Comisión intersecretarial para el control del proceso y uso de plaguicidas, fertilizantes y sustancias toxicas.

**Coline, D;** Oliver, D; Annette, V; Evodie, N; Maurice, M. 2011. Optimization of extraction procedure and chromatographic separation of glyphosate, glufosinate and aminomethylphosphonic acid in soil. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 399, 1725-1732.

**Currie, L.A.** 1995. Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities (IUPAC recommendation). *Pure and Applied Chemistry*. 67, 1699-1723.

**De Jong, H;** De Jonge, L.W. 1999. Influence of pH and solution composition on the sorption of glyphosate and prochloraz to a sand loamy soil. *Chemosphere*. 39, 753-763.

**De Jonge, H;** de Jonge, L.W; Jacobsen, O.H; Yamaguchi, T; Moldrup, P. 2001. Glyphosate sorption in soils of different pH and phosphorus content. *Soil Science*. 166, 230-238.

**Della-Cioppa, G;** Christopher, B.S; Klein, B.K; Shah, D.M; Fraley, R.T; Kishore, G.M. 1986. Translocation of the precursor of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase into chloroplasts of higher plants in vitro. *The Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 83, 6873-6877.

**Dion, H.M;** Harsh, J.B; Hill, H.H. 2001. Competitive sorption between glyphosate and inorganic phosphate on clay minerals and low organic matter soils. *Journal Radioanalytical and Nuclear Chemistry*. 249, 385-390.

**Duke, S.O;** Dayan, F.E. 2001. Classification and mode of action of the herbicides. In: De Prado, R. y J. V. Jorrín (eds). *Uso de Herbicidas en la Agricultura del Siglo XXI*. Servicio de Publicaciones. Universidad de Córdoba, España. 31-44.

**Eberbach, P.L;** Douglas, L.A. 1991. Method for the determination of glyphosate and (aminomethyl)phosphonic acid in soil using electron capture gas chromatography. *Journal Agriculture Food Chemistry*. 39, 1776-1780.

**EPA Method 547**, Determination of glyphosate in drinking water by direct-aqueous-injection HPLC, post-column derivatization and fluorescence detection, Office of research and developed, US Environmental Protection Agency, Cincinnati OH, 1990.

**FOA**, Food and Agricultural Organization. 2000. Specifications and evaluations for plant protection products: glyphosate, 29.

**Franz, J.E**; Mao, M.K; Sikorski, J.A. 1997. Glyphosate, A Unique Global Herbicide, *American Chemical Society*. 653.

**Friestad, H.O**; Broenstad, J.O. 1985. Improved polarographic method for determination of glyphosate herbicide in crops, soil, and water. *Journal Association of Official Analytical Chemists*. 68, 76-79.

**Gerritse, R.G**; Beltran, J; Hernandez, F. 1996. Adsorption of atrazine, simazine, and glyphosate in soil the Gnangara Mound, Western Australia. *Australian Journal of Soil Research*. 34, 599-607.

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

**Gimsing, A.L**; Borggaard, O.K. 2001. Effect of background electrolyte on the competitive adsorption of glyphosate and phosphate onto goethite. *Clays and Clay Minerals*. 49, 70-275.

**Gimsing, A.L**; Borggaard, O.K. 2002. Competitive adsorption and desorption of glyphosate and phosphate on clay silicates and oxides. *Clays and Clay Minerals*. 37, 509-515.

**Gimsing, A.L**; Borggaard, O.K; Bang, M. 2004. Influence of soil composition on adsorption of glyphosate and phosphate by contrasting Danish surface soil. *European Journal of Soil Science*. 55, 183-191.

**Glass, R.L.** 1983. Liquid chromatographic determination of glyphosate in fortified soil and water samples. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 31, 280-282.

**Glass, R.L.** 1987. Adsorption of glyphosate by soil and clay minerals. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 35, 497-500.

**Goodwin, L;** Startin, J.R; Keely, B.J; Goodall, D.M. 2003. Analysis of glyphosate and glufosinate by capillary electrophoresis-mass spectrometry utilizing a sheathless microelectrospray interface. *Journal of Chromatography A*. 1004, 107-114.

**Guinivan, R.A;** Thompson, N.P; Wheeler, W.B. 1982. Derivatization and clean-up improvements in determination of residues of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in blueberries. *Journal Association of Official Analytical Chemists*. 65, 35-39.

**Gunsolus, J.L;** Curran, W.S. 1996. Herbicide mode of action and injury symptoms. *North Central Extension Publication*. 377. 14-22.

**Hall, G.J;** Hart, C.A; Jones, C.A. 2000. Plants as sources of cations antagonistic to glyphosate activity. *Pest Management Science*. 56, 351-358.

**Heap, I.** 2001. International Survey of Herbicide-Resistant Weeds. Classification of Herbicides by Mode of Action, (Octubre 2012) [www.weedscience.com](http://www.weedscience.com).

**Heineke, D;** Franklin, S.J; Raymond, K.N. 1994. Coordination chemistry of glyphosate. *Inorganic Chemistry*. 33, 2413-2421.

**Hernando, D;** Saurina, J; Hernández-Cassou, S. 1999. Liquid Chromatographic determination of aniline in table-top sweeteners based on pre-column derivatization with 1,2-naphthoquinone-4-sulfonate. *Journal of Chromatography A*. 859, 227-233.



**Hill, H.H.** 2001. Competitive sorption between glyphosate and inorganic phosphate on clay minerals and low organic matter soils. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*. 249, 385-390.

**Honey, R;** Senseman, S; Hons, F; Zuberer, D. 2000. Effect of glyphosate on soil microbial activity and biomass. *Weed Science*. 48, 89-93.

**Hongendoorn, E.A;** Huls, R; Dijkman, E; Hoogerbrugge, R. 2001. Microwave assisted solvent extraction and coupled-column reversed-phase liquid chromatography with UV detection. Use of an analytical restricted-access-medium column for the efficient multi-residue analysis of acidic pesticides in soils. *Journal of Chromatography A*. 938, 23-29.

**Hongendoorn, E.A;** Ossendrijver, F.M; Dijkman, E; Baumann, R.A. 1999. Rapid determination of glyphosate in cereal samples by means of pre-column derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate and coupled-column liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal Chromatography A*. 833, 67-73.

**Hornsby, A.G;** Wauchope, R.D; Herner, A.E. 1996. Pesticide properties in the environmental. *Springer-Verlag*, New York.

**labáñes, M;** Pozo, O,J; Sancho, J.V; López, F.J; Hernández, F. 2005. Residue determination of glyphosate, glufosinate and aminomethylphosphonic acid in water and soil samples by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1081, 145-155.

**Jan, M.R;** Shah, J; Muhammad, M; Ara, B. 2009. Glyphosate herbicide residue determination in samples of environmental importance using spectrophotometric method. *Journal of Hazard Material*. 169, 742-745.

**Jiang, J;** Lucy, C.A. 2007. Determination of glyphosate using off-line ion exchange preconcentration and capillary electrophoresis-laser induce fluorescence detection. *Talanta*. 72, 113-118.

**Kataoka, H;** Ryu, S; Sakiyama, N; Makita, M. 1996. Simple and rapid determination of the herbicides glyphosate and glufosinate in river water, soil and carrot samples by gas chromatography with flame photometric detection. *Journal Chromatography A*. 726, 253.258.

**Khrolenko, M.V;** Wieczorek, P.P. 2005. Determination of glyphosate and its metabolite aminomethylphosphonic acid in fruit juices using supporter-liquid membrane preconcentration method with high-performance liquid chromatography and UV derivatization with p-toluenesulphonyl chloride. *Journal of Chromatography A*. 1093, 111-117.

**Kobayashi, Y;** Kubo, H; Kinoshita, T. 1987. Fluorometric determination of guanidino compounds by new postcolumn derivatization system using reversed-phase ion-pair high-performance liquid chromatography. *Analytical Biochemistry*. 160, 392-398.

**Koger, C.H;** Henry, W.B; Shaner, D.L. 2004. Shikimate accumulation in conventional corn and soybean as affected by sub-lethal rates of glyphosate. Meeting Abstract. Presented at the swiss annual meeting. Jan. 23-30. Memphis, Tn.

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

**Kuehl, R.O.** Diseño de experimentos. Principios estadísticos de diseño y análisis de investigación. Ed. 2ª. Editorial THOMSON. 2001. 431-435.

**Kun, T;** Tao, T; Tianyu, S; Fang, W; Wang, J; Li, Y.C. 2009. Residue determination of glyphosate in environmental water samples with high-performance liquid chromatography and UV detection after derivatization with 4-chloro-3,5-dinitrobenzotrifluoride. *Analytical Chimica Acta*. 635, 222-226.

**Lundgren, L.N.** 1986. A new method for the determination of glyphosate and (aminomethyl)phosphonic residues in soils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 34. 535-538.

**Mamy, L;** Barriuso, E. 2005. Glyphosate adsorption in soil compared to herbicides replaced with the introduction of glyphosate resistant crops. *Chemosphere*. 61, 844-855.

**Massart, D.L;** Vandeginste, B.G.M; Buydens, L.M.C; Jong, S.D; Lewi, P.J; Smeyers-Verbeke, J. 1997. Handbook of chemometrics and qualimetrics, Part A. Amsterdam: Elsevier.

**McConnell, J.S;** Hossner, L.R. 1985. pH dependent adsorption isotherms of glyphosate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 33, 1075-1078.

**Mensink, H;** Janssen, P. 1994. Glyphosate. International programme on chemical safety. *Environmental Health Criteria*. 159-162.

**Meras, I.D;** Días, T.G; Franco, M.A. 2005 Simultaneous fluorimetric determination of glyphosate and its metabolite, aminomethylphosphonic acid, in water, previous derivatization with NBD-Cl and by partial least squares calibration (PLS). *Talanta*. 65, 7-14.

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

**Miles, C.J;** Moye, H. 1988. Extraction of glyphosate herbicide from soil and clay minerals and determination of residual in soil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 36, 486-491.

**Morillo, E;** Undabeytia, C; Maqueda, C; Ramos, A. 2000. Glyphosate adsorption on soils of different characteristics: Influence of copper addition. *Chemosphere*. 40, 103-107.

**Morillo, E;** Undabeytia, T; Maqueda, C; Ramos, A. 2002. The effect of dissolved glyphosate upon the sorption of copper by three selected soil. *Chemosphere*. 47, 747-752.

**Nelson, D;** Cox, M. 2005. Principios de bioquímica. 4<sup>a</sup>.ed. S.A. Barcelona. España, OMEGA, 1119.

**Niveen, A.M;** Hanaa, M.A.W; Sameh, A. 2011. An efficient one-pot reaction for selective fluorimetric determination of cefpodoxime and its prodrug. *Talanta*. 85, 2121-2127.

**Nomura, N.S;** Hilton, H.W. 1977. The adsorption and degradation of glyphosate in five Hawaiian sugarcane soils. *Weed Research*. 17, 113-121.

**Pablo, J.P;** Atilio, A.P; Alicia, E.R. 2008. Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina. *Environmental Pollution*. 156, 61-66.

**Patsias, J;** Papadopoulou,a; Papadopoulou-Mourkidou, E. 2001. Automated trace level determination of glyphosate and aminomethyl phosphonic acid in water by on-line anion-exchange solid-phase extraction followed by cation-exchange liquid chromatography and post-column derivatization. *Journal of Chromatography A*. 932, 83-90.

**Pessagno, R.C;** Dos Santos, A.M; Torres Sanchez, R.M. 2005. N-(phosphonomethyl)glycine interactions with soils. *Journal of Argentina Chemical Society*. 93, 97-108.

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

**Peterson, D.E;** Thompson, C.R; Regehr, D.L; Al-Khatib, K. 2001. Herbicide mode of action. Kansas State University. C-715, 24

**Piccolo, A;** Celano, G. 1994. Hydrogen bonding interactions between the herbicide glyphosate and water-soluble humic substances. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 13, 1737-1741.

**Piccolo, A;** Celano, G; Conte, P. 1996. Adsorption of glyphosate by humic substance. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 44, 2442-2446.

**Prata, F;** Camponez, V; Lvorenti, A; Tornisielo, V; Borges, J. 2003. Glyphosate sorption and desorption in soil with distinct phosphorus levels. *Scientia Agricola*. 60, 175-180.

**Qian, K;** Tang, T; Shi, T; Wang, F; Li, J; -Cao, Y. 2009. Residue determination of glyphosate in environmental water samples with high-performer liquid chromatography and UV detection after derivatization with 4-chloro-3,5-dinitrobenzotrifluoride. *Analytica Chimica Acta*. 635, 222-226.

**Quinn, J.P;** Peden, J.M.M; Dick, R.E. 1988. Glyphosate tolerance and utilization by the microflora of soil treated with the herbicide. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 29, 511-516.

**Ramstedt, M;** Norgren, C; Sheals, J; Bostrom, D; Sjoberg, S; Persson, P. 2004. Thermodynamic and spectroscopic studies of cadmium(II)-N-(phosphonomethyl)glycine (PMG) complexes. *Inorganic Chimica Acta*. 357, 1185-1192.

**Robert, L.G.** 1983. Liquid chromatographic determination of glyphosate in fortified soil and water samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 31, 280-282.

**Rosenthal, S.S;** Maddox, D.M; Brunetti, K. 1984. Biological Methods of Weed Control. Thomson Publications, Fresno, CA, 88.

**Ross, M.A;** Lembi, C.A. 1985. Applied Weed Science. Burgess Publishing Co. Minneapolis, MN. 340

**Roy, D.N;** Konar, S.K. 1989. Development of an analytical method for the determination of glyphosate and (aminomethyl)phosphonic acid residues in soil by nitrogen-selective gas chromatography. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 37, 441-443

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

**Rueppel, M.L;** Brightwell, B.B; Schaefer, J; Marvel, J.T. 1977. Metabolism and degradation of glyphosate in soil and water. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 25, 517-528.

**Sahasrabuddhey, B;** Jain, A; Verma, K.K. 1999. Determination of ammonia and aliphatic amines in environmental aqueous samples utilizing pre-column derivatization to their phenylthiourea and high performance liquid chromatography. *Analyst*. 124, 1017-1021.

**Sancho, J.V;** Hadalgo, C; Hernández, F.J.; López, E.A; Hongendoorn, E.A; Dijkman. 1996. Rapid determination of residues of glyphosate and its main metabolite AMPA in soil samples by liquid chromatography. *International Journal Environmental Analytical Chemistry*. 62, 53-56.

**Saurina, J;** Hernández-Cassou, S. 1996. Chromatographic determination of amino acids by pre-column derivatization using 1,2-naphthoquinone-4-sulfonate as reagent. *Journal of Chromatography A*. 740, 21-30.

**Scalla, R;** Gauvrit, C. 1991. Mecanismos d'acción fitotoxíques des autres familles d'herbicides. In Scalla. R (Ed), Les herbicides. Mode D'Action. Et Principes D'Utilisation INRA, 115-191.

**Schuette, J.** 1998. Environmental fate of glyphosate. Environmental Monitoring and Pest Management. Sacramento, CA, Department of pesticide regulation, 95824-5624.

**Schuster, R;** Gratzfeld-Husgen, A. 1992. Application Note No. 12-5091-3621E, Hewlett Packard, Avondale.

**Seiber, J.N;** McChesney, M.M; Kon, R; Leavitt, J. 1984. Analysis of glyphosate residues in kiwi fruit and asparagus using high-performance liquid chromatography of derivatized glyphosate as a cleanup step. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 32, 678-681.

**Sheals, J;** Sjoberg, S; Persson, P. 2002. Adsorption of glyphosate on goethite: molecular characterization of surface complexes. *Environmental Science and Technology*. 36, 3009-3095.

**Span, K.P;** Hargreaves, P.A. 1994. The determination of glyphosate in soils with moderate to high clay content. *Pesticide Science*. 40, 41-48.

**Sprankle, P;** Meggtt, W; Penner, D. 1975. Absorption, mobility and microbial degradation of glyphosate in soil. *Weed Science Lawrence*. 23, 229-234.

**Subbramanian, V;** Hoggard, P.E. 1988. Metal complex of glyphosate. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 36, 1326-1329.

**Sun, Y;** wang, C; Wen, Q; Wang, G; Wang, H. 2010. Determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in water by LC a new labeling reagent, 4-methoxybenzenesulfonyl fluoride. *Chromatographia*. 72, 679-686.

**Sundaram, K.M.S;** Curry, J. 1997. A comparison of UV and fluorescence detectors in the liquid chromatographic analysis of glyphosate deposits after post-column derivatization. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*. 20, 511-524.

**Thompson, D.G;** Cowell, J.E; Daniels, R.J; Staznik, B; MacDonald, L.M. 1989. Liquid chromatographic method for quantitation of glyphosate and metabolite residues in organic and mineral soil, stream sediments, and hardwood foliage. *Journal Association of Official Analytical Chemists*. 72, 355-360.

**Torstensson, L.** 1985. Behavior of glyphosate in soil and its degradation. En: The herbicide glyphosate (Grossbard E; Atkinson D., eds). London, Butterworth 137-149.

**Tsuji, M.T;** Akiyama, Y; Yano, M. 1997. Simultaneous determination of glufosinate and glyphosate in crops. *Analytical Sciences*. 13, 283-288.

**Tsuji, M.T;** Wang, W; Chu, L.M. 2005. Influence of glyphosate and its formulation (Roundup) on the toxicity and bioavailability of metals to ceriodaphnia dubia. *Environmental Pollution*. 138, 59-68.

**Tuinstra, L.G.M.Th;** Kienhuis, P.G.M. 1987. Automated two-dimensional HPLC residue procedure for glyphosate on cereals, soil and vegetables with postcolumn fluoregenic labelling. *Chromatographia*. 24, 696-700.

**USDA. 1984.** Forest Service. Pesticide background statements. In USDA: Agriculture Handbook No 633. Vol 1. Herbicide. Part 2. 61-672.

**Volke, S.T;** Velasco, T.J. 2002. Tecnologías de restauración para suelos contaminados., Instituto Nacional de Ecología (INE-SEMARNAT).



**Waiman, C.V;** Avena, M.J; Garrido, M, Band, B.F; Zanini, G.P. 2012. A simple and rapid spectrophotometric methods to quantify the herbicide glyphosate in aqueous media. Application to adsorption isotherms on soil and goethite. *Geoderma*. 170, 154-158.

**Wang, Y.J;** Zhou, D.M; Sun, R.J. 2005. Effects of phosphate on the adsorption of glyphosate on three different types of Chinese soils. *Journal of Environmental Sciences*. 17, 711-715.

**WHO. 1994.** Glyphosate. IPCS international programme on chemical safety, Environmental Health Criteria, 159-177.

**William, G.M;** Kroes, R; Munro, I.C. 2000. Safety evaluation and risk assessment of herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 31, 117-165.

**You, J;** Koropchak, J.A. 2003. Condensation nucleating light scattering detection with ion chromatography for direct determination of glyphosate and its metabolite in water. *Journal of Chromatography A*. 989, 231-238.

**Zhou, L;** Luo, Z; Wang, S; Hui, Y; Hu, Z; Chen, X. 2007. In-capillary derivatization and laser-induced fluorescence detection for the analysis of organophosphorus pesticides by micellar electrokinetic chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1149, 377-384.