

**IMPLEMENTACIÓN DE UNA METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE  
GLIFOSATO EN MUESTRAS DE AGUA**

**MÓNICA ALEJANDRA HERRERA AGUDELO**



**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE QUÍMICA  
BUCARAMANGA**

**2011**

**IMPLEMENTACIÓN DE UNA METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE  
GLIFOSATO EN MUESTRAS DE AGUA**

**MÓNICA ALEJANDRA HERRERA AGUDELO**

**Trabajo de grado presentado como requisito  
parcial para optar al título de Químico(a)**

**Directores:**

**ELENA STASHENKO, Química, Ph.D.**

**JAIRO RENÉ MARTÍNEZ MORALES, Químico, Ph.D.**



**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE QUÍMICA  
BUCARAMANGA**

**2011**

*DEDICATORIA*

*“Al ser más especial y amoroso, la razón de muchos de mis esfuerzos, que ha colmado mi vida de alegrías y bendiciones, mi mami **Aminta**. A las personas más importantes y que amo con todo mi corazón mi papá **Eduardo**, mis hermanos **Johana**, **Bibiana** y **William**, mis hermosos sobrinos, **Juan Sebastián** y **Mateo** y a la persona que en este poco tiempo a logrado compartir muchos momentos importantes de mi vida, **Daniel Alejandro**”.*

*Mónica Alejandra*

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por guiar mi camino y darme las fuerzas necesarias para lograr los objetivos que me propuse.

A mi mami quien con su incondicional apoyo y esfuerzo, me ha impulsado durante toda mi vida; igualmente a mi papá y mis hermanos, quienes me han brindado lo necesario para alcanzar las metas propuestas. Por sus orientaciones y por depositar su confianza en mí.

A los Doctores Elena Stashenko y Jairo René Martínez por la oportunidad de trabajar junto a ellos, por su constancia y disposición para educar y sus numerosas e inspiradoras enseñanzas.

Al Laboratorio de Cromatografía, adscrito al Centro de Investigación en Biomoléculas, CIBIMOL, que suministró el soporte financiero para la realización del proyecto.

A los estudiantes de doctorado del laboratorio de cromatografía, Deyanira y William, por sus observaciones y colaboración, siempre dispuestos a compartir sus experiencias y conocimientos.

A Daniel, por su compañía y apoyo en una de las etapas más importantes de mi vida, además por ser mi complemento y ayudante de mis locuras.

A mis amigos, Katherine, Alexandra, Andrés, Mónica, Alejo y Víctor, por todos los momentos compartidos durante toda la carrera, por las mil y una locuras realizadas, por la amistad incondicional en las circunstancias difíciles, por sus frases de aliento y principalmente porque juntos logramos nuestro objetivo.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>1</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>21</b>
<b>2</b>	<b>ESTADO DEL ARTE</b>	<b>25</b>
2.1	PLAGUICIDAS	25
2.2	HERBICIDAS	26
2.3	GLIFOSATO	27
2.3.1	Generalidades	27
2.3.2	Modo de acción en plantas	28
2.3.3	Modo de acción en agua y suelos	29
2.3.4	Toxicidad	32
2.3.5	Legislación sobre la presencia de glifosato en el ambiente	33
2.3.6	Formulaciones comerciales de glifosato	35
2.3.7	Uso de glifosato en Colombia	36
2.4	DETERMINACIÓN DE GLIFOSATO EN MUESTRAS DE AGUA	38
2.4.1	Técnicas de preparación de muestras	38
2.4.1.1	Extracción líquido-líquido (ELL)	39
2.4.1.2	Membranas líquidas	40
2.4.1.3	Extracción en fase sólida	41
2.4.2	Técnicas analíticas usadas para la determinación de glifosato	46
2.4.2.1	Electroforesis capilar (CE)	46
2.4.2.2	Técnicas de inmunoensayo	47
2.4.2.3	Cromatografía iónica (IC)	48
2.4.2.4	Cromatografía líquida de alta eficiencia	48
2.4.2.5	Cromatografía de gases	50
<b>3</b>	<b>ANTECEDENTES</b>	<b>54</b>
3.1	CIENCIOMETRÍA	54
3.1.1	Publicaciones por años, países y áreas de estudio.	54
3.1.2	Patentes	58

<b>4</b>	<b>DESARROLLO EXPERIMENTAL</b>	<b>59</b>
4.1	MATERIALES Y REACTIVOS	59
4.1.1	Reactivos y solventes	59
4.1.2	Material de referencia certificado	60
4.1.3	Material de laboratorio	60
4.2	MUESTRAS DE AGUA	61
4.3	ESTANDARIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA TÉCNICA DE DERIVACIÓN DE GLIFOSATO.	61
4.3.1	Determinación de las condiciones de derivatización.	61
4.3.2	Formación de los productos fluoroacetilados y fluoroetilesterificados	62
4.3.3	Caracterización del derivado.	63
4.3.4	Determinación de la estabilidad de los derivados.	64
4.4	SELECCIÓN DEL SISTEMA DE DETECCIÓN CROMATOGRÁFICO PARA EL ANÁLISIS DE GLIFOSATO Y AMPA EN FORMA DE DERIVADO FLUOROACETILADO Y FLUOROETILESTERIFICADO	64
4.4.1	Sistema de detección GC/ $\mu$ -ECD.	64
4.5	ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA GC/ $\mu$ -ECD.	66
4.5.1	Estandarización externa usando curva de calibración en dos niveles de concentración.	66
4.5.2	Determinación de las figuras analíticas de mérito	66
4.5.2.1	Determinación de la reproducibilidad del proceso de derivación y de los tiempos de retención de cada uno de los derivados	66
4.5.2.2	Evaluación de la repetibilidad del método para tiempos de retención ( $t_R$ ) y áreas	67
4.5.2.3	Evaluación del rango dinámico lineal (RDL), la linealidad y la sensibilidad del método cromatográfico	67
4.5.2.4	Determinación de los límites de detección y de cuantificación.	67
4.5.2.5	Evaluación de la exactitud del método	68
4.5.2.6	Evaluación de la eficiencia del método	68

4.6	DETERMINACIÓN DE LAS MEJORES CONDICIONES DE EXTRACCIÓN SIMULTÁNEA DE GLIFOSATO Y AMPA	68
4.6.1	Evaluación del solvente de extracción	68
4.6.2	Diseño experimental	69
4.6.3	Procedimiento de extracción	71
4.7	APLICACIÓN DEL ANÁLISIS A MUESTRAS DE AGUA SUPERFICIAL DE LA LOCALIDAD	71
4.7.1	Determinación	72
4.7.2	Cuantificación	72
<b>5</b>	<b>ANÁLISIS DE RESULTADOS</b>	<b>73</b>
5.1	ESTANDARIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA TÉCNICA DE DERIVACIÓN DE GLIFOSATO	73
5.1.1	Determinación de las condiciones de derivatización	73
5.1.2	Caracterización por espectroscopía de infrarrojo de los derivados obtenidos del glifosato.	77
5.1.2.1	Derivado trifluoroesterificado-acetilado	79
5.1.3	Caracterización por espectrometría de masas del derivado obtenido	80
5.1.4	Estabilidad de los derivados	83
5.2	IMPLEMENTACIÓN DE LA METODOLOGÍA DE ANÁLISIS POR GC/ $\mu$ -ECD	84
5.2.1	Determinación de las figuras analíticas de mérito	84
5.2.1.1	Determinación de la reproducibilidad en el proceso de derivación y los tiempos de retención de cada uno de los derivados	84
5.2.1.2	Evaluación de la repetibilidad del método para los tiempos de retención y áreas cromatográficas.	86
5.2.1.3	Evaluación de la linealidad y sensibilidad del método	88
5.2.1.4	Determinación de los niveles de detección (NMD) y cuantificación (NMC)	89
5.3	DETERMINACIÓN DE LAS MEJORES CONDICIONES DE EXTRACCIÓN SIMULTÁNEA DE GLIFOSATO Y AMPA	90

5.3.1	Evaluación del solvente de extracción	90
5.3.2	Diseño experimental	91
5.3.2.1	Análisis de la varianza	91
5.3.2.2	Mejores condiciones de extracción	93
5.4	ANÁLISIS DE MUESTRAS DE AGUA SUPERFICIAL	95
5.4.1	Evaluación de la eficiencia del método	97
<b>6</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>98</b>
<b>7</b>	<b>RECOMENDACIONES</b>	<b>100</b>
<b>8</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>101</b>
<b>9</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>109</b>

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Límites permisibles de glifosato por algunas organizaciones mundiales [2,33].	34
<b>Tabla 2.</b> Comportamiento de los cultivos de coca y amapola desde 2000 al 2004, hectáreas asperjadas y cantidad de <i>Round-up® Ultra</i> utilizado [3,4].	38
<b>Tabla 3.</b> Características de la resina <i>Amberlite IRA-900</i> [42].	46
<b>Tabla 4.</b> Especificaciones del material de referencia certificado.	60
<b>Tabla 5.</b> Variables para la reacción simultánea de fluoroacetilación y fluoroetilesterificación.	62
<b>Tabla 6.</b> Parámetros cromatográficos empleados para el análisis de los pesticidas por GC/ $\mu$ -ECD.	65
<b>Tabla 7.</b> Variables y niveles del diseño experimental factorial $2^3$ , empleados.	70
<b>Tabla 8.</b> Experimentos realizados para las dos variables del diseño factorial.	70
<b>Tabla 9.</b> Bandas de absorción en el espectro IR del glifosato [73].	78
<b>Tabla 10.</b> Tiempos de retención de los derivados AMPA y glifosato analizados, obtenidos por GC/ $\mu$ -ECD, en una columna DB-5 (30 m x 0,25mm (di) x 0,25 $\mu$ m), y evaluación de su reproducibilidad.	85
<b>Tabla 11.</b> Áreas cromatográficas de los derivados AMPA y glifosato analizados por GC/ $\mu$ -ECD, en una columna DB-5 (30 m x 0,25mm (di) x 0,25 $\mu$ m), y evaluación de su reproducibilidad.	86
<b>Tabla 12.</b> Repetibilidad de los tiempos de retención en el método desarrollado por GC/ $\mu$ -ECD para los derivados trifluoroesterificados-acetilados.	87
<b>Tabla 13.</b> Repetibilidad de las áreas en el método desarrollado por GC/ $\mu$ -ECD para los derivados trifluoroesterificados-acetilados.	87
<b>Tabla 14.</b> Linealidad y sensibilidad del método GC/ $\mu$ -ECD.	88
<b>Tabla 15.</b> Niveles mínimos de detección y cuantificación del método GC/ $\mu$ -ECD.	89
<b>Tabla 16.</b> Medida del error experimental de los pesticidas analizados, para la evaluación del diseño factorial $2^3$ .	91
<b>Tabla 17.</b> Condiciones favorables para la extracción de AMPA y de glifosato.	94

**Tabla 18.** Condiciones para la extracción de AMPA y de glifosato. 94

**Tabla 19.** Porcentaje de recuperación (%), evaluado con matrices de agua enriquecidas con el producto comercial *Round-up* y una solución *stock* de AMPA y de glifosato. 97

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Equilibrios ácido-base del glifosato con sus $pK_a$ correspondientes [10].	27
<b>Figura 2.</b> Ruta de degradación del glifosato [10].	32
<b>Figura 3.</b> Publicaciones sobre el glifosato, por año. Fuente: <i>ISI Web of Science (WOS)</i> . Período de observación: 2001-2010. Fecha de consulta: Diciembre de 2010. Palabras-clave: “ <i>glyphosate</i> ”, “ <i>water</i> ”, “ <i>soil</i> ”, “ <i>CG</i> ” y “ <i>HPLC</i> ”	55
<b>Figura 4.</b> Publicaciones sobre el glifosato por países. Fuente: <i>ISI Web of Science (WOS)</i> . Período de observación: 2001-2010. Fecha de consulta: Diciembre de 2010. Palabras-clave: “ <i>glyphosate</i> ”, “ <i>water</i> ”, “ <i>soil</i> ”, “ <i>GC</i> ” y “ <i>HPLC</i> ”.	56
<b>Figura 5.</b> Publicaciones sobre el glifosato, por áreas de investigación. Fuente: <i>ISI Web of Science (WOS)</i> . Período de observación: 2001-2010. Fecha de consulta: Diciembre de 2010. Palabras clave: “ <i>glyphosate</i> ”, “ <i>water</i> ”, “ <i>soil</i> ”, “ <i>GC</i> ” y “ <i>HPLC</i> ”.	57
<b>Figura 6.</b> Patentes sobre glifosato. Fuente: <i>Scopus</i> . Periodo de observación 1985-2010. Fecha de consulta: Diciembre de 2010. <b>Ecuación 1.</b> TITLE-ABS-KEY("glyphosate") AND TITLE-ABS-KEY("HPLC") <b>Ecuación 2.</b> TITLE-ABS-KEY("glyphosate") AND TITLE-ABS-KEY("Gas chromatography")	58
<b>Figura 7.</b> Reacción de formación del derivado fluoroacetilado -fluoroetilesterificado del glifosato.	63
<b>Figura 8.</b> Diagrama de flujo para la extracción de AMPA y glifosato.	71
<b>Figura 9.</b> Reacción de formación de los derivados fluoroacetilado y fluoroetilesterificado del glifosato y AMPA [68].	74
<b>Figura 10.</b> Estudio del efecto de la temperatura para la derivación de glifosato. Tiempo 60 min y relación molar glifosato/TFAA/TFE 1:100:100.	75
<b>Figura 11.</b> Estudio de la relación molar pesticida/agentes derivatizantes para el glifosato. Temperatura 80°C, tiempo 60 min y relación molar TFAA/TFE 1:1.	76
<b>Figura 12.</b> Espectro infrarrojo de la N-(fosfonometil)-glicina.	77

<b>Figura 13.</b> Espectro infrarrojo del derivado trifluoroesterificado-acetilado del glifosato (sintetizado con una relación molar glifosato/TFAA/TFE de 1:100:100, temperatura 80°C y tiempo 60 min).	79
<b>Figura 14.</b> Espectro de masas de derivado trifluoroesterificado acetilado del glifosato obtenido experimentalmente. Impacto de electrones, 70 eV.	81
<b>Figura 15.</b> Ruta de fragmentación propuesta para la formación de los iones $m/z$ 411, 384,140, 113 y 69, en el espectro de masas del derivado del glifosato. Impacto de electrones, 70 eV.	81
<b>Figura 16.</b> Espectro de masas del derivado trifluoroesterificado acetilado del AMPA obtenido experimentalmente. Impacto de electrones, 70 eV.	82
<b>Figura 17.</b> Ruta de fragmentación propuesta para la formación de los iones $m/z$ 302, 246,126 y 69, en el espectro de masas del derivado del AMPA. Impacto de electrones, 70 eV.	83
<b>Figura 18.</b> Estabilidad de los derivados glifosato y AMPA durante su almacenamiento (Temperatura 4°C, protegido de la luz, solvente acetato de etilo).	84
<b>Figura 19.</b> Cromatograma de los derivados trifluoroesterificados-acetilados de glifosato y AMPA analizados, obtenido por GC/ $\mu$ -ECD en una columna DB-5 (30 m x 0,25mm (di) x 0,25 $\mu$ m). Inyección: <i>splitless</i> . Volumen: 1 $\mu$ L.	85
<b>Figura 20.</b> Efecto del solvente de elución en el proceso de extracción SPE de intercambio iónico.	90
<b>Figura 21.</b> Diagramas de Pareto de efectos para el AMPA y glifosato.	92
<b>Figura 22.</b> Efectos principales y de interacción de cada uno de los factores, en el proceso de extracción del glifosato.	93
<b>Figura 23.</b> Perfiles cromatográficos comparados con el patrón de AMPA y de glifosato derivados, obtenidos por GC/ $\mu$ -ECD de las muestras procedentes de: <b>A.</b> Quebrada de Berlín y <b>B.</b> Nacimiento de San Vicente de Chucurí.	96

## LISTA DE ANEXOS

<b>ANEXO 1.</b> Clasificación de los herbicidas	116
<b>ANEXO 2.</b> Principales propiedades físico-químicas del herbicida glifosato	117
<b>ANEXO 3.</b> Mecanismo de inhibición de la vía del shikimato por el glifosato [25].25	118
<b>ANEXO 4.</b> Presentaciones comerciales de glifosato en Colombia [17].	119
<b>ANEXO 5.</b> Curvas de calibración para los derivados trifluoroesterificados-acetilados de AMPA y glifosato analizados, siguiendo la metodología GC/ $\mu$ -ECD.	120
<b>ANEXO 6.</b> Resultados, obtenidos por el <i>software</i> estadístico <i>Statgraphics Centurion XVI</i> , de los efectos de diferentes parámetros y sus interacciones, para la extracción por SPE de intercambio iónico de AMPA y del glifosato.	121
<b>ANEXO 7.</b> Efectos principales y de interacción de cada uno de los factores, en el proceso de extracción del AMPA.	121

## ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

<b>μECD</b>	<i>Micro-Electron Capture Detector</i> (Micro-detector de captura de electrones).
<b>AMPA</b>	<i>Aminomethylphosphonic Acid</i> (Ácido aminometilfosfónico)
<b>ANEOS</b>	Alquilaminas etoxiladas
<b>ANOVA</b>	<i>Analysis of Variance</i> (Análisis de la varianza)
<b>BIAL</b>	<i>Bialophos</i> (Bialafos)
<b>CAS</b>	<i>Chemical Abstracts Registry</i>
<b>CE</b>	<i>European Community</i> (Comunidad Europea)
<b>CE</b>	<i>Capillary Electrophoresis</i> (Electroforesis capilar)
<b>CNBF</b>	<i>4-Chloro-3,5-dinitrobenzotrifluoride</i> (4-Cloro-3,5-dinitrobenzotrifluoruro)
<b>DL<sub>50</sub></b>	<i>Mean Lethal Dose</i> (Dosis letal media)
<b>DNP</b>	<i>1-Fluoro-2,4-dinitrobenzene</i> (1-Fluoro-2,4-dinitrobenzeno)
<b>DNE</b>	Dirección Nacional de Estupefacientes
<b>DTAF</b>	5-(4,6-Diclorotriazinilamino) fluoresceína
<b>E</b>	Eficiencia de extracción
<b>e.g.</b>	<i>Exempli gracia</i> (Por ejemplo)
<b>ECD</b>	<i>Electron Capture Detector</i> (Detector de captura de electrones)
<b>EI</b>	<i>Electron impact</i> (Impacto de electrones)
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> (Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas)
<b>ELLB</b>	Extracción líquido-líquido por lotes
<b>ELLC</b>	Extracción líquido-líquido en continuo
<b>EPA</b>	<i>Environmental Protection Agency</i> (Agencia de Protección del Medio Ambiente)
<b>EPO</b>	<i>European Patent Office</i> (Oficina de Patentes de Europa)
<b>EPSPS</b>	<i>5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase</i> (5-Enolpiruvil shikimato 3-fosfato sintetasa)
<b>EQGs</b>	<i>Canadian Environmental Quality Guidelines</i> (Guía de la Calidad Ambiental Canadiense)
<b>eV</b>	Elentrón-voltios
<b>F</b>	Factor de concentración

<b>FAO</b>	<i>The Food and Agriculture Organization of the United Nations</i> (Organización de Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación)
<b>FMOC-CI</b>	<i>9-Fluorenylmethylchloroformate</i> (9-Fluorenilmetil cloroformato)
<b>GC</b>	<i>Gas Chromatography</i> (Cromatografía de gases)
<b>GC-ECD</b>	<i>Gas Chromatography-Electron Capture Detector</i> (Cromatografía de gases con detector de captura de electrones)
<b>GC-MS</b>	<i>Gas Chromatography- Mass Spectrometry</i> (Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas)
<b>GLUF</b>	<i>Glufosinate</i> (Glufosinato)
<b>GPS</b>	<i>Glyphosate</i> (Glifosato)
<b>HFB</b>	<i>2,2,3,3,4,4,4-Heptafluoro-1-butanol</i> (2,2,3,3,4,4,4-Heptaflúor-1-butanol)
<b>HFBA</b>	Anhídrido Heptaflúorbutírico
<b>HPLC</b>	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografía líquida de alta eficiencia)
<b>IC</b>	<i>Ion chromatography</i> (Cromatografía iónica)
<b>ICA</b>	Instituto Colombiano Agropecuario
<b>IDA</b>	Ingesta diaria admisible
<b>JPO</b>	<i>Japanese Patent Office</i> (Oficina de Patentes de Japón)
<b>K<sub>oc</sub></b>	<i>Adsorption Coefficient</i> (Coeficiente de adsorción)
<b>K<sub>ow</sub></b>	<i>Octanol-Water Partition Coefficient</i> (Coeficiente de partición octanol-agua)
<b>K<sub>p</sub></b>	<i>Partition Coefficient</i> (Coeficiente de partición)
<b>LIF</b>	Detector de fluorescencia inducida por láser
<b>LLE</b>	<i>Liquid-Liquid Extraction</i> (Extracción líquido-líquido)
<b>m/z</b>	Relación masa sobre carga
<b>M<sup>+</sup></b>	Ion molecular
<b>MBTFA</b>	<i>N-Methyl-bis(trifluoroacetamide)</i> (N-Metil-bis(trifluoroacetamida))
<b>MCL</b>	<i>Maximum Contaminant Level</i> (Nivel Máximo de Contaminante)
<b>MERC</b>	<i>2-Mercaptoethanol</i> (2-Mercaptoetanol)
<b>MSD</b>	<i>Mass Selective Detector</i> (Detector selectivo de masas)
<b>NBD-CI</b>	<i>4-Chloro-7-nitrobenzofurazan</i> (4-Cloro-7-nitrobenzofurazan)
<b>NMC</b>	Nivel mínimo de cuantificación
<b>NMD</b>	Nivel mínimo de detección

<b>ODS</b>	<i>Octadecylsilyl</i> (Octadecilsiloxano)
<b>OMS</b>	<i>World Health Organization</i> (Organización Mundial de la Salud)
<b>OPA</b>	<i>o-Phthalaldehyde</i> (o-Ftalaldehído)
<b>OPA-MERC</b>	<i>o-Phthalaldehyde-mercaptoethanol</i> (o-Ftalaldehído 2-mercaptoetanol)
<b>PEP</b>	<i>Phosphoenolpyruvate</i> (Fosfoenolpiruvato)
<b>PH</b>	<i>Phenyl</i> (Fenil)
<b>PM</b>	Peso molecular
<b>POEA</b>	<i>Polyethoxylated Tallow Amine</i> (Polioxietilamina)
<b>ppb</b>	Partes por billón
<b>R<sup>2</sup></b>	Coeficiente de determinación
<b>RDL</b>	Rango dinámico lineal
<b>S</b>	Desviación estándar
<b>S3P</b>	<i>Shikimate-3-phosphate</i> (Shikimato-3-fosfato)
<b>Sb</b>	Desviación estándar de la pendiente de la recta
<b>SDB</b>	<i>Styrenedivinybenzene</i> (Estirenodivinilbenceno)
<b>SIM</b>	<i>Selective Ion Monitoring</i> (Monitoreo de ion seleccionado)
<b>SPE</b>	<i>Solid-Phase Microextraction</i> (Extracción en fase sólida)
<b>S<sub>y/x</sub></b>	Desviación estándar de la recta
<b>TFAA</b>	<i>Trifluoroacetic anhydride</i> (Anhídrido trifluoroacético)
<b>TFE</b>	<i>Trifluoroethanol</i> (Trifluoroetanol)
<b>TsCl</b>	<i>p-Toluenesulphonyl chloride</i> (Cloruro de <i>p</i> -toluenosulfonilo)
<b>UKPO</b>	<i>UK Patent Office</i> (Oficina de Patentes del Reino Unido)
<b>USPTO</b>	<i>US Patent Office</i> (Oficina de patentes de Estados Unidos)
<b>UV-Vis</b>	Ultravioleta –Visible
<b>WIPO</b>	<i>World Intellectual Property Organization</i> (Organización Mundial de la Propiedad Intelectual)
<b>WOS</b>	<i>ISI Web of Science</i>

## RESUMEN

### TÍTULO: IMPLEMENTACIÓN DE UNA METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE GLIFOSATO EN MUESTRAS DE AGUA\*

**Autor:** HERRERA AGUDELO, Mónica Alejandra \*\*

**Palabras claves:** análisis de agua, glifosato, ácido aminometilfosfónico, derivatización, GC/ $\mu$ -ECD.

El glifosato [N-(fosfonometil)glicina], uno de los pesticidas más frecuentemente usados en el mundo; es un herbicida no selectivo, post-emergente, sistémico y de amplio espectro, el cual se une rápida y fuertemente a la materia orgánica al entrar en contacto con el suelo y a las partículas en los sedimentos acuáticos. Debido a su amplio uso y al impacto sobre el medio ambiente, es necesario controlar los residuos de este compuesto y su principal metabolito, el ácido aminometilfosfónico (AMPA); para ello se han desarrollado técnicas, ya sean de tipo exploratorio como la técnica de inmunoensayo, o para identificar y cuantificar, como los métodos cromatográficos acoplados a detectores selectivos.

En el presente trabajo se implementó una técnica para la determinación por GC/ $\mu$ -ECD del glifosato y del AMPA, a través de la derivación con anhídrido trifluoroacético y trifluoroetanol. Para la técnica se determinaron las figuras de mérito, alcanzándose niveles mínimos de detección (NMD) y de cuantificación (NMC) por debajo del nivel máximo de contaminante (MCL) establecidos por la Agencia de Protección del Medio Ambiente (EPA).

Adicionalmente, se estudió la recuperación de los analitos en muestras de agua mediante extracción en fase sólida (SPE) de intercambio iónico; para ello se diseñó un experimento factorial que involucró los principales factores, siendo la concentración del ácido clorhídrico y el volumen de elución las variables de mayor incidencia sobre la eficiencia.

La técnica se aplicó a muestras de agua de la quebrada de Berlín y el nacimiento de San Vicente de Chucurí, para evaluar la existencia de los analitos. Según los resultados, no hay presencia de los plaguicidas estudiados por encima del NMD del sistema empleado GC/ $\mu$ -ECD. Los resultados de este trabajo pretenden ser una base para futuras investigaciones y programas de control de los analitos en muestras de agua, frutos y suelos.

---

\*Proyecto de grado

\*\*Facultad de Ciencias, Escuela de Química, Directores: Dra. Elena E. Stashenko y Dr. Jairo R. Martínez.

## ABSTRACT

### TITLE: IMPLEMENTATION OF A METHODOLOGY FOR THE DETERMINATION OF GLYPHOSATE IN WATER\*

**Author:** HERRERA AGUDELO, Mónica Alejandra \*\*

**Key words:** Water analysis, Glyphosate, Aminomethylphosphonic acid, derivatization, GC /  $\mu$ -ECD.

Glyphosate [N-(phosphonomethyl)glycine], one of the most frequently used pesticides in the world, is a nonselective, postemergence, systemic and broad spectrum herbicide, which binds rapidly and tightly to organic matter to enter contact with soil and sediment particles in water. Because of its widespread use and impact on the environment, it is necessary to control residues of this compound and its major metabolite, aminomethyl) phosphonic acid (AMPA) for it has developed techniques, whether exploratory as immunoassay, or to identify and quantify, such as chromatographic methods coupled with selective detectors.

In this work implemented a technique for the determination by GC /  $\mu$ -ECD for glyphosate and AMPA, through the derivation with trifluoroacetic anhydride and trifluoroethanol. The method was validated and demonstrated to be reliable and linear in the concentration range of interest. For the technique were determined figures of merit, the reaching minimum levels of detection (LODs) and quantification (LOQs) below the maximum contaminant level (MCL) set by the Environmental Protection Agency (EPA).

Additionally, the recovery of the analitos was studied in samples of water by solid phase extraction (SPE) of ionic exchange; for it was designed it a factorial experiment that involved the main factors, the concentration of hydrochloric acid and the elution volume variables greater impact on efficiency. The technique was applied to samples of water from Berlin and San Vicente de Chucuri, to evaluate the existence of the analytes. The results indicated no presence of the pesticides studied over NMD system employed GC/ $\mu$ -ECD.

The results of this work pretend to be a base for future investigations and programs to monitoring glyphosate and AMPA in water, fruits, and soils samples.

---

\*Thesis

\*\*Science Faculty, Chemistry School, Directors: Dra. Elena and. Stashenko and Dr. Jairo R. Martínez

## 1 INTRODUCCIÓN

Durante los últimos años, se han producido grandes avances en el campo de la química, con la síntesis de muchas sustancias químicas nuevas, entre las que se destacan los plásticos, los fármacos, los productos derivados del petróleo, los fertilizantes y los plaguicidas. La producción y el uso de estas sustancias han mejorado las condiciones de vida humana, lo que ha conducido al crecimiento poblacional; sin embargo, el desarrollo de la industria química sintética, presenta grandes implicaciones para el ambiente, ello, por la liberación de grandes cantidades de sustancias orgánicas e inorgánicas de las cuales, en diversas ocasiones, se desconocen sus efectos sobre el medio ambiente [1].

Los principales contaminantes ambientales son los plaguicidas, los cuales forman un grupo muy extenso, entre los que se destacan los herbicidas. Estos presentan un amplio uso en la agricultura, con el fin de controlar el crecimiento de las malezas o hierbas, que se consideran indeseables, siendo aplicados en las plantas o en los suelos, lo cual puede ocasionar la contaminación de los sistemas acuáticos.

Los factores más importantes en el transporte de los herbicidas hacia los cuerpos de agua naturales son la dispersión aérea por los vientos, la volatilización y el arrastre por aguas de lluvia y riego, que causan daños o efectos adversos a los organismos acuáticos, lo cual constituye un problema ambiental importante en las últimas décadas [2].

Uno de los agroquímicos de más amplio uso a nivel mundial es el glifosato [N-(fosfometil)-glicina], es un herbicida no selectivo, postemergente, sistémico y de amplio espectro, el cual se une rápida y fuertemente a la materia orgánica al entrar en contacto con el suelo y a las partículas suspendidas en los sedimentos acuáticos. Desde los años noventa, este producto abarcó uno de los más grandes

mercados en la industria de los pesticidas, debido a su amplio uso en la agricultura y jardinería ornamental [3,4].

El glifosato fue sintetizado y patentado por la compañía Monsanto, empresa que descubrió por primera vez su uso potencial como un herbicida en 1970 por el Dr. John E. Franz, y hasta 1974 fue introducido como producto comercial con el nombre de *Round-up*. En la actualidad, esta compañía es el principal distribuidor del glifosato, junto con semillas transgénicas resistentes a este herbicida [5]. El éxito comercial del glifosato como herbicida altamente efectivo ha impulsado varios estudios sobre su comportamiento y persistencia en los cuerpos de agua y suelos, con el fin de desarrollar un método analítico robusto para su seguimiento en el medio ambiente.

En Colombia, el herbicida glifosato se utiliza ampliamente en la agricultura y se ha implementado como componente de la mezcla de aspersion usada en las prácticas de erradicación química de los cultivos de coca y amapola, la cual se constituye de glifosato en su forma comercial *Round-up Ultra*, el surfactante *Cosmoflux 411F* y agua en la proporción 44:1:55 v/v, con una tasa de aspersion de 10,4 L/ha [4], aprobado en el Plan Colombia desde el año 2001 [2], como se contempla en la Resolución 1054 de 2003 del Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial.

Aunque se ha venido justificando la práctica de fumigación bajo los parámetros establecidos en Colombia con base en un riesgo relativamente bajo, estudios han demostrado que el glifosato causa graves problemas de salud en personas y animales; contamina el suelo, el aire, el agua y los alimentos; destruye cultivos no objetivo, animales de cría y peces, los cuales constituyen la base de la sobrevivencia de comunidades campesinas e indígenas, y atenta contra la biodiversidad de flora y fauna; ya que cuando se fumigan por vía aérea los cultivos ilícitos, simultáneamente pueden afectarse cultivos alimenticios vecinos o intercalados, fuentes de agua, ganado y animales domésticos, escuelas,

viviendas, hombres, mujeres y niños, especies de flora y fauna de áreas selváticas aledañas [4].

Los efectos ambientales y de salud causados por estas fumigaciones aéreas se suman a los que genera su uso agrícola como desecante de granos y madurante en la caña de azúcar, lo cual es legal y se fundamenta en el modelo de producción agrícola conocido como “la revolución verde”, que se basa en monocultivos, irrigación, crédito y uso intenso de fertilizantes y agroquímicos tóxicos con licencias de venta [6].

A pesar del largo tiempo del uso de este agente agroquímico, en Colombia no se ha prestado atención a esta problemática ambiental y sanitaria, dado que no se cuenta con las suficientes medidas para reconocer la cantidad residual de glifosato en las fuentes de agua; con el fin de cumplir con el límite máximo autorizado (0.7 mg/L), establecido por la Agencia de Protección Ambiental (EPA) [7]. Por ende, en el Laboratorio de Cromatografía de la Universidad Industrial de Santander se aprovecharon los recursos tecnológicos disponibles para implementar el método de análisis de glifosato en muestras de agua; ya que su uso se ha incrementado en los últimos años.

Los residuos de glifosato y su metabolito, el ácido aminometilfosfónico (AMPA) pueden ser estimados mediante técnicas de tipo exploratorio como las pruebas colorimétricas y de inmunoensayo, o para identificar y cuantificar, como los métodos cromatográficos acoplados a detectores selectivos como: la cromatografía líquida, recomendada por el método EPA 547, que requiere derivatización post-columna para aumentar la sensibilidad en la detección, ya que el glifosato carece de grupos cromóforos y fluoróforos, y la cromatografía de gases, la cual también requiere derivación, para aumentar su volatilidad y así obtener niveles de detección bajos.

En el presente trabajo, se desarrolló una metodología para la determinación por cromatografía de gases de alta resolución con *micro*-detector de captura de electrones (GC/ $\mu$ -ECD) de glifosato y su principal metabolito AMPA, en muestras de agua, a través de la formación de derivados mediante fluoroacetilación y fluoroetilesterificación, los cuales son termoestables y ayudan a mejorar la sensibilidad y selectividad de la técnica cromatográfica.

Algunos resultados preliminares de esta investigación fueron presentados en la modalidad póster, bajo el título "Implementación de una metodología para la determinación de glifosato en agua por GC- $\mu$ ECD", en el XXIX Congreso Latinoamericano de Química- CLAQ 2010, realizado entre el 27 de septiembre y el 1 de octubre de 2010 en el Centro de Convenciones de Cartagena de Indias.

## 2 ESTADO DEL ARTE

### 2.1 PLAGUICIDAS

La Organización de Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) define plaguicida como: "Cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluyendo los vectores de enfermedades humanas o de los animales, las especies no deseadas de plantas o animales que causan perjuicio o que interfieren de cualquier forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas, maderas y sus productos o alimentos para animales, o que pueden administrarse a los animales para combatir insectos, arácnidos u otras plagas en o sobre sus cuerpos" [8,9]. Esta definición incluye las sustancias destinadas a usarse como reguladoras del crecimiento de las plantas, defoliantes, desecantes, agentes para reducir la densidad de frutas o agentes para evitar la caída prematura de la fruta y las sustancias aplicadas a los cultivos antes o después de la cosecha para proteger el producto del deterioro, durante el almacenamiento y transporte [8].

Los plaguicidas se pueden clasificar siguiendo diferentes criterios: funcional, químico o toxicológico. La clasificación funcional se basa en el organismo sobre el que actúan, se catalogan en insecticidas, herbicidas, fungicidas, nematocidas, rodenticidas y reguladores fisiológicos. Conforme a su toxicidad aguda, los plaguicidas pueden ser extremadamente peligrosos, altamente peligrosos, moderadamente peligrosos y ligeramente peligrosos. Según su vida media, pueden ser permanentes, persistentes, moderadamente persistentes y no persistentes. Dada su estructura química, se clasifican en diversas familias, como los organoclorados, los organofosforados, los carbamatos y los piretroides [9].

Actualmente, en todo el mundo, se utilizan cientos de plaguicidas de diferente naturaleza química, mayoritariamente por parte de granjas, instituciones y

particulares, debido a los numerosos beneficios obtenidos; sin embargo, la utilización a escala mundial de cantidades crecientes de estos compuestos ha dado origen a una serie de problemas que afectan el medio ambiente y la salud humana; ya que la liberación de plaguicidas en el ambiente puede provocar una serie de procesos o transformaciones muy complejos, que permiten el transporte del plaguicida a través del aire o del agua, hacia el subsuelo e incluso hacia organismos vivos [1,10].

## **2.2 HERBICIDAS**

Los herbicidas son productos fitosanitarios que se usan con el fin de destruir o controlar el crecimiento de las malezas o hierbas que se consideran indeseables, principalmente, en la agricultura, ya que causan problemas al competir con el cultivo por agua, nutrientes, luz y espacio o por la fitotoxicidad de algunas de ellas.

El uso agrícola de los herbicidas ha reemplazado los métodos mecánicos y manuales en áreas de agricultura intensiva y altamente mecanizada, reduciendo los costes y controlando más efectivamente las malas hierbas [11]; sin embargo, la exposición de la población a los herbicidas que se liberan al medio ambiente, es alta, ya que éstos presentan una mayor movilidad en las diversas matrices ambientales, principalmente, en el agua y el suelo, debido a la alta polaridad que presentan estos agroquímicos [10].

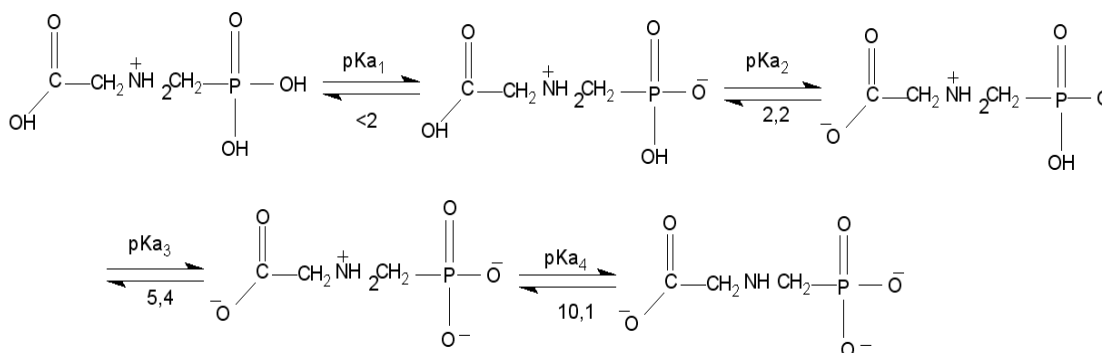
En el **ANEXO 1** se presentan los esquemas de clasificación de los herbicidas, basados en la selectividad, en el modo cómo actúan, en el momento y la forma de su aplicación [1,10,11].

## 2.3 GLIFOSATO

### 2.3.1 Generalidades

El glifosato [(N-fosfometil)glicina], es un ácido orgánico débil formado por una molécula de glicina y otra de fosfometilo. El número del ácido en el *Chemical Abstracts Registry* (CAS) es el 114370-14-8 y su fórmula empírica es  $C_3H_8NO_5P$  [12,13]. El compuesto es un polvo cristalino blanco e inodoro, resistente a la volatilización y a la degradación solar, con un peso específico de 1,704 y una solubilidad en agua de 12 g/L (25 °C) en la forma ácida, es insoluble en la mayoría de disolventes orgánicos tales como acetona, etanol, xileno, entre otros. En el **ANEXO 2**, se encuentran las principales propiedades físico-químicas del herbicida [1,10,14].

El glifosato es un compuesto muy polar y anfotérico, que se puede encontrar formando compuestos iónicos diversos, en función del pH del medio, debido al carácter hidrofílico que presenta. Las constantes de acidez para este herbicida son:  $pK_{a1} < 2$ ;  $pK_{a2}$  2,441;  $pK_{a3}$  5,518 y  $pK_{a4}$  10,083. La ionización del glifosato se produce según las reacciones de la **Figura 1** [10].



**Figura 1.** Equilibrios ácido-base del glifosato con sus  $pK_a$  correspondientes [10].

Este herbicida actúa en varios sistemas enzimáticos, que controlan la biosíntesis de aminoácidos aromáticos, esenciales para las plantas y microorganismos; se

ioniza fácilmente y como anión, se adsorbe fuertemente por la materia orgánica en los suelos con pH normal. Por consiguiente, posee poca movilidad en los suelos y es rápidamente removido del agua por la adsorción a los sedimentos y a las partículas de materia suspendidas, debido a que los compuestos fosfonados poseen no sólo la capacidad para formar complejos con metales de transición estables en soluciones acuosas, sino que, además, muestran una gran afinidad por la superficie de aluminio y óxidos de hierro [15,16].

El ácido aminometilfosfónico (AMPA), cuya fórmula estructural es  $\text{CH}_6\text{NO}_3\text{P}$ , es un producto de degradación del glifosato y su principal metabolito [17,18], presenta un carácter polar y alta solubilidad en agua, es un compuesto anfotérico con valores de  $pK_a$  de 0,9 (primer fosfónico), 5,6 (segundo fosfónico) y 10,2 (amina) [19].

### **2.3.2 Modo de acción en plantas**

El glifosato actúa como herbicida post-emergente de amplio espectro, no selectivo, el cual es absorbido por las hojas de las plantas tratadas y se desplaza rápidamente a otras partes de la planta, incluidos los botones de las puntas de los tallos y de las raíces, y a los órganos subterráneos de almacenamiento, como rizomas y tubérculos [20].

El glifosato es un herbicida inhibidor de la síntesis de aminoácidos en plantas, bacterias, algas, hongos y parásitos apicomplejos, actúa a través de la inhibición de la enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintetasa (EPSPS) (**ANEXO 3**) [3,4,20,22]. El glifosato puede afectar otras dos enzimas relacionadas con la vía del shikimato: la clorismatomutasa y prefrenato hidratasa. Además, puede afectar otras enzimas no relacionadas con la vía del shikimato; por ejemplo, en la caña de azúcar reduce la actividad de una de las enzimas involucradas en el metabolismo del azúcar, la ácido invertasa [4].

La EPSPS es codificada por el núcleo celular y transportada al cloroplasto a través de un péptido de transporte, y es en el cloroplasto donde participa en la ruta metabólica del ácido shikimato. Esta enzima está asociada con la síntesis de tres aminoácidos esenciales cromáticos: fenilalanina, tirosina y trifófono [3,4,13] que son precursores de la síntesis de compuestos aromáticos como ligninas, alcaloides, flavonoides, ácidos benzoicos y hormonas vegetales. En esta vía, se emplea un 20% del carbono fijado durante la fotosíntesis [13].

En el cloroplasto, la EPSPS enlaza primero una molécula de shikimato-3-fosfato (S3P), inmediatamente después una molécula de fosfoenolpiruvato (PEP) se enlaza al sitio activo de la enzima. La EPSPS cataliza entonces una reacción de condensación para producir 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato [23].

Es importante señalar, que el PEP no presenta afinidad por EPSPS, a menos que una molécula de S3P se enlace primero. La función de la EPSP es unir el ácido shikimico con ácido fosfoenolpirúvico, para formar la EPSPS. Como la estructura de PEP y del glifosato son muy similares, el glifosato actúa como inhibidor competitivo y se une fuertemente al complejo formado por el shikimato y la EPSPS, lo que conduce a una acumulación de shikimato en concentraciones tóxicas. El glifosato se transporta simplásticamente hacia los meristemas de la planta en crecimiento y, al actuar como inhibidor competitivo de la EPSPS, resulta en la acumulación de shikimato y el bloqueo de la síntesis de los aminoácidos aromáticos [24,25]. Los síntomas de su acción en las plantas incluyen coloración amarillenta de los meristemas, necrosis y muerte en cuestión de días o semanas [13].

### **2.3.3 Modo de acción en agua y suelos**

La gran solubilidad del glifosato y sus sales en el agua, sugiere que son móviles en esta matriz; sin embargo, la fuerte y rápida unión a los sedimentos y partículas,

especialmente, en aguas poco profundas y turbulentas, o en aquellas que llevan grandes cargas de partículas, remueve el glifosato de la columna de agua [3].

La estabilidad del glifosato en el suelo está relacionada con el flujo de biomasa y la tasa metabólica microbiana o con cambios fisicoquímicos generados a partir de la actividad microbiológica [4], ya que éste es inactivado inmediatamente en el suelo mediante la adsorción por la vinculación a la capa de silicatos, óxidos metálicos, materiales no cristalinos o materia orgánica, a través de la formación de enlaces de hidrógeno o mediante la interacción electrostática con los iones de intercambio en la superficie de la arcilla [26].

El glifosato se adsorbe a los materiales no cristalinos, óxidos de hierro y aluminio, mediante fuerzas físicas de tipo electrostáticas; en este tipo de adsorción interviene un mecanismo de intercambio de ligandos, donde uno o más hidroxilos de la esfera de hidratación del hierro o aluminio, se pueden intercambiar por el grupo fosfonato del glifosato; mientras que su adsorción a la materia orgánica (las sustancias húmicas), es a través de un mecanismo de formación de puentes de hidrógeno. El glifosato, una vez liberado en el suelo, puede interaccionar temporalmente con sustancias húmicas y ser liberado de nuevo al cabo de cierto tiempo. Igualmente, la movilidad del herbicida hacia horizontes más profundos del suelo puede estar controlado por la formación de complejos relativamente estables entre el glifosato y las sustancias húmicas solubles. Sin embargo, debido a la naturaleza ácida del glifosato, este herbicida es más propenso a sufrir interacciones iónicas con el suelo y no hidrófobas, siendo adsorbido principalmente por los minerales arcillosos vía mecanismo de intercambio de ligandos con su grupo fosfonato [1]. De este modo, su movilidad en el suelo está determinada por la composición del mismo, presentando una alta movilidad en suelos con bajo contenido de materia orgánica y arcillas [4].

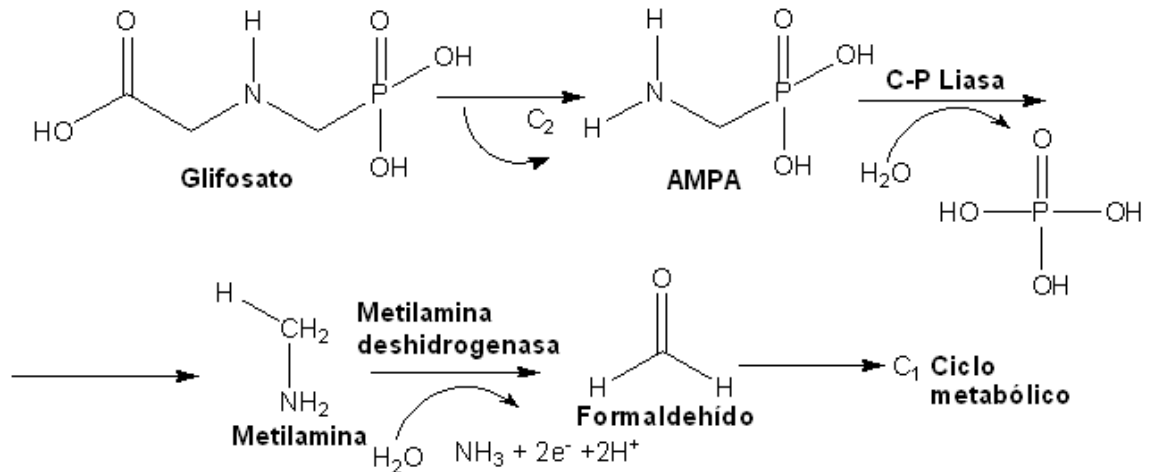
El tiempo de residencia del glifosato en el suelo es función de la retención y es afectado por la composición mineralógica del mismo. La tendencia del glifosato a

formar compuestos de coordinación con iones metálicos es notable; los principales cationes que quelan el glifosato en el suelo son el  $\text{Al}^{+3}$  y el  $\text{Fe}^{+2}$  y, en menor grado,  $\text{Mn}^{+2} > \text{Zn}^{+2} > \text{Ca}^{+2} > \text{Mg}^{+2} > \text{Na}^{+}$  [4,13,27]. La disponibilidad de  $\text{Al}^{+3}$  y  $\text{Fe}^{+2}$ , y P en la adsorción del glifosato, es influida por el pH del suelo, ya que un aumento del pH incrementa la estabilidad de  $\text{Al}^{+3}$  y el  $\text{Fe}^{+2}$  y reducción del P, lo que conduce a una mayor adsorción del glifosato y reducción de la movilidad, ya que el fosfato compite por los sitios de adsorción con el glifosato, lo que indica que, al aumentar la concentración de fosfato, la biodisponibilidad del glifosato aumenta, haciéndolo más susceptible a la actividad microbiana [28].

La degradación de glifosato en suelos tiene lugar básicamente por los microorganismos presentes. En función de las propiedades del suelo, el herbicida se puede degradar a diferentes velocidades, de modo que se encuentra un amplio rango de valores de vida media para este compuesto en suelos, de 1 a 174 días. En la mayoría de casos, más del 90% del glifosato aplicado se degrada en los seis meses posteriores a la aplicación [16]. Generalmente, se incluye en el grupo de plaguicidas de persistencia moderada en suelos. En medios acuáticos, la degradación también tiene lugar por acción biológica, lo que conduce a que la vida media del glifosato en este medio varía entre los 7 y 14 días. En las aguas superficiales el glifosato es degradado continuamente por microorganismos [1,10,13].

El glifosato parece ser degradable por los microorganismos a través de dos vías. Una ruta es la formación de AMPA y un fragmento C2, probablemente, glioxilato. En esta ruta, la ruptura de la unión C-N es la primera etapa, posteriormente, mediante la acción de la enzima C-Piase, se produce la ruptura del enlace C-P, el cual es resistente a la descomposición química, llevando a la formación de fosfato y metilamina [4,10] (**Figura 2**). Sin embargo, hay otra ruta de degradación, vía sarcosina (*N*-metilglicina) y ortofosfato, la cual ocurre por el clivaje del enlace C-P del glifosato, lo que conduce a la formación de sarcosina. Posteriormente, la

sarcosina se degrada a glicina y a una unidad de un carbono, que, eventualmente, forma CO<sub>2</sub>, probablemente, vía formaldehído [3,29].



**Figura 2.** Ruta de degradación del glifosato [10].

### 2.3.4 Toxicidad

La toxicidad describe el grado en el cual una sustancia es venenosa o puede causar una lesión; depende de diferentes factores: dosis, duración y ruta de exposición, forma y estructura de la sustancia química y factores humanos individuales. La dosis letal media (DL<sub>50</sub>) es aquella concentración que, al ser administrada por cualquier vía de ingreso oral o dermal, en un periodo de tiempo definido, mata el 50% de la población evaluada, se expresa en miligramos de producto por kilogramo de peso del animal [17,30,31].

La EPA, ha establecido que el glifosato y sus sales son compuestos moderadamente tóxicos, asignándole la Categoría de Toxicidad III, por el efecto ocular irritante y la opacidad corneal. La dosis letal media (DL<sub>50</sub>) es ca. de 4900 a 5000 mg/kg, de peso vivo [1].

La toxicidad aguda de este plaguicida se considera baja, según la Organización Mundial de la Salud (OMS); la DL<sub>50</sub> oral de glifosato puro en ratas es 4230 mg/kg,

mientras que el fabricante (Monsanto) cita una  $DL_{50}$  de 5600 mg/kg [13]. La  $DL_{50}$  oral para la sal de trimetilsulfonio es ca. de 750 mg/kg en ratas, lo que indica la toxicidad moderada. La  $DL_{50}$  oral para el glifosato es mayor de 10.000 mg/kg en ratones, conejos y cabras. Por exposición cutánea, es considerado no tóxico, con valores  $DL_{50}$  cutánea de mayor de 5000 mg/kg para el ácido y la sal isopropilamina [32]. Las fórmulas con el glifosato producen mayor toxicidad aguda, encontrándose que la cantidad de *Round-up* (glifosato + POEA) requerida para ocasionar la muerte de ratas es tres veces menor que la del glifosato puro. En cuanto a las formas de exposición, la toxicidad del glifosato puro y la de las fórmulas compuestas son más altas en caso de exposición dérmica e inhalatoria, que por la ingestión. En humanos, los síntomas de envenenamiento incluyen irritaciones dérmicas y oculares, náuseas y mareos, edema pulmonar, descenso de la presión sanguínea, reacciones alérgicas, dolor abdominal, pérdida masiva de líquido gastrointestinal, vómito, pérdida de conciencia, destrucción de glóbulos rojos, electrocardiogramas anormales y daño o falla renal [12,13,17,18].

### **2.3.5 Legislación sobre la presencia de glifosato en el ambiente**

La presencia de plaguicidas en el medio ambiente, debido al aumento en su utilización, que supera miles de toneladas al año y sus efectos tóxicos, han llevado a los organismos internacionales oficiales a establecer normas para regular sus concentraciones máximas admisibles en alimentos y aguas, especialmente, las superficiales y subterráneas, las cuales se utilizan en el abastecimiento para consumo humano [10].

La Comisión de la Comunidad Europea, en la Directiva 98/83/CE, efectiva a partir del 25 de diciembre de 2003 [1], establece como concentración máxima admisible, para pesticidas individuales y productos relacionados, un valor de 0,1  $\mu\text{g/L}$  y, para pesticidas totales, la concentración de 0,5  $\mu\text{g/L}$  [1,2,10,13], sin tener en cuenta las características individuales de los plaguicidas. Éste es un requerimiento muy estricto, para el cual es necesario disponer de métodos analíticos suficientemente

sensibles que permitan detectar estos compuestos a niveles de 0,02 µg/L para poder determinar con suficiente fiabilidad el nivel exigido [10]. En cambio, en los Estados Unidos, la Agencia de Protección del Medio Ambiente (EPA), estableció como nivel máximo para pesticidas totales, dos categorías de estándares de las aguas potables: los estándares primarios o Nivel Máximo de Contaminante (*MCL, Maximum Contaminant Level*), que son aplicables legalmente a los sistemas públicos de agua, y los estándares secundarios u Objetivo del Nivel Máximo de Contaminante (*MCLG, Maximum Contaminant Level Goal*), que son guías informativas de los contaminantes, que pueden suponer cierto riesgo para la salud, a pesar de no ser obligatorios. Los MCL siempre se establecen tan próximos a los MCLG como sea posible, considerando la tecnología actual [1]. En el caso del glifosato, ambos estándares están establecidos en 0,7 mg/L [1,2,10,13]. La Organización Mundial de la Salud (OMS) también establece que los niveles máximos de glifosato en aguas potables deben ser 0,7 ppm, coincidiendo pues, con los de la EPA. En la **Tabla 1** se registran los límites permisibles de glifosato establecidos por algunas organizaciones mundiales en varios tipos de agua [2,33].

**Tabla 1.** Límites permisibles de glifosato por algunas organizaciones mundiales [2,33].

Tipo de muestra	(EQGs) Guía de la calidad ambiental canadiense, µg/L	EEC, Unión Europea, µg/L	US EPA, Estados Unidos, µg/L	Estándar Nacional y guía para pesticidas en agua, Alemania, µg/L
Agua potable	280	0,1	700	700
Agua: Vida acuática	65	---	---	---
Agua: Agricultura (cría)	280	---	---	---

### 2.3.6 Formulaciones comerciales de glifosato

El glifosato fue sintetizado y patentado por la compañía Monsanto en 1974 y, actualmente, es el principio activo de muchos productos comerciales. Este compuesto se comercializa en la forma de concentrados solubles de la sal isopropilamina de N-(fosfometil)glicina, en los cuales se integran el glifosato y los ingredientes inertes, requeridos para cada tipo de formulación comercial [1,26]. La sal de isopropilamina, uno de los pesticidas más frecuentemente usados en el mundo, se utiliza como herbicida para controlar las plantas de hoja ancha e hierbas de muchos tipos de cultivo [1,10]. También, se aplica para el control de malas hierbas en puntos varios como pueden ser zonas ornamentales, céspedes, áreas residenciales, plantaciones forestales, entre otros; presenta un amplio uso en la agricultura y jardinería ornamental [1].

El glifosato también es comercializado como sal sódica y sal de amonio de N-(fosfometil)glicina, los cuales se utilizan como reguladores del crecimiento de las plantas de cacahuets y caña de azúcar, para modificar el crecimiento de la planta y acelerar la maduración de los frutos. Esta forma de glifosato fue introducida en 1984 [1].

Bajo una gran variedad de nombres, el herbicida glifosato es comercializado en todo el mundo, ya sea en forma líquida, sólida o en pastillas, llegando a ser el plaguicida más utilizado en el sector agrícola en el 2001 y el segundo en sectores no agrícolas [1]. Las formulaciones que se destacan son el *Round-up*<sup>®</sup>, cuya composición es: 48% de sal ácida isopropilamina de glifosato, 15% de surfactante polioxietilamina (POEA) y 37% de agua; el surfactante POEA se compone de múltiples unidades etoxi (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O) y un grupo funcional amina [17,21,29]. *Rodeo*<sup>®</sup>, el cual se compone de 53,5% de glifosato y 46,5% de agua y *Accord*<sup>®</sup> compuesto por 41,5% de glifosato y 58,5% agua [10].

En el mercado colombiano, existen las presentaciones comerciales formuladas por empresas establecidas en el país, con registros de venta vigentes en abril de 1997, indicadas en el **ANEXO 4** [17].

Las ventas de productos de glifosato se valoran actualmente en unos 1.200 millones de euros anualmente, lo que representa un 60% de las ventas totales de herbicidas no selectivos. Entre todos estos productos, hay que destacar el *Round-up*, herbicida comercializado por la empresa Monsanto, con una gran producción en todo el mundo [1].

### **2.3.7 Uso de glifosato en Colombia**

En Colombia, el crecimiento paulatino de los cultivos de coca y amapola en los últimos años, ha llevado a que las políticas de control se encaminen a la erradicación de dichos cultivos, basada en la aspersión aérea de glifosato. Desde 1992, se inició la práctica de aspersión con glifosato bajo la presentación comercial *Round-up*<sup>®</sup> *Ultra*, por aplicación aérea, con previa aprobación por la Dirección Nacional de Estupefacientes (DNE), para el control de los cultivos de amapola. En 1994, su uso se extendió a los cultivos de coca mediante aprobación del Ministerio de Salud. Las prácticas de aspersión estuvieron limitadas a lotes de más de 2 ha, bajo la Resolución No. 0001 de febrero de 1994, emitida por el DNE, excluyendo de estas prácticas a aquellos cultivos establecidos en áreas de manejo especial y reservas naturales, en las cuales se aprobó la erradicación manual o mecánica. Sin embargo, en el año 2000, se aprobó el Plan Colombia cuyo eje central es la lucha contra el narcotráfico por medio de la erradicación forzosa de los cultivos ilícitos, con lo cual la Resolución No. 0005 amplió la cobertura de aspersión a cultivos fraccionados (cultivos divididos con barreras vivas o artificiales, plantaciones lícitas, cultivos de pancoger o bosque nativo) o mezclados (lícitos e ilícitos). Finalmente, con la Resolución No. 0013 del 27 de junio de 2003 fueron habilitadas las aspersiones aéreas sobre cultivos establecidos en áreas de manejo especial y reservas naturales [4,34,35].

La mezcla de aspersión sobre cultivos de coca y amapola se compone de glifosato, utilizado bajo la presentación comercial *Round-up® Ultra*, constituyendo el 44% de la mezcla en proporción volumen/volumen lo que determina una concentración de 180 g de sal isopropilamina del N-(fosfonometil)glicina, como principio activo, por litro de la mezcla. Además, se agrega el surfactante no-iónico Cosmoflux® 411F y agua en la proporción 1:55 volumen/volumen, respectivamente [3,4].

El adyuvante Cosmoflux® 411F está constituido por una mezcla de tensoactivos estereoespecíficos no iónicos [36], basado en una mezcla de alcoholes polietoxilatos lineal y aril – 17% peso/volumen, e isoparafinas al 83% v/v [3,4]; este tensoactivo se agrega en el momento de la aspersión, debido a que mejora la adherencia y uniformidad de las preparaciones de agroquímicos, controlan la evaporación e hidrólisis del producto activo con cubrimiento total, garantizan la concentración homogénea del activo por unidad de área y permite extender el espectro de actividad biológica del agroquímico [4]; además, genera la disminución de la tensión superficial de la solución e incrementa la penetración en los tejidos de las plantas, ya que la gran solubilidad en el agua y la naturaleza iónica del glifosato retardan su penetración a través de la cera de la cutícula de la planta [3].

Inicialmente, el *Round-up® Ultra* fue asperjado bajo una tasa de 8 L/ha, pero a finales del año 2002, el DNE aprobó el incremento de la concentración del herbicida en la mezcla de aspersión hasta 10,4 L/ha sobre cultivos de coca y de 2,5 L/ha para los cultivos de amapola, con el fin de aumentar la eficacia de la mezcla [3,4]. Estos parámetros exceden las concentraciones recomendadas por el fabricante del *Round-up® Ultra* de 1,6 a 7,7 % y una tasa de aspersión de un galón por acre (2,33 L/ha) [36].

El uso de glifosato en el programa de aspersión de coca y amapola se presenta en la **Tabla 2**, junto con el comportamiento de los cultivos de coca y amapola desde el año 2000 al 2004.

**Tabla 2.** Comportamiento de los cultivos de coca y amapola desde 2000 al 2004, hectáreas asperjadas y cantidad de *Round-up® Ultra* utilizado [3,4].

<b>Año</b>	<b>Hectáreas de coca cultivadas</b>	<b>Hectáreas de coca asperjadas</b>	<b>Hectáreas de amapola cultivadas</b>	<b>Hectáreas de amapola asperjadas</b>	<b>Cantidad de <i>Round-up® Ultra</i> utilizado, L</b>
2000	162.510	58.073	6.500	9.254	603.970
2001	144.807	94.153	6.200	2.066	984.848
2002	102.071	130.364	4.153	3.371	1.061.538
2003	86.340	132.817	4.026	2.995	1.381.296
2004	80.350	136.552	3.950	3.061	1.420.130

## **2.4 DETERMINACIÓN DE GLIFOSATO EN MUESTRAS DE AGUA**

Para la determinación de glifosato en agua, se desarrolla un proceso de extracción, concentración y análisis de la muestra, para lo cual se han implementado una gran variedad técnicas, teniendo en cuenta las propiedades químicas del glifosato y del AMPA, que son compuestos poco volátiles y altamente hidrófilos. A continuación, se revisarán las principales técnicas usadas para la extracción y las técnicas analíticas, ya sean de tipo exploratorio, como el método de inmunoensayo, o para identificar y cuantificar, como los métodos cromatográficos acoplados a detectores selectivos.

### **2.4.1 Técnicas de preparación de muestras**

En el análisis medioambiental, es de vital importancia la preparación de la muestra, previa a su determinación analítica. Los analitos, que se encuentran a nivel de trazas en la matriz, deben ser extraídos cuantitativamente de la muestra hacia una matriz que sea compatible con el resto del procedimiento analítico, lo

que proporcionará resultados fiables que contribuirán, junto con otros parámetros a conocer la distribución y comportamiento de las sustancias de interés en las diversas matrices ambientales [1].

Las técnicas más utilizadas para la extracción de plaguicidas en muestras acuosas incluyen la extracción líquido-líquido en continuo (ELLC) y por lotes (ELLB), y la extracción en fase sólida (SPE). Sin embargo, se han implementado técnicas de extracción y concentración mediante membranas líquidas, y la utilización de resinas de intercambio iónico, entre otros [37].

#### **2.4.1.1 Extracción líquido-líquido (ELL)**

La extracción líquido-líquido es una técnica de separación “clásica”, tradicional y útil en el análisis de matrices acuosas de carácter ambiental. Esta técnica se basa en la distribución o reparto de un analito entre una fase acuosa y el solvente de extracción, además del valor del coeficiente de partición ( $K_p$ ) entre la concentración del analito en la fase orgánica y su concentración en la fase acuosa, el cual depende del tipo de disolvente orgánico elegido, la temperatura, el pH de la muestra y la cantidad de materia orgánica, entre otros factores [10,31,38]. Las principales desventajas de esta técnica son las grandes cantidades de disolvente orgánico que se utiliza. En su mayoría, los disolventes de baja polaridad, como el hexano, éter dietílico, diclorometano, cloroformo o acetato de etilo. Otras dificultades se relacionan con la automatización y la formación de emulsiones, que impiden una extracción eficiente [1,10]. Esta técnica es poco aplicada en la extracción de glifosato en muestras acuosas, debido a la elevada solubilidad del glifosato en agua (12 g/L de 25 °C) y su insolubilidad en la mayoría de disolventes orgánicos. No obstante, se han reportado publicaciones en donde se describe la purificación de extractos de glifosato provenientes de alimentos mediante ELL [1].

### **2.4.1.2 Membranas líquidas**

La extracción y concentración mediante la técnica de membranas líquidas es una alternativa de extracción líquido-líquido tradicional. Esta técnica combina la selectividad y concentración de la ELL con la eficiencia en la eliminación de interferencias de la matriz característica de la técnica de diálisis [1]. El sistema de extracción de membrana líquida consiste en una fase acuosa, llamada solución de carga, donde inicialmente están presentes las especies químicas a transportar y una segunda fase acuosa, receptora o de retroextracción, donde se recuperan los analitos después de su transporte a través de la disolución orgánica que es la membrana propiamente dicha. Por tanto, en un solo paso, se combinan la extracción y la concentración de los analitos [1].

El transporte y la separación de los analitos ocurre por una fuerza impulsora, debida a la diferencia de potencial químico del soluto en las dos interfases de la membrana, que a menudo se expresa como gradiente de concentración. El parámetro que caracteriza el proceso de separación y recuperación con membranas líquidas es la eficiencia de extracción (E) y el factor de concentración (F), definidos como la fracción de moléculas de analito que se recuperan en la fase receptora, y como la relación entre la concentración del analito en la disolución receptora y la carga, respectivamente [10]. El transporte a través de la membrana líquida se puede producir mediante los mecanismos de transporte pasivo y transporte facilitado. El transporte pasivo se basa en procesos de disolución-difusión-disolución de las especies y, por tanto, es limitado. En el caso del transporte facilitado, la membrana líquida está constituida por una disolución orgánica de un reactivo transportador, que mediante la formación de un complejo neutro con la especie que se debe separar en la fase membrana, facilita su paso a la fase receptora. Mediante este mecanismo, la especie que se debe separar puede ser transportada a través de la membrana en contra de su gradiente de concentración [10].

### 2.4.1.3 Extracción en fase sólida

La extracción en fase sólida (SPE) o extracción sólido-líquido, es una de las técnicas de preparación de muestras más utilizadas actualmente, debido a su rapidez y selectividad, ya que permite ser utilizada con numerosos propósitos, entre los que se encuentran la extracción, la limpieza de la muestra (*clean-up*) y la concentración en trazas. Este proceso involucra varios mecanismos de separación: adsorción, afinidad e intercambio iónico [38-40].

La SPE es un proceso relativamente sencillo, rápido y menos costoso en comparación con ELL, ya que el análisis puede ser realizado, utilizando un volumen de muestra y disolventes orgánicos más pequeño, y se pueden obtener recuperaciones y factores de concentración elevados (>1.000). Además, es una técnica automatizable que permite el acoplamiento en línea con técnicas cromatográficas [10]. La SPE ofrece una multitud de adsorbentes para las interacciones polares, hidrofóbicas e iónicas, mientras que la extracción líquido-líquido se limita a los equilibrios entre las fases líquidas [39,40].

La selectividad en SPE depende de la estructura química de la sustancia analizada, las propiedades del adsorbente, la composición de la matriz de la muestra y el eluyente utilizado. La selectividad óptima se logra a través de los grupos funcionales de la sustancia analizada, que no están presentes en la muestra en los componentes de interferencia de la matriz [39,40].

El método de extracción sólido-líquido requiere que un volumen medido de la muestra acuosa sea pasado a través del cartucho empacado con un material adsorbente sólido, el cual generalmente consiste en un material polimérico o de sílice modificada, con unas características físicas y propiedades químicas adecuadas. La naturaleza de este material y los grupos funcionales adicionales determinan el modo de acción del adsorbente [1]. La extracción puede realizarse en modo discontinuo, en donde el sólido extractante está mezclado con la solución

líquida de la muestra; o en modo continuo, en el cual el sólido se empaca en un tubo y se pasa la muestra líquida a través de él, siendo este modo de extracción el más utilizado en el análisis químico. Dependiendo de la muestra que se analice, la extracción puede llevarse a cabo a través de membranas, discos, cartuchos o mediante columnas de vidrio con empaquetamiento manual del sólido adsorbente [1,39,39]. El proceso de extracción en fase sólida se puede dividir en cuatro etapas: (1) acondicionamiento, (2) adsorción de los analitos, (3) lavado y (4) elución de los analitos [39,40].

- ◆ Acondicionamiento: Consiste en la preparación del sorbente para la interacción eficaz con el analito por disolución o la activación de los ligandos en la superficie del adsorbente, seguida del equilibrio en un disolvente similar a la muestra, en fuerza iónica y pH. Esto ayuda a eliminar el disolvente residual que queda de la etapa de disolución, y equilibra el sorbente en un disolvente, que maximice las interacciones con el analito con el fin de promover la retención. El acondicionamiento se realiza mediante la adición de dos a tres volúmenes de solventes, correspondiente al de la columna, empleando tres solventes de diferente polaridad, con el fin de preparar el material adsorbente de la columna y certificar la retención reproducible de los analitos.
- ◆ Aplicación de la muestra (adsorción): El objetivo principal de la etapa de carga de la muestra es asegurar que el analito sea cuantitativamente retenido por el adsorbente, mientras que se reduzcan al mínimo la cantidad de interferencias. La muestra puede ser aplicada al adsorbente con presión positiva o negativa, a un flujo constante entre 1-10 mL/min, con el objetivo de lograr buenos rendimientos.
- ◆ Lavado del adsorbente: En esta etapa se eliminan selectivamente las impurezas que están vinculadas al adsorbente con menos fuerza que el analito, mediante el lavado con un solvente cuya polaridad sea diferente a la del compuesto de interés. En este paso, una etapa de secado del cartucho puede ser necesaria, para eliminar agua, si el disolvente de elución es inmiscible con ésta. El secado

se puede llevar a cabo con nitrógeno, por aplicación de presión reducida, en un tiempo que puede variar de 30 seg a 30 min, según las características del sistema.

◆ Elución de los analitos: En esta etapa, los analitos extraídos son eluidos del sólido adsorbente, con un disolvente adecuado específicamente escogido para romper los diferentes tipos de interacción analito-adsorbente.

El mecanismo que tiene lugar entre el adsorbente y el analito se puede clasificar en: (1) fase reversa, (2) fase normal y (3) intercambio iónico.

La **fase reversa** implica la partición de solutos orgánicos entre una fase polar, como el agua, y una fase no polar, como los adsorbentes C-18. El mecanismo de extracción es una interacción no polar, de van der Waals. La fase orgánica está químicamente ligada a la sílica, por tanto, los analitos más hidrofóbicos serán más retenidos en este tipo de adsorbente. Los sorbentes comunes en fase reversa contienen cadenas de hidrocarburos saturados tales como C<sub>8</sub> y C<sub>18</sub>, o los anillos aromáticos como el fenilo (PH) o SDB [39,40].

La SPE en **fase normal** se refiere a la sorción de analitos en fases sólidas polares. El mecanismo de extracción es una interacción polar donde se involucran fuerzas, como puentes de hidrógeno, interacciones dipolo-dipolo, interacciones  $\pi - \pi$  e interacciones dipolo-dipolo inducidas. El mecanismo implica la interacción de los grupos funcionales de los analitos en los puntos polares del material adsorbente. Los sorbentes más empleados son la sílice, la alúmina, el silicato de magnesio (Florisil) y los adsorbentes que contienen grupos funcionales del tipo cianopropilo (CN), aminopropilo (NH<sub>2</sub>) y diol (COHCOH), unidos químicamente al gel de sílice [39,40].

El **Intercambio iónico**, implica un mecanismo de intercambio de un analito orgánico cargado de un disolvente polar o apolar en un adsorbente de carga

opuesta. Este mecanismo se basa en interacciones específicas, de fuerzas coulómbicas altas entre el sorbente y el analito, ya que sólo las especies de la carga adecuada son retenidas por la columna, por lo que la mayoría de los contaminantes de la matriz son simplemente eluidos a los residuos durante la carga y los pasos de lavado. Las reacciones de intercambio iónico, son estequiométricas, ya que por cada equivalente de iones que se extraen de la solución, un equivalente de iones de la misma carga se liberará del intercambiador iónico [39,40].

Los factores, que afectan al intercambio iónico, son la carga del analito, que se intercambia, así como la carga de los iones que compiten con él; cuanto más elevada es la carga, mayor es la retención que se produce.

Existen muchos tipos de intercambiadores, sin embargo, las resinas sintéticas de intercambio iónico, son ampliamente utilizadas, por su elevada estabilidad química y mecánica, la gran capacidad que presentan, su alta velocidad de intercambio y su versatilidad [10]. Una resina de intercambio iónico puede considerarse como una estructura de cadenas hidrocarbonadas a las que se encuentran unidos de forma rígida grupos iónicos libres. Estas cadenas se encuentran unidas transversalmente, formando una matriz tridimensional, que proporciona rigidez a la resina y donde el grado de reticulación o entrecruzamiento determina la estructura porosa interna de la misma. Como los iones deben difundirse en el interior de la resina para que ocurra el intercambio, la selección del grado de reticulación puede limitar la movilidad de los iones participantes. Las cargas de los grupos iónicos inmóviles se equilibran con las de otros iones, de signo opuesto, denominados contraiones o grupos ionogénicos, que están libres y que son los que se intercambian con los del electrolito disuelto [1,10].

Las resinas sintéticas se pueden clasificar, según la estructura de su red polimérica, en:

◆ Resinas tipo gel o microporosas: son resinas formadas por una red homogénea de naturaleza elástica, que no es porosa, pero que tiene canales resultantes del proceso de inflado o *swelling*, ya que se hinchan en mayor o menor medida en función del porcentaje de agente entrecruzante empleado durante la polimerización y del disolvente en el que se encuentre la resina [41].

◆ Resinas macroporosas o macroreticulares: Durante la síntesis de estas resinas a partir de sus monómeros, se utiliza un co-solvente que actúa interponiéndose entre las cadenas poliméricas y crea grandes superficies internas. Este disolvente se elimina una vez formada la estructura rígida del polímero. Esta resina, tiene una relación área/volumen mayor que las resinas tipo gel, y por tanto, mayor capacidad de intercambio. La estructura macroreticular favorece la difusión de los iones, mejorando, por tanto, la cinética de intercambio. Son muy uniformes en cuanto a la forma externa y presentan una gran estabilidad mecánica [41].

◆ Resinas isoporosas: en estas resinas el cruce y la estructura porosa se han modificado para obtener polímeros con un tamaño de poro sustancialmente uniforme. Son resinas de alta capacidad, regeneración eficiente y de coste más bajo que las resinas macroporosas [41].

En función del contraión, que presentan las resinas, éstas se clasifican en catiónicas o aniónicas. Las resinas de intercambio catiónico contienen grupos fijos aniónicos y, por tanto, los iones intercambiables son cationes. Los intercambiadores de ácido fuerte o de ácido débil, respectivamente, son el ácido sulfónico ( $-\text{SO}_3\text{H}$ ), que tiene un protón como contraión, y en el segundo caso, el más utilizado es el absorbente con grupos ácido carboxílico ( $-\text{COOH}$ ). Las resinas de intercambio aniónico, por el contrario, contienen grupos fijos catiónicos y, por tanto, los iones que pueden canjear son aniones. Las resinas de base fuerte contienen grupos amonio cuaternario ( $-\text{NR}_3^+\text{OH}$ ), principalmente, y las de base débil, grupos amino monosustituidos o disustituidos ( $-\text{NH}_2$  o  $-\text{NH}-$ ) [1,10].

La resina de intercambio aniónico *Amberlite IRA-900*, es una resina de base fuerte, que tiene como contraión un ion cloruro, por lo tanto, puede canjear el ion cloruro por el glifosato o AMPA en forma aniónica, ya que dadas las propiedades ácido-base, que presenta el herbicida y su metabolito, ambos analitos pueden estar en forma iónica si se ajusta adecuadamente el pH del medio donde se encuentran [1,10]. Las características de la resina se detallan en la **Tabla 3**.

**Tabla 3.** Características de la resina *Amberlite IRA-900* [42].

<b>Característica</b>	<b><i>Amberlite IRA-900 (CI)</i></b>
Apariencia	Perlas <i>beige</i>
Porosidad	Macroporosa o macroreticular
Modo de intercambio	Aniónica de base fuerte
Grupo funcional	Tipo I: trialquilbenzil amonio PS-DVB-N <sup>+</sup> (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>
Capacidad total	1,0 meq/mL 4,2 meq/g
Humedad	60%
Densidad	700 g/L
Temperatura máxima de trabajo	77°C
Rango pH	0-14
Tamaño de partícula	16-50 µm

## 2.4.2 Técnicas analíticas usadas para la determinación de glifosato

### 2.4.2.1 Electroforesis capilar (CE)

La electroforesis capilar es un método microanalítico, aplicable para el análisis de una amplia gama de compuestos iónicos, ionizables y neutros. CE proporciona ventajas en términos de velocidad, bajo costo y simplicidad. Por tanto, este método se puede emplear como una excelente alternativa para análisis de

pesticidas [43]. En esta técnica, la separación de los analitos se basa en las diferencias de las movilidades electroforéticas de los solutos iónicos que determinarán la migración de los analitos a través del capilar bajo la acción del campo eléctrico aplicado, que ocasiona que lleguen al detector en tiempos diferentes. La movilidad electroforética de un soluto es función de su carga, del radio (suponiendo una geometría esférica) y de la viscosidad del medio; por tanto, a mayor carga y menor radio, mayor será su movilidad electroforética, siendo estos analitos los primeros en ser detectados [44].

Para la determinación de glifosato, se han llevado a cabo análisis con detección indirecta tanto con UV-Vis como con fluorescencia, debido a la ausencia de grupos cromóforos o fluoróforos en las estructuras moleculares del glifosato y del AMPA, para lo cual se ha reportado la derivatización de los analitos con reactivos como cloruro de *p*-toluensulfonilo, donde la detección es con UV a 240 nm, y se obtienen límites de detección del orden de mg/L o con 5-(4,6-diclorotriazinilamino) fluoresceína (DTAF), donde se utiliza un detector de fluorescencia inducida por láser (LIF) [37,43].

#### **2.4.2.2 Técnicas de inmunoensayo**

Actualmente, se han desarrollado numerosos estudios sobre la determinación de pesticidas en aguas mediante la técnica de inmunoensayo ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), la cual se fundamenta en la interacción del analito con un anticuerpo, que lo “reconoce” debido a su alta afinidad y especificidad. El rápido desarrollo de los métodos inmunoquímicos en la determinación de plaguicidas, se debe a la obtención de anticuerpos monoclonales y policlonales para una gran variedad de estos compuestos [1,10,45].

Esta técnica se caracteriza por ser sencilla, de bajo costo, rápida, sensible, selectiva, se puede llevar al sitio de trabajo, no requiere instrumentación sofisticada, se pueden analizar un número elevado de muestras y es un método

complementario en los análisis agroquímicos. Se considera una técnica de *screening*, no confirmatoria [1,10].

Las técnicas inmunoquímicas para la determinación de glifosato se han desarrollado rápidamente a lo largo de la última década, y aunque en el primer método propuesto por Clegg *et al.* [46], para la determinación directa de glifosato en muestras acuosas, obtuvo un límite de detección de 7,6 mg/L, en los métodos más recientes se han obtenido límites de detección del orden de los µg/L [1,10,45].

#### **2.4.2.3 Cromatografía iónica (IC)**

La cromatografía iónica (IC), es una técnica de separación basada en el principio de adsorción selectiva, cuyo objetivo es separar los distintos iones en una solución. La fase estacionaria contiene resinas de intercambio iónico, que son matrices sólidas y contienen sitios activos con carga electrostática, positiva o negativa. La muestra queda retenida sobre el soporte sólido por afinidad electrostática. Dependiendo de la relación carga/tamaño, algunos constituyentes de la mezcla se retienen con mayor fuerza sobre el soporte sólido que otros, ello conduce a su separación. La detección se realiza, mediante el uso de detectores conductimétricos, amperométricos o UV/Vis [47-49].

Esta técnica ha sido utilizada para la determinación de glifosato, ya que este compuesto presenta un grupo fosfato fuertemente ionizado, como resultado de sus constantes  $pK_{a1} < 2$ ;  $pK_{a2}$  2,441;  $pK_{a3}$  5,518 y  $pK_{a4}$  10,083 [1,10]; lo cual permite el uso de IC para su análisis, ya sea mediante la derivatización post-columna y detección UV o un análisis directo con supresión de conductividad y detector electroquímico [50,51].

#### **2.4.2.4 Cromatografía líquida de alta eficiencia**

La cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) permite el análisis de una extensa variedad de moléculas, de alto peso molecular, alto punto de ebullición,

compuestos iónicos y termolábiles. Es uno de los métodos analíticos ampliamente utilizados en los laboratorios. En esta técnica, los analitos se separan por partición entre una fase estacionaria líquida, enlazada a un soporte, y una fase móvil, solvente. La sílice utilizada, generalmente como soporte, posee grupos funcionales enlazados a la superficie. Los analitos son transportados a través de la columna por una fase móvil líquida, donde son retenidos selectivamente por la fase estacionaria, que permite realizar su separación [52].

La HPLC, puede ser desarrollada en fase normal y en fase reversa. En la primera, la superficie enlazante es polar, debido a que contiene grupos amino, diol y ciano, unidos al soporte de sílice, y la fase móvil apolar. La HPLC en fase reversa hace referencia a una fase estacionaria menos polar que la fase móvil. La fase móvil podría ser agua con modificadores orgánicos como acetonitrilo, metanol, tetrahidrofurano, entre otros; la fase estacionaria más utilizada es de sílice modificada, a la cual se unen grupos octadecilsiloxano (ODS), conformados por 18 carbonos, que constituyen un ambiente con características no polares; se observa la retención con mayor fuerza de los analitos menos polares y un orden de elución del más polar al menos polar [48,53].

Para la determinación de glifosato y su principal metabolito, AMPA, la técnica HPLC ha sido ampliamente utilizada, debido al carácter iónico que presentan estas sustancias, además de las ventajas de derivatización pre- y post-columna, con el fin de mejorar la capacidad de detección por UV o fluorescencia, debido a la ausencia de grupos cromóforos o fluoróforos en su estructura [54,55]. Esta derivatización permite alcanzar la sensibilidad y selectividad necesarias en la etapa de determinación; muchos agentes derivatizantes han sido utilizados incluyendo 4-cloro-7-nitrobenzofurazan (NBD-Cl) [56], 2,2-dihidroxi-1h-indeno-1,3-(2h)-diona (Ninhidrin), 1-fluoro-2,4-dinitrobenzeno (DNP), cloruro de p-toluenosulfonilo (TsCl), 4-cloro-3,5-dinitrobenzotrifluoruro (CNBF) [55]; sin embargo, los agentes derivatizantes más comunes para determinar glifosato y AMPA son OPA-MERC (o-ftalaldehído 2-mercaptoetanol), con derivatización post-

columna [57], y FMOCl (9-fluorenilmetil cloroformato), en derivatización pre-columna [54].

El método de determinación de glifosato en aguas potables propuesto por la EPA (*EPA Method 547*), se basa en la inyección directa de las muestras de agua, previamente filtradas, la utilización de una columna de intercambio catiónico (250 x 4,6mm, BioRad Aminex A-9) a 65°C y una precolumna C<sub>18</sub>, una fase móvil isocrática compuesta por KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,005 M) y metanol en una relación 96:4 v/v. Tras la elución a 65°C, se realiza la oxidación con hipoclorito de calcio y, el producto, se mezcla con o-ftaldehído (OPA) y 2-mercaptoetanol (MERC) a 38°C, para obtener un derivado altamente fluorescente, que se detecta a las longitudes de excitación y emisión de 340 nm, y >455 nm, respectivamente; los niveles mínimos de detección, que se alcanzan, son de 6,0 µg/L y 9,0 µg/L para aguas potables y subterráneas, respectivamente [58].

#### **2.4.2.5 Cromatografía de gases**

La cromatografía de gases (GC) es una herramienta muy sensible, que de acuerdo con el sistema de detección empleado, puede registrar analitos a nivel de ppt, generando la respuesta directamente proporcional a la cantidad de analito, que emerge de la columna cromatográfica. El principio de esta técnica se basa en la volatilización de la muestra y su posterior elución, que se produce por el flujo de una fase móvil de gas inerte, que transporta el analito a través de la columna, recubierta con la fase estacionaria. Una de las dificultades que presenta el método, es que las moléculas poco volátiles y termolábiles, generalmente, no se pueden analizar por esta técnica [48].

Aunque la cromatografía de gases, es una de las técnicas más aplicadas en la determinación de plaguicidas en matrices acuosas, para el caso del glifosato y el AMPA, este método se ve limitado, debido a la presencia de grupos polares en su estructura, tales como hidroxilo, carbonilo y amina, los cuales disminuyen la

volatilidad de las moléculas, por su tendencia a formar enlaces tipo puente de hidrógeno; lo cual aumenta su absorción en el soporte de la fase estacionaria y les confieren inestabilidad térmica y química. La determinación de glifosato y AMPA requiere pues, una etapa previa de derivatización, para convertir estos compuestos a derivados menos polares y suficientemente volátiles, a través de reacciones de acilación y esterificación, simultáneas [1,10,43].

### ◆ Derivación química

La derivación química permite obtener compuestos más estables, volátiles, de menor polaridad, e introducir en la molécula aquellos grupos, que permiten emplear detectores específicos; con ello, se logra una mayor sensibilidad, selectividad y la separación de algunos compuestos en el análisis cromatográfico; con frecuencia se permite obtener picos más simétricos y minimizar las interacciones excesivas con la fase estacionaria, que conducen a una adsorción irreversible y la formación de picos asimétricos o su desaparición [59,60].

La reacción de acilación se utiliza para derivar aminas, fenoles, alcoholes, tioles, enoles, glicoles y compuestos insaturados. Para formar los derivados acilo, los analitos se hacen reaccionar con un exceso de reactivo de acilación, anhídridos o haluros de ácido, en presencia de piridina, tetrahidrofurano u otro solvente, capaz de enlazar el ácido formado en la reacción. Los derivados obtenidos son compuestos de menor polaridad (ésteres, amidas, tioésteres), debido a que se sustituye un hidrógeno activo por un grupo acilo. Esto permite disminuir la capacidad de la molécula para formar puentes de hidrógeno e incrementar así su volatilidad [61].

El agente de acilación puede perder el grupo acilo por mecanismos electrofílicos, nucleofílicos o de radicales libres, siendo más común la acilación electrofílica. Los reactivos de acilación más usados son los anhídridos ácidos, a saber: anhídrido acético, anhídrido heptafluorobutírico (HFBA), (N-metil-bis(trifluoroacetamida)

(MBTFA), anhídrido trifluoroacético (TFAA), los haluros de ácido y derivados acilo [61,62].

La reacción de esterificación, es un método muy utilizado para la derivatización de ácidos carboxílicos, conduce a la formación de ésteres, que son compuestos no polares, más volátiles, aptos para el análisis cromatográfico. La esterificación implica la condensación del grupo carboxilo de un ácido y el grupo hidroxilo de un alcohol, con la formación de agua, la cual se elimina mediante condiciones anhidras, debido a que no existe una competencia por el anhídrido entre el agua formada en la reacción de esterificación y el exceso de alcohol; en las condiciones adecuadas el anhídrido reacciona preferentemente con el agua [61]. Este enfoque es particularmente útil en la derivatización del glifosato y su metabolito, ya que estos compuestos poseen los ácidos carboxílico y fosfónico, que son esterificados y un grupo amino, capaz de sufrir una reacción de acilación. Para ello, se han desarrollado diversos métodos que involucran el uso de diazometano e isopropilcloroformato, anhídrido heptafluorobutírico y 2-cloroetanol, N-metil-N-(*tert*-butildimetilsilil)-trifluoroacetamida, anhídrido trifluoroacético (TFAA) y trifluoroetanol (TFE) o anhídrido trifluoroacético (TFAA) y 2,2,3,3,4,4,4-heptafluoro-1-butanol (HFB), con el fin de obtener un derivado apropiado para el análisis por cromatografía de gases [37,43,62].

#### ◆ Detectores para cromatografía de gases

##### Ⓢ Detector de captura de electrones (ECD)

El detector de captura de electrones se utiliza frecuentemente para la determinación de compuestos que contienen halógenos. Es un detector de respuesta selectiva, siendo muy sensible a las moléculas que contiene grupos funcionales electronegativos, tales como halógenos, peróxidos, quinonas o grupos nitro, entre otros. El principio de funcionamiento de este detector se basa en la disminución de la conductividad debido a que los electrones, son capturados por analitos específicos que tienen grupos electronegativos. El detector utiliza una

fuente radiactiva de baja intensidad, usualmente, una lámina de  $^{63}\text{Ni}$ , para generar electrones de alta energía mediante emisiones  $\beta$ . En presencia de un gas como nitrógeno o mezcla de argón/metano, éstos se convierten en electrones térmicos, principalmente responsables de la conductividad en la cavidad del ECD. Cuando un compuesto orgánico halogenado u otro con grupos electronegativos entra al detector, los electrones son capturados y su corriente disminuye, generando una señal proporcional a la cantidad de moléculas con alta afinidad electrónica [48,63]. ECD se ha empleado para detectar los derivados de glifosato y AMPA con TFAA y TFE, debido a una sensibilidad alta, particularmente, para este tipo de compuestos [37,43].

#### **Detector selectivo de masas (MSD)**

Los compuestos orgánicos, que entran al espectrómetro de masas, se ionizan y se fragmentan en la cámara de ionización por medio de diversos métodos, principalmente, por impacto de electrones (EI). En la ionización por impacto de electrones, las moléculas se bombardean con electrones acelerados a 70 eV de energía, emanados de un filamento de tungsteno o rutenio, lo que conduce a la formación de los iones moleculares ( $M^+$ ), muchos de los cuales adquieren una gran cantidad de energía, que se acumula en algunos de sus enlaces, para luego ser disociados a iones-fragmento, radicales y especies neutras. Se trabaja a presiones bajas ( $10^{-5}$  -  $10^{-6}$  torr), para favorecer las reacciones unimoleculares y la no asociación entre moléculas e iones-fragmento. El detector selectivo de masas puede operar en el modo *Full Scan* y *Selective Ion Monitoring* (SIM). En *full scan* (barrido completo), se procesa la corriente iónica total en función del tiempo y, en el modo SIM [monitoreo de ion(es) seleccionado(s)], solo se mide la corriente iónica parcial del fragmento de interés pre-seleccionado, lo que produce un aumento de la selectividad del método [48,63]. El detector selectivo de masas se ha utilizado para identificar y cuantificar los derivados de glifosato y su producto de degradación [62,64].

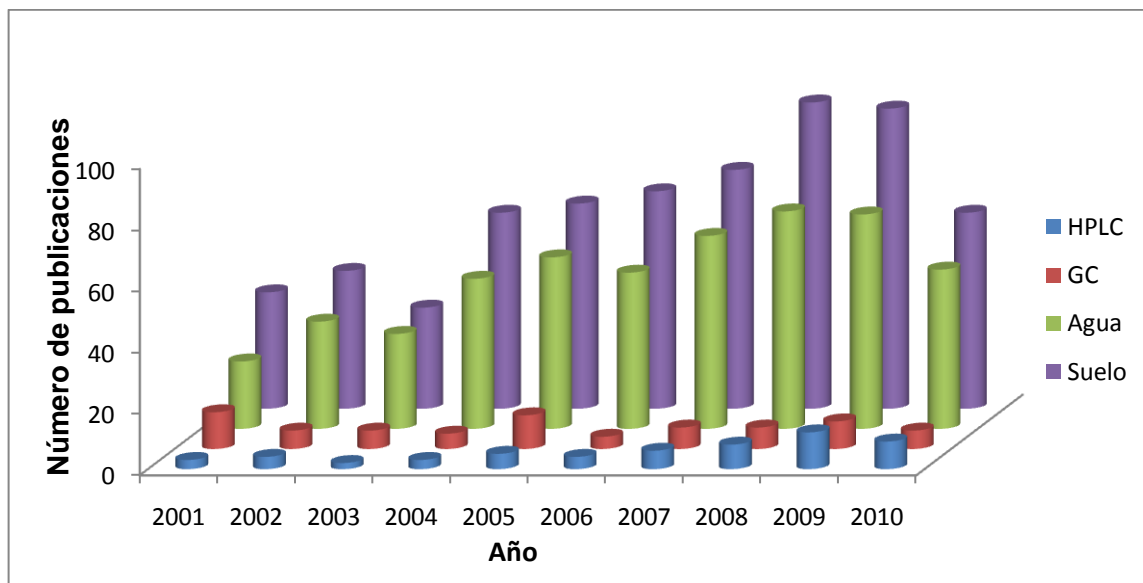
### 3 ANTECEDENTES

#### 3.1 CIENCIOMETRÍA

Con el objeto de analizar el estado actual de las investigaciones sobre los efectos, propiedades, toxicología, detección, entre otros aspectos, del glifosato, se realizó un estudio cuantitativo usando la base de datos *Web of Science (ISI Web of Knowledge, Thomson, Version 3.0)* y *Scopus*.

##### 3.1.1 Publicaciones por años, países y áreas de estudio.

Las ecuaciones de búsqueda, utilizadas para realizar el análisis cuantitativo, se basaron en las palabras-clave y sus combinaciones: “*glyphosate*”, “*water*”, “*soil*”, “*gas chromatography*” y “*HPLC*”. En la **Figura 3**, se encuentran los resultados con respecto a cada año de publicación en el periodo del 2001- 2010; con lo cual se puede inferir que las publicaciones referentes a la ecuación de búsqueda *Topic= (“glyphosate”, “soils”)*, presentan una mayor investigación en el año 2008, con respecto a las investigaciones en aguas. En general, las investigaciones referentes a estos temas presentan una tendencia de aumento hacia el estudio de los mismos, siendo el año 2008 cuando más se publicó sobre el glifosato, sin embargo, las ecuaciones de búsqueda *Topic=(“glyphosate”, “gas chromatography”)* y *Topic=(“glyphosate”, “HPLC”)*, muestran que el número de las publicaciones comprendido entre los años 2001 - 2007 ha fluctuado y para este periodo de tiempo, no se puede especificar con exactitud la tendencia, mientras que para el periodo de los siguientes tres años, existe un aumento en desarrollo de análisis de glifosato implementando estas técnicas analíticas, siendo el año 2009 el que más presenta publicaciones con 21,43% y 12,33% para el análisis de este pesticida por HPLC y GC, respectivamente.



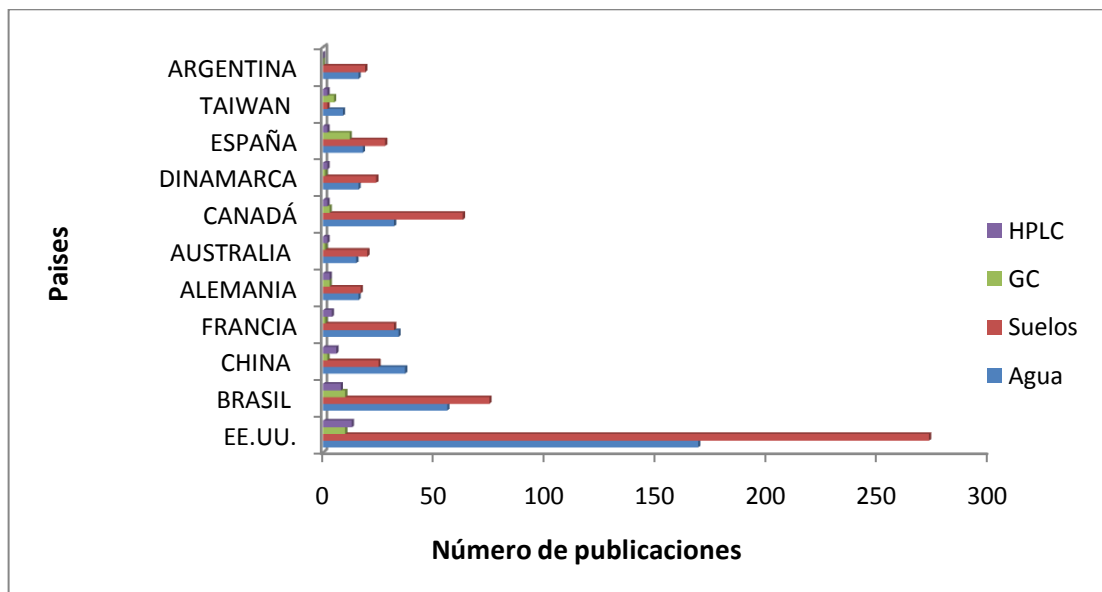
**Figura 3.** Publicaciones sobre el glifosato, por año. Fuente: *ISI Web of Science (WOS)*. Período de observación: 2001-2010. Fecha de consulta: Diciembre de 2010. Palabras-clave: “*glyphosate*”, “*water*”, “*soil*”, “*GC*” y “*HPLC*”

Los países que muestran mayor interés (Ver **Figura 4**) para investigar sobre el glifosato en los suelos y agua son los Estados Unidos (EE.UU.), con 273 (en suelos) y 169 (en agua) publicaciones, seguido de Brasil con 57 y 75 publicaciones de investigaciones en suelos y agua, respectivamente; mientras que el número de estudios analíticos usando cromatografía de gases, es de 13,70%, lo que equivale a 10 publicaciones para ambos países; se destaca España con 12 publicaciones (16,44%), referente al uso de GC en la detección de glifosato. Sin embargo, EEUU presenta un mayor número de estudio sobre glifosato mediante la técnica HPLC, con un 23,21% y Brasil, con un 14,29%. Dentro de esta búsqueda se encuentran dos publicaciones realizadas en Colombia: “*Electrooxidation of glyphosate on nickel and copper electrodes*”, por Sierra, Edgar *et al.* [65], en la cual se reportó el comportamiento de la señal eléctrica de los electrodos de cobre y níquel en función de la concentración del glifosato, y “*Toxicity of Formulated Glyphosate (Glyphos) and Cosmo-Flux to Larval and Juvenile Colombian Frogs 2. Field and Laboratory Microcosm Acute Toxicity*”, por Bernal, M. H *et al.* [66], en el

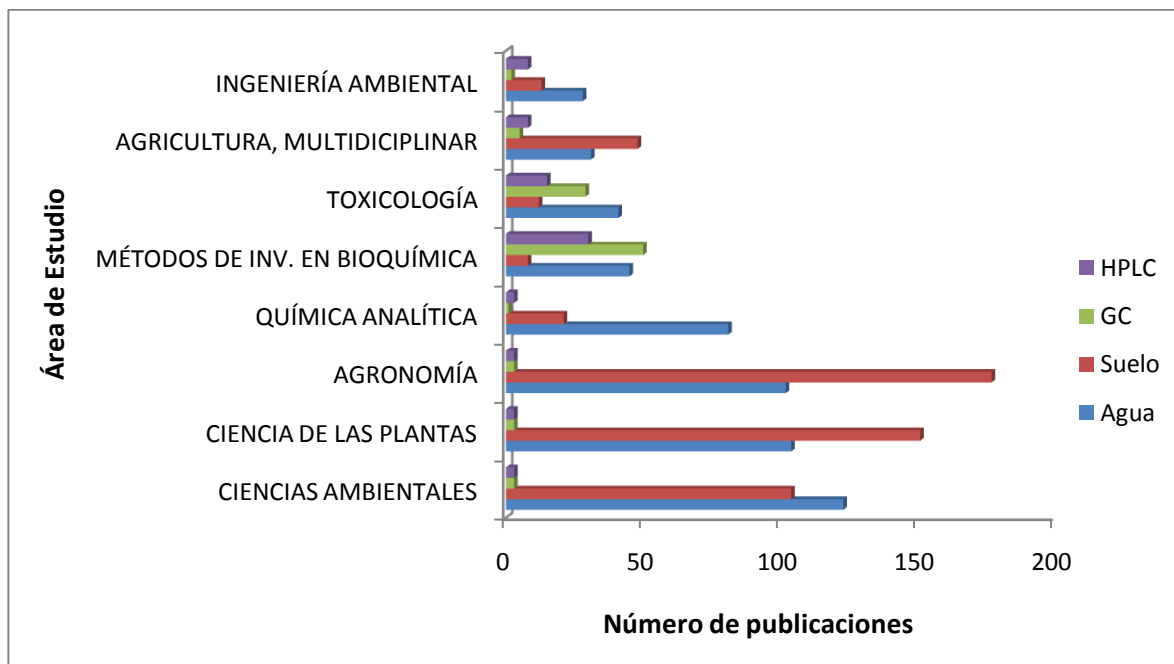
cual se evaluaron los efectos tóxicos de la mezcla de aspersión *Glyphos*, *Cosmo-Flux*, usada para la erradicación de cultivos de coca, en especies de anfibios en un área experimental en Tolima, Colombia.

Por último, entre las áreas en que más se ha investigado sobre el [N-(fosfometil)-glicina], se destacan las ciencias ambientales, con 104 publicaciones en el estudio de suelos y 123 en el estudio de aguas; seguidas de la ciencia de las plantas, con 151 y 104 investigaciones en suelos y agua, respectivamente (Ver **Figura 5**).

Los resultados obtenidos del estudio cuantitativo sobre glifosato analizado por HPLC y GC: se observa, que para ambos casos, las áreas de aplicación con mayor número de publicaciones, están relacionadas con los métodos de investigación en bioquímica y química analítica, lo cual significa que ambas técnicas han despertado mucho interés en la comunidad científica, con fines similares, siendo un 68,50% de publicaciones reportadas en el área de estudio de la química analítica y 39,73% para los métodos de investigación en bioquímica.



**Figura 4.** Publicaciones sobre el glifosato por países. Fuente: *ISI Web of Science (WOS)*. Período de observación: 2001-2010. Fecha de consulta: Diciembre de 2010. Palabras-clave: “*glyphosate*”, “*water*”, “*soil*”, “*GC*” y “*HPLC*”.



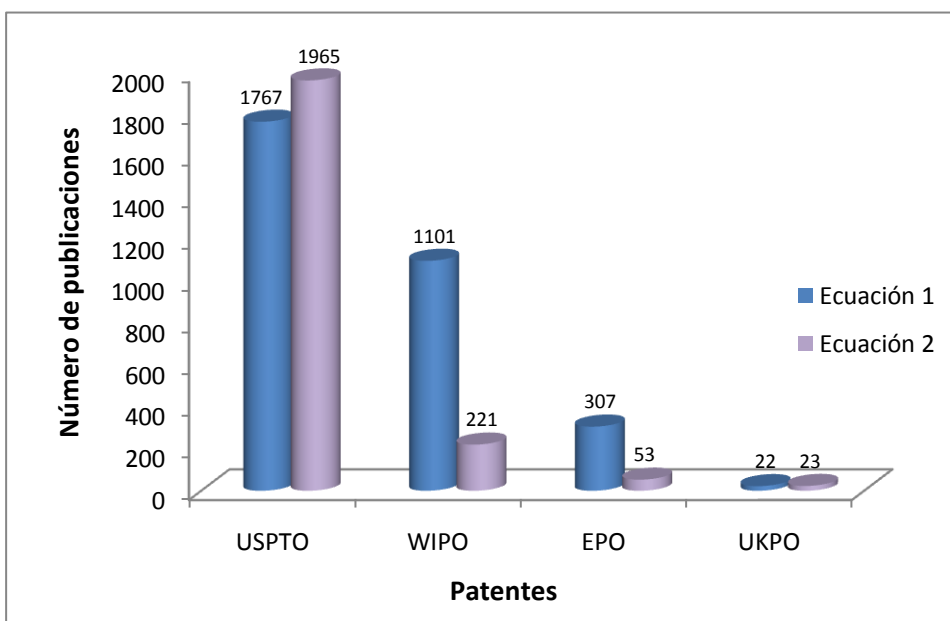
**Figura 5.** Publicaciones sobre el glifosato, por áreas de investigación. Fuente: *ISI Web of Science (WOS)*. Período de observación: 2001-2010. Fecha de consulta: Diciembre de 2010. Palabras clave: “*glyphosate*”, “*water*”, “*soil*”, “*GC*” y “*HPLC*”.

Entre los resultados de las diversas ecuaciones, utilizadas para el estudio cuantitativo, se destacan dos artículos, por el número de sus citas más alto, a saber: “*Analytical methods to determine phosphonic and amino acid group-containing pesticides*”, realizado por *Stalikas, D.C et al.* [43], que contiene una revisión de los métodos y técnicas cromatográficas más recientes para el análisis de los pesticidas glifosato (*GLYP*), glufosinato (*GLUF*) y bialafos (*BIAL*) y sus metabolitos. En segundo lugar, se destaca el artículo “*Effect of glyphosate on the microbial activity of two Brazilian soils*” de *Araújo, ASF et al.* [67], en el cual se estudiaron los cambios en la actividad microbiana de los suelos típicos *Hapludult* y *Hapludox* brasileños *in vitro*, con y sin glifosato aplicado. El glifosato se aplicó a una tasa de 2,16 mg de glifosato/kg del suelo y la actividad microbiana se midió por la respiración del suelo (evolución de  $\text{CO}_2$ ) y diacetato de fluoresceína (FDA) de la hidrólisis, en un plazo de 32 días. Se encontró un aumento de 10-15% en el  $\text{CO}_2$  evolucionado y un aumento del 19,9% en la hidrólisis de la FDA en la

presencia de glifosato en comparación con el mismo tipo de suelo, que no había sido asperjado con el herbicida.

### 3.1.2 Patentes

La información recopilada por la base de datos *SCOPUS* muestra que la mayor parte de las patentes relacionadas con el estudio de glifosato, empleando HPLC y GC, se encuentran en la Oficina de Patentes de Estados Unidos (USPTO) y en la *World Intellectual Property Organization* (WIPO) (**Figura 6**). Estas patentes están enfocadas en el desarrollo de los métodos para la detección sensible de glifosato y sus metabolitos.



**Figura 6.** Patentes sobre glifosato. Fuente: *Scopus*. Periodo de observación 1985-2010. Fecha de consulta: Diciembre de 2010. **Ecuación 1.** TITLE-ABS-KEY("glyphosate") AND TITLE-ABS-KEY("HPLC") **Ecuación 2.** TITLE-ABS-KEY("glyphosate") AND TITLE-ABS-KEY("Gas chromatography")

## 4 DESARROLLO EXPERIMENTAL

La implementación de una metodología analítica para la determinación de residuos de glifosato y su principal metabolito, AMPA, se desarrolló en las siguientes etapas experimentales:

- Estandarización y evaluación de la técnica de derivación del glifosato con los agentes derivatizantes, i.e, anhídrido trifluoroacético (TFAA) y trifluoroetanol (TFE).
- Selección del sistema de detección cromatográfico para el análisis en muestras de agua, del glifosato, como un derivado fluoroacetilado y fluoroetilesterificado.
- Estandarización de la técnica GC/ $\mu$ -ECD para los derivados fluoroacetilados y fluoroetilesterificados de glifosato.
- Determinación de las mejores condiciones del método SPE de intercambio iónico, para la extracción de glifosato y AMPA en las muestras de agua; estudio de la influencia de variables tales como pH, concentración y cantidad de eluyente, mediante un diseño experimental factorial 2<sup>n</sup>, sobre la eficiencia y reproducibilidad de la extracción.
- Implementación de la metodología en muestras de agua adquiridas en la localidad.

### 4.1 MATERIALES Y REACTIVOS

#### 4.1.1 Reactivos y solventes

Se emplearon los siguientes reactivos: Diclorometano (99,9%), ácido clorhídrico (37%), hidróxido de sodio (99%), cloruro de sodio (99,5%) de *Merck* (Darmstadt, Alemania), sulfato de sodio anhídrido ( $\geq 99\%$ ) *Sigma-Aldrich* (Seelze, Germany),

agua HPLC, metanol (99,96%) y acetato de etilo (99,9%) marca *J.T. Baker* (México D.F., México).

#### 4.1.2 Material de referencia certificado

En la **Tabla 4** se reportan las especificaciones comerciales de los patrones de referencia, empleados en este estudio.

**Tabla 4.** Especificaciones del material de referencia certificado.

Pesticida	Pureza, %	Nº. de Lote	Fabricante
Glifosato [N-(fosfometil)glicina]	96,0	09128BJ	<i>Sigma-Aldrich</i> (Milwaukee, Wisconsin EE.UU.)
Ácido aminometilfosfónico (AMPA)	99,0	13023ME	<i>Sigma-Aldrich</i> (Milwaukee, Wisconsin EE.UU.)
Trifluoroetanol (TFE)	≥99,0	1393120	<i>Fluka</i> (Buchs, Switzerland)
Anhídrido trifluoroacético (TFAA)	≥99,0	1449393	<i>Fluka</i> (Buchs, Switzerland)
Amberlite IRA-900	----	MKBB9079J9	<i>Sigma-Aldrich</i> (Milwaukee, Wisconsin EE.UU.)

#### 4.1.3 Material de laboratorio

Se emplearon los siguientes materiales de laboratorio: Balanza analítica AG 285 *Mettler Toledo* (Schwerzenbach, Suiza), Centrífuga CompactII Clay Adams, Rotaevaporador R-200/205 Buchi Rotavapor, Shaker L002051 IKA\*MS 3 basic (Wilmington, EE.UU), Plancha de calentamiento D91126/MR HEI-ESTÁNDAR de Heidolph (Schwabach, Alemania), Estufa secadora PL-325 Fisher Scientific, baño ultrasónico LC-20H de Ultrasonic (Darmstadt, Alemania), pH-metro MPC227 de Mettler Toledo 55 (Schwerzenbach, Suiza), Pipetas volumétricas de 1, 2, 5, 10 mL, Balones aforados de 2, 5, 10, 50, 100 mL, micropipetas de 2-20, 25-250, 100-1000 µL *Brand* (Wertheim, Alemania), puntas plásticas para micropipetas, tubos cónicos de poli(propileno) de 1,5 mL de Brand (Wertheim, Alemania), microjeringas de 25 y 50 µL de *Agilent Technologies* (Melbourne, Australia), tubos de ensayo de 16 x

150 mm de *Scott* (Texas, EE.UU), viales ámbar estándar para SPME de 4 mL; y *septa* de silicona blanca recubierta con teflón; *Supelco* (Bellefonte, EE.UU.).

## **4.2 MUESTRAS DE AGUA**

Las muestras de agua fueron suministradas por el Laboratorio de Consultas Industriales de la Universidad Industrial de Santander (Directora: Luz Yolanda Vargas, Qca, M.Sc.), procedentes de la quebrada de Berlín y un nacimiento de agua en el municipio San Vicente de Chucurí en Santander.

## **4.3 ESTANDARIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA TÉCNICA DE DERIVACIÓN DE GLIFOSATO.**

Debido al carácter polar y anfotérico que presentan el glifosato y AMPA, el análisis por GC requiere un paso previo de derivación, para aumentar su volatilidad y mejorar su estabilidad térmica. Para ello, se han desarrollado diversos métodos que involucran una gran variedad de agentes derivatizantes; por lo cual el proceso de derivación se efectuó basado en pruebas preliminares y en estudios realizados por Deyrup C, *et al* [68], mediante el uso de los agentes derivatizantes, anhídrido trifluoroacético y trifluoroetanol, con el fin de encontrar la mejor opción de derivatización.

La derivación del pesticida y su principal metabolito se llevó a cabo en 2 etapas. En la primera etapa, se determinaron las condiciones adecuadas para derivar una solución del pesticida glifosato con los agentes derivantes antes mencionados, para formar el correspondiente derivado fluoroacetilado y fluoroetilesterificado. En la segunda etapa, se aplicó la metodología establecida al AMPA.

### **4.3.1 Determinación de las condiciones de derivatización.**

De acuerdo con las pruebas preliminares, se determinaron las variables más críticas para el desarrollo de la reacción de derivatización en el análisis de

glifosato y AMPA por GC/ $\mu$ -ECD. Se realizaron experimentos para la reacción simultánea de fluoroacetilación y fluoroetilesterificación (**Tabla 5**), de acuerdo con las variables de mayor influencia en cada proceso.

**Tabla 5.** Variables para la reacción simultánea de fluoroacetilación y fluoroetilesterificación.

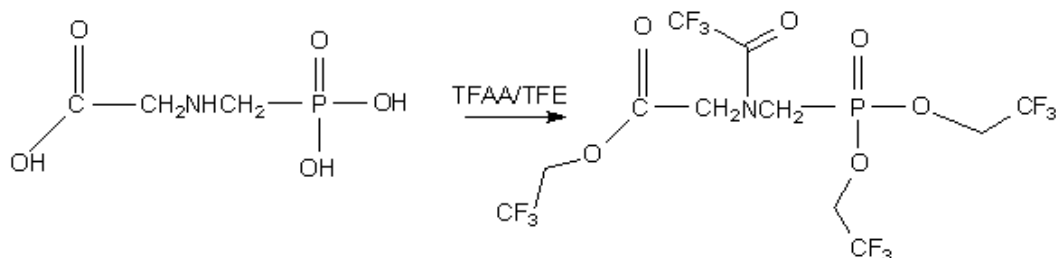
<b>Parámetros evaluados:</b>	
<b>Relación molar glifosato/TFE/TFAA</b>	1:10:10
	1:50:50
	1:100:100
	1:125:125
<b>Temperatura de reacción, °C</b>	60
	80
	100
	120
<b>Parámetros constantes:</b>	
<b>Tiempo de reacción, min</b>	60
<b>Solvente de reconstitución</b>	Acetato de etilo
<b>Relación molar TFE/TFAA</b>	1:1

#### 4.3.2 Formación de los productos fluoroacetilados y fluoroetilesterificados

El procedimiento para la obtención de los derivados del glifosato y AMPA (**Figura 7**), se basó en el proceso simultáneo de acetilación y esterificación, en donde el anhídrido trifluoroacético reacciona con un alcohol para la formación del éster y de la amida, respectivamente.

Para preparar el derivado del glifosato, se tomó una cantidad determinada del pesticida y se colocó en un vial ámbar estándar para SPME de 4 mL, se agregaron los agentes derivatizantes TFAA y TFE, en la relación más adecuada encontrada en los ensayos de variación de las condiciones más críticas. La mezcla se agitó y

se calentó por el intervalo de tiempo establecido (60 min). Pasado este tiempo, la solución resultante se llevó a sequedad con un flujo de N<sub>2</sub> a temperatura ambiente, para eliminar el exceso de reactivos. Posteriormente, el derivado del glifosato se reconstituyó con 1 mL de acetato de etilo y se inyectó 1 μL, para su respectivo análisis por GC/μECD.



**Figura 7.** Reacción de formación del derivado fluoroacetilado -fluoroetilesterificado del glifosato.

#### 4.3.3 Caracterización del derivado.

El derivado fluoroacetilado y fluoroetilesterificado del glifosato obtenido se caracterizó por:

■ **Espectroscopía de infrarrojo.** El espectro infrarrojo se utilizó como herramienta para determinar la identidad de los grupos funcionales del glifosato y su derivado, para ello, se utilizó un espectrofotómetro de infrarrojo Avatar 360 FT-IR, *Nicolet* (Maryland, EE.UU.).

■ **Espectrometría de masas.** Para la identificación, confirmación de la estructura de los derivados y determinación de las mejores condiciones de derivación, se empleó un cromatógrafo de gases HP-5890A Series II (*Hewlett-Packard*, Palo Alto, California, EE.UU.), acoplado a un detector selectivo de masas (MSD) HP 5972 (*Hewlett-Packard*, Palo Alto, California, EE.UU.); con puertos de inyección *split/splitless* e inyección automática para soluciones, HP 7683 Series *Injector*. Se utilizó un sistema de datos MS *ChemStation Rev.* (*Hewlett-Packard*,

Palo Alto, California, EE.UU.). Se empleó una columna capilar HP-5MS de fase estacionaria 5%-fenil-poli(dimetilsiloxano) [30 m x 0,25 mm (d.i.) x 0,25 mm (f.e)].

Se emplearon los siguientes parámetros operacionales: el inyector se operó a 250°C en modo *splitless*. La programación de la temperatura del horno se inició a 70°C por 2 min, con una rampa de calentamiento de 10°C/min hasta 200°C (10 min) @ 10°C/ min hasta 280°C (10 min).

Las temperaturas de la cámara de ionización y de la línea de transferencia fueron 185 y 285°C, respectivamente. La energía de los electrones bombardeantes fue de 70 eV. La corriente iónica total reconstruida y los espectros de masas se obtuvieron por medio de barrido automático de radiofrecuencias a 2,4 scan/s en el rango de masas de m/z 40-520.

#### **4.3.4 Determinación de la estabilidad de los derivados.**

Para determinar la estabilidad de los derivados analizados por GC/μ-ECD, se prepararon los derivados tomando 100 μL de una solución *stock* de 1000 ppm de glifosato y AMPA, se derivatizaron de acuerdo con el procedimiento descrito en la **Sección 4.3.2**; seguidamente, se inyectaron al equipo GC/μ-ECD bajo las mismas condiciones, en diferentes días; para determinar la variación de las áreas de cada uno de los derivados. El almacenamiento de los derivados se realizó en solución con acetato de etilo, a una temperatura de 4°C y protegidos de la luz.

### **4.4 SELECCIÓN DEL SISTEMA DE DETECCIÓN CROMATOGRÁFICO PARA EL ANÁLISIS DE GLIFOSATO Y AMPA EN FORMA DE DERIVADO FLUOROACETILADO Y FLUOROETILESTERIFICADO**

#### **4.4.1 Sistema de detección GC/μ-ECD.**

Los patrones de calibración derivados fueron analizados en un cromatógrafo de gases HP-6890 *Series Plus* (Hewlett-Packard, Palo Alto, California, EE.UU.), con programación electrónica de temperatura y control electrónico de presión de

gases, equipado con un *micro*-detector de captura de electrones ( $\mu$ -ECD), con puertos de inyección *split/splitless*, inyección automática para soluciones, HP 7683 *Series Injector*. El sistema de datos fue el *ChemStation Rev.* (Hewlett-Packard, Palo Alto, California, EE.UU.).

Análisis preliminares permitieron establecer los parámetros de operación de los cromatógrafos utilizados (**Tabla 6**), los cuales posibilitan la determinación simultánea del glifosato y AMPA con una resolución aceptable.

**Tabla 6.** Parámetros cromatográficos empleados para el análisis de los pesticidas por GC/ $\mu$ -ECD.

<b>Parámetro cromatográfico</b>	<b>Descripción:</b>
Columna cromatográfica	Columna capilar de sílice fundida con fase estacionaria de 5%-fenilpoli(dimetil siloxano) de 30 m x 0,25mm (di) x 0,25 $\mu$ m.
Temperatura del detector	285°C
Temperatura del inyector	250°C
Temperatura del horno	
Temperatura inicial:	70°C (2min)
Programación:	10°C/min hasta 200°C (10min) @ 10°C/min hasta 280°C (10min)
Gas de arrastre	Helio, 99,995%, AGA Fano, S.A.
Modo	Flujo constante, 1 mL/min
Gas auxiliar ( <i>Make up gas</i> )	Ar-CH <sub>4</sub> , (1:10), AGA Fano, S.A.
Flujo volumétrico	30 mL/min
Presión del gas de arrastre	23,87 psi
Modo de inyección	<i>Splitless</i>

## 4.5 ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA GC/ $\mu$ -ECD.

### 4.5.1 Estandarización externa usando curva de calibración en dos niveles de concentración.

Se empleó el método de estandarización externa para la cuantificación del glifosato y AMPA, convertidos en sus respectivos derivados fluoroacetilados y fluoroetilesterificados. Para ello, se usaron soluciones de calibración de los derivados en las concentraciones entre 2,5 y 2500 ng/mL y 100 y 2500 ng/mL para el glifosato y AMPA, respectivamente. Cada uno de los patrones de calibración fue analizado por GC usando el detector de *micro*-captura de electrones ( $\mu$ -ECD).

- Solución *stock*: Para los patrones de los derivados se preparó 1 mL de solución *stock* de AMPA y glifosato, derivatizados en acetato de etilo de una concentración de 2000 ppm cada uno de los compuestos, a partir de ésta, se preparó una segunda solución *stock* de 50  $\mu$ g/mL.
- Soluciones de trabajo: Se prepararon mediante la dilución de la solución *stock* 2 para preparar soluciones de 1 mL cuyas concentraciones fueron: 2,5; 5; 10; 25; 50; 75; 100; 250; 500 y 750 ppb y 1; 1,5 y 2,5 ppm.

### 4.5.2 Determinación de las figuras analíticas de mérito

Se determinaron las figuras de mérito, tales como precisión (expresada como repetibilidad y reproducibilidad), nivel mínimo de detección (NMD), nivel mínimo de cuantificación (NMC), rango dinámico lineal (RDL) y sensibilidad.

#### 4.5.2.1 Determinación de la reproducibilidad del proceso de derivación y de los tiempos de retención de cada uno de los derivados

Una vez establecidos los parámetros cromatográficos, se procedió a establecer los tiempos de retención ( $t_R$ ), para cada uno de los analitos derivatizados. Para ello,

se prepararon soluciones *stock* de 1 mg/mL y dilución a 1 µg/mL, para inyectar cada uno de los patrones de los derivados de AMPA y glifosato, al GC/µ-ECD.

La reproducibilidad del proceso se evaluó derivando un patrón de glifosato y AMPA de 1 µg/mL, por triplicado, bajo las condiciones descritas en la **Sección 4.3.2**; se estudió la desviación de los  $t_R$  y de las áreas cromatográficas, medidas en cuentas. Los criterios de calidad están representados en términos del coeficiente de variación (CV, %) [69].

#### **4.5.2.2 Evaluación de la repetibilidad del método para tiempos de retención ( $t_R$ ) y áreas**

Para establecer la repetibilidad de los  $t_R$  y del área cromatográfica medida en cuentas, se inyectó una mezcla de los derivados de AMPA y glifosato, por quintuplicado, al GC/µ-ECD, bajo las condiciones cromatográficas descritas anteriormente.

#### **4.5.2.3 Evaluación del rango dinámico lineal (RDL), la linealidad y la sensibilidad del método cromatográfico**

El RDL y la sensibilidad del método se calcularon empleando la curva de calibración realizada en el intervalo de 2,5 a 2500 ppb y de 100 a 2500 ppb, para el glifosato y AMPA, respectivamente. El RDL se determinó evaluando el rango de concentraciones en que la respuesta del detector es lineal, y se reportó como el coeficiente de correlación de la curva de calibración. La sensibilidad se reportó como la pendiente de la curva, a un nivel de confianza del 95%.

#### **4.5.2.4 Determinación de los límites de detección y de cuantificación.**

Para la determinación del límite de detección, se encontró 3  $Sy/x$  usando las curvas de calibración de los derivados del glifosato y AMPA. El límite de cuantificación se definió como el doble de la concentración del límite de detección, es decir, 6  $Sy/x$ .

#### **4.5.2.5 Evaluación de la exactitud del método**

La exactitud del método desarrollado se evaluó con base en el porcentaje de recuperación. Se realizó un diseño experimental factorial  $2^3$  (Ver **Numeral 4.6**) que permitió seleccionar las condiciones en la etapa de preparación de la muestra, para obtener la recuperación del glifosato y del AMPA más alta.

#### **4.5.2.6 Evaluación de la eficiencia del método**

La eficiencia del método desarrollado se evaluó con base en el porcentaje de recuperación, representado en las áreas del cromatograma, de un triplicado del análisis de una muestra de agua enriquecida con 35  $\mu\text{g/L}$  de glifosato y AMPA, analizadas bajo las condiciones obtenidas en el diseño experimental y de derivación.

### **4.6 DETERMINACIÓN DE LAS MEJORES CONDICIONES DE EXTRACCIÓN SIMULTÁNEA DE GLIFOSATO Y AMPA**

El procedimiento de extracción se efectuó basado en pruebas preliminares y estudios, realizados por Martha Corbera *et al.* [70], Carmen Hidalgo *et al.* [71] y Tomaz Alves de Souza *et al.* [72], mediante el uso de una resina polimérica, macroporosa, de intercambio aniónico, formada por grupos cloruros adheridos al esqueleto del copolímero estireno-divinilbenceno (PS-DVB), *Amberlite IRA 900* (Ver **Tabla 3**). El mecanismo de extracción se basó en la adsorción de los aniones glifosato y AMPA a través de intercambio iónico con los grupos cloruros presentes; este mecanismo implicó una interacción electrostática entre los analitos polares y los grupos iónicos de la resina [70].

#### **4.6.1 Evaluación del solvente de extracción**

Debido a que el eluyente juega un rol importante en el proceso de extracción mediante SPE, se procedió a determinar el mejor solvente de elución evaluando el HCl y NaCl, a una concentración de 0,1 M. Para ello, se enriqueció una muestra

de agua (250 mL) con glifosato y AMPA (50 ppb). El proceso de extracción realizado se observa en la **Figura 8**.

#### 4.6.2 Diseño experimental

Para el análisis de los parámetros de extracción se utilizó un diseño experimental factorial completo a dos niveles ( $2^3$ ), el cual permitió determinar la importancia en la extracción de las variables evaluadas tomando como variable de respuesta del sistema de detección, el área cromatográfica para cada uno de los compuestos.

Las variables de extracción escogidas para el análisis fueron:

- pH de la muestra. Este parámetro es de gran importancia, dado que los analitos presentan un carácter zwitteriónico, por la presencia de grupos funcionales amino, y ácidos fosfónico y carboxílico, que pueden tener carga positiva o negativa, dependiendo del pH de la solución acuosa, con predominio de cargas negativas en un amplio rango de pH [10]. Los valores de pH fueron establecidos teniendo en cuenta el reporte de la literatura, entre 6-8.
- Concentración del eluyente. La concentración de iones cloruro juega un papel importante debido a que el proceso de elución es consecuencia del intercambio iónico de los iones cloruro presentes en la solución por el glifosato retenido en la fase sólida [70].
- Cantidad del eluyente.

Para ello, se eligen los extremos del dominio experimental para cada variable tal como se indica en la **Tabla 7**.

**Tabla 7.** Variables y niveles del diseño experimental factorial  $2^3$ , empleados.

Variable	Niveles		
	Alto	Central	Bajo
(A) pH	8	7	6
(B) [HCl], mM	100	60	10
(C) Cantidad de eluyente, mL	15	10	5

Con el diseño factorial completo, se realizan las posibles combinaciones que pueden formarse con los niveles de los factores a investigar aleatoriamente resultando ocho experimentos, los cuales se muestran en la **Tabla 8**. El tamaño del error experimental fue calculado realizando cinco experimentos adicionales en el punto central. Los ensayos se desarrollaron enriqueciendo muestras de agua de MilliQ.

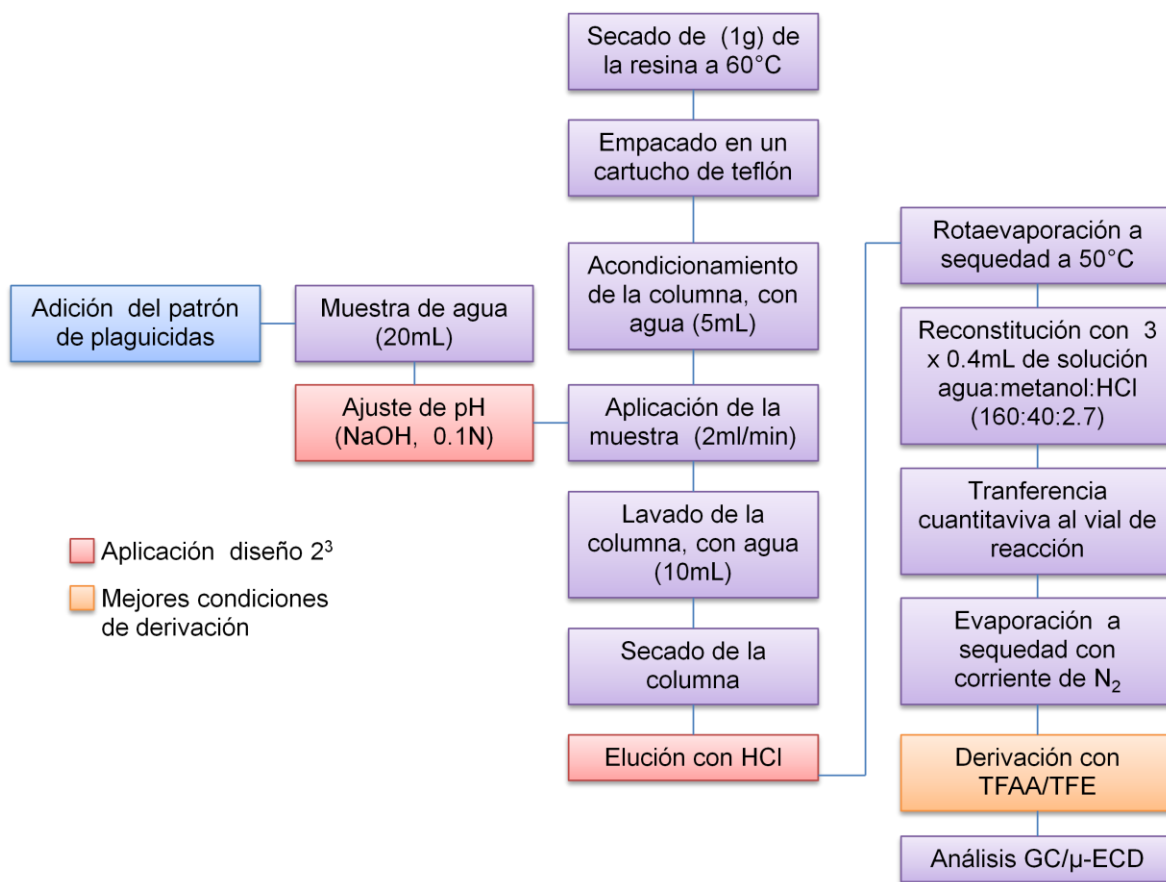
**Tabla 8.** Experimentos realizados para las dos variables del diseño factorial.

N° Experimentos	pH	[HCl], mM	Cantidad de eluyente, mL
1	7	60	10
2	6	100	5
3	8	10	5
4	7	60	10
5	8	100	15
6	8	10	15
7	7	60	10
8	6	10	10
9	6	10	15
10	7	60	10
11	8	100	5
12	6	100	15
13	7	60	10

El análisis de los resultados del diseño experimental se realizó mediante la metodología de superficie de respuesta, usando el *software* estadístico *Statgraphics Centurion XVI*, con licencia de prueba de 30 días.

### 4.6.3 Procedimiento de extracción

En la **Figura 8**, se muestra el procedimiento de extracción para el análisis simultáneo de glifosato y AMPA, previa su derivatización, para el análisis por GC- $\mu$ ECD.



**Figura 8.** Diagrama de flujo para la extracción de AMPA y glifosato.

## 4.7 APLICACIÓN DEL ANÁLISIS A MUESTRAS DE AGUA SUPERFICIAL DE LA LOCALIDAD

Las muestras de agua fueron suministradas por el Laboratorio de Consultas Industriales de la Universidad Industrial de Santander (directora: Luz Yolanda Vargas, Qca, M.Sc.), procedentes de la quebrada de Berlín y un nacimiento de agua del municipio San Vicente de Chucurí en Santander, fueron conservadas a

4°C en botellas de poli(propileno), protegidas de la luz, con el fin de evitar la degradación fotoquímica y la adsorción del glifosato por las paredes internas.

#### **4.7.1 Determinación**

Se desarrolló el proceso de extracción por SPE de intercambio iónico y posterior derivatización, realizando cada una de las extracciones por triplicado, la determinación se efectuó comparando los  $t_R$  con cada uno de los derivados de glifosato y AMPA de referencia, con los de los picos cromatográficos observados en los cromatogramas obtenidos de los extractos de las matrices acuosas, analizados bajo las mismas condiciones cromatográficas.

#### **4.7.2 Cuantificación**

Para la cuantificación, se utilizó el factor de respuesta ( $R_f$ ) establecido del análisis de las soluciones-patrón de los derivados de los pesticidas en diferentes concentraciones.

## 5 ANÁLISIS DE RESULTADOS

### 5.1 ESTANDARIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA TÉCNICA DE DERIVACIÓN DE GLIFOSATO

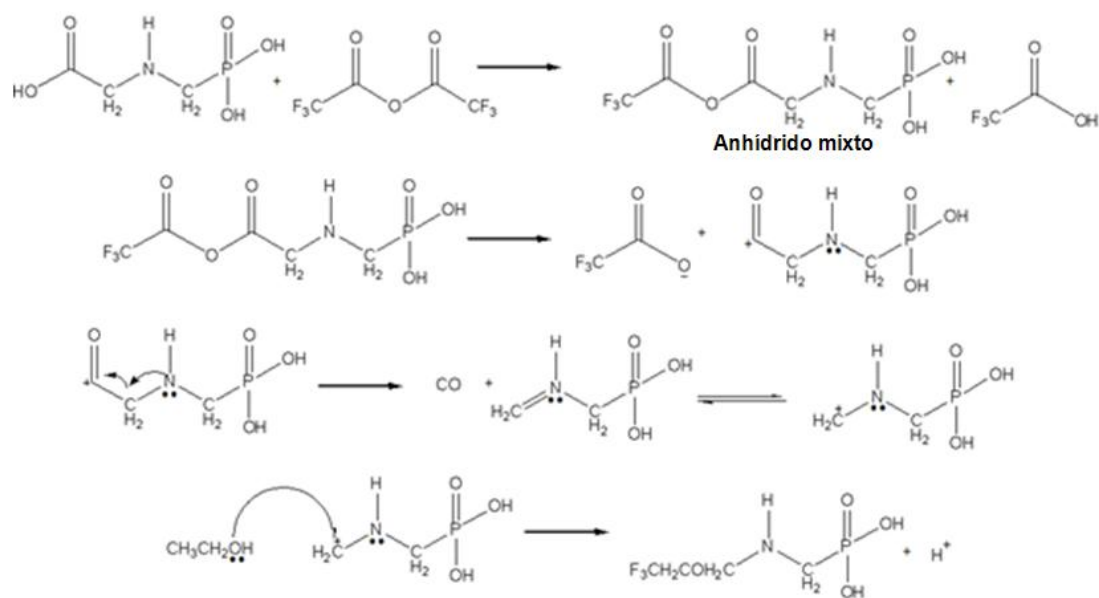
La determinación de glifosato y su producto de degradación, por GC, presentó dificultades, debido a la presencia de grupos polares en su estructura, los cuales disminuyen su volatilidad y les confieren inestabilidad térmica y química, favorecen su degradación en el puerto de inyección, generan la pérdida de la muestra y sus componentes en el sistema cromatográfico. Por tanto, fue necesario modificar los grupos polares a través de reacciones de derivación, con el objetivo de convertir estos compuestos en sustancias más estables y suficientemente volátiles. Para ello, se han desarrollado métodos que involucran la esterificación y acilación simultánea mediante el uso de alcoholes fluorados y anhídridos perfluorados, con los cuales se obtienen compuestos más volátiles, con menor polaridad, y que permiten el uso de detectores específicos, por ej.,  $\mu$ -ECD.

#### 5.1.1 Determinación de las condiciones de derivatización

En el presente trabajo, se empleó TFAA y TFE para derivar el glifosato y el AMPA; las variables estudiadas en el proceso de derivación fueron: cantidades de agentes derivantes y temperatura de reacción; se dejaron constantes el tiempo (60 min) y el tipo de disolvente (acetato de etilo). Cada una de las pruebas se realizó por duplicado, según el procedimiento descrito en el **Numeral 4.3.2** de la Parte Experimental.

La derivación se desarrolló inicialmente con el patrón de glifosato y, al establecer las condiciones más adecuadas de la reacción, éstas se aplicaron al AMPA, debido a que las estructuras de ambos compuestos son similares y se presenta la misma tendencia de transformación química.

En los estudios realizados por Deyrup C *et al.* [68], se reportó el mecanismo de la reacción de esterificación de los compuestos, que transcurre a través de la formación de un enlace tipo éster entre los ácidos fosfónico y carboxílico del pesticida y el alcohol, donde se sustituye el protón de los ácidos presentes en la molécula de glifosato, por el grupo  $\text{CH}_2\text{CF}_3$  del alcohol. La esterificación del carbonilo se acompaña de la producción del carboxilato a través de la formación de un anhídrido mixto, y posterior heterólisis, para formar el ion acilio, para luego originarse un ataque nucleofílico por el alcohol para la formación del respectivo éster (**Figura 9**) [68]. La reacción de N-acilación de los compuestos se realizó mediante un enlace tipo amida entre la amina secundaria del pesticida y el anhídrido trifluoroacético, donde se sustituyó el protón de la amina por el grupo trifluoroacetilo del anhídrido (**Figura 7**).

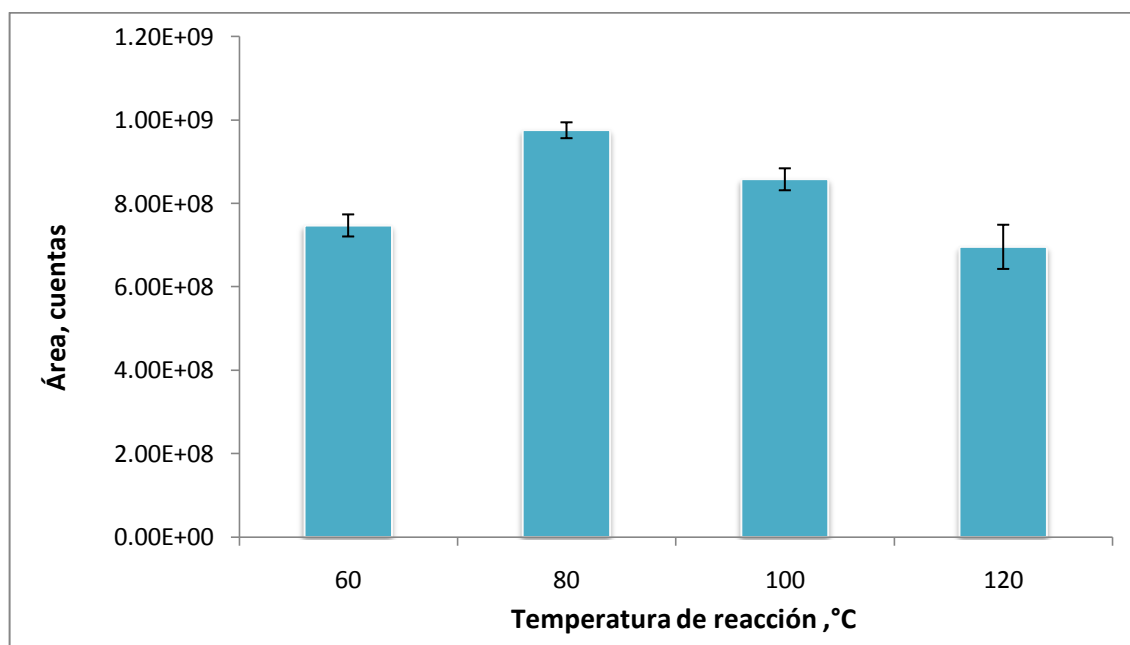


**Figura 9.** Reacción de formación de los derivados fluoroacetilado y fluoroetilesterificado del glifosato y AMPA [68].

Con el fin de escoger las mejores condiciones para la derivación de los compuestos, la temperatura fue una de las variables, que se estudió, para mejorar este procedimiento.

En la **Figura 10**, se evidencia que el área cromatográfica correspondiente al derivado trifluoroesterificado-acetilado del glifosato fue mayor a una temperatura de reacción de 80°C. A temperaturas más altas los agentes derivantes se volatilizan y escapan del sistema, lo que disminuye el porcentaje de derivación.

La reacción se llevó a cabo en viales ámbar estándar para SPME de 4 mL con *septum* de silicona blanca recubierta con teflón, debido a que un menor volumen del recipiente favoreció la interacción de los agentes derivantes con los analitos y redujo la pérdida de los mismos por volatilización; además, las mezclas de reacción obtenidas presentaron menor contaminación en comparación con las realizadas en tubos cónicos de poli(propileno). En esta etapa, se utilizó la relación molar 1:100, tiempo de reacción de 60 min y disolvente de reconstitución acetato de etilo.

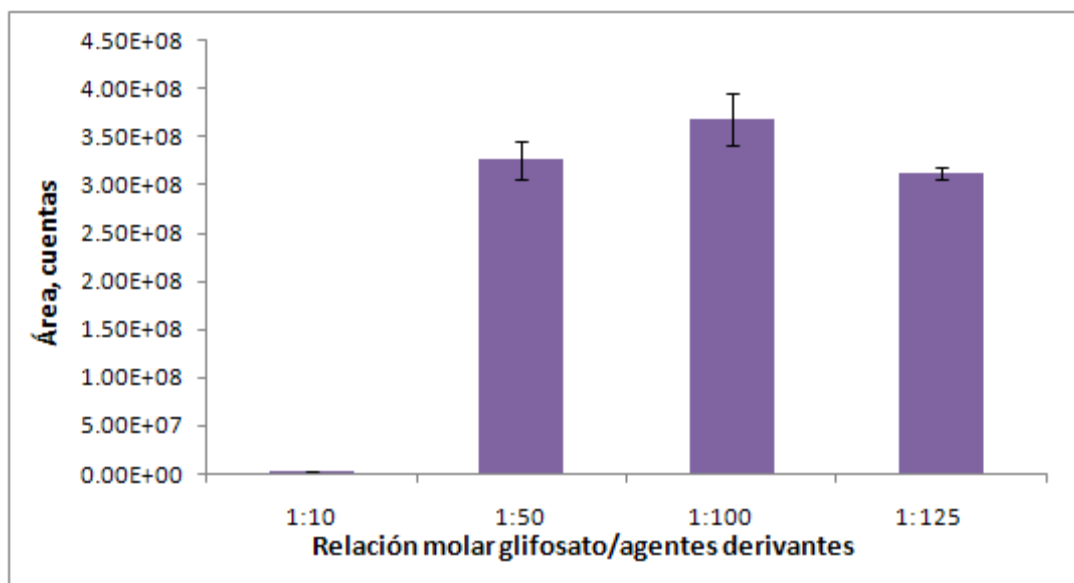


**Figura 10.** Estudio del efecto de la temperatura para la derivación de glifosato. Tiempo 60 min y relación molar glifosato/TFAA/TFE 1:100:100.

Con la temperatura de reacción seleccionada, se evaluaron las relaciones molares entre el pesticida glifosato y los agentes derivatizantes TFAA y TFE. Para ello, se

probaron diferentes relaciones estequiométricas analito:agentes derivantes, a saber: 1:10, 1:50, 1:100 y 1:125, manteniendo constante la relación 1:1 entre los derivantes. Posteriormente, el derivado se analizó por GC-MS, bajo las condiciones cromatográficas establecidas en el **Numeral 4.3.3** de la Parte Experimental.

En la **Figura 11**, se observan las áreas cromatográficas del derivado preparado bajo las mismas condiciones de reacción y análisis cromatográfico, con variación en las relaciones molares. Se evidencia, que la relación molar glifosato/TFAA/TFE 1:100:100 permitió obtener mayor cantidad del derivado. Para relaciones molares por debajo de 1:10:10, se dificultó la adición de los reactivos, particularmente, el anhídrido trifluoroacético, debido a su alta volatilidad.



**Figura 11.** Estudio de la relación molar pesticida/agentes derivatizantes para el glifosato. Temperatura 80°C, tiempo 60 min y relación molar TFAA/TFE 1:1.

Finalmente, las mejores condiciones establecidas para la derivación de glifosato con TFAA y TFE, que luego se aplicaron para el AMPA, fueron:

Relación molar pesticida/TFAA/TFE: 1:100:100

Tiempo de reacción: 60 min

Temperatura: 80°C

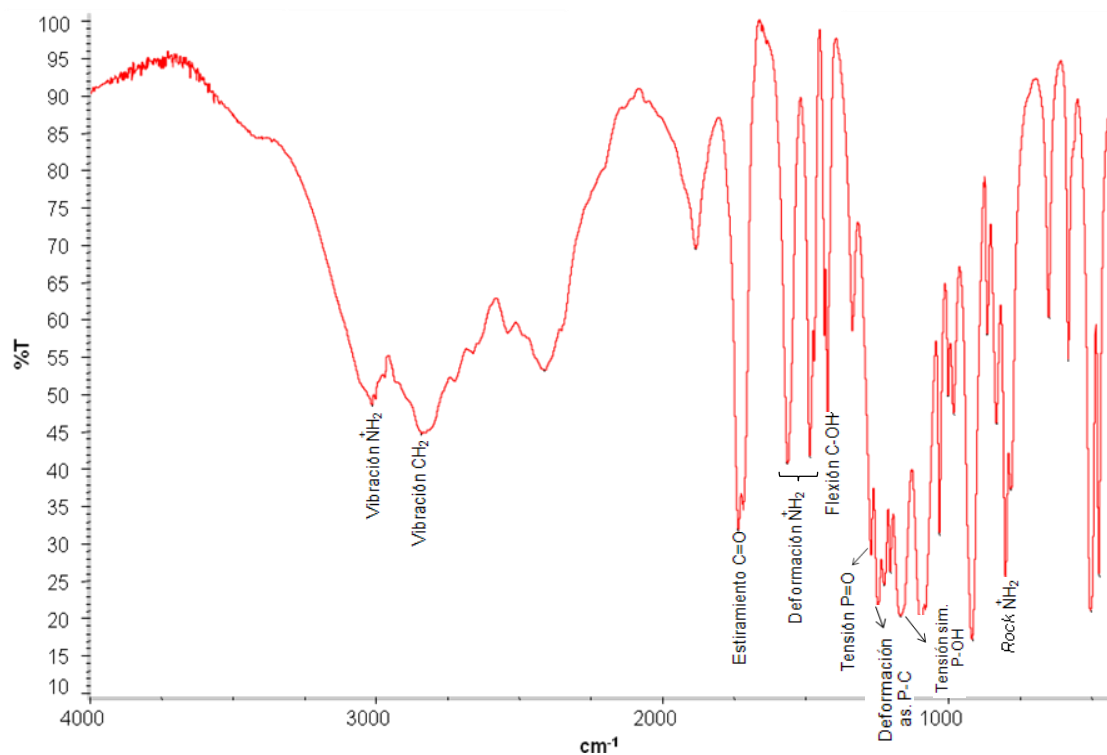
Disolvente de reacción: acetato de etilo

Relación molar TFAA/TFE: 1:1

Recipiente de reacción: viales ámbar estándar para SPME de 4 mL y *septum* de silicona blanca recubierta con teflón.

### 5.1.2 Caracterización por espectroscopía de infrarrojo de los derivados obtenidos del glifosato.

La espectroscopia de infrarrojo (IR) fue una herramienta útil para caracterizar los derivados trifluoroesterificados-acetilados del glifosato obtenidos en el estudio realizado, bajo las mejores condiciones de reacción, debido a que permitió realizar la confirmación de los grupos funcionales en la estructura. En la **Figura 12**, se presenta el espectro infrarrojo de la N-(fosfonometil)glicina utilizada durante el desarrollo del proyecto.



**Figura 12.** Espectro infrarrojo de la N-(fosfonometil)-glicina.

Dado que el glifosato es una molécula trifuncional, ya que presenta en su estructura ácidos carboxílico, fosfónico y amina, las regiones de absorción en el espectro IR (**Tabla 9**) características se atribuyen a vibraciones simétrica, asimétrica y deformación del metileno en la regiones de 2840, 1468,1430 y 1334  $\text{cm}^{-1}$ ; tensiones asimétricas y simétricas del *N-H*, vibraciones de deformación y movimiento de balanceo (*rocking*), producto de la amina secundaria protonada ( $\text{NH}_2^+$ ) en 3013, 1560, 1485 y 796  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente.

En las regiones 1733,1262 y 1203  $\text{cm}^{-1}$  se observan las bandas de absorción debido a las vibraciones de tensión de los grupos *C=O*, *C-O* y *C-OH*. En 1422  $\text{cm}^{-1}$  se encuentra la banda de absorción debido a la flexión del *C-O-H* y en 915  $\text{cm}^{-1}$ , la vibración es resultado de la flexión del grupo *O-H* fuera del plano. La vibración de estiramiento del grupo *P=O*, aparece como una banda fuerte en la región de 1285  $\text{cm}^{-1}$ , además de una deformación asimétrica del grupo *P-C* en la región de 1269  $\text{cm}^{-1}$ , y vibraciones simétricas y asimétricas del *P-O-H* en 1160 y 1093  $\text{cm}^{-1}$  [73-75].

**Tabla 9.** Bandas de absorción en el espectro IR del glifosato [73].

<b>Grupo funcional</b>	<b>Región de absorción, <math>\text{cm}^{-1}</math></b>
<b>Ácido carboxílico (-CO<sub>2</sub>H)</b>	
C=O estiramiento	1733
C-OH flexión	1422
C-O estiramiento	1262
-OH flexión fuera del plano	915
<b>Metil (-CH<sub>2</sub>)</b>	
-CH <sub>2</sub> deformación	1468,1430,1334
<b>Amina secundaria protonada (NH<sub>2</sub><sup>+</sup>)</b>	
NH <sub>2</sub> <sup>+</sup> deformación	1560,1485
NH <sub>2</sub> <sup>+</sup> <i>rock</i>	796

---

### Ácido fosfónico (-PO<sub>3</sub>H')

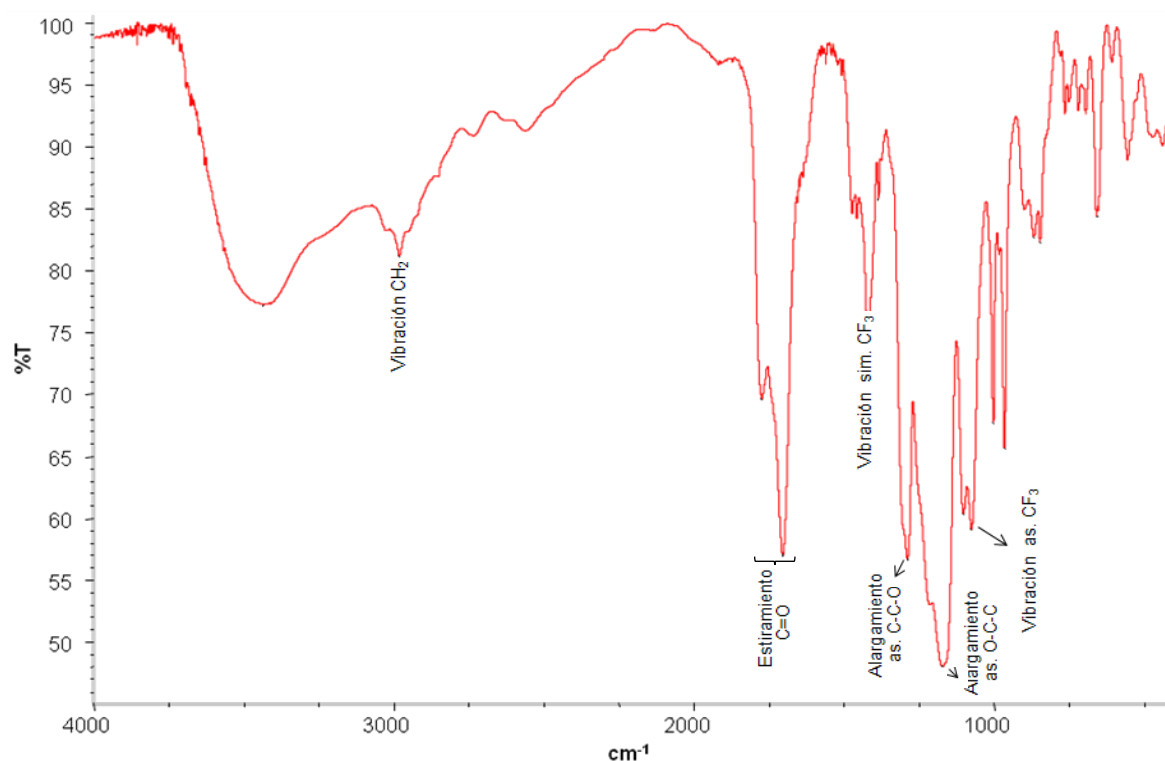
---

P=O tensión	1285
P-C deformación asimétrica	1269
P-OH tensión simétrica	1160

---

#### 5.1.2.1 Derivado trifluoroesterificado-acetilado

El derivado que se obtuvo por reacción del glifosato con anhídrido trifluoroacético y trifluoroetanol, presenta en su estructura los grupos éster y amida, producto de la esterificación de los ácidos carboxílico y fosfónico por reacción con el alcohol TFE y acetilación de la amina secundaria con TFAA. En la **Figura 13** se presenta el espectro IR del derivado obtenido, bajo las condiciones de reacción anteriormente descritas.

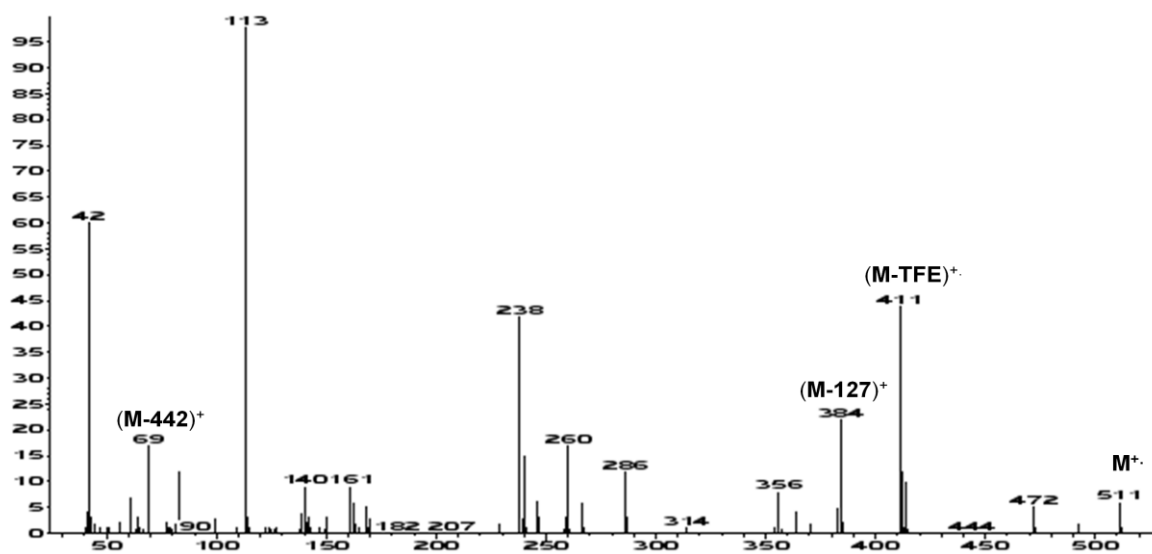


**Figura 13.** Espectro infrarrojo del derivado trifluoroesterificado-acetilado del glifosato (sintetizado con una relación molar glifosato/TFAA/TFE de 1:100:100, temperatura 80°C y tiempo 60 min).

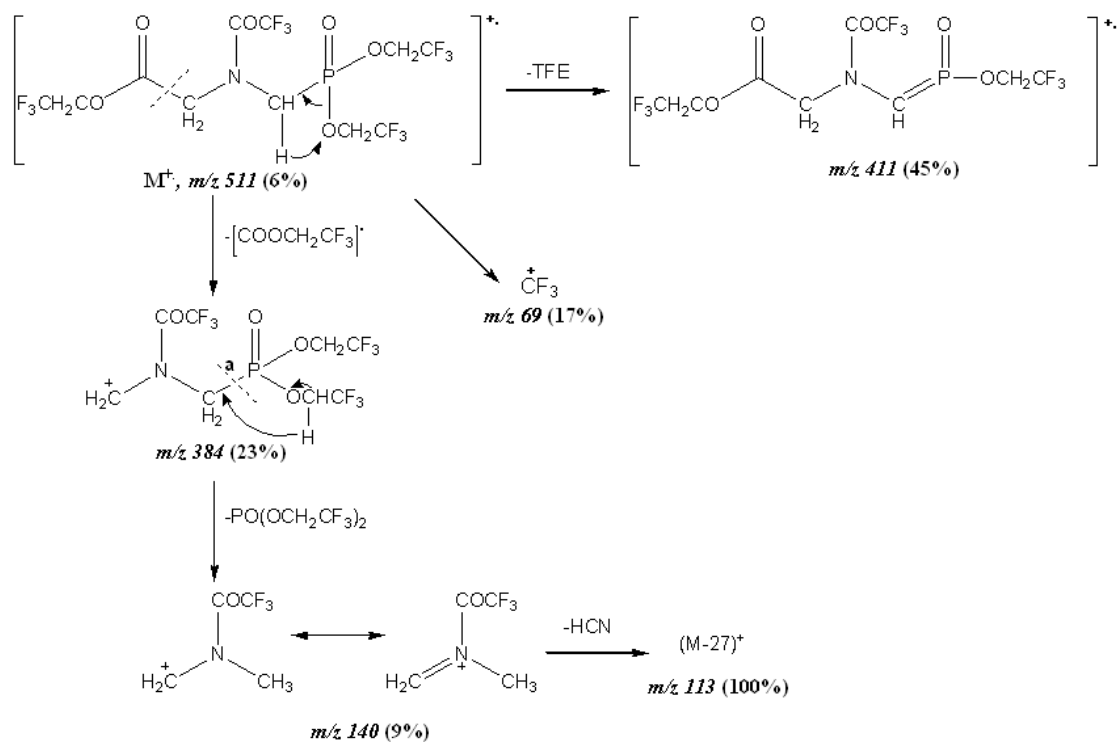
En el espectro IR del derivado (**Figura 13**), se observa una banda de absorción muy intensa en la región de 1400 a 1050  $\text{cm}^{-1}$  debido a vibraciones de estiramiento simétrico y asimétrico de  $\text{CF}_3$ , producto de la elevada electronegatividad del flúor presente en la estructura, el cual forma enlaces polares con los átomos de carbono con amplios momentos dipolares. En la región de 1780-1700  $\text{cm}^{-1}$ , la banda de absorción se debe al alargamiento  $\text{C=O}$ , producto de la amida y el éster formados por reacción con los grupos amina y ácido carboxílico, respectivamente, estas bandas presentan un corrimiento debido a la electronegatividad que presenta el flúor, provocando un desplazamiento de +50  $\text{cm}^{-1}$ . En 1240-1200  $\text{cm}^{-1}$ , la banda es ocasionada por el alargamiento asimétrico de los enlaces  $\text{C-C}$  y  $\text{C-O}$ , unidos al carbono carbonilo, y en 1200-1100  $\text{cm}^{-1}$  la banda de absorción se atribuye a la vibración que involucra el oxígeno del éster y los carbonos cercanos en la cadena hidrocarbonada unida a él, en esta vibración, los enlaces  $\text{O-C}$  y  $\text{C-O}$  son alargados asimétricamente [74,75]. En las regiones de 3013, 2410, 1560, 1485, 1422 y 915  $\text{cm}^{-1}$ , se observa la ausencia de bandas de absorción, correspondientes a estiramientos y/o flexiones simétricas y asimétricas de los grupos  $\text{NH}_2^+$ ,  $\text{P-O-H}$ ,  $\text{C-OH}$  y  $\text{OH}$ , presentes en el IR del glifosato (**Figura 13**), lo cual indica que el producto de la reacción corresponde al derivado; sin embargo la confirmación de su obtención se realiza mediante el análisis GC-MS.

### 5.1.3 Caracterización por espectrometría de masas del derivado obtenido

La espectrometría de masas MS, acoplada a la cromatografía de gases, es una de las técnicas analíticas más útiles, ya que permite obtener la máxima información sobre la estructura molecular del derivado obtenido con las reacciones de esterificación y acilación del glifosato y su principal metabolito de degradación, el AMPA. En las **Figura 14** y **16** se muestran los espectros de masas obtenidos experimentalmente de los derivados del glifosato y AMPA, respectivamente.

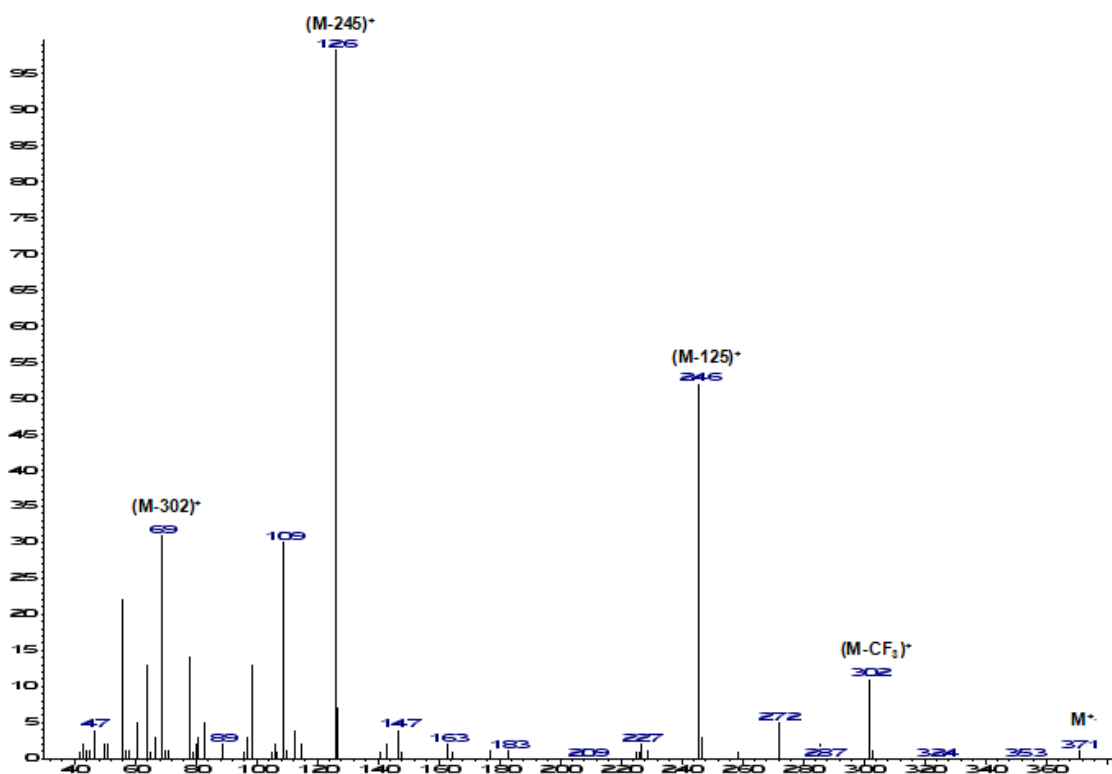


**Figura 14.** Espectro de masas de derivado trifluoroesterificado acetilado del glifosato obtenido experimentalmente. Impacto de electrones, 70 eV.

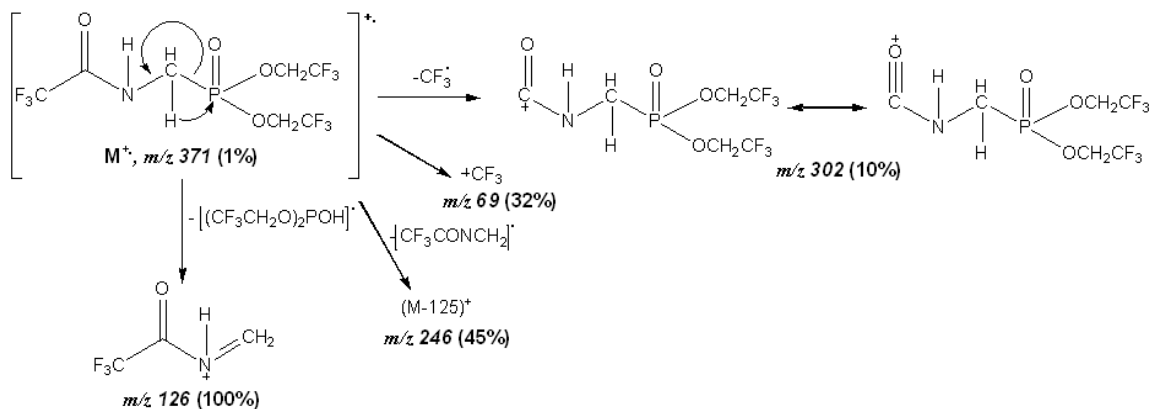


**Figura 15.** Ruta de fragmentación propuesta para la formación de los iones  $m/z$  411, 384, 140, 113 y 69, en el espectro de masas del derivado del glifosato. Impacto de electrones, 70 eV.

En el espectro de masas del producto de derivatización del glifosato, se observan las señales en  $m/z$  511 y 113, correspondientes al ion molecular  $M^{+}$ , la cual presenta una baja intensidad (6%), y al pico base, respectivamente. El ion en  $m/z$  411, con una intensidad de 45%, se forma por la pérdida de una molécula de trifluoroetanol, producido por una transposición de un átomo de H; la aparición de este fragmento confirma la esterificación de los grupos hidroxilo del ácido fosfónico presente en la molécula. El ion en  $m/z$  384 (23%) es producto de la pérdida del radical  $[\text{COOCH}_2\text{CF}_3]^{\bullet}$ , por ruptura  $\beta$ , del ion molecular, acompañada de la respectiva formación del ion onio del átomo de nitrógeno, lo que confirma la esterificación del grupo COOH. La pérdida sucesiva del radical  $[\text{COOCH}_2\text{CF}_3]^{\bullet}$  y la molécula neutra  $\text{PO}(\text{OCH}_2\text{CF}_3)_2$  conduce a la formación de los iones en  $m/z$  140 (9%), el cual confirma la acetilación del grupo amino, y el ion  $m/z$  69 (17%) producto de una ruptura alfa con respecto al grupo ceto.



**Figura 16.** Espectro de masas del derivado trifluoroesterificado acetilado del AMPA obtenido experimentalmente. Impacto de electrones, 70 eV.



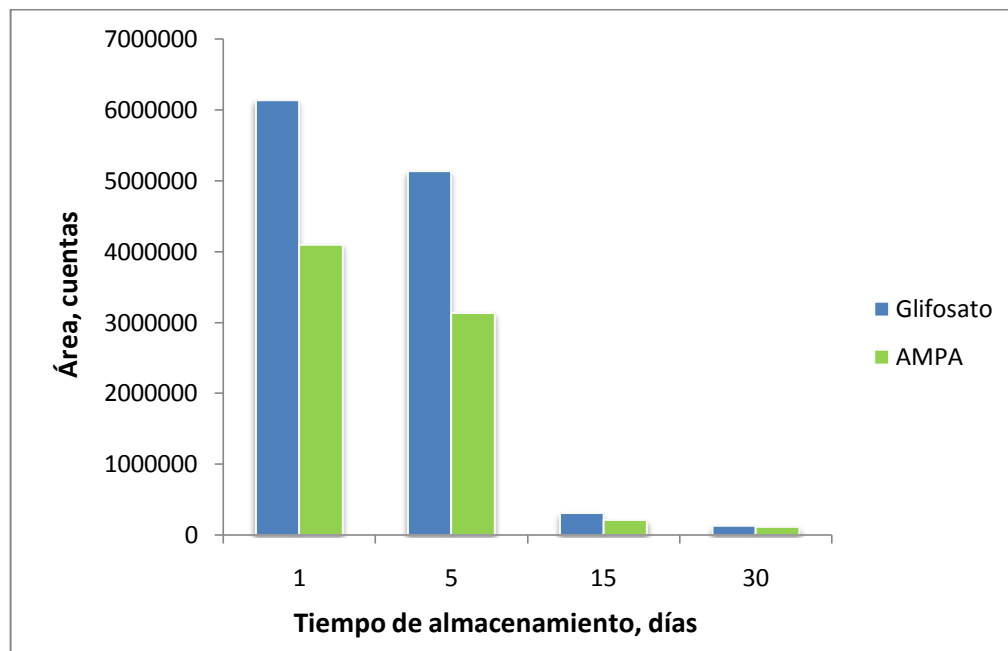
**Figura 17.** Ruta de fragmentación propuesta para la formación de los iones  $m/z$  302, 246, 126 y 69, en el espectro de masas del derivado del AMPA. Impacto de electrones, 70 eV.

En el espectro de masas del derivado del AMPA, se observa el ion molecular en  $m/z$  371 (1%) y el ion característico en  $m/z$  126 (100%) debido a la trasposición de hidrógeno y posterior pérdida del radical  $[(CF_3CH_2O)_2POH]^+$ , el cual indica la acetilación del grupo amino. Los iones en  $m/z$  246 (45%) y 302 (10%) confirman, de manera significativa, la esterificación de los grupos hidroxilo del ácido fosfónico, productos de la pérdida de un radical  $[CF_3]^+$  y  $[CF_3CONCH_2]^+$ , respectivamente. El ion en  $m/z$  69 (32%) es producto de una ruptura alfa con respecto al grupo ceto de la amida.

#### 5.1.4 Estabilidad de los derivados

El estudio de la degradación de los derivados, se llevó a cabo con un patrón de glifosato y AMPA (3 mg/mL), derivatizado bajo las condiciones descritas en el **Numeral 4.3.2**. El patrón en acetato de etilo, se almacenó en un vial ámbar, se refrigeró a 4°C y se aisló de la luz. Durante un periodo de un mes, los derivados se inyectaron en el equipo GC/ $\mu$ -ECD bajo las mismas condiciones en diferentes días, con el fin de determinar la variación de las áreas en función del tiempo de almacenamiento. En la **Figura 18**, se muestra el proceso de degradación de los

derivados, lo cual indica que éstos deben ser analizados inmediatamente después de ser preparados, para que los resultados sean confiables y reproducibles.



**Figura 18.** Estabilidad de los derivados glifosato y AMPA durante su almacenamiento (Temperatura 4°C, protegido de la luz, solvente acetato de etilo).

## 5.2 IMPLEMENTACIÓN DE LA METODOLOGÍA DE ANÁLISIS POR GC/ $\mu$ -ECD

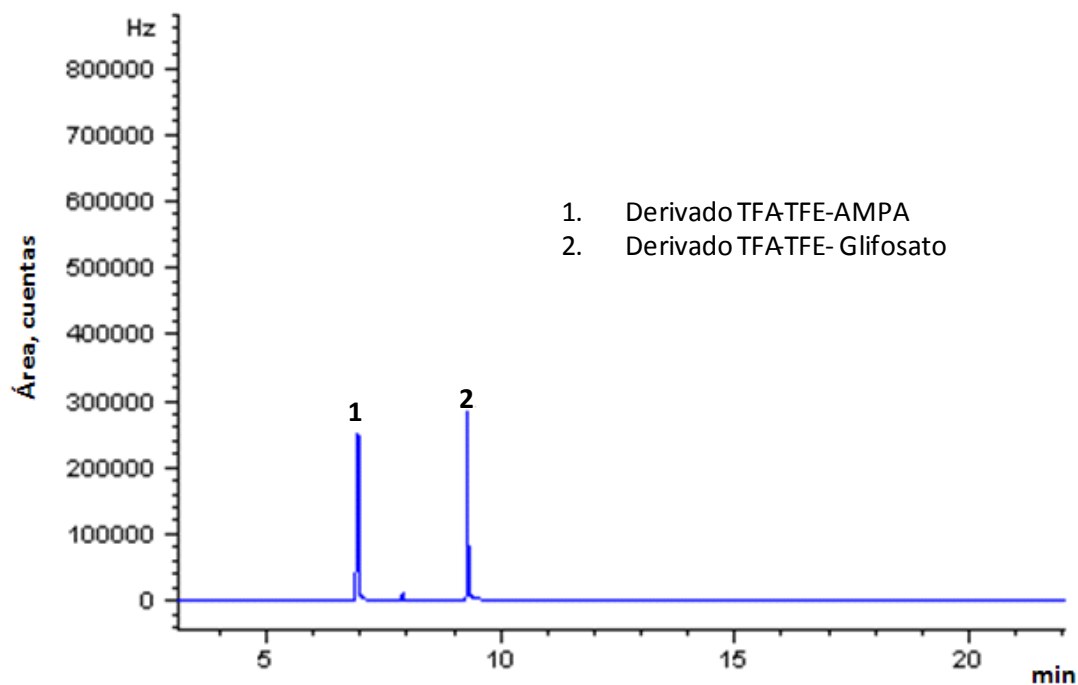
### 5.2.1 Determinación de las figuras analíticas de mérito

El procedimiento para la determinación de las figuras analíticas de mérito del método se describió en el **Numeral 4.5.2**.

#### 5.2.1.1 Determinación de la reproducibilidad en el proceso de derivación y los tiempos de retención de cada uno de los derivados

Una vez establecidas las condiciones cromatográficas, con las cuales se consiguió la determinación simultánea de los derivados de glifosato y AMPA, con una buena resolución, como se muestra en la **Figura 19**, se procedió a determinar los tiempos de retención; para ello, se realizó el estudio de la reproducibilidad del

proceso de derivación al derivar un patrón de AMPA y glifosato, como se describe en el **Numeral 4.5.2.1**. En la **Tabla 10**, aparecen en orden de elución los compuestos, sus tiempos de retención, áreas cromatográficas medidas en cuentas, y la evaluación de la reproducibilidad expresada mediante el coeficiente de variación (CV).



**Figura 19.** Cromatograma de los derivados trifluoroesterificados-acetilados de glifosato y AMPA analizados, obtenido por GC/ $\mu$ -ECD en una columna DB-5 (30 m x 0,25mm (di) x 0,25 $\mu$ m). Inyección: *splitless*. Volumen: 1 $\mu$ L.

**Tabla 10.** Tiempos de retención de los derivados AMPA y glifosato analizados, obtenidos por GC/ $\mu$ -ECD, en una columna DB-5 (30 m x 0,25mm (di) x 0,25 $\mu$ m), y evaluación de su reproducibilidad.

Compuesto	$t_R$ , min			$t_R$ promedio, min	s	CV,%
	1	2	3			
<b>AMPA</b>	6,81	6,78	6,76	6,79	0,02	0,28
<b>Glifosato</b>	9,46	9,45	9,47	9,46	0,01	0,07

**Tabla 11.** Áreas cromatográficas de los derivados AMPA y glifosato analizados por GC/ $\mu$ -ECD, en una columna DB-5 (30 m x 0,25mm (di) x 0,25 $\mu$ m), y evaluación de su reproducibilidad.

Compuesto	Área, cuentas			Área promedio, cuentas	S	CV, %
	1	2	3			
<b>AMPA</b>	3,75E+04	4,21E+04	3,88E+04	4,0E+04	2,37E+03	6,01
<b>Glifosato</b>	3,32E+04	3,58E+04	3,43E+04	3,5E+04	1,32E+03	3,82

Para la metodología de derivación implementada, los resultados obtenidos en las **Tablas 10** y **11**, muestran la alta reproducibilidad de los  $t_R$  y las áreas cromatográficas, al no presentar desviaciones significativas, ya que los coeficientes de variación obtenidos se encuentran entre 0,07 y 0,28%, para los  $t_R$ , y 3,82 y 6,01%, para las áreas. En ambos casos, los CV no superaron los valores aceptables por las Normas de las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL); las cuales establecen un CV máximo aceptado del 5%, para los  $t_R$ , y 10%, para las áreas.

#### **5.2.1.2 Evaluación de la repetibilidad del método para los tiempos de retención y áreas cromatográficas.**

La repetibilidad del método cromatográfico se estimó al inyectar glifosato (1  $\mu$ L, 75 ppb) y AMPA (500 ppb) -puntos de la curva de calibración-, por quintuplicado. Los resultados para la evaluación del método, en cuanto a los  $t_R$  y áreas cromatográficas de picos, se observan en las **Tablas 12** y **13**, respectivamente.

**Tabla 12.** Repetibilidad de los tiempos de retención en el método desarrollado por GC/ $\mu$ -ECD para los derivados trifluoroesterificados-acetilados.

Compuesto	$t_R$ , min	$t_R$ promedio, min	S	CV, %
<b>AMPA</b>	6,78	6,77	1,01E-02	0,15
	6,76			
	6,77			
	6,78			
	6,75			
<b>Glifosato</b>	9,464	9,464	7,07E-04	0,01
	9,463			
	9,464			
	9,464			
	9,465			

**Tabla 13.** Repetibilidad de las áreas en el método desarrollado por GC/ $\mu$ -ECD para los derivados trifluoroesterificados-acetilados.

Compuesto	Área, cuentas	Área promedio, cuentas	S	CV, %
<b>AMPA</b>	1,28E+04	1,2E+04	1,10E+03	8,96
	1,04E+04			
	1,29E+04			
	1,30E+04			
	1,26E+04			
<b>Glifosato</b>	1,13E+03	1,12E+03	2,59E+01	2,30
	1,13E+03			
	1,12E+03			
	1,15E+03			
	1,08E+03			

En las **Tablas 12** y **13**, se observa, que las mediciones, de  $t_R$  y áreas cromatográficas de los derivados, no presentaron desviaciones considerables; se concluye que el método implementado es preciso. Para los tiempos de retención

los coeficientes de variación estuvieron entre 0,01 y 0,15 % y, para las áreas, entre 2,30 y 8,96 %. En ambos casos, el CV no superó el 10%, indicando que el método es repetible.

### 5.2.1.3 Evaluación de la linealidad y sensibilidad del método

Mediante la curva de calibración para cada uno de los derivados trifluoroesterificados-acetilados del AMPA y glifosato (**Anexo 5**), se evaluaron la linealidad y la sensibilidad del método. Los resultados obtenidos (**Tabla 14**) muestran para cada compuesto, la pendiente de la curva (factor de respuesta,  $R_f$ ) que mide la sensibilidad del método y su desviación ( $S_{Rf}$ ); el coeficiente de determinación  $R^2$ , que mide el ajuste de la curva para el intervalo de concentraciones evaluado (2,5 - 2500  $\mu\text{g/L}$ , para el glifosato, y 100 - 2500  $\mu\text{g/L}$ , para el AMPA).

**Tabla 14.** Linealidad y sensibilidad del método GC/ $\mu$ -ECD.

Compuesto	$R_f$	$t^*S_{Rf}$	b	$R^2$	RDL, ppb
<b>AMPA</b>	42,841	5,19	-10632	0,9960	250-2500
<b>Glifosato</b>	23,806	3,09	-1405,3	0,9967	100-2500
	16,008	1,82	-13,992	0,9986	2,5-100

$R_f$ : Pendiente       $S_{Rf}$ : Desviación estándar de la pendiente      b: Ordenada en el origen      t: 2,31 para un 95% de confianza. (Curva de calibración  $y = R_f + b$ )

En el intervalo de concentraciones evaluado se observó una buena linealidad para los derivados de glifosato y AMPA (coeficiente de determinación  $R^2 = 0,996-0,9996$ ). Por tanto, el RDL del método implementado para el glifosato fue de 2.5–2500 ppb y para el AMPA en el nivel de concentraciones de 250-2500 ppb. La sensibilidad del método se determinó como la pendiente de la curva de calibración ( $R_f$ ); se encontró que el método presenta una sensibilidad alta debido a que sus pendientes fluctúan entre 42,841-23,806; la incertidumbre en las mediciones

realizadas para cada analito no superaron el 5,19; lo cual otorga confiabilidad a los resultados obtenidos.

#### 5.2.1.4 Determinación de los niveles de detección (NMD) y cuantificación (NMC)

Para la determinación del NMD y NMC, se siguieron los criterios descritos en el **Numeral 4.5.2.4**. En la **Tabla 15** se observan los NMD y NMC para el glifosato y AMPA derivatizados.

**Tabla 15** Niveles mínimos de detección y cuantificación del método GC/ $\mu$ -ECD.

Compuesto	NMD, ppb	NMC, ppb
AMPA	50,2	100,5
Glifosato	3,1	6,3

Los niveles mínimos de cuantificación alcanzados para el método implementado están por debajo de los LMR establecidos por la EQGs, USEPA y el estándar nacional y guía para pesticidas en agua de Alemania, de 280 y 700  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente.

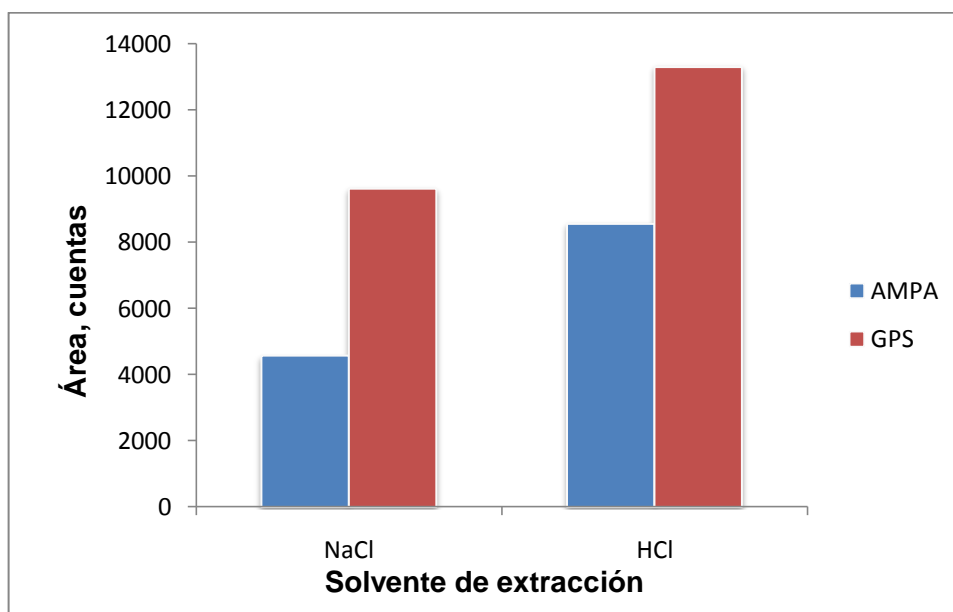
Los bajos niveles mínimos de detección obtenidos para el AMPA y glifosato derivatizados, se deben a que la respuesta del detector depende del número de grupos electronegativos en la molécula. Por tanto, aquellos pesticidas que poseen mayor número de átomos de flúor, presentan los niveles de detección más bajos, como es el caso del glifosato el cual al ser derivado posee en su estructura 12 átomos de flúor, estableciéndose un NMD bajo de 3,1 ppb.

### 5.3 DETERMINACIÓN DE LAS MEJORES CONDICIONES DE EXTRACCIÓN SIMULTÁNEA DE GLIFOSATO Y AMPA

El procedimiento para elegir las mejores condiciones para la extracción simultánea de glifosato y AMPA de muestras de agua se describió en el **Numeral 4.6** de la Parte Experimental.

#### 5.3.1 Evaluación del solvente de extracción

Para determinar el solvente requerido para la extracción de glifosato y de AMPA mediante un intercambio iónico, se usaron como eluyentes el ácido clorhídrico (HCl) y cloruro de sodio (NaCl), a una concentración de 0,1 N. En la **Figura 20**, se muestran las áreas obtenidas después del proceso de extracción y posterior derivación.



**Figura 20.** Efecto del solvente de elución en el proceso de extracción SPE de intercambio iónico.

Como se aprecia en la **Figura 20**, el ácido clorhídrico presenta un mayor efecto que el NaCl en el proceso de extracción SPE de intercambio iónico para el AMPA

y glifosato, por la evidencia de las mayores áreas obtenidas en el análisis cromatográfico. Estas condiciones posteriormente se aplicaron en el diseño experimental, para la determinación de los efectos significativos en el proceso.

### 5.3.2 Diseño experimental

En la **Tabla 16** se aprecia el tratamiento de los datos del diseño experimental, basado en la determinación de los efectos significativos; mediante la comparación del tamaño de cada efecto con la variación causada por el error experimental, el cual se midió con el quintuplicado del punto central, donde el CV fue el parámetro estadístico utilizado. Se encontraron valores entre 4,74 y 6,51% para el AMPA y el glifosato, respectivamente.

**Tabla 16.** Medida del error experimental de los pesticidas analizados, para la evaluación del diseño factorial  $2^3$ .

Compuesto	Área, cuentas	Área promedio, cuentas	S	CV, %
AMPA	2,64E+05	2,8E+05	1,84E+04	6,51
	2,65E+05			
	3,05E+05			
	2,96E+05			
	2,84E+05			
Glifosato	4,32E+05	4,5E+05	2,15E+04	4,74
	4,54E+05			
	4,34E+05			
	4,65E+05			
	4,83E+05			

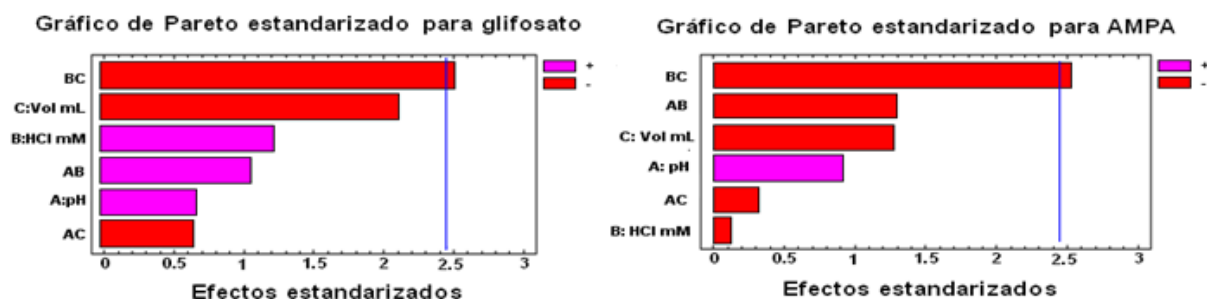
#### 5.3.2.1 Análisis de la varianza

Los resultados del diseño experimental fueron analizados mediante la metodología de ANOVA con ayuda del *software* estadístico *Statgraphics Centurion XVI*, con licencia de prueba de 30 días. Con este diseño se estudian 7 efectos: tres

principales y tres interacciones dobles y una interacción triple para el glifosato y el AMPA.

El análisis de varianza ANOVA, para la variable de respuesta, medida en área cromatográfica (cuentas) se encuentra en el **Anexo 6**. Allí se resume el análisis estadístico realizado para el diseño experimental. Para cada factor se muestran dos términos: la **Razón-F** que mide la contribución de cada factor en la variación de la respuesta y el **Valor-P**, el cual es una medida de la significancia estadística de cada uno de estos valores, de manera que para este estudio los factores considerados como significativos en el proceso de extracción SPE de intercambio iónico, son aquellos que presentan un valor  $p < 0,05$  que es el valor de probabilidad o nivel de confianza del 95% [76].

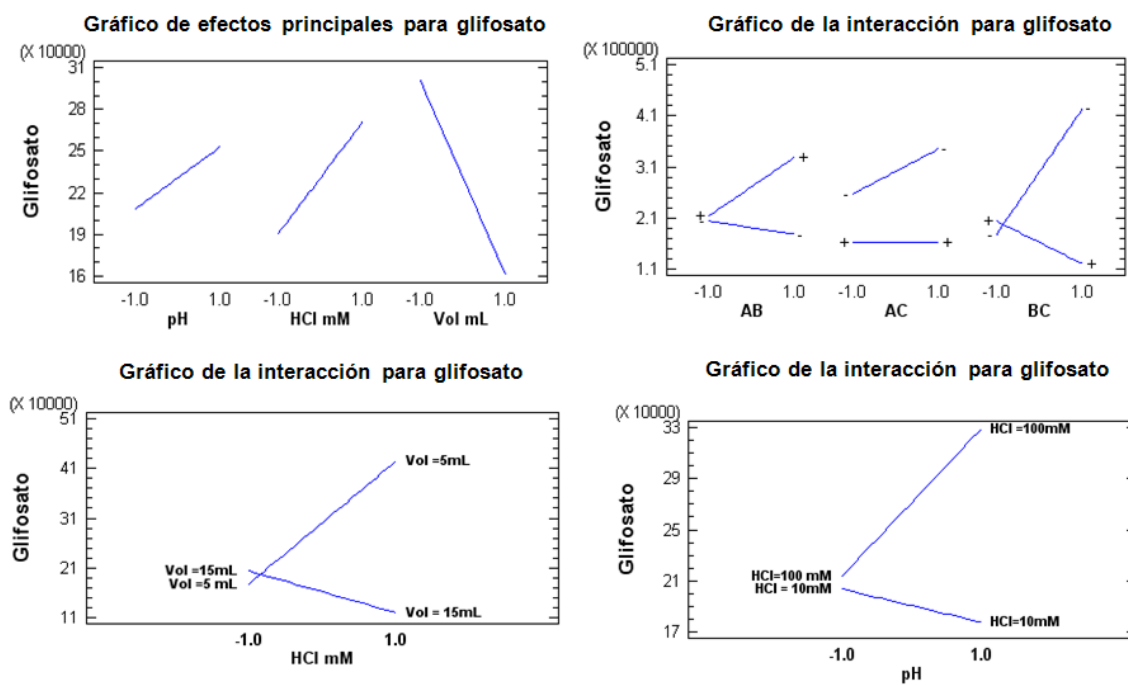
En la tabla ANOVA (**Anexo 6**) y los diagramas de Pareto de la **Figura 22**, se observa que el factor significativo para el proceso de SPE de intercambio iónico del AMPA y del glifosato, es la interacción de segundo orden entre la concentración de HCl (B) y el volumen de elución (C); ningún otro factor resultó ser significativo en el diseño, sin embargo, el pH (A) fue indispensable debido a la naturaleza de la matriz trabajada, el carácter zwitteriónico de los analitos y por la interacción de este factor con el solvente de elución (AB).



**Figura 21.** Diagramas de Pareto de efectos para el AMPA y glifosato.

En la **Figura 22** se observan los efectos de interacción AB, entre el pH y la concentración de HCl y la interacción BC, del volumen de elución de HCl y su

concentración. En este tipo de interacciones la respuesta de un factor depende drásticamente del nivel del otro factor. La interpretación gráfica de estas interacciones (**Figura 22**), muestra que las mejores condiciones de extracción para el glifosato fueron: pH de 8, concentración de HCl de 100 mM y un volumen de elución de 5 mL. Sin embargo, en el AMPA las interacciones reflejan (**Anexo 7**) como mejores condiciones de extracción un pH de 6, una concentración de HCl de 100 mM y un volumen de elución de 5 mL.



**Figura 22.** Efectos principales y de interacción de cada uno de los factores, en el proceso de extracción del glifosato.

Al unificar estas condiciones, según las gráficas de interacciones y las de los efectos principales, se pueden determinar las mejores condiciones para la extracción simultánea del glifosato y del AMPA.

### 5.3.2.2 Mejores condiciones de extracción

Para el análisis simultáneo de AMPA y de glifosato fue necesario minimizar la pérdida de los analitos durante el proceso de SPE de intercambio iónico. Sin

embargo, no fue posible trabajar en el punto óptimo para cada uno de los compuestos de interés (**Tabla 17**).

**Tabla 17.** Condiciones favorables para la extracción de AMPA y de glifosato.

Compuesto	pH	[HCl], mM	Volumen de elución, mL
AMPA	6	100	5
Glifosato	8	100	5

Sin embargo, se establecen las condiciones que permiten extraer la mayoría de los compuestos, y para el glifosato y el AMPA, las mejores condiciones para recuperar la mayor cantidad de los analitos en el proceso de SPE de intercambio iónico, se indican en la **Tabla 18**.

**Tabla 18.** Condiciones para la extracción de AMPA y de glifosato.

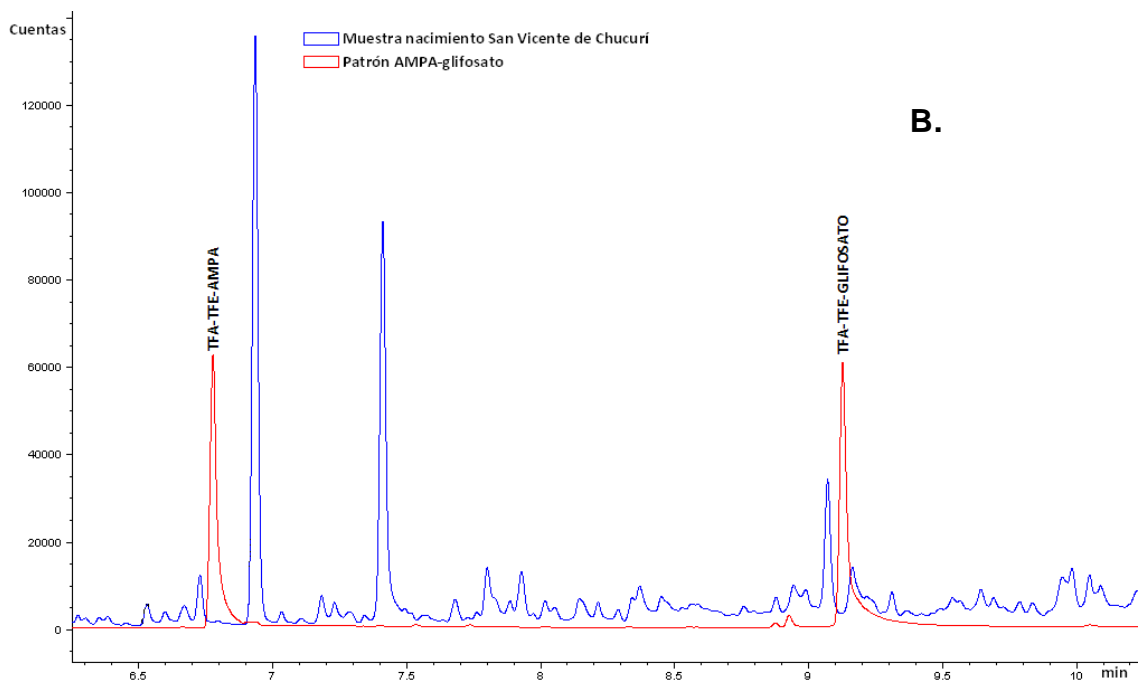
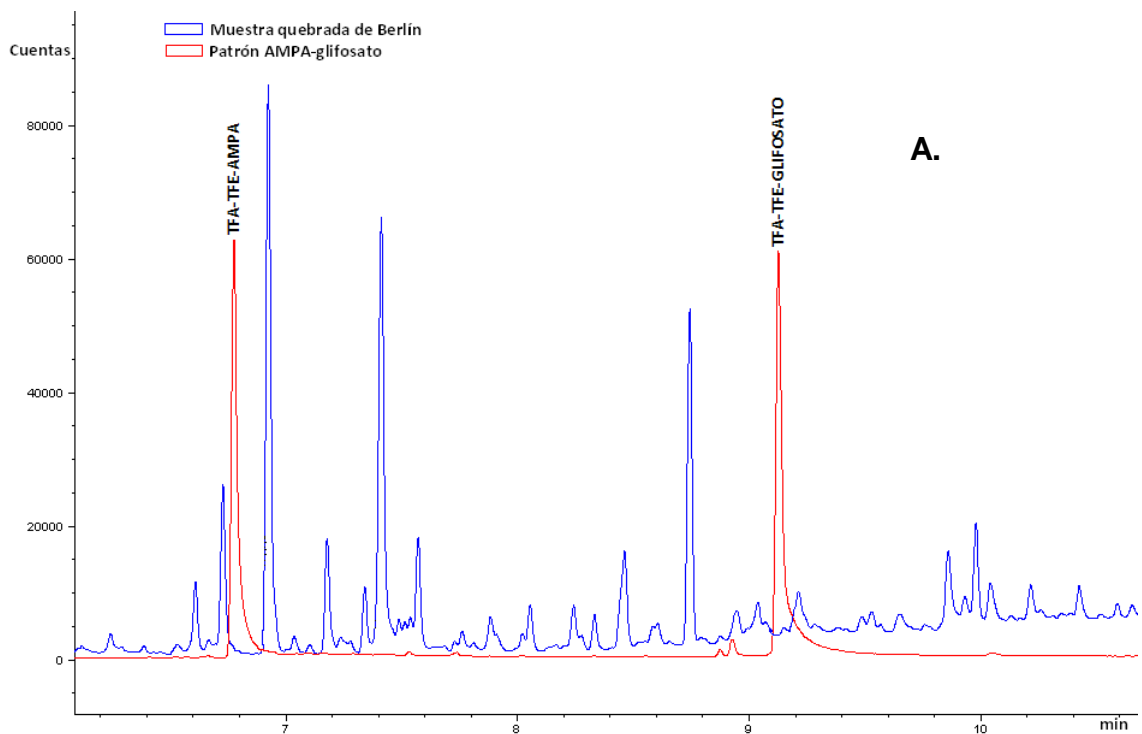
Variable	Especificaciones
pH	7
Concentración HCl, mM	100
Volumen elución, mL	5

De manera, que los posteriores procedimientos de extracción fueron realizados de la siguiente forma: el pH de la muestra se ajustó a 7 y el acondicionamiento del cartucho empacado con la resina de intercambio *AMBERLITE IRA-900* se realizó mediante la adición de 10 mL de agua, sin dejar secar el cartucho se adicionaron 20 mL de la muestra, el lavado se realizó con agua (15 mL) y, posteriormente, se eluyó con 5 mL de ácido clorhídrico a una concentración de 100 mM. Posteriormente, el extracto recibió el tratamiento descrito en la **Sección 4.6.3** de la Parte Experimental, para su posterior análisis por CG/ $\mu$ -ECD.

#### 5.4 ANÁLISIS DE MUESTRAS DE AGUA SUPERFICIAL

El análisis de muestras reales se realizó por GC/ $\mu$ -ECD; se emplearon las mejores condiciones de extracción SPE de intercambio iónico definidas en la **Sección 5.3** de la Parte de Análisis, y posterior derivación con TFAA-TFE, bajo las condiciones establecidas. Las muestras de agua fueron suministradas por el Laboratorio de Consultas Industriales de la Universidad Industrial de Santander, procedentes de la quebrada de Berlín y un nacimiento de agua en el municipio San Vicente de Chucurí en Santander.

Las muestras fueron extraídas por el proceso descrito anteriormente, por triplicado. Los tiempos de retención de los picos cromatográficos observados de los extractos, se compararon con los  $t_R$  del AMPA y de glifosato de referencia, analizados bajo las mismas condiciones cromatográficas. En las dos muestras analizadas no se determinó glifosato o su producto de degradación AMPA, por encima de los niveles mínimos de detección del sistema empleado. En la **Figura 23**, se muestran y se comparan los perfiles cromatográficos de las dos muestras analizadas con el de un patrón de AMPA y de glifosato derivados.



**Figura 23.** Perfiles cromatográficos comparados con el patrón de AMPA y de glifosato derivados, obtenidos por GC/ $\mu$ -ECD de las muestras procedentes de: **A.** Quebrada de Berlín y **B.** Nacimiento de San Vicente de Chucurí.

#### 5.4.1 Evaluación de la eficiencia del método

La muestra procedente de la quebrada de Berlín (muestra A) fue enriquecida con 35 ppb de una solución *stock* de AMPA y de glifosato, mientras que la muestra de agua del nacimiento de San Vicente de Chucurí (muestra B) se enriqueció con 35 ppb de glifosato en su forma comercial *Round-up*. Se desarrolló el procedimiento de extracción propuesto en el proyecto para el análisis simultáneo de estos analitos (**Sección 5.3**) y para el análisis por GC/ $\mu$ -ECD se desarrolló el procedimiento de derivación al extracto (**Sección 5.1.1**). Los resultados obtenidos de la eficiencia del método desarrollado, evaluada como porcentaje de recuperación, de las muestras de agua enriquecidas, aparecen en la **Tabla 19**.

**Tabla 19.** Porcentaje de recuperación (%), evaluado con matrices de agua enriquecidas con el producto comercial *Round-up* y una solución *stock* de AMPA y de glifosato.

Pesticidas	Recuperación agua destilada enriquecida con 35 ppb de <i>stock</i> de AMPA y glifosato, %	Recuperación muestra A, enriquecida con 35 ppb de <i>stock</i> de AMPA y glifosato, %	Recuperación muestra B, enriquecida con 35 ppb de <i>Round up</i> , %
AMPA	70	51	----
Glifosato	106	96	98

El efecto de la matriz en la eficiencia del método de extracción SPE de intercambio iónico, influye de manera significativa sobre el porcentaje de recuperación de los analitos, debido a la carga de iones presentes en las aguas naturales, que pueden interferir en el proceso de intercambio entre los iones glifosato y AMPA y la resina catiónica.

## 6 CONCLUSIONES

1. Se implementó un método por cromatografía de gases con *micro*-detector de captura de electrones ( $\mu$ -ECD) para la determinación simultánea del glifosato y su principal producto de degradación AMPA, empleando derivación química.
2. Se desarrolló la técnica de derivación del glifosato con anhídrido trifluoroacético y trifluoroetanol. Se logró derivar su producto de degradación, el ácido aminometilfosfónico (AMPA). Las mejores condiciones de derivación fueron: relación molar glifosato/agente derivantes 1:100:100; relación molar TFAA/TFE 1:1; temperatura 80°C; tiempo de reacción 60 min y como disolvente se usó acetato de etilo.
3. Mediante el cumplimiento de los parámetros establecidos en las Buenas Practicas de Laboratorio (BPL), respecto a las reproducibilidades de los tiempos de retención,  $t_R$ , (CV 0,07 – 0,28%, tanto para el glifosato como para el AMPA) y las áreas cromatográficas (CV 3,82 – 6,01% para el glifosato y AMPA, respectivamente); así como los altos coeficientes de determinación para los derivados en las curvas de calibración externa ( $R^2 > 0,99$ ), se garantizó la realización reproducible del análisis de AMPA y glifosato, mediante la obtención de los respectivos derivados trifluoroesterificados-acetilados por GC/ $\mu$ -ECD.
4. Los niveles mínimos de cuantificación y detección alcanzados para los derivados fluoroacetilados y fluoroesterificados de glifosato (NMD: 3,1 ppb y NMC: 6.3 ppb) y AMPA (NMD: 50,2 ppb y NMC: 100,5 ppb), están por debajo de los LMR establecidos por la EQGs, USEPA y el estándar nacional y guía para pesticidas en agua de Alemania, de 280 y 700 ppb, respectivamente; lo cual indica que la técnica implementada, es bastante

sensible, selectiva y adecuada para el control de glifosato y su productos de degradación.

5. Se implementó la técnica de extracción en fase sólida (SPE), para la recuperación del glifosato y su principal producto de degradación, en muestras de aguas superficiales o potables. Las condiciones establecidas para SPE de intercambio iónico, se basaron en las mejores condiciones encontradas bajo el diseño experimental 2<sup>3</sup> [pH 7; HCl (5mL, 100mM)], las cuales permitieron obtener aceptables porcentajes de recuperación para el glifosato (106, 96 y 98% en agua destilada, muestra A y muestra B, respectivamente) y AMPA (70 y 51%, en agua destilada y muestra A, respectivamente).
6. El método desarrollado se aplicó a la extracción, identificación y cuantificación de glifosato y de AMPA en muestras de agua suministradas por el Laboratorio de Consultas Industriales de la quebrada de Berlín y el nacimiento de agua de San Vicente de Chucurí. En estas muestras no se detectó ninguno de los analitos estudiados por encima de los niveles mínimos de detección de la técnica implementada.

## 7 RECOMENDACIONES

1. En el presente trabajo, se observó cómo los derivados de AMPA y glifosato con TFAA y TFE, son poco estables en solución durante el proceso de su almacenamiento; por tanto, para asegurar la reproducibilidad y confiabilidad de los resultados hay que preparar patrones de los derivados por separado, purificarlos y estudiar su estabilidad durante el almacenamiento.
2. Se recomienda desarrollar un diseño de experimento en el método de derivación, utilizando diversos agentes derivatizantes, con el propósito de mejorar la sensibilidad de los analitos y la respuesta de detector, esto con el fin de lograr NMD y NMC más bajos que los obtenidos para el glifosato (NMD: 3,1 ppb y NMC: 6.3 ppb) y el AMPA (NMD: 50,2 ppb y NMC: 100,5 ppb).
3. Se recomienda optimizar el procedimiento de extracción SPE de intercambio iónico para el AMPA, aumentando sus porcentajes de recuperación (70 y 51% en agua destilada y la muestra de la quebrada de Berlín, respectivamente), ya que las condiciones escogidas en el proceso fueron establecidas con el blanco de muestra. Por tanto, es interesante estudiar el efecto matriz de las aguas superficiales o naturales, cargadas por los diferentes iones que interfieren en el proceso de intercambio iónico con la resina *AMBERLITE IRA-900*.
4. Debido a la fuerte y rápida unión a los sedimentos y partículas, especialmente, en aguas poco profundas y turbulentas, o en aquellas que llevan grandes cargas de partículas, remueven el glifosato de la columna de agua, por tanto, se recomienda implementar la metodología para la determinación de este analito y su principal metabolito en sedimentos y suelos, con el fin de realizar su determinación en este tipo de matriz.

## 8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CORBERA, M. Desenvolupament de metodologia analítica per a la determinació de glifosat i adjuvants Girona 2007. Trabajo de grado. Universitat de Girona. Departament de Química. Unitat de Química Analítica.
2. SÁNCHEZ, J., ETTIENE, G. y RIVAS, Z. Determinación de glifosato en muestras de agua en la cuenca del río Catatumbo. *Ciencia*, **2005**, 13(2), pp. 211–217.
3. SOLOMON, K., ANADÓN, A., CERDEIRA, A., MARSHALL J., y SANÍN, L. Estudio de los efectos del programa de erradicación de cultivos ilícitos mediante la aspersión aérea con el herbicida glifosato (PECIG) y de los cultivos ilícitos en la salud humana y en el medio ambiente. Informe preparado para la Comisión Interamericana para el Control del Abuso de Drogas (CICAD), División de la Organización de los Estados Americanos (OEA), Washington, D.C., Estados Unidos de América, **2005**.
4. ESLAVA, P., RAMÍREZ, W. y RONDÓN, I. Sobre los efectos del glifosato y sus mezclas: impacto en peces nativos. Instituto de Acuicultura de los Llanos (IALL). Instituto de Investigaciones de la Orinoquia Colombiana (IIOC). Universidad de los Llanos, **2007**.
5. AULING, R., Development of LC-MS method for determination of glyphosate residues in wheat. Tartu 2009. Master's Thesis. University of Tartu. Faculty of Science and Technology. Institute of Chemistry.
6. NIVIA, E., Fumigación con glifosato: Efectos nocivos (2005). [Sitio en Internet]. Disponible en: [www.peaceobservatory.org/es/7/fumigacion-con-glifosato-efectos-nocivos](http://www.peaceobservatory.org/es/7/fumigacion-con-glifosato-efectos-nocivos). Acceso: 6 de enero 2010.
7. HEREDIA, D. y SÁNCHEZ, F. Regulaciones internacionales del glifosato. [Sitio en Internet]. Disponible en: [www.biodiversidadla.org/Principal/Otros\\_Recursos/Boletin\\_de\\_la\\_Red\\_por\\_una\\_America\\_Latina\\_Libre\\_de\\_Transgenicos/Regulaciones\\_internacionales\\_del\\_glifosato](http://www.biodiversidadla.org/Principal/Otros_Recursos/Boletin_de_la_Red_por_una_America_Latina_Libre_de_Transgenicos/Regulaciones_internacionales_del_glifosato). Acceso: 6 de enero 2010.
8. Comisión Nacional del Medio Ambiente – región metropolitana. Guía para el control y prevención de la contaminación industrial; fabricación de plaguicidas, insecticidas, pesticidas y fungicidas. SANTIAGO de CHILE. AGOSTO 1998; 6p.

9. RAMÍREZ, J., y LACASAÑA, M. Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición. *Arch Prev Riesgos Labor*, **2001**, 4(2), pp. 67-75.
10. LOSADA, C. Desenvolupament de mètodes de preconcentració emprant membranes líquides suportades i extracció en fase sòlida per a la determinació de l'herbicida glifosat i el seu metabòlit ampa en aigües naturals. Universitat de Girona, Catalunya, España [Sitio en Internet] Disponible en: [www.tdr.cesca.es/TESIS\\_UdG/AVAILABLE/TDX-0817104134215//tcr1.pdf](http://www.tdr.cesca.es/TESIS_UdG/AVAILABLE/TDX-0817104134215//tcr1.pdf). Acceso: 6 de enero 2010.
11. Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes: Herbicidas. [Sitio en Internet] Disponible en: [www.casafe.org/usep/Herbicidas.pdf](http://www.casafe.org/usep/Herbicidas.pdf). Acceso: 26 de julio 2010.
12. Identificación del herbicida glifosato, propiedades y toxicidad [Sitio en Internet]. Disponible en: [www.dne.gov.co/recursosuser/documentos/Doc\\_tecnicos/glifosato.pdf](http://www.dne.gov.co/recursosuser/documentos/Doc_tecnicos/glifosato.pdf). Acceso: 2 de noviembre de 2009.
13. POSSIDÔNIO, O. e RODRIGUES, T. Glifosato: propiedades, toxicidade, usos e legislação. *Quim. Nova*, **2002**, 25 (4), pp.589-593.
14. WHO/FAO Data sheets on pesticides. N<sup>o</sup>. 91. Glyphosate. Sitio en Internet]. Disponible en: [www.inchem.org/documents/pds/pds/pest91\\_e.htm](http://www.inchem.org/documents/pds/pds/pest91_e.htm). Acceso: 16 de junio 2010.
15. SHEALS, J., GRANSTRÖM, M., SJÖBERG, S., PERSSON, P. Coadsorption of Cu(II) and glyphosate at the water-goethite ( $\alpha$ -FeOOH) interface: molecular structures from FTIR and EXAFS measurements. *J. Colloid Interface Sci.*, **2003**, 262, pp.38-47.
16. PESSAGNO C., TORRES, R. and SANTOS, M. Glyphosate behavior at soil and mineral water interfaces. *Environ. Pollut.*, **2008**, 153, pp.53-59.
17. Identificación del herbicida glifosato, propiedades y toxicidad [Sitio en Internet]. Disponible en: [www.dne.gov.co/recursosuser/documentos/Doc\\_tecnicos/glifosato.pdf](http://www.dne.gov.co/recursosuser/documentos/Doc_tecnicos/glifosato.pdf). Acceso: 2 de noviembre de 2009.
18. TSUI, M. and CHU, L.M. Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. *Chemosphere*, **2003**, 52, pp.1189-1197.
19. GARCÍA DE LLASERA, M.P., GÓMEZ, L., VERA, L. and PEÑA, A. Matrix solid phase dispersion extraction and determination by high performance liquid chromatography with fluorescence detection of residues of glyphosate

- and aminomethylphosphonic acid in tomato fruit. *J. Chromatogr. A*, **2005**, 1093, pp.139-146.
20. BAERSON, S., RODRIGUEZ, D., TRAN, M., FENG, Y., BIEST, N., and DILL, G. Glyphosate-resistant goosegrass. Identification of a mutation in the target enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-Phosphate Synthase. *Plant Physiology*, **2002**, 129, pp.1265–1275.
  21. BOOCOCK, M. and COGGINS, J. Kinetics of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase inhibition by glyphosate. *Federation of European Biochemical Societies*, **1983**, 154(1), pp.127-133.
  22. JOHAL, G. and HUBER, D. Glyphosate effects on diseases of plants. *Europ. J. Agronomy*, **2009**, 31, pp.144–152.
  23. HOLLÄNDER, H. and AMRHEIN, N. The Site of the Inhibition of the Shikimate Pathway by Glyphosate. *Plant Physiol*, **1980**, 66, pp.823-829.
  24. AMRHEIN, N., SCHAB, J. and STEINRÜCKEN, H. The mode of action of the herbicide glyphosate. *Springer-Verlag*, **1980**, 67, 356 p.
  25. TONI, L., SANTANA, H e ZAIA, D. Adsorção de glifosato sobre solos e minerais. *Quim. Nova*, **2006**, 29(4), pp.829-833.
  26. VEIGA, F., ZAPATA, J.M.; FERNANDEZ MARCOS, M.L.; ALVAREZ, E. Dynamics of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in a forest soil in Galicia, north-west Spain. *The Science of the Total Environment*, **2001**, 271, pp.135-144.
  27. ALVES DE SOUZA, T., RIZZO DA MATTA, M., MONTAGNER, É. e GONÇALVES DE ABREU, A. Estudo de recuperação de glifosato e AMPA derivados em solo utilizando-se resinas nacionais. *Quim. Nova*, **2006**, 29(6), pp.1372-1376.
  28. ZHAO, B., ZHANG, J., GONG, J., ZHANG, H. and ZHANG, C. Glyphosate mobility in soils by phosphate application: Laboratory column experiments. *Geoderma*, **2009**, 149, pp.290–297.
  29. ESLAVA, P., RAMÍREZ, W. y RONDÓN, L. Sobre los efectos del glifosato y sus mezclas: impacto en peces nativos. Universidad de los Llanos, **2007**.pp. 1-105.
  30. KAMRIN, M. A. Pesticides profiles: Toxicity, environmental impact and fate. Florida. Lewis Publishers, 1997; pp. 135-139

31. BARRERA, M. Implementación de una técnica de análisis cromatográfico para determinar N-metilcarbamatos y sus productos de degradación en muestras de agua. Bucaramanga, 2005. Trabajo de grado. Universidad Industrial de Santander. Facultad de ciencias. Escuela de Química.
32. Extension toxicology network, pesticide information profiles. Glyphosate. [Sitio en Internet]. Disponible en: [extoxnet.orst.edu/pips/glyphosa.htm](http://extoxnet.orst.edu/pips/glyphosa.htm). Acceso: 16 de junio 2010.
33. ROMERO, J. Calidad del agua, Ed. Escuela Colombiana de Ingeniería, Colombia, 2005 p. 387.
34. Drogas, conflicto armado y seguridad global en Colombia. [Sitio en Internet]. Disponible en: [www.nuso.org/upload/articulos/3212\\_1.pdf](http://www.nuso.org/upload/articulos/3212_1.pdf) Acceso: 5 de octubre de 2010.
35. Las fumigaciones del Plan Colombia. [Sitio en Internet]. Disponible en: [www.grain.org/biodiversidad\\_files/biodiv37-2-plan\\_colombia.pdf](http://www.grain.org/biodiversidad_files/biodiv37-2-plan_colombia.pdf) Acceso: 5 de octubre de 2010.
36. RAMÍREZ, W., RONDÓN, I., VIDAL, H. y ESLAVA, P. Toxicidad aguda y lesiones histopatológicas en cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) expuestas a la mezcla de herbicida Roundup® más surfactante Cosmoflux® 411F. *Revista MVZ Córdoba*, **2009**, 14(1), pp.1563-1575.
37. POSSIDÔNIO, O. e RODRIGUES, T. Métodos de extração e determinação do herbicida glifosato: breve revisão. *Quim. Nova*, **2002**, 25(3), pp.420-428.
38. RODRÍGUEZ, D. Análisis comparativo de diferentes técnicas de extracción de pesticidas organoclorados y bifenilos policlorados en aguas naturales, usando cromatografía de gases de alta resolución. Bucaramanga, 2001. Trabajo de grado (maestría en ciencias químicas). Universidad Industrial de Santander. Facultad de ciencias. Escuela de Química.
39. SPE, Reference Manual & User's Guide. Penomenex, **2000**.
40. Solid Phase Extraction Application Guide. Macherey-Nagel, **2004**.
41. Estudio, desarrollo y caracterización de resinas quelantes de iones metálicos. Aplicación en sistemas de impacto ambiental y en el diseño de nuevos métodos cromatográficos. [Sitio en Internet]. Disponible en: [www.tdr.cesca.es/TESIS\\_UAB/AVAILABLE/TDX-0507108-160225//sds1de2.pdf](http://www.tdr.cesca.es/TESIS_UAB/AVAILABLE/TDX-0507108-160225//sds1de2.pdf). Acceso: 15 de septiembre de 2010

42. Amberlite® IRA-900 chloride form. [Sitio en Internet]. Disponible en: [www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?D7=0&N5=SEARCH\\_CO\\_NCAT\\_PNO|BRAND\\_KEY&N4=216585|ALDRICH&N25=0&QS=ON&F=SPEC](http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?D7=0&N5=SEARCH_CO_NCAT_PNO|BRAND_KEY&N4=216585|ALDRICH&N25=0&QS=ON&F=SPEC). Acceso: 15 de septiembre de 2010.
43. STALIKAS, C. and KONIDARI, C. Analytical methods to determine phosphonic and amino acid group-containing pesticides. *J. Chromatogr. A*, **2001**, 907, pp.1-19.
44. BAKER, D.; Capillary electrophoresis, Ed. John Wiley & Sons, INC., New York, 1995, 244 p.
45. RUBIO, F., VELDHUIS, L., CLEGG, B., FLEEKER, J. and HALL J. Comparison of a Direct ELISA and an HPLC Method for Glyphosate Determinations in Water. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, pp.691–696.
46. CLEGG, B., STEPHENSON, G. and HALL, J. Development of an Enzyme Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Glyphosate. *J. Agric. Food Chem.*, **1999**, 47(12), pp.5031-5037.
47. Ion Chromatography. [Sitio en Internet]. Disponible en: [serc.carleton.edu/microbelife/research\\_methods/biogeochemical/ic.html](http://serc.carleton.edu/microbelife/research_methods/biogeochemical/ic.html). Acceso: 3 de noviembre de 2010.
48. RUBINSON, K. y RUBINSON, J. Análisis Instrumental, Ed. Prentice Hall, Madrid, 2001, pp. 636 – 674, 680-700.
49. CORRADO, S. Recent developments in ion chromatography. Review. *J. Chromatogr. A*, **2002**, 956, pp.3–13.
50. ZHU, Y., ZANG, F., TONG, C. and LIU, W. Determination of glyphosate by ion chromatography, Short communication, *J. Chromatogr. A*, **1999**, 850, pp.297 –301.
51. COUTINHO, C., COUTINHO, L., MAZO, L., NIXDORF, S. and CAMARA, C. Rapid and direct determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in water using anion-exchange chromatography with coulometric detection. *J. Chromatogr. A*, **2008**, 1208, pp.246–249.
52. POOLE, C. F. Chromatography today. Amsterdam: Elsevier. 1991. 302 p.

53. QUATTROCCHI, O.; ABELAIRA, S.; LABA, F. Introducción a la HPLC, aplicación y práctica. Ed. Artes Gráficas Farro S.A., Buenos Aires, 1992, 407 p.
54. NEDELKOSKA, T.V. and LOW, G.K. High-performance liquid chromatographic determination of glyphosate in water and plant material after pre-column derivatisation with 9-fluorenylmethyl chloroformate. *Anal. Chim. Acta*, **2004**, 511, pp.145–153.
55. QIAN, K., TANG, T., SHI, T., WANG, F., LI, J. and CAO, Y. Residue determination of glyphosate in environmental water samples with high-performance liquid chromatography and UV detection after derivatization with 4-chloro-3,5-dinitrobenzotrifluoride. *Anal. Chim. Acta*, **2009**, 635, pp.222-226.
56. COLIN, R, LE FUR, E., CHARRÊTEUR, C., DUFAU, C. and PÉRON, J-J. Determination of glyphosate herbicide and (aminomethyl)phosphonic acid (AMPA) in water by liquid chromatography and fluorescence detection. Part II: Direct determination using pre-column derivatization with NBD-Cl. *Analisis*, **2000**, 28, pp.819-824.
57. ANSON, H., MILES, C. and SCHERER, S. A Simplified High-Performance Liquid Chromatographic Residue Procedure for the Determination of Glyphosate Herbicide and (Aminomethyl)phosphonic Acid in Fruits and Vegetables Employing Postcolumn Fluorogenic Labeling. *J. Agric. Food Chem.* **1983**, 31(1), pp.69-72.
58. U.S. Environmental Protection Agency. Method 547: Determination of glyphosate in drinking water by direct-aqueous-injection HPLC, post-column derivatization, and fluorescence detection. Julio, 1990.
59. GC Derivatizing Agents. [Sitio en Internet]. Disponible en: [www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/analytical-reagents/chromatography/gas-chromatography/gc-derivatizing-agents.html](http://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/analytical-reagents/chromatography/gas-chromatography/gc-derivatizing-agents.html). Acceso: 13 de noviembre de 2010.
60. Chemical derivatization in gas chromatography. [Sitio en Internet]. Disponible en: [books.google.com.co/books?id=g\\_cj6bHipBAC&printsec=frontcover&dq=Chemical+derivatization&source=bl&ots=eWvL6eM0Rb&sig=ZTPILdflgO15OK0axlh5VhRAQg&hl=es&ei=jWH6TPneMoP88Abc0vWOCw&sa=X&oi=book\\_result&ct=result&resnum=8&ved=0CFYQ6AEwBw#v=onepage&q&f=false](http://books.google.com.co/books?id=g_cj6bHipBAC&printsec=frontcover&dq=Chemical+derivatization&source=bl&ots=eWvL6eM0Rb&sig=ZTPILdflgO15OK0axlh5VhRAQg&hl=es&ei=jWH6TPneMoP88Abc0vWOCw&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=8&ved=0CFYQ6AEwBw#v=onepage&q&f=false). Acceso: 13 de noviembre de 2010.

61. BLAU, K. and HALKET, J. Handbook of derivates for chromatography. 2<sup>da</sup> ed. Chichester: Jhon Wiley and Sons, 1996.
62. ROYER, A., BEGUIN, S., TABET, JC., HULOT, S., REDING, MA. and COMMUNAL, PY. Determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid residues in water by gas chromatography with tandem mass spectrometry after exchange ion resin purification and derivatization. Application on vegetable matrixes. *Anal. Chem.*, **2000**, 72(16), pp.3826-3832.
63. MILLER, J., Basic gas chromatography, Jhon Wiley, Canada, 1997, pp. 3-5.
64. BÖRJESSON, E. and TORSTENSSON, L. New methods for determination of glyphosate and (aminomethyl)phosphonic acid in water and soil. *J. Chromatogr. A.*, **2000**, 886, pp.207–216.
65. SIERRA, E., MÉNDEZ, M., SARRIA, V. and CORTÉS, M. Electrooxidation of glyphosate on nickel and copper electrodes, *Quim. Nova*, **2008**, 31(2), pp.220-226.
66. BERNAL, MH., SOLOMON, KR. and CARRASQUILLA, G. Toxicity of Formulated Glyphosate (Glyphos) and Cosmo-Flux to Larval and Juvenile Colombian Frogs 2. Field and Laboratory Microcosm Acute Toxicity. *J. Toxicol. Environ. Health A*, **2009**, 72(15-16), pp.966-973.
67. ARAÚJO, A.S.F., MONTEIRO, R.T.R. and ABARKELI, R.B. Effect of glyphosate on the microbial activity of two Brazilian soils. *Chemosphere*, **2003**, 52, pp.799–804.
68. DEYRUP C., CHANG, S., WEINTRAUB, R. and MOYE, A. Simultaneous esterification and acylation of pesticides for analysis by gas chromatography. 1. Derivatization of glyphosate and (aminomethyl)phosphonic acid with fluorinated alcohols-perfluorinated anhydrides. *J. Agric. Food Chem.* **1985**, 33, pp.944-947.
69. MILLER, J.C. and MILLER, J.N, Estadística para química analítica, Delware Addison-Wesley Iberoamericana, **1993**, 345 p.
70. CORBERA, M., HIDALGO, M. and SALVADÓ, V. Extraction and preconcentration of the herbicide Glyphosate and its metabolite AMPA using anion-exchange solid phases. *Microchimica Acta*, **2006**, 153, pp.203–209.
71. HIDALGO, C., RIOS, C., HIDALGO, M., SALVADÓ, V., SANCHO, J. and HERNÁNDEZ, F. Improved coupled-column liquid chromatographic method for the determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid

residues in environmental waters. *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1035, pp.153-157.

72. ALVES DE SOUZA, T., RIZZO DA MATTA, M., MONTAGNER, É e GONÇALVES DE ABREU, A. Estudo de recuperação de glifosato e AMPA derivados em solo utilizando-se resinas nacionais. *Quim. Nova*, **2006**, 29(6), 1372-1376.
73. McCONNELL, J. and HOSSNER, LL. X-ray Diffraction and infrared spectroscopic studies of adsorbed glyphosate. *J. Agric. Food Chem.*, **1989**, 37(2), pp.555-560.
74. SMITH, B. Infrared Spectral Interpretation. CRC Press, New York, 1999, pp. 75–124.
75. CALDERÓN, C. Manual para la interpretación de espectros infrarrojos. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.E, Guadalupe LTDA, **1985**, pp. 37-84.
76. PULIDO, H. y DE LA VARA, R., Análisis y diseño de experimentos, McGrawHill, **2008**, pp.168-191.

## 9 BIBLIOGRAFÍA

ALVES DE SOUZA, T., RIZZO DA MATTA, M., MONTAGNER, É. e GONÇALVES DE ABREU, A. Estudo de recuperação de glifosato e AMPA derivados em solo utilizando-se resinas nacionais. *Quim. Nova*, 2006, 29(6), pp.1372-1376.

Amberlite® IRA-900 chloride form. [Sitio en Internet]. Disponible en: [www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?D7=0&N5=SEARCH\\_CONCAT\\_PNO|BRAND\\_KEY&N4=216585|ALDRICH&N25=0&QS=ON&F=SPEC](http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?D7=0&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&N4=216585|ALDRICH&N25=0&QS=ON&F=SPEC). Acceso: 15 de septiembre de 2010.

AMRHEIN, N., SCHAB, J. and STEINRÜCKEN, H. The mode of action of the herbicide glyphosate. Springer-Verlag, 1980, 67, 356 p.

ANSON, H., MILES, C. and SCHERER, S. A Simplified High-Performance Liquid Chromatographic Residue Procedure for the Determination of Glyphosate Herbicide and (Aminomethyl)phosphonic Acid in Fruits and Vegetables Employing Postcolumn Fluorogenic Labeling. *J. Agric. Food Chem.* 1983, 31(1), pp.69-72.

ARAÚJO, A.S.F., MONTEIRO, R.T.R. and ABARKELI, R.B. Effect of glyphosate on the microbial activity of two Brazilian soils. *Chemosphere*, 2003, 52, pp.799–804.

AULING, R., Development of LC-MS method for determination of glyphosate residues in wheat. Tartu 2009. Master's Thesis. University of Tartu. Faculty of Science and Technology. Institute of Chemistry.

BAERSON, S., RODRIGUEZ, D., TRAN, M., FENG, Y., BIEST, N., and DILL, G. Glyphosate-resistant goosegrass. Identification of a mutation in the target enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-Phosphate Synthase. *Plant Physiology*, 2002, 129, pp.1265–1275.

BAKER, D.; Capillary electrophoresis, Ed. John Wiley & Sons, INC., New York, 1995, 244 p.

BARRERA, M. Implementación de una técnica de análisis cromatográfico para determinar N-metilcarbamatos y sus productos de degradación en muestras de agua. Bucaramanga, 2005. Trabajo de grado. Universidad Industrial de Santander. Facultad de ciencias. Escuela de Química.

BERNAL, MH., SOLOMON, KR. and CARRASQUILLA, G. Toxicity of Formulated Glyphosate (Glyphos) and Cosmo-Flux to Larval and Juvenile Colombian Frogs 2. Field and Laboratory Microcosm Acute Toxicity. *J. Toxicol. Environ. Health A*, 2009, 72(15-16), pp.966-973.

BLAU, K. and HALKET, J. Handbook of derivates for chromatography. 2da ed. Chichester: Jhon Wiley and Sons, 1996.

BOOCOCK, M. and COGGINS, J. Kinetics of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase inhibition by glyphosate. Federation of European Biochemical Societies, 1983, 154(1), pp.127-133.

BÖRJESSON, E. and TORSTENSSON, L. New methods for determination of glyphosate and (aminomethyl)phosphonic acid in water and soil. J. Chromatogr. A., 2000, 886, pp.207–216.

CALDERÓN, C. Manual para la interpretación de espectros infrarrojos. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.E, Guadalupe LTDA, 1985, pp. 37-84.

Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes: Herbicidas. [Sitio en Internet] Disponible en: [www.casafe.org/usep/Herbicidas.pdf](http://www.casafe.org/usep/Herbicidas.pdf). Acceso: 26 de julio 2010.

Chemical derivatization in gas chromatography. [Sitio en Internet]. Disponible en: [books.google.com.co/books?id=g\\_cj6bHipBAC&printsec=frontcover&dq=Chemical+derivatization&source=bl&ots=eWvL6eM0Rb&sig=ZTPILdflgO15OK0axIh5VhRAQg&hl=es&ei=jWH6TPneMoP88Abc0vWOCw&sa=X&oi=book\\_result&ct=result&resnum=8&ved=0CFYQ6AEwBw#v=onepage&q&f=false](http://books.google.com.co/books?id=g_cj6bHipBAC&printsec=frontcover&dq=Chemical+derivatization&source=bl&ots=eWvL6eM0Rb&sig=ZTPILdflgO15OK0axIh5VhRAQg&hl=es&ei=jWH6TPneMoP88Abc0vWOCw&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=8&ved=0CFYQ6AEwBw#v=onepage&q&f=false). Acceso: 13 de noviembre de 2010.

CLEGG, B., STEPHENSON, G. and HALL, J. Development of an Enzyme Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Glyphosate. J. Agric. Food Chem., 1999, 47(12), pp.5031-5037.

COLIN, R, LE FUR, E., CHARRÊTEUR, C., DUFAU, C. and PÉRON, J-J. Determination of glyphosate herbicide and (aminomethyl)phosphonic acid (AMPA) in water by liquid chromatography and fluorescence detection. Part II: Direct determination using pre-column derivatization with NBD-Cl. Analisis, 2000, 28, pp.819-824.

Comisión Nacional del Medio Ambiente – región metropolitana. Guía para el control y prevención de la contaminación industrial; fabricación de plaguicidas, insecticidas, pesticidas y fungicidas. SANTIAGO de CHILE. AGOSTO 1998; 6p.

CORBERA, M. Desenvolupament de metodologia analítica per a la determinació de glifosat i adjuvants Girona 2007. Trabajo de grado. Universitat de Girona. Departament de Química. Unitat de Química Analítica.

CORBERA, M., HIDALGO, M. and SALVADÓ, V. Extraction and preconcentration of the herbicide Glyphosate and its metabolite AMPA using anion-exchange solid phases. Microchimica Acta, 2006, 153, pp.203–209.

CORRADO, S. Recent developments in ion chromatography. Review. J. Chromatogr. A, 2002, 956, pp.3–13.

COUTINHO, C., COUTINHO, L., MAZO, L., NIXDORF, S. and CAMARA, C. Rapid and direct determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in water using anion-exchange chromatography with coulometric detection. J. Chromatogr. A, 2008, 1208, pp.246–249.

DEYRUP C., CHANG, S., WEINTRAUB, R. and MOYE, A. Simultaneous esterification and acylation of pesticides for analysis by gas chromatography. 1. Derivatization of glyphosate and (aminomethyl)phosphonic acid with fluorinated alcohols-perfluorinated anhydrides. J. Agric. Food Chem. 1985, 33, pp.944-947.

Drogas, conflicto armado y seguridad global en Colombia. [Sitio en Internet]. Disponible en: [www.nuso.org/upload/articulos/3212\\_1.pdf](http://www.nuso.org/upload/articulos/3212_1.pdf) Acceso: 5 de octubre de 2010.

ESLAVA, P., RAMÍREZ, W. y RONDÓN, I. Sobre los efectos del glifosato y sus mezclas: impacto en peces nativos. Instituto de Acuicultura de los Llanos (IALL). Instituto de Investigaciones de la Orinoquia Colombiana (IIOC). Universidad de los Llanos, 2007.

ESLAVA, P., RAMÍREZ, W. y RONDÓN, L. Sobre los efectos del glifosato y sus mezclas: impacto en peces nativos. Universidad de los Llanos, 2007.pp. 1-105.

Estudio, desarrollo y caracterización de resinas quelantes de iones metálicos. Aplicación en sistemas de impacto ambiental y en el diseño de nuevos métodos cromatográficos. [Sitio en Internet]. Disponible en: [www.tdr.cesca.es/TESIS\\_UAB/AVAILABLE/TDX-0507108-160225//sds1de2.pdf](http://www.tdr.cesca.es/TESIS_UAB/AVAILABLE/TDX-0507108-160225//sds1de2.pdf). Acceso: 15 de septiembre de 2010

Extension toxicology network, pesticide information profiles. Glyphosate. [Sitio en Internet]. Disponible en: [extoxnet.orst.edu/pips/glyphosa.htm](http://extoxnet.orst.edu/pips/glyphosa.htm). Acceso: 16 de junio 2010.

GARCÍA DE LLASERA, M.P., GÓMEZ, L., VERA, L. and PEÑA, A. Matrix solid phase dispersion extraction and determination by high performance liquid chromatography with fluorescence detection of residues of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in tomato fruit. J. Chromatogr. A, 2005, 1093, pp.139-146.

GC Derivatizing Agents. [Sitio en Internet]. Disponible en: [www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/analytical-reagents/chromatography/gas-chromatography/gc-derivatizing-agents.html](http://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/analytical-reagents/chromatography/gas-chromatography/gc-derivatizing-agents.html). Acceso: 13 de noviembre de 2010.

HEREDIA, D. y SÁNCHEZ, F. Regulaciones internacionales del glifosato. [Sitio en Internet]. Disponible en: [www.biodiversidadla.org/Principal/Otros\\_Recursos/Boletin\\_de\\_la\\_Red\\_por\\_una\\_America\\_Latina\\_Libre\\_de\\_Transgenicos/Regulaciones\\_internacionales\\_del\\_glifosato](http://www.biodiversidadla.org/Principal/Otros_Recursos/Boletin_de_la_Red_por_una_America_Latina_Libre_de_Transgenicos/Regulaciones_internacionales_del_glifosato). Acceso: 6 de enero 2010.

HIDALGO, C., RIOS, C., HIDALGO, M., SALVADÓ, V., SANCHO, J. and HERNÁNDEZ, F. Improved coupled-column liquid chromatographic method for the determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid residues in environmental waters. *J. Chromatogr. A*, 2004, 1035, pp.153-157.

HOLLÄNDER, H. and AMRHEIN, N. The Site of the Inhibition of the Shikimate Pathway by Glyphosate. *Plant Physiol*, 1980, 66, pp.823-829.

Identificación del herbicida glifosato, propiedades y toxicidad [Sitio en Internet]. Disponible en: [www.dne.gov.co/recursosuser/documentos/Doc\\_tecnicos/glifosato.pdf](http://www.dne.gov.co/recursosuser/documentos/Doc_tecnicos/glifosato.pdf). Acceso: 2 de noviembre de 2009.

Identificación del herbicida glifosato, propiedades y toxicidad [Sitio en Internet]. Disponible en: [www.dne.gov.co/recursosuser/documentos/Doc\\_tecnicos/glifosato.pdf](http://www.dne.gov.co/recursosuser/documentos/Doc_tecnicos/glifosato.pdf). Acceso: 2 de noviembre de 2009.

Ion Chromatography. [Sitio en Internet]. Disponible en: [serc.carleton.edu/microbelife/research\\_methods/biogeochemical/ic.html](http://serc.carleton.edu/microbelife/research_methods/biogeochemical/ic.html). Acceso: 3 de noviembre de 2010.

JOHAL, G. and HUBER, D. Glyphosate effects on diseases of plants. *Europ. J. Agronomy*, 2009, 31, pp.144–152.

KAMRIN, M. A. Pesticides profiles: Toxicity, environmental impact and fate. Florida. Lewis Publishers, 1997; pp. 135-139

Las fumigaciones del Plan Colombia. [Sitio en Internet]. Disponible en: [www.grain.org/biodiversidad\\_files/biodiv37-2-plan\\_colombia.pdf](http://www.grain.org/biodiversidad_files/biodiv37-2-plan_colombia.pdf) Acceso: 5 de octubre de 2010.

LOSADA, C. Desenvolupament de mètodes de preconcentració emprant membranes líquides suportades i extracció en fase sòlida per a la determinació de l'herbicida glifosat i el seu metabòlit ampa en aigües naturals. Universitat de Girona, Catalunya, España [Sitio en Internet] Disponible en: [www.tdr.cesca.es/TESIS\\_UdG/AVAILABLE/TDX-0817104134215//tctrl.pdf](http://www.tdr.cesca.es/TESIS_UdG/AVAILABLE/TDX-0817104134215//tctrl.pdf). Acceso: 6 de enero 2010.

McCONNELL, J. and HOSSNER, LL. X-ray Diffraction and infrared spectroscopic studies of adsorbed glyphosate. *J. Agric. Food Chem.*, 1989, 37(2), pp.555-560.

- MILLER, J., Basic gas chromatography, Jhon Wiley, Canada, 1997, pp. 3-5.
- MILLER, J.C. and MILLER, J.N, Estadística para química analítica, Delware Addison-Wesley Iberoamericana, 1993, 345 p.
- NEDELKOSKA, T.V. and LOW, G.K. High-performance liquid chromatographic determination of glyphosate in water and plant material after pre-column derivatisation with 9-fluorenylmethyl chloroformate. *Anal. Chim. Acta*, 2004, 511, pp.145–153.
- NIVIA, E., Fumigación con glifosato: Efectos nocivos (2005). [Sitio en Internet]. Disponible en: [www.peaceobservatory.org/es/7/fumigacion-con-glifosato-efectos-nocivos](http://www.peaceobservatory.org/es/7/fumigacion-con-glifosato-efectos-nocivos). Acceso: 6 de enero 2010.
- PESSAGNO C., TORRES, R. and SANTOS, M. Glyphosate behavior at soil and mineral water interfaces. *Environ. Pollut.*, 2008, 153, pp.53-59.
- POOLE, C. F. Chromatography today. Amsterdam: Elsevier. 1991. 302 p.
- POSSIDÔNIO, O. e RODRIGUES, T. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. *Quim. Nova*, 2002, 25 (4), pp.589-593.
- POSSIDÔNIO, O. e RODRIGUES, T. Métodos de extração e determinação do herbicida glifosato: breve revisão. *Quim. Nova*, 2002, 25(3), pp.420-428.
- PULIDO, H. y DE LA VARA, R., Análisis y diseño de experimentos, McGrawHill, 2008, pp.168-191.
- QIAN, K., TANG, T., SHI, T., WANG, F., LI, J. and CAO, Y. Residue determination of glyphosate in environmental water samples with high-performance liquid chromatography and UV detection after derivatization with 4-chloro-3,5-dinitrobenzotrifluoride. *Anal. Chim. Acta*, 2009, 635, pp.222-226.
- QUATTROCCHI, O.; ABELAIRA, S.; LABA, F. Introducción a la HPLC, aplicación y práctica. Ed. Artes Gráficas Farro S.A., Buenos Aires, 1992, 407 p.
- RAMÍREZ, J., y LACASAÑA, M. Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición. *Arch Prev Riesgos Labor*, 2001,4(2), pp. 67-75.
- RAMÍREZ, W., RONDÓN, I., VIDAL, H. y ESLAVA, P. Toxicidad aguda y lesiones histopatológicas en cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) expuestas a la mezcla de herbicida Roundup® más surfactante Cosmoflux® 411F. *Revista MVZ Córdoba*, 2009, 14(1), pp.1563-1575.
- RODRÍGUEZ, D. Análisis comparativo de diferentes técnicas de extracción de pesticidas organoclorados y bifenilos policlorados en aguas naturales, usando

cromatografía de gases de alta resolución. Bucaramanga, 2001. Trabajo de grado (maestría en ciencias químicas). Universidad Industrial de Santander. Facultad de ciencias. Escuela de Química.

ROMERO, J. Calidad del agua, Ed. Escuela Colombiana de Ingeniería, Colombia, 2005 p. 387.

ROYER, A., BEGUIN, S., TABEL, JC., HULOT, S., REDING, MA. and COMMUNAL, PY. Determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid residues in water by gas chromatography with tandem mass spectrometry after exchange ion resin purification and derivatization. Application on vegetable matrixes. Anal. Chem., 2000, 72(16), pp.3826-3832.

RUBINSON, K. y RUBINSON, J. Análisis Instrumental, Ed. Prentice Hall, Madrid, 2001, pp. 636 – 674, 680-700.

RUBIO, F., VELDHUIS, L., CLEGG, B., FLEEKER, J. and HALL J. Comparison of a Direct ELISA and an HPLC Method for Glyphosate Determinations in Water. J. Agric. Food Chem. 2003, 51, pp.691-696.

SÁNCHEZ, J., ETTIENE, G. y RIVAS, Z. Determinación de glifosato en muestras de agua en la cuenca del río Catatumbo. Ciencia, 2005, 13(2), pp. 211–217.

SHEALS, J., GRANSTRÖM, M., SJÖBERG, S., PERSSON, P. Coadsorption of Cu(II) and glyphosate at the water–goethite ( $\alpha$ -FeOOH) interface: molecular structures from FTIR and EXAFS measurements. J. Colloid Interface Sci., 2003, 262, pp.38–47.

SIERRA, E., MÉNDEZ, M., SARRIA, V. and CORTÉS, M. Electrooxidation of glyphosate on nickel and copper electrodes, Quim. Nova, 2008, 31(2), pp.220-226.

SMITH, B. Infrared Spectral Interpretation. CRC Press, New York, 1999, pp. 75–124.

Solid Phase Extraction Application Guide. Macherey-Nagel, 2004.

SOLOMON, K., ANADÓN, A., CERDEIRA, A., MARSHALL J., y SANÍN, L. Estudio de los efectos del programa de erradicación de cultivos ilícitos mediante la aspersión aérea con el herbicida glifosato (PECIG) y de los cultivos ilícitos en la salud humana y en el medio ambiente. Informe preparado para la Comisión Interamericana para el Control del Abuso de Drogas (CICAD), División de la Organización de los Estados Americanos (OEA), Washington, D.C., Estados Unidos de América, 2005.

SPE, Reference Manual & User's Guide. Penomenex, 2000.

STALIKAS, C. and KONIDARI, C. Analytical methods to determine phosphonic and amino acid group-containing pesticides. *J. Chromatogr. A*, 2001, 907, pp.1-19.

TONI, L., SANTANA, H e ZAIA, D. Adsorção de glifosato sobre solos e minerais. *Quim. Nova*, 2006, 29(4), pp.829-833.

TSUI, M. and CHU, L.M. Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. *Chemosphere*, 2003, 52, pp.1189–1197.

U.S. Environmental Protection Agency. Method 547: Determination of glyphosate in drinking water by direct-aqueous-injection HPLC, post-column derivatization, and fluorescence detection. Julio, 1990.

VEIGA, F., ZAPATA, J.M.; FERNANDEZ MARCOS, M.L.; ALVAREZ, E. Dynamics of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in a forest soil in Galicia, north-west Spain. *The Science of the Total Environment*, 2001, 271, pp.135-144.

WHO/FAO Data sheets on pesticides. No. 91. Glyphosate. Siteo en Internet]. Disponible en: [www.inchem.org/documents/pds/pds/pest91\\_e.htm](http://www.inchem.org/documents/pds/pds/pest91_e.htm). Acceso: 16 de junio 2010.

ZHAO, B., ZHANG, J., GONG, J., ZHANG, H. and ZHANG, C. Glyphosate mobility in soils by phosphate application: Laboratory column experiments. *Geoderma*, 2009, 149, pp.290–297.

ZHU, Y., ZANG, F., TONG, C. and LIU, W. Determination of glyphosate by ion chromatography, Short communication, *J. Chromatogr. A*, 1999, 850, pp.297 –301.

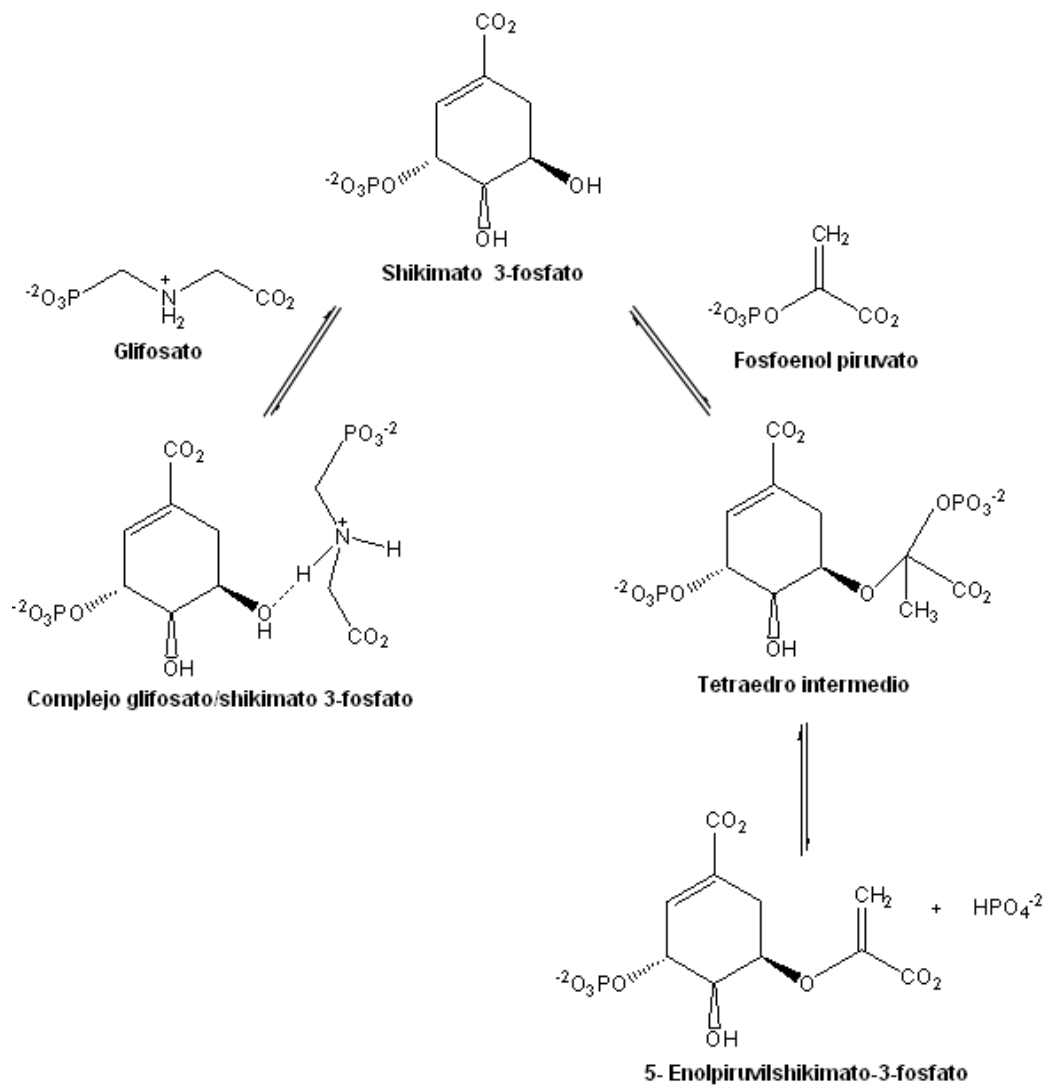
**ANEXO 1. Clasificación de los herbicidas**

<b>Criterio de clasificación</b>	<b>Tipo de herbicida</b>	
<b>Función</b>	No selectivo	Generalmente utilizados para limpieza de terrenos donde se controlan todas las especies existentes, sin discriminación.
	Selectivo	Aquellos que controlan un objetivo, preservando el cultivo de interés económico.
<b>Modo de acción</b>	Contacto	Atacan las partes de la planta en las que se aplica el producto químico.
	Sistémico	Son absorbidos por las raíces o por las partes aéreas de las plantas y luego circulan por el interior de la planta hasta llegar a tejidos distantes.
<b>Momento de aplicación</b>	Pre-emergente	Son herbicidas que se aplican antes del nacimiento del cultivo.
	Emergente	Se aplican cuando las plántulas de las malezas brotan de la superficie del suelo.
	Post-emergente	Se emplean para eliminar las malezas que se han desarrollado hasta el momento de la aplicación con o sin presencia de cultivo.

## ANEXO 2. Principales propiedades físico-químicas del herbicida glifosato

<b>PROPIEDAD</b>	
<b>Fórmula molecular</b>	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> NO <sub>5</sub> P
<b>Nombre científico</b>	N-(Fosfonometil)glicina
<b>Forma</b>	Polvo cristalino blanco e inodoro
<b>Grupos químicos</b>	Ácidos fósfonico y carboxílico, amino
<b>Peso molecular</b>	169,09 g.mol <sup>-1</sup>
<b>Solubilidad</b>	12 g. L <sup>-1</sup> (25 °C) en la forma ácida
<b>Presión de vapor, 20-25°C</b>	Despreciable (no volátil)
<b>Coefficiente de partición (K<sub>ow</sub>)</b>	0,0006-0,0017
<b>Punto de fusión</b>	200 °C (no volátil)
<b>Coefficiente de adsorción (K<sub>oc</sub>)</b>	24000 mL.g <sup>-1</sup>
<b>Vida media</b>	47 días (estimación media)
<b>Metabolitos</b>	Ácido aminometilfosfónico (AMPA)

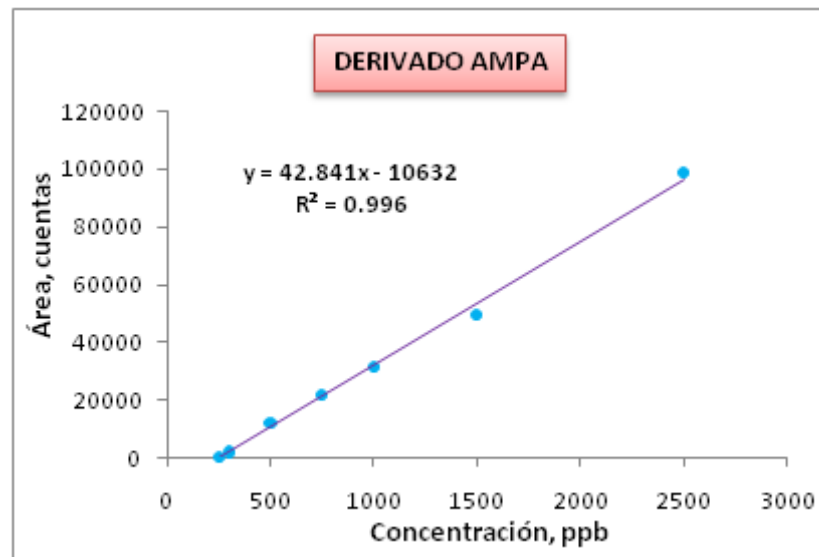
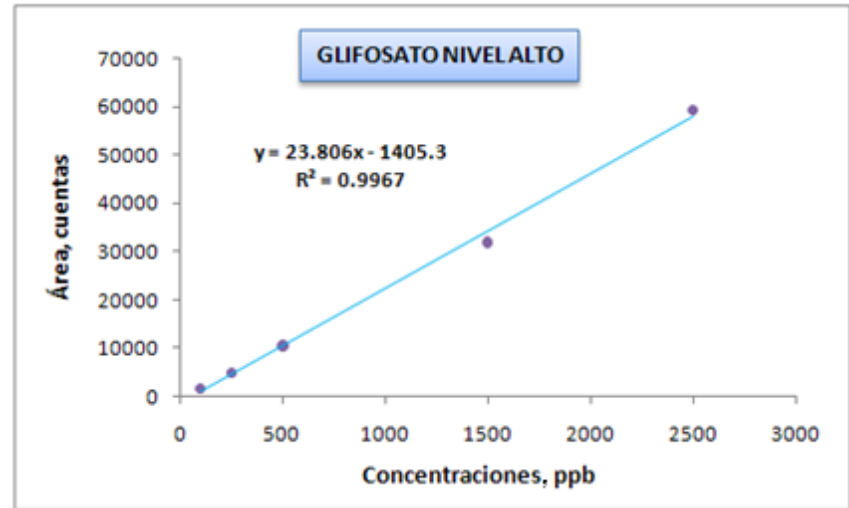
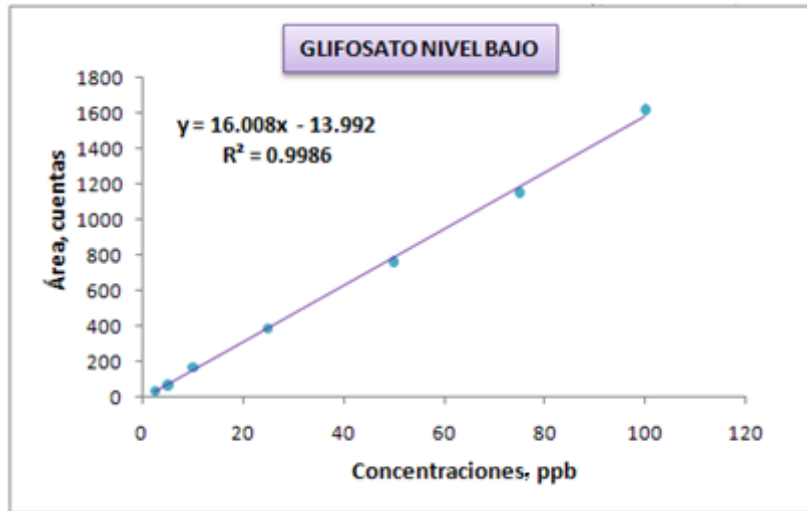
**ANEXO 3.** Mecanismo de inhibición de la vía del shikimato por el glifosato [25].



**ANEXO 4.** Presentaciones comerciales de glifosato en Colombia [17].

<b>Nombre comercial</b>	<b>Firmas productoras</b>	<b>Concentración, g/L</b>	<b>Registro ICA</b>
Faena 320	Proficol SA	320	1800
Faena 320 SL	Monsanto, Colombia	320	1775
Fuete SL	Monsanto, Colombia	480	2475
Ranger SL	Monsanto, Colombia	240	2312
Rocket SG	Monsanto, Colombia	74-75%	1993
Rocky SL	Monsanto, Colombia	120	1757
Round-up madurante SL	Monsanto, Colombia	480	2670
Round-up SG	Monsanto, Colombia	74-75%	2488
Round-up SL (sal)	Monsanto, Colombia	480	756
Glifosato 48 SL	Coagro Ltda	48%	2699
Clinofox	Cedar Crystal Chemical	480	2490
Glifosol SL	Colijap Ind. Agroquímica	480	2337
Glyfosan SL	Químicos e Insumos Agrícolas	480	2234
Glyphogan 480 SL	Magan de Colombia	480	2530
Candela 120 SL	Agroser S.A.	120	2233
Candela XL	Agroser S.A.	120	2800
Coloso SL	BASF Química Colombiana	480	2609
Panzer 320 SL	Invequímica S.A.	320	2569
Panzer 480 SL	Invequímica S.A.	480	2399
Regio SL	Quimor S.A.	480	2211

**ANEXO 5.** Curvas de calibración para los derivados trifluoroesterificados-acetilados de AMPA y glifosato analizados, siguiendo la metodología GC/ $\mu$ -ECD.



**ANEXO 6.** Resultados, obtenidos por el software estadístico *Statgraphics Centurion XVI*, de los efectos de diferentes parámetros y sus interacciones, para la extracción por SPE de intercambio iónico de AMPA y del glifosato.

Pesticida		Factores			Interacción		
		A:pH	B:[HCl]mM	C: Vol (mL)	AB	AC	BC
AMPA	Razón-F	0,38	0,01	1,25	1,3	0,16	6,67
	Valor-P	0,5584	0,9445	0,3069	0,2969	0,7039	<b>0,0416</b>
GLIFOSATO	Razón-F	0,27	1,62	4,39	3,38	0,21	6,09
	Valor-P	0,6232	0,2499	0,081	0,1158	0,6640	<b>0,0486</b>

**ANEXO 7.** Efectos principales y de interacción de cada uno de los factores, en el proceso de extracción del AMPA.

