



REPORTE FINAL

1. PRESENTACIÓN DEL PROYECTO.

1.1. DATOS DEL RESPONSABLE TÉCNICO (Nombre, Cargo e Institución, CVU actualizado)

Dr. Eliel Ruíz May
Investigador Titula "A"
Red de Estudios Moleculares Avanzados
Instituto de Ecología A.C. (INECOL). Xalapa, Veracruz, México

1.2. TÍTULO DESCRIPTIVO DE LA PROPUESTA

Establecimiento de un protocolo de detección y cuantificación de glifosato y ácido aminometilfosfónico en granos de maíz mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (primer paso hacia la acreditación).

2. DATOS GENERALES DEL PROYECTO

NOMBRE DEL PROYECTO	ESTABLECIMIENTO DE UN PROTOCOLO DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE GLIFOSATO Y ÁCIDO AMINOMETILFOSFÓNICO EN GRANOS DE MAÍZ MEDIANTE CROMATOGRFÍA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS (PRIMER PASO HACIA LA ACREDITACIÓN).
ÁREA DE DESARROLLO:	DESARROLLO TECNOLÓGICO (TRL 5 EN ADELANTE) Desarrollo de prototipo, TRL 5.
OBJETIVO GENERAL	Establecer y validar un método analítico selectivo, reproducible y robusto, utilizando cromatografía de líquidos





	acoplada a espectrometría de masas, que permita la detección y cuantificación del glifosato y de ácido aminometilfosfónico (AMPA) en maíz y productos derivados.
TIEMPO DE EJECUCIÓN (meses)	Seis
RELEVANCIA DEL PROYECTO (máximo 300 palabras)	<p>A pesar de ser el agroquímico más utilizado, el glifosato es difícil de detectar en el ambiente y alimentos, por lo que los datos sobre su contenido tanto en zonas de aplicación como en productos agrícolas de consumo inmediato podrían estar subestimados. La exposición prolongada a este agente químico, así como a los aditivos empleados durante su uso para potenciar su efecto herbicida, pueden ser causa del desarrollo de padecimientos severos, lo que lo hace un riesgo potencial para la salud. A pesar de que existen métodos analíticos reportados para cuantificar el glifosato, en México existe muy poca información acerca de los niveles de este herbicida en productos alimenticios y los laboratorios que cuentan con la infraestructura y experiencia necesaria para ofrecer el servicio son muy pocos.</p> <p>Actualmente, el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) a través del Centro nacional de Referencia de Plaguicidas y Contaminantes, ofrece un servicio de detección, identificación y cuantificación de residuos de plaguicidas en productos hortofrutícolas por cromatografía (gases/líquidos) acoplado a espectrometría de masas, sin embargo, este no incluye al glifosato ni sus derivados. Por ello es necesario establecer un método analítico confiable y validado que permita identificar y cuantificar</p>





	<p>glifosato y AMPA, en maíz y sus productos derivados. El laboratorio de Química Bioanalítica del Instituto de Ecología A.C. cuenta con la infraestructura y experiencia para desarrollar y validar un método confiable, robusto y accesible, que contribuirá con una agricultura mexicana libre de agroinsumos tóxicos.</p>
<p>RESULTADOS E IMPACTOS (máximo 300 palabras)</p>	<p>La contribución de la presente propuesta es poner a disposición de los sectores agrícolas y alimentario, un método validado, sensible, reproducible y robusto para el monitoreo de glifosato en matrices alimentarias derivadas del maíz que potencialmente se podrá extrapolar a frutos, vegetales, semillas, y alimentos procesados para validación de productos libres de este agroquímico, lo cual permitirá su libre comercio nacional e internacional, así como detectar zonas de riesgo a exposición de concentraciones elevadas de estos agroquímicos.</p>

3. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO.

3.1 INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

El glifosato [N-(fosfonometil) glicina] es uno de los herbicidas no selectivos y post emergencia más populares utilizados para el control de pasto alto y malezas en la práctica agrícola (COFEPRIS, 2021), este compuesto ingresa a la planta por las hojas para después distribuirse al resto de los tejidos vegetales, en donde impide la biosíntesis de aminoácidos aromáticos por medio la inhibición de la enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato-sintetasa (EPSPS) (Eslava et al., 2007; EPA, 2007; Granby et al., 2003). El éxito de su popularidad radica en su rápida absorción en el suelo y su biodegradación (Valavanidis, 2018). El principal producto de su catabolismo bajo condiciones biológicas es el ácido aminometilfosfónico (AMPA), el cual también está clasificado como un compuesto altamente tóxico (Chamkasem y Harmon 2016).

La cuantificación de estos compuestos en niveles bajos es muy difícil debido a su carácter anfótero, alta polaridad, no volatilidad, baja masa y ausencia de grupos químicos que faciliten su detección. Por esta razón la mayoría de los métodos desarrollados emplean la derivatización pre-columna o post columna (Botero et al., 2013;





GOBIERNO DE
MÉXICO



Chen et al., 2012). La cromatografía es el método analítico más usado para determinar glifosato y sus derivados, tanto por cromatografía de gases (CG) como por cromatografía de líquidos (CL), generalmente acoplada a detectores de fluorescencia. Sin embargo, se ha descrito mayor sensibilidad y selectividad usando cromatógrafos acoplados a espectrómetros de masas (Ibañez et al., 2005; Chen et al., 2005).

En las últimas décadas este agroquímico se ha puesto en tela de juicio ya que se considera causante de padecimientos severos como el aumento en la probabilidad de desarrollar cáncer (Franke et al., 2021), alteraciones endócrinas (Tadeu De Araujo-Ramos et al., 2021), desórdenes neurológicos (Coullery et al., 2016), autismo (Hashimoto y Hammock, 2021), y efectos sobre los eritrocitos (Kwiatkowska et al., 2014), entre otros, por lo que fue reclasificado en 2015 como “probablemente carcinogénico” en el Grupo 2A por parte de La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer. Este hallazgo ha sido difundido ampliamente por grupos de protección ambiental, los cuales reclaman el uso restringido o la prohibición del glifosato. En consecuencia, su uso en los últimos años ha sido regulado o prohibido en 20 países. En México, el uso de este producto es excesivo e irracional, por lo que se señaló recientemente en el Diario Oficial de la Federación que el periodo de uso de glifosato vence el 31 de enero de 2024. Por consiguiente, encontrar herbicidas alternativos se ha convertido en uno de los objetivos prioritarios de la comunidad científica en la rama de agrobiotecnología. Sin embargo, también será indispensable contar con mecanismos y herramientas que garanticen la ausencia de este compuesto en los productos agrícolas a partir de esa fecha. El problema ante el uso excesivo de glifosato radica principalmente en que la exposición humana a este agente químico se da no solo durante su aplicación en campos de cultivo, sino también en todos los niveles a lo largo de la cadena de distribución y consumo de alimentos, por tanto, es un riesgo para los habitantes de zonas rurales y urbanas, debido a su presencia residual en productos de consumo inmediato como frutos y semillas. La presencia del glifosato ha sido documentada tanto en alimentos frescos (Jallow et al., 2017; Kwiatkowska et al., 2014; Zoller et al., 2018), como procesados, por ejemplo, tortillas (Mann, 2021), cerveza, leche y vino (López et al., 2020), así como en fluidos humanos como orina (Zoller et al., 2020) y sangre (Woźniak et al., 2020; González et al., 2007).

3.2 JUSTIFICACIÓN

Los métodos actuales para detección de glifosato o su principal producto de degradación, el ácido aminometilfosfónico (AMPA), comprenden sistemas de cromatografía de líquidos o de gases acoplados a detectores de luz ultravioleta (UV-Vis,





GOBIERNO DE
MÉXICO



fluorescencia o espectrómetros de masas de triple cuadrupolo. Hasta el momento la mayoría de los flujos de procesamiento implican que las muestras sean sometidas a pasos de derivatización previos al análisis instrumental, lo cual implica la pérdida de analitos de interés, cálculos subestimados en caso de que la reacción sea deficiente, reproducibilidad baja, así como variaciones en los límites de detección y cuantificación. Lo ideal al establecer un método de análisis es realizar el número menor de pasos posible durante el procesamiento de la muestra y contar con un sistema de detección que no requiera la modificación química del o los analitos de interés. Por lo tanto, en esta propuesta proponemos utilizar un sistema de extracción acelerada por disolventes y posterior análisis por cromatografía de líquidos de ultra alta resolución acoplada a espectrometría de masas del tipo triple cuadrupolo (UPLC-MS-QqQ). De tal modo que, a partir de la huella cromatográfica y espectrométrica del glifosato y ácido aminometilfosfónico se pueda cuantificar en granos de maíz y productos derivados de manera rutinaria. Se pretende que nuestro protocolo pueda ser extrapolable para la detección y cuantificación de glifosato y ácido aminometilfosfónico en frutas, hortalizas y otros productos agrícolas, así como en el monitoreo en alimentos procesados y muestras ambientales (suelo y agua).

3.3 OBJETIVO GENERAL

Establecer y validar un método analítico selectivo, reproducible y robusto a través de una plataforma UPLC-MS-QqQ, que permita la detección y cuantificación de glifosato y del ácido aminometilfosfónico en granos de maíz, con el propósito de establecer un flujo de procesamiento de rutina en el laboratorio, de modo que el método esté disponible como servicio externo para el sector agroalimentario y sea de utilidad para la validación de alimentos libres de glifosato, y apoyar en las actividades de vigilancia en el control de calidad e inocuidad granos de maíz.

3.3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS. Breve descripción de cada uno de ellos.

3.3.2 Establecer el protocolo de extracción dirigida de glifosato y el AMPA en granos de maíz mediante extracción acelerada por disolventes.

3.3.3 Desarrollar el método de cuantificación de glifosato y de AMPA por cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas con un método de monitoreo de reacciones múltiples (MRM).





3.3.4 Realizar la validación del método de cuantificación estableciendo parámetros linealidad, rango de aplicación, robustez, límites de detección y cuantificación, precisión, exactitud y recuperación en granos de maíz.

3.3.5 Evaluar el método analítico propuesto en otros alimentos derivados del maíz como tortillas y harinas.

3.4 ACERCAMIENTO TEÓRICO Y CONCEPTUAL. Descripción de la metodología que se empleó durante la ejecución del proyecto (técnicas, procedimientos, factores, variables e indicadores).

Considerando la bibliografía, se decidió desarrollar un método de identificación y cuantificación por cromatografía de líquidos de ultra alta resolución (Agilent 1290) acoplada a un espectrómetro de masas del tipo triple cuadrupolo (Agilent 6460; UPLC-MS-QqQ). Se utilizó una columna ZORBAX Eclipse Plus C18 (2.1 mm x 1.8 Micron, 600 Bar) con un flujo de 0.1 mL/min y un volumen de inyección de 5 µL.

Para la separación cromatográfica se utilizó el siguiente gradiente:

Composición inicial 95% A + 5% B (3 minutos)

Rampa lineal hasta llegar a 95% B (1 minutos)

Composición 95% B + 5% A (5 minutos)

Regresar a composición inicial 95% A + 5% B (1 minutos)

*Se mantiene por cinco minutos más la última composición

Tiempo total de ejecución de 15 minutos por inyección

En donde A es: Agua (LC-MS) + 1% ácido fórmico y B es: Metanol (LC-MS) + 1% ácido fórmico).

En el cuadro 1 se muestran las condiciones espectrométricas que se utilizaron para identificar al glifosato y al AMPA. En la Figura 1 se muestra un cromatograma representativo de glifosato y en la Figura 2 un espectro de masas para la transición elegida. En la Figura 3 se muestra un cromatograma representativo de AMPA y en la Figura 4 un espectro de masas para la transición elegida.

Cuadro 1. Condiciones de voltaje y transiciones para la realización de la curva de AMPA y glifosato.

ESI-	Ion Precursor	Ion Producto	Tiempo de retención (minutos)	Fragmentor (Volts)	Polaridad
Glifosato	169	151.1	1.43	135	Negativa
AMPA	110	79	1.36	135	Negativa



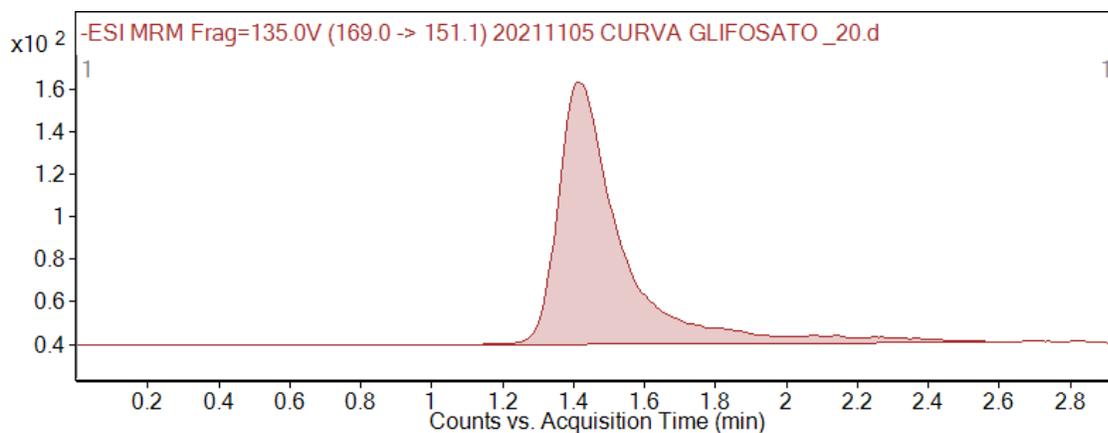


Figura 1. Cromatograma representativo de glifosato 20 µM.

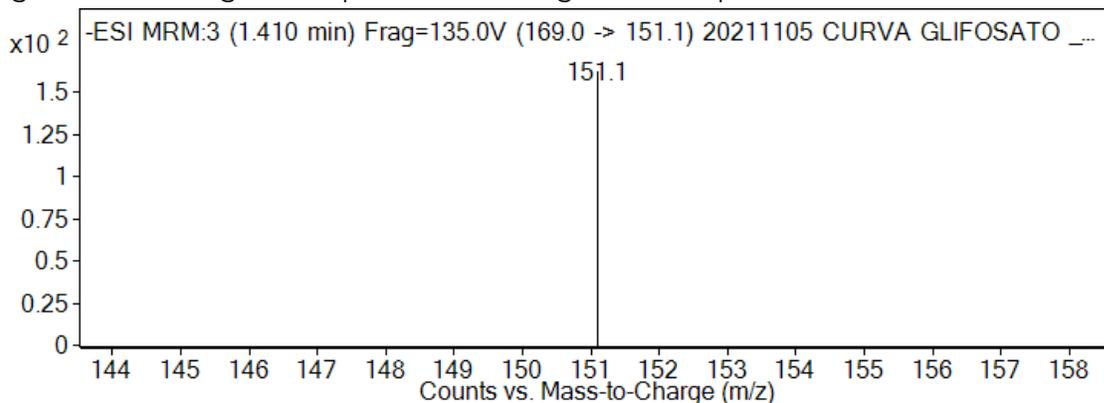


Figura 2. Espectro de masas representativo de la transición 169.0>151.1 utilizada para la identificación de glifosato.

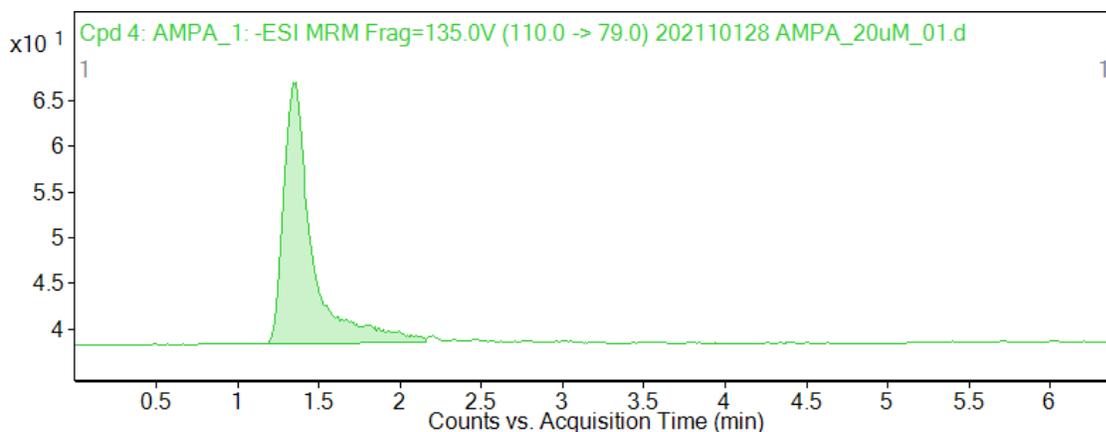


Figura 3 Cromatograma representativo de AMPA 20 µM.



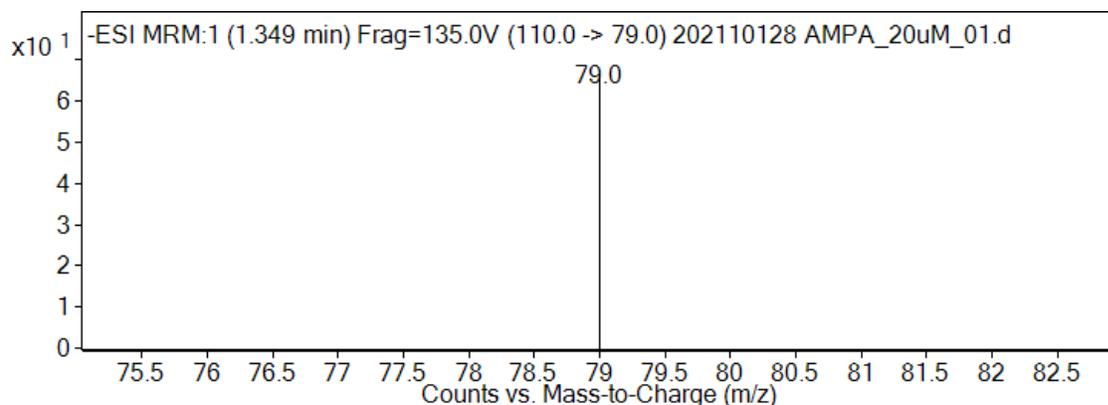


Figura 4. Espectro de masas representativo de la transición 110.0>79.0 utilizada para la identificación de AMPA.

Una vez establecidas las condiciones cromatográficas y espectrométricas se prepararon curvas de calibración para glifosato y AMPA con las siguientes concentraciones: 0.1, 0.2, 0.4, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 μM . En las Figuras 5 y 6 se muestran las curvas de calibración para glifosato y AMPA, respectivamente. Las gráficas muestran la relación entre la concentración y la respuesta registrada en el equipo. El coeficiente de correlación fue de 0.9989 para una regresión de segundo orden.

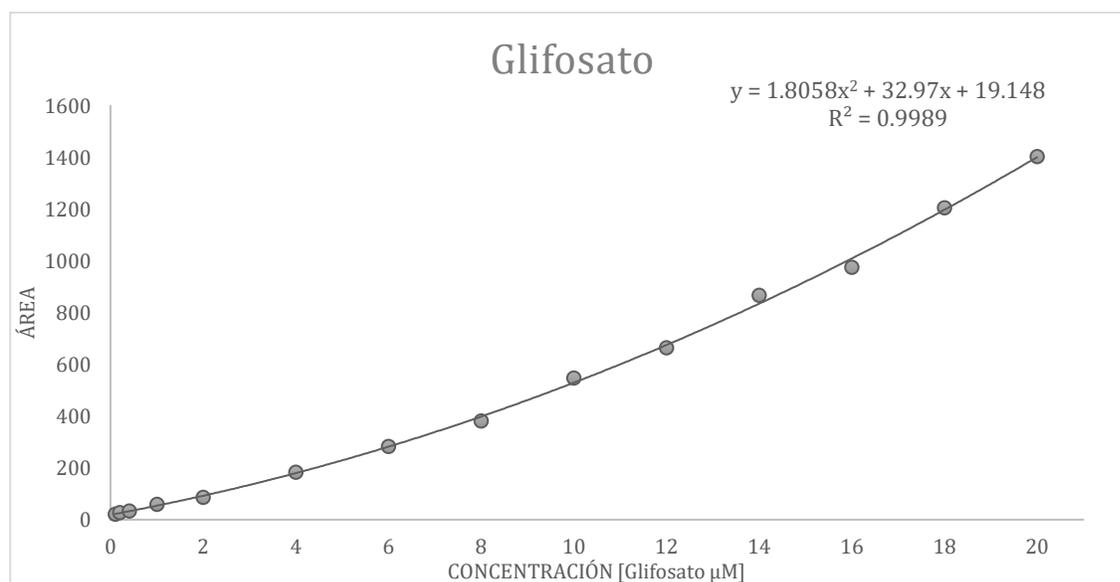


Figura 5. Curva de calibración de Glifosato.



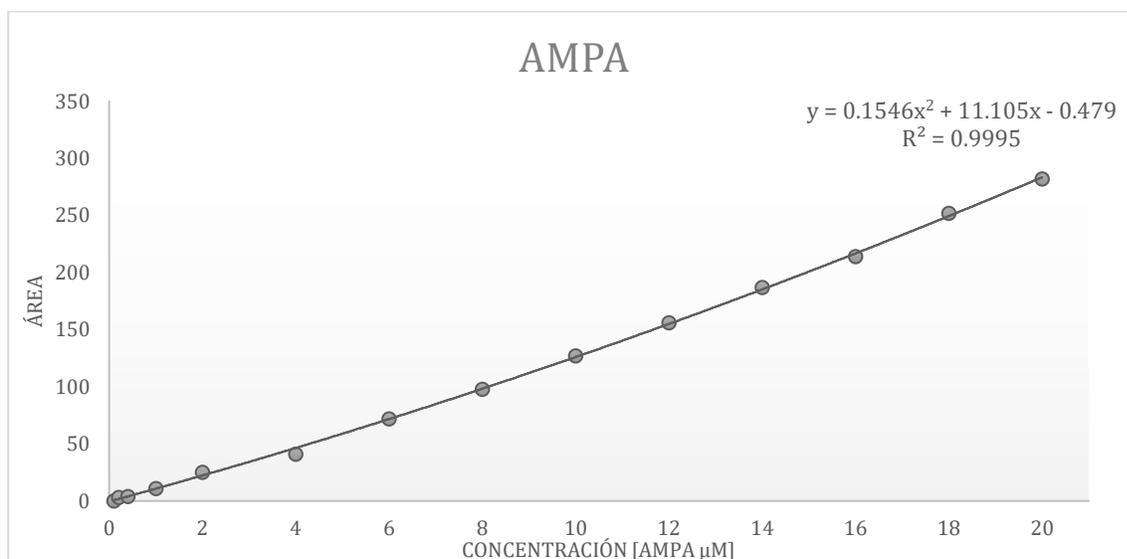


Figura 6. Curva de calibración para AMPA.

Con la finalidad de evaluar la sensibilidad del método se determinó la relación señal-ruido a la concentración de 1 μM. En el Cuadro 2 se muestran los resultados, en donde se observa claramente que la señal propia del glifosato y del AMPA es mucho más alta que el ruido a una concentración tan baja como 1 μM.

Cuadro 2. Relación señal ruido.

Compuestos	Concentración	Relación Señal/Ruido)
Glifosato	1 μM	52.5
AMPA	1 μM	83.3

Para validar la robustez del método se evaluó la reproducibilidad de las determinaciones. La figura 7 y 8 muestran la reproducibilidad de las inyecciones de glifosato (se muestra el promedio de tres inyecciones realizados en tres diferentes días) y AMPA (el promedio de dos inyecciones en el mismo día), respectivamente. En cada curva se grafica el valor esperado y el experimental (final) en el rango de cuantificación de 0.1-20 μM. La figura 9 muestra la reproducibilidad de la cuantificación de glifosato de distintas inyecciones a la misma concentración.





Reproducibilidad de curva de glifosato

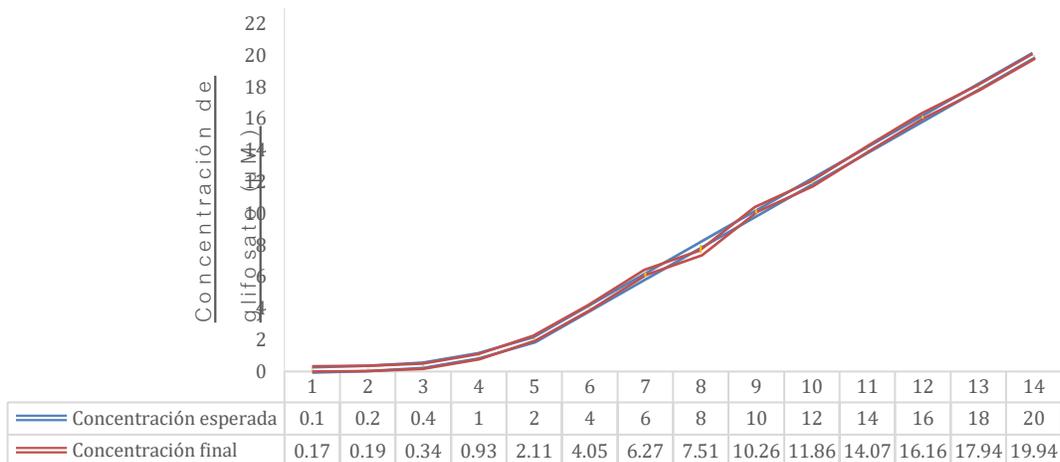


Figura 7. En azul la concentración que fue preparada para la inyección de la curva, en naranja la concentración cuantificada por el LC-MS/MS (el resultado del promedio de tres distintas inyecciones).

Reproducibilidad de curva de AMPA

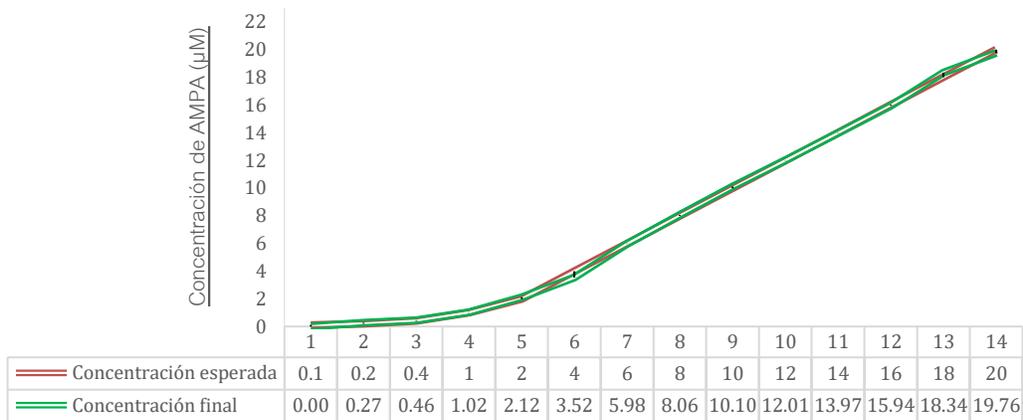


Figura 8. En línea naranja la concentración preparada para inyección en el equipo, y en verde el valor real cuantificado por el equipo LC-MS/MS. Promedio de dos inyecciones.



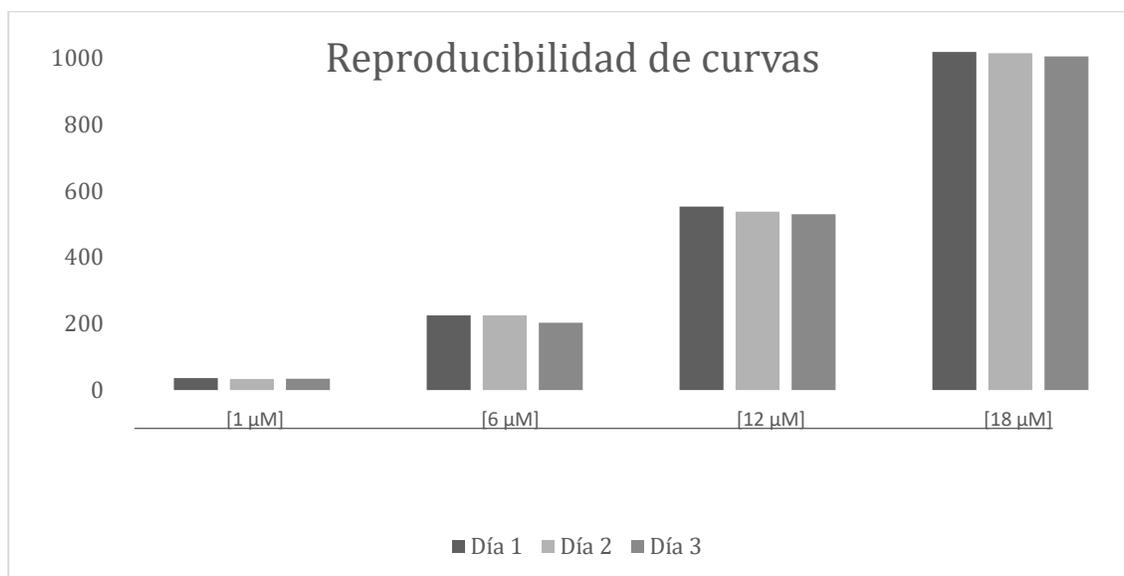


Figura 9. Reproducibilidad en la cuantificación de glifosato de cuatro distintas concentraciones analizadas en tres diferentes días.

Una vez establecidos los métodos de identificación y cuantificación de glifosato y de AMPA se evaluaron distintos métodos de extracción. Para evaluar los diferentes métodos de extracción en granos de maíz, se decidió utilizar harina comercial de maíz debido a su alto grado de homogenización y su reducido tamaño de partícula. Se hicieron extracciones por distintos métodos y condiciones y las posteriores cuantificaciones de muestras enriquecidas (adicionadas con glifosato y AMPA) y no enriquecidas. La Figura 10 muestra el esquema general de procesamiento de muestras. Los métodos de extracción evaluados fueron sonicación, extracción acelerada por disolventes (ASE) y extracción guiada dispersiva energizada (EDGE). A continuación, mencionamos el principio de cada método.



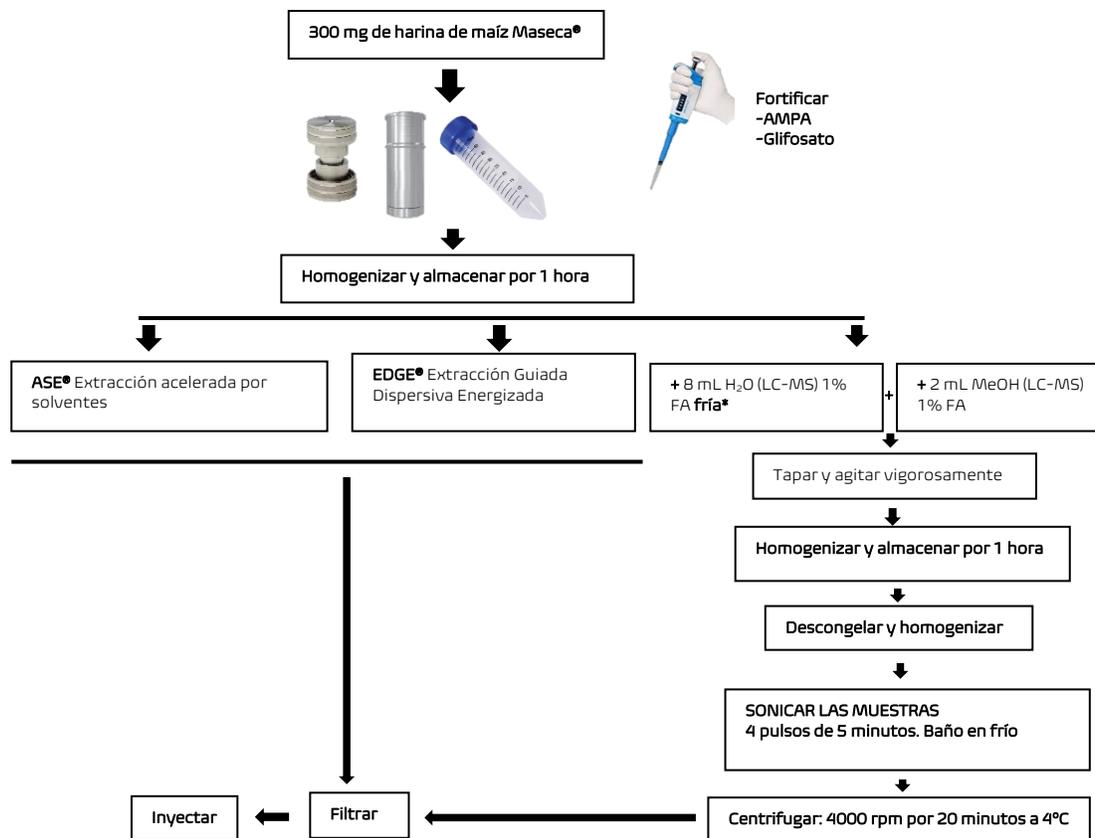


Figura 10. Esquema de trabajo usado para la extracción de muestras para AMPA y glifosato por los distintos sistemas (EDGE, ASE, ultrasonificación).

ULTRASONICACIÓN

Las ondas acústicas de naturaleza mecánica no pueden ser absorbidas por las moléculas, por lo que debe convertirse en una forma químicamente útil a través de un proceso indirecto llamado cavitación.

Las técnicas de preparación de muestras frecuentemente hacen uso de ácidos concentrados, solventes altamente volátiles, altas temperaturas, y a menudo altas presiones para efectuar la disolución de analitos elementales de muestras sólidas. En el esfuerzo para acortar el paso de preparación del análisis de la muestra, una de las técnicas que se ha mostrado prometedora para acelerar y simplificar el tratamiento de muestras es la extracción ultrasónica (Manual de fabricante Cole Parmer)

PROCESO

1. Colocar la muestra en tubos dentro del ultrasonificador programando pulsos de 5 minutos.



GOBIERNO DE
MÉXICO



ASE® Extracción acelerada por solventes

Dionex ASE 350 Accelerated Solvent Extraction. Thermo Scientific

ASE usa una técnica de extracción automatizada con solventes, que aplica temperatura y presión elevadas. El uso de altas temperaturas incrementa la capacidad de los disolventes de solubilizar los analitos y conduce a velocidades de difusión más rápidas, lo que significa que los analitos se mueven más rápido desde la capa límite cerca de la superficie de la matriz de la cual se extraen, hasta el disolvente a temperaturas más altas. Las altas temperaturas también indican viscosidades de solventes más bajas, lo que resulta en mayor penetración entre los poros de la matriz y la interrupción de las interacciones soluto-matriz (atracciones dipolares, fuerzas de Van der Waals, enlaces de hidrógeno y otros), sin embargo, la temperatura por sí sola no es suficiente, porque muchos disolventes orgánicos alcanzan su punto de ebullición a temperaturas relativamente bajas. Si se ejerce suficiente presión sobre el disolvente durante las extracciones, se pueden utilizar temperaturas por encima del punto de ebullición (Manual de fabricante, Documento No. 065220)

PROCESO

1. La muestra sólida se carga en una celda (1 a 100 mL), se tapan los extremos y se aprietan manualmente.
2. Las celdas con muestra se cargan en una bandeja en el equipo y los recipientes de recolección (botellas o viales) se cargan en una bandeja de recolección.
3. Un brazo robótico transfiere cada celda por separado en el horno para su extracción.
4. El horno se mantiene a la temperatura seleccionada durante las extracciones (temperatura ambiente hasta 200 °C).

El sistema permite la extracción en presiones elevadas (500 a 1500 psi) para mantener los solventes como líquidos a temperaturas por encima de sus puntos de ebullición. La temperatura y la presión son controlados de forma independiente para cada celda no importando el disolvente utilizado, la humedad o el contenido mineral de la muestra, o cualquier característica de la matriz que pueda afectar la temperatura de extracción real.

5. Cuando la celda está en su lugar en el horno, la bomba comienza inmediatamente a depositar el solvente.
6. Una vez que el solvente ha pasado a través de la celda y llega al recipiente de recolección, la válvula estática se cierra para permitir la presurización de la celda. Dado que el disolvente se expande a medida que se calienta, la presión en la celda aumenta cuando se cierra la válvula estática.
7. Cuando la presión alcanza los 200 psi, la válvula estática se abre rápidamente para aliviar la presión y luego se cierra de nuevo.
8. Durante la primera fase de una corrida (llamada tiempo de calentamiento), el horno calienta el contenido de la celda a la temperatura de operación seleccionada. Los tiempos de calentamiento varían entre 5 minutos para 100 °C y 9 minutos para 200 °C.
9. La extracción entra en un período estático con una duración seleccionada por el usuario. Los tiempos estáticos típicos son de 5 minutos, pero pueden variar de 0 a 2000 minutos.
10. Se bombea disolvente nuevo a través de la celda para eliminar los analitos extraídos mientras la muestra y el disolvente aún están calientes.





GOBIERNO DE
MÉXICO



11. La cantidad utilizada para el enjuague puede variar de 0% a 150% del volumen de la celda utilizada para la extracción (40% a 60% es lo más común)
12. El tiempo total para la extracción es normalmente menos de 15 minutos y la cantidad de disolvente utilizada es aproximadamente 1.5 veces el volumen de la celda de muestra.
13. Dado que el extracto se diluye por el volumen total de disolvente de extracción más el disolvente de enjuague, puede ser necesario un paso de concentración adicional (por ejemplo, evaporación o extracción en fase sólida) al realizar el análisis de trazas.
14. Una vez completado el paso de purga, la celda regresa a la bandeja y la siguiente muestra se lleva al horno para comenzar nuevamente el proceso de extracción.

EDGE® Extracción Guiada Dispersiva Energizada ENERGIZED DISPERSIVE GUIDED EXTRACTION. CEM

Es un sistema de extracción automatizada que analiza hasta 12 muestras a la vez, con un proceso de lavado, filtrado y enfriamiento. Consiste en una celda abierta que crea un efecto dispersivo que promueve la extracción y filtración, es un sistema de extracción por disolvente con fluidos presurizados (Figura 13A). Extrae muestras en fase sólida dispersiva, líquido soportado, fluido presurizado, líquido-líquido (Notas de aplicación del fabricante ap0107).

Proceso

1. Creación del método y selección del método en el equipo.
Se indica las condiciones, las líneas de lavado, la temperatura, el disolvente, tiempo de lavado y filtrado.
2. El Q-cup es un cilindro de aluminio en donde se coloca la muestra para ser extraídas dentro del equipo, estos se cargan automáticamente hacia el auto muestreador.
3. El solvente es agregado primero a través del fondo para llenar el espacio entre la cámara y el Q-cup, para favorecer la transferencia de calor, luego el solvente es adicionado a través de la parte superior del Q-cup para humedecer la muestra, a medida que las paredes de la cámara se calientan, aumenta la presión en el espacio, esto supera la presión dentro del Q-cup, forzando al solvente a dispersarse en la muestra.
4. Una vez que la muestra alcanza la temperatura deseada, el solvente se dispersa a través del Q-disc, la bobina de enfriamiento y dentro de un vial de recolección. Los Q-Discs son filtros que se insertan dentro del Q-Cup para el sistema de extracción EDGE. Para la extracción de glifosato se usó dos filtros; el disco G1 de fibra de vidrio de 0.3 μm y discos C9 que deben usarse debajo y encima de los discos G1 para proporcionar soporte estructural durante la extracción.
5. El equipo regresa el Q-cup a su posición y continúa con la siguiente muestra.

El Cuadro 3 muestra los distintos disolventes y condiciones que fueron usados experimentalmente en el método con EDGE. Se utilizaron cuatro sistemas de disolventes: metanol 100%, metanol-agua (50:50), metanol-agua (20:80) y acetonitrilo: todos acidificados con ácido fórmico al 1% (v/v). El volumen de extracción también fue modificado para cada condición, así como el recipiente de extracción (tubos de 50 mL).





Las muestras se procesaron por triplicado fortificando la harina con 13.62 µg de glifosato. Los volúmenes finales fueron desde 35 mL (condiciones A, B, D, E, G, H, J y H del Cuadro 3) y 80 mL para las condiciones restantes (C, F, I y L del Cuadro 3). Posterior a la extracción se eliminó el disolvente por rotaevaporación a presión reducida y por liofilización hasta su completa sequedad. Posteriormente se resuspendió en 1 mL de agua y se inyectó en el UPLC-MS/QqQ. El Cuadro 4 muestra los resultados del experimento, en donde el mejor resultado se obtuvo con la condición I: metanol-agua (20:80) + FA 1%. La masa total recuperada fue de 1.047 µg de 13.62 µg y un porcentaje de extracción de 7.689%.

Cuadro 3. Condiciones experimentales de extracción el equipo EDGE.

Solventes							
Metanol 100% + FA 1%		Metanol- AGUA (50:50) 100% + FA 1%		Metanol- AGUA (20:80) 100% + FA 1%		ACN+ FA 1%	
A	Vial de plástico (10 mL)	D	Vial de plástico (10 mL)	G	Vial de plástico (10 mL)	J	Vial de plástico (10 mL)
B	Vial de vidrio (10 mL)	E	Vial de vidrio (10 mL)	H	Vial de vidrio (10 mL)	K	Vial de vidrio (10 mL)
C	Vial de vidrio (25 mL)	F	Vial de vidrio (25mL)	I	Vial de vidrio (25 mL)	L	Vial de vidrio (25 mL)

Cuadro 4. Resultados de la inyección de las muestras extraídas en EDGE.

Muestras EDGE	Masa recuperada (µg)	Porcentaje de recuperación (%)
Maseca+Gli_A	0.193	1.417
Maseca+Gli_B	0.329	2.412
Maseca+Gli_C	0.304	2.229
Maseca+Gli_D	0.440	3.232
Maseca+Gli_E	0.398	2.920
Maseca+Gli_F	0.377	2.770
Maseca+Gli_G	0.604	4.438
Maseca+Gli_H	0.687	5.047
Maseca+Gli_I	1.047	7.689
Maseca+Gli_J	0.427	3.133
Maseca+Gli_K	0.575	4.219
Maseca+Gli_L	0.600	4.402

En el Cuadro 5 se muestran los resultados de la extracción de glifosato con los sistemas evaluados y las condiciones usadas, volúmenes y proporciones de disolventes.

Para la extracción de AMPA se utilizó el método de sonicación con distintas condiciones, en las que se valora la solubilidad del compuesto en la proporción de disolventes (Cuadro 7). En la figura 15 se muestra la gráfica del porcentaje de recuperación de AMPA, el porcentaje aumenta al incrementar la proporción de agua en el disolvente, aunque la recuperación fue baja <10%.





Cuadro 6. Métodos de detección de maíz fortificado con glifosato

SISTEMA	FASE MÓVIL H ₂ O- MeOH + 1% FA	PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN DE GLIFOSATO	DESV. STD
EDGE 27 mL	50:50	41.65	26.08
EDGE 10 mL	80:20	58.49	10.19
ASE 14.8 mL	80:20	109.19	8.26
ASE 14.8 mL	50:50	65.70	13.15
SONICADOR 10 mL	80:20	93.12	1.58
SONICADOR 10 mL	50:50	48.42	0.71

Cuadro 7. Métodos de detección de maíz fortificado con AMPA

SISTEMA	FASE MÓVIL	PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN DE AMPA	DESV. STD
SONICADOR 10 mL	100% H ₂ O	9.70	0.24
SONICADOR 10 mL	80:20 H ₂ O-MeOH + 1% FA	7.35	0.39
SONICADOR 10 mL	50:50 H ₂ O-MeOH + 1% FA	0.00	0.00

4. GRUPO DE TRABAJO.

Responsable técnico: Dr. Eliel Ruiz May, Investigador Titular A, responsable del laboratorio de Proteómica y co-responsable del laboratorio de Química Bio-analítica (QBA) del INECOL.

Colaboradores:

Dr. José Antonio Guerrero Analco, Investigador Titular A, responsable del laboratorio de Química de Productos Naturales (QPN) y co-responsable del laboratorio de Química Bio-analítica del INECOL.

Dr. Juan Luis Monribot Villanueva, Técnico Académico Titular C de los laboratorios de QPN y QBA de INECOL.

M. en C. José Miguel Elizalde Contreras, Técnico Académico Titular A de los laboratorios de Proteómica y QBA de INECOL.

Dra. Liliana Hortencia Méndez Barredo

Los laboratorios de Química de Productos Naturales, Proteómica y Química Bioanalítica se encuentran ubicados en el Campus 3 del INECOL, también conocido como el Clúster Científico y Tecnológico BioMimic®, donde convergen colaboraciones con 12 Centros Públicos de Investigación de CONACYT, estos laboratorios cuentan con la infraestructura y capacidad humana para desarrollar el presente proyecto. El INECOL, cuenta con instrumentación de frontera en biología molecular, proteómica, metabolómica, bioquímica, ecología química y microscopía. Para este proyecto contamos con





GOBIERNO DE
MÉXICO



espectrómetros de masas de alta resolución, espectrómetros de masa tri-híbridos como el Orbitrap Fusion Tribrid y el Q-TOF con movilidad iónica y con el QqQ en el que se planea montar el método. También contamos con investigadores y técnicos altamente capacitados para realizar estudios metabolómicos dirigidos y no dirigidos en diversos sistemas biológicos. Estas fortalezas se pueden ver reflejadas con la publicación en los últimos tres años de más de 30 artículos científicos en revistas indizadas por el Journal Citation Reports, en las áreas del conocimiento anteriormente descritas.

5. PRODUCTOS OBTENIDOS. Descripción clara y concisa de los productos comprometidos en el proyecto. Es necesario vincular cada uno de los objetivos específicos con los productos esperados. Se sugiere usar la información en la pregunta 3 y 4 del informe técnico.

La metodología desarrollada en este trabajo permite tener un porcentaje bueno de extracción para glifosato con todos los métodos (ASE, EDGE, SONICACIÓN). Sobresaliendo con mayor porcentaje de extracción los sistemas ASE y sonicación. Sin embargo, considerando que la extracción por sonicación, no requiere de métodos sofisticados, es rápido, y se usa disolventes económicos, se considera que podría seguir utilizándose para los siguientes experimentos y fue el motivo por lo que se utilizó únicamente este método para la extracción de AMPA.

La extracción de la matriz fortificada con glifosato fue mejor cuando se extrajo con una proporción mayor de agua en el disolvente. La ventaja de extracción con EDGE radica en que es un equipo fácil de montar y puede extraer varias muestras a la vez y cada una en un tiempo corto, y es un equipo completamente automatizado.

El desarrollo de esta metodología compara diversos métodos de extracción de glifosato y AMPA en harina de maíz, pudimos observar que todos fueron eficientes, sin embargo, la extracción por sonicación resulta mejorar y simplificar el análisis, es de costo bajo, no hay pasos de derivatización, ni de regeneración de columnas, además de que proporciona un tiempo corto y al combinar la tecnología de la cromatografía líquida con la sensibilidad y especificidad proporcionada por la espectrometría de masas en tándem, se obtiene porcentajes de recuperación del 93%.

Se estableció y se validó en términos de sensibilidad, rango de cuantificación, reproducibilidad y robustez un método analítico selectivo, a través de una plataforma UPLC-MS-QqQ, que permite la detección y cuantificación de glifosato y del ácido aminometilfosfónico en matrices derivadas de granos de maíz





GOBIERNO DE
MÉXICO



6. BENEFICIOS, RESULTADOS Y USUARIOS FINALES. Se deberá indicar las ventajas, consecuencias positivas e impacto del proyecto y cuáles fueron los mecanismos de transferencia de resultados y/o usuarios finales.

Se logró establecer un protocolo de extracción eficiente, robusto y reproducible, que nos permite identificar glifosato en muestras de harina de maíz fortificada, los resultados indican que se desarrolló un método sencillo y de bajo costo, que puede ser adaptable y modificable para el uso en otras matrices. La generación de esta metodología nos permitirá monitorear glifosato en maíz y productos derivados de este, así como en otras matrices alimentarias, frutos, vegetales, semillas, y alimentos procesados para validación de productos libres de este agroquímico, lo cual permite su libre comercio en territorio nacional e internacional. Así como identificar zonas del país con mayor riesgo de exposición a concentraciones elevadas de glifosato.

El principal beneficio es un protocolo analítico validado para la determinación de glifosato y el AMPA en granos de maíz. El protocolo estará disponible para ser utilizado por la sociedad agrícola, en forma de servicios analíticos externos o replicando el método en cualquier laboratorio. Los cromatogramas con intensidades y tiempos de retención, así como los espectros de masas del glifosato y el AMPA estarán disponibles para toda la comunidad científica. Nuestro protocolo estará disponible y podrá proporcionarse material de soporte a todas las autoridades y productores de maíz en el país. También tendremos disponible el método y equipamiento para proporcionar constantemente servicios externos a usuarios finales.

7. PROBLEMÁTICAS Y DIFICULTADES ENCONTRADAS DURANTE EL DESARROLLO DEL PROYECTO. Describa brevemente los principales retos y dificultades científicas, tecnológicas, de infraestructura, sociales, culturales, etc. a las cuales se enfrentó durante el desarrollo del proyecto y que pudieron afectar su logro.

Obstáculos identificados:

Tiempo reducido para el desarrollo del proyecto (Asignación 17 de junio del 2021)

La llegada de los estándares analíticos fue larga y el comienzo del proyecto se retrasó (Glifosato y AMPA, septiembre y octubre respectivamente).

8. VINCULACIÓN Y ARTICULACIÓN AL IMPLEMENTAR EL MODELO PENTAHÉLICE (Gobierno-Academia-Industria-Sociedad-Ambiente). Describa brevemente su experiencia general sobre las vinculaciones realizadas o logradas durante el desarrollo





GOBIERNO DE
MÉXICO



del proyecto.

La importancia de que México en el Diario Oficial de la Federación hacia el 31 de diciembre de 2020 haya celebra el decreto que marca que entidades en el ámbito de su competencia deban sustituir gradualmente el uso, adquisición, distribución, promoción e importación de la sustancia química denominada glifosato, por medio de la investigación participativa impulsada por instituciones públicas, genera el dialogo y proporcionen tecnología y conocimiento científico entre investigadores ,agricultores y las comunidades campesinas.

Aunque el proyecto se encuentra en la fase final, tiene un impacto hacia toda la sociedad, siendo las comunidades indígenas una de las más afectadas, los cultivos de pequeña escala realizada por campesinos y zonas residenciales ya que hacen uso irracional de los pesticidas sin tener conocimiento de lo peligroso para la salud humana. En este sentido la erradicación y/o control de este compuesto permitirá buscar alternativas de siembra sostenibles y culturalmente más adecuadas y seguras para la salud humana además de un ambiente libre de agentes tóxicos que afectan las tierras de cultivo y al ecosistema en general.

9. FINANCIAMIENTO SOLICITADO Y EJERCIDO. Presupuesto total solicitado y ejercido para el desarrollo del proyecto y su justificación, infraestructura disponible y la nueva requerida (explicando las razones para su adquisición), así como posibles fondos complementarios.

ANEXO

10. REFERENCIAS. Máximo 25 referencias.

Botero-Coy, A. M., Ibáñez, M., Sancho, J. V., & Hernandez, F. (2013). Direct liquid chromatography–tandem mass spectrometry determination of underivatized glyphosate in rice, harinae and soybean. *Journal of Chromatography A*, 1313, 157-165.

Chen MX, Cao ZY, Jiang Y, Zhu ZW (2012). Direct determination of glyphosate and its major metabolite, aminomethylphosphonic acid, in fruits and vegetables by mixed-mode hydrophilic interaction/weak anion-exchange liquid chromatography coupled with electrospray tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2013 Jan 11;1272:90-9. doi: 10.1016/j.chroma.2012.11.069. Epub 2012 Dec 3. PMID: 23261284.





GOBIERNO DE
MÉXICO



Chamkasem, N., & Harmon, T. (2016). Direct determination of glyphosate, glufosinate, and AMPA in soybean and corn by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 408(18), 4995-5004.

COFEPRIS 2021. Consulta de registros sanitarios de plaguicidas, Nutrientes vegetales LMR. <http://siipris03.cofepris.gob.mx/Resoluciones/Consultas/ConWebRegPlaguicida.asp> (Página visitada el 09-11-2021)

Coullery, R.P., Ferrari, M.E., Rosso, S.B., 2016. Neuronal development and axon growth are altered by glyphosate through a WNT non-canonical signaling pathway. *Neurotoxicology* 52, 150–161.

United States EPA. Environmental Protection Agency. EPA's evaluation of the carcinogenic potential of glyphosate. December 12, 2017. EPA'S Office of Pesticide Programs.

Eslava, P., Ramírez, W. Rondón, I. 2007. Sobre los efectos del glifosato y sus mezclas: impacto en peces nativos. *Institutode acuicultura de los Llanos. Instituto de investigaciones de Orinoquia Colombia*. Pp 34-43

Franke, A.A., Li, X., Shvetsov, Y.B., Lai, J.F., 2021. Pilot study on the urinary excretion of the glyphosate metabolite aminomethylphosphonic acid and breast cancer risk: The Multiethnic Cohort study. *Environ. Pollut.* 277, 116848.

González-Ortega E., Piñeyro-Nelson A., Gómez-Hernández E., Monterrubio-Vázquez E., Arleo M., Dávila-Velderrain J., Martínez-Debat C., & Álvarez-Buylla R.E. (2017): Pervasive presence of transgenes and glyphosate in maize-derived food in Mexico, *Agroecology and Sustainable Food Systems*. DOI: 10.1080/21683565.2017.1372841

Granby, K., Johannesen, S., & Vahl, M. (2003). Analysis of glyphosate residues in cereals using liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS). *Food Additives & Contaminants*, 20(8), 692-698.

Hashimoto, K., Hammock, B.D., 2021. Reply to Reeves and Dunn: Risk for autism in offspring after maternal glyphosate exposure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 118, 22–23.

Ibáñez M, Pozo OJ, Sancho JV, López FJ, Hernández F. (2005). Residue determination of glyphosate, glufosinate and aminomethylphosphonic acid in water and soil samples by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*. Jul 22;1081(2):145-55. doi: 10.1016/j.chroma.2005.05.041. PMID: 16038204.

Jallow, M.F.A., Awadh, D.G., Albaho, M.S., Devi, V.Y., Ahmad, N., 2017. Monitoring of pesticide residues in commonly used fruits and vegetables in Kuwait. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 14.





GOBIERNO DE
MÉXICO



Kwiatkowska, M., Huras, B., Bukowska, B., 2014. The effect of metabolites and impurities of glyphosate on human erythrocytes (in vitro). *Pestic. Biochem. Physiol.* 109, 34–43.

Lopez, S.H., Dias, J., Mol, H., de Kok, A., 2020. Selective multiresidue determination of highly polar anionic pesticides in plant-based milk, wine and beer using hydrophilic interaction liquid chromatography combined with tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1625, 0–7.

Mann, A., 2021. Framing the Future of Food, in: *Food in a Changing Climate*. Emerald Publishing Limited, pp. 65–94.

Tadeu De Araujo-Ramos, A., Tapias Passoni, M., Aure Lio Romano, M., Romano, R.M., Martino-Andrade, A.J., 2021. Controversies on Endocrine and Reproductive Effects of Glyphosate and Glyphosate-Based Herbicides: A Mini-Review. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*.

Valle, A.L., Mello, F.C.C., Alves-Balvedi, R.P., Rodrigues, L.P., Goulart, L.R. 2019. Glyphosate detection: methods, needs and challenges. *Environ Chem Lett* 17, 291–317. <https://doi.org/10.1007>

Woźniak, E., Reszka, E., Jabłońska, E., Mokra, K., Balcerczyk, A., Huras, B., Zakrzewski, J., Bukowska, B., 2020. The selected epigenetic effects of aminomethylphosphonic acid, a primary metabolite of glyphosate on human peripheral blood mononuclear cells (in vitro). *Toxicol. In Vitro* 66, 104878.

Zoller, O., Rhy, P., Rupp, H., Zarn, J.A., Geiser, C., 2018. Glyphosate residues in Swiss market foods: monitoring and risk evaluation. *Food Addit. Contam. Part B Surveill.* 11, 83–91.

Zoller, O., Rhy, P., Zarn, J.A., Dudler, V., 2020. Urine glyphosate level as a quantitative biomarker of oral exposure. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 228, 113526.

