



GOBIERNO DE
MÉXICO



Red de estudios avanzados moleculares

Xalapa, Veracruz. Noviembre de 2021

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).

Elaboró: Dra. Liliana Hortencia Méndez Barredo.

Participantes:

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

Dr. Juan Luis Monribot Villanueva
Técnico Académico "C"
Red de Estudios Moleculares Avanzados
Campus III
Instituto de Ecología A.C. (INECOL)
Xalapa, Veracruz, México

Dr. José Antonio Guerrero Analco
Investigador Titular "A"
Red de Estudios Moleculares Avanzados
Instituto de Ecología A.C. (INECOL)
Xalapa, Veracruz, México

M. en C. José Miguel Elizalde Contreras
Técnico Académico Titular "A"
Red de Estudios Moleculares Avanzados
Campus III
Instituto de Ecología A.C. (INECOL)
Xalapa, Veracruz, México.



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 a., 2013; 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





GOBIERNO DE
MÉXICO



CONACYT
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología



INECOL
INSTITUTO DE ECOLOGÍA, A. C.

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





GOBIERNO DE
MÉXICO



CONACYT
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología



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).

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.





GOBIERNO DE
MÉXICO



Revisión bibliográfica

La revisión de la literatura se realizó para seleccionar las condiciones relacionadas con identificación y cuantificación de glifosato y AMPA por distintos métodos e instrumentos. En la búsqueda se eligió los trabajos que tenían similitudes con nuestras condiciones de trabajo, en equipo, instrumentos y reactivos, así como el objetivo de estudio. En el Cuadro 1 se enlista la literatura revisada en donde se especifican distintas condiciones experimentales.

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).





GOBIERNO DE
MÉXICO



CONACYT
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología



INECOL
INSTITUTO DE ECOLOGÍA, A. C.

En el Cuadro 2 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. Revisión bibliográfica de extracción, detección de AMPA y glifosato en diferentes matrices sin derivatizar.

MATRIZ	COLUMNA	FASE MÓVIL	DETECCIÓN	IONIZACIÓN	REFERENCIA
Arroz Maíz Soja	-Waters Acquity UPLC BEH amide/HILIC (1.7 µm, 2.1 mm x 100 mm) -Siec Obelisc R/N	H2O + 1% HCOOH/ Acetonitrilo + 1% HCOOH	LC-MS/MS	Negativa	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. <i>Journal of Chromatography A</i> , 1313, 157-165.
Soya Maíz	Acclaim™ Trinity™ Q1 (3 µm, 100x 3 mm)	FORMIATO DE AMONIO/ ACIDO FORMICO 500 mM Ph 2.9. + H2O	LC-MS/MS	Negativa	Chamkasem, N., & Harmon, T. (2016). Direct determination of glyphosate, glufosinate, and AMPA in soybean and corn by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. <i>Analytical and bioanalytical chemistry</i> , 408(18), 4995-5004.
Vegetales Frutas (Frescos)	Asahipak NH2P-50 4E (250 mm x 4.6 mm i.d., 5 µM)	A: H2O B: acetonitrilo C: H2O + hidróxido de amonio 0.1 M	HPLC-ESI-MS-MS	Negativa	Chen MX, Cao ZY, Jiang Y, Zhu ZW. 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. <i>J Chromatogr A</i> . 2013 Jan 11;1272:90-9.
Maíz	Dionex Ion pack AS11 (2 x 250 mm);	A: H2O + buffer de fosfatos 6 mM B: Metanol	LC-MS/MS	Positiva	Angela Santilio, Chiara Pompili & Arianna Giambenedetti (2019): Determination of glyphosate residue in harinae and rice using a fast and easy method involving liquid chromatography-mass spectrometry (LC/MS/MS), <i>Journal of Environmental Science and Health</i> .
Suelo	Waters NovaPak C18, 300 x 3.9 mm	A: H3PO4 al 0.2% B: Acetonitrilo	HPLC	Negativa	Druart, C., Delhomme, O., De Vaufleury, A., Ntcho, E., & Millet, M. (2011). Optimization of extraction procedure and chromatographic separation of glyphosate, glufosinate and aminomethylphosphonic acid in soil. <i>Analytical and bioanalytical chemistry</i> , 399(4), 1725-1732.
Canola	Zorbax Eclipse Plus C18 Rapid Resolution HP (100 x 2.1 mm, 1.8 µm)	A: 1% de ácido acético B: 1% de ácido acético + Metanol	LC-MS/MS	Negativa	Kaczyński, Piotr and Łozowicka, Bożena. "Liquid chromatographic determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid residues in rapeseed with MS/MS detection or derivatization/fluorescence detection" <i>Open Chemistry</i> , vol. 13, no. 1, 2015, pp. 000010151520150107.





Cuadro 2. 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

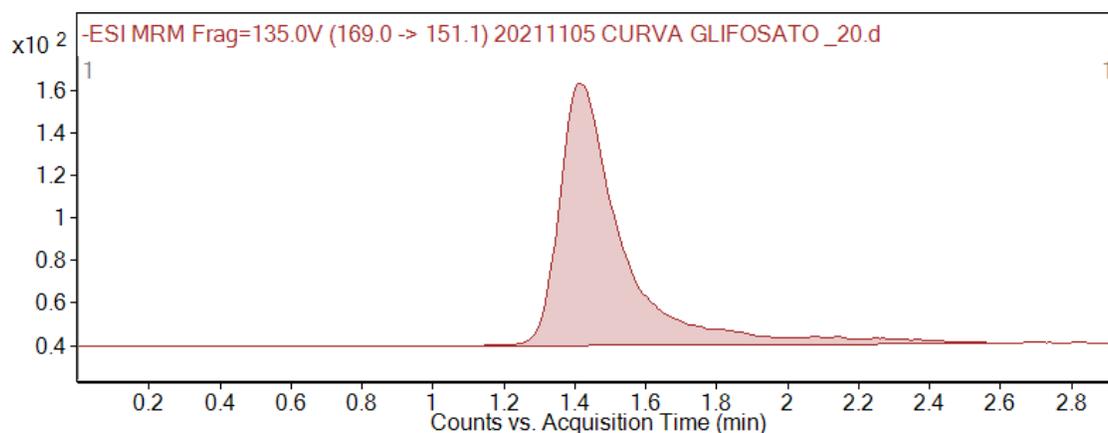


Figura 1. Cromatograma representativo de glifosato 20 µM.

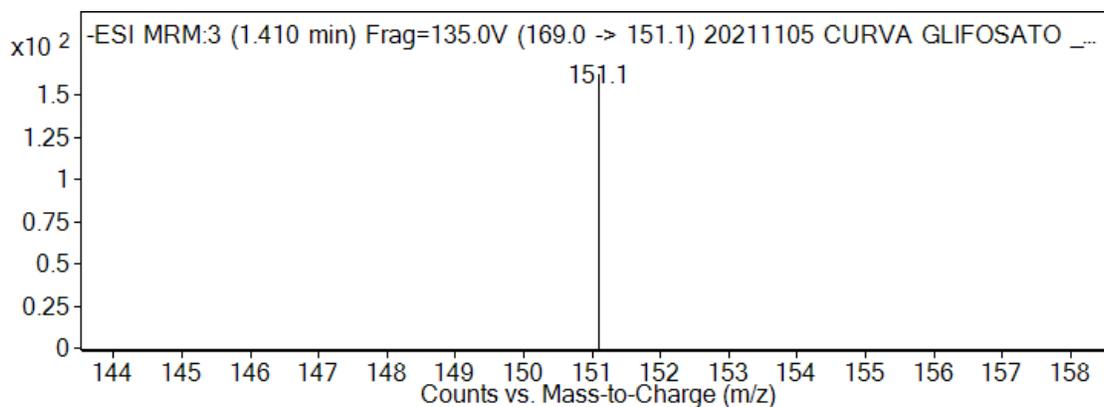


Figura 2. Espectro de masas representativo de la transición 169.0>151.1 utilizada para la identificación de glifosato.



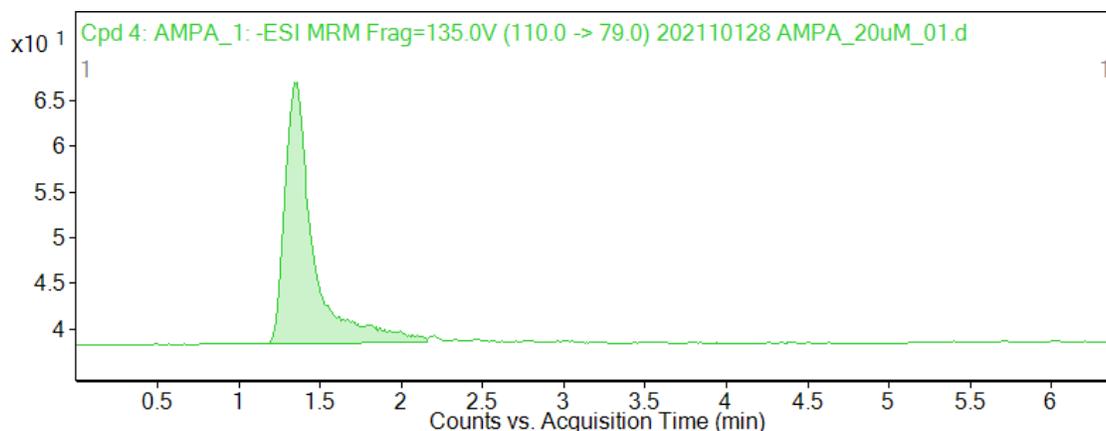


Figura 3 Cromatograma representativo de AMPA 20 μ M.

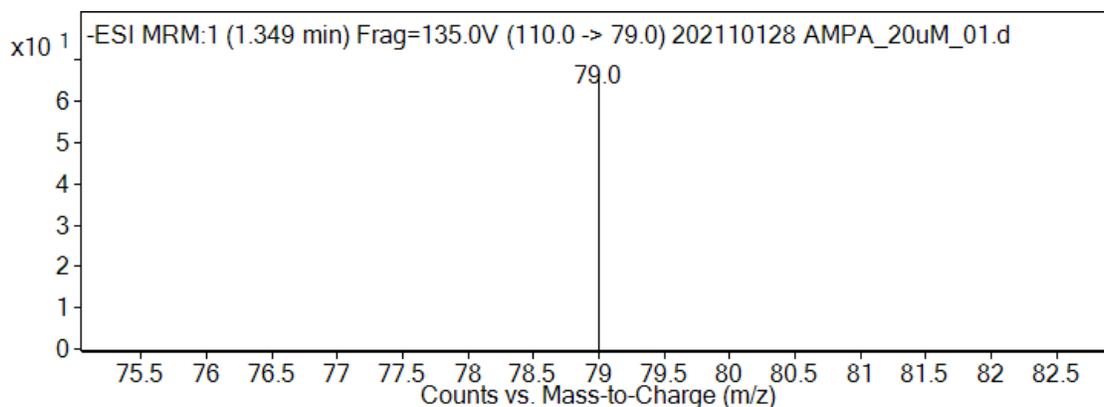


Figura 4. Espectro de masas representativo de la transición 110.0>79.0 utilizada para la identificación de AMPA.

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 μ M. 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.



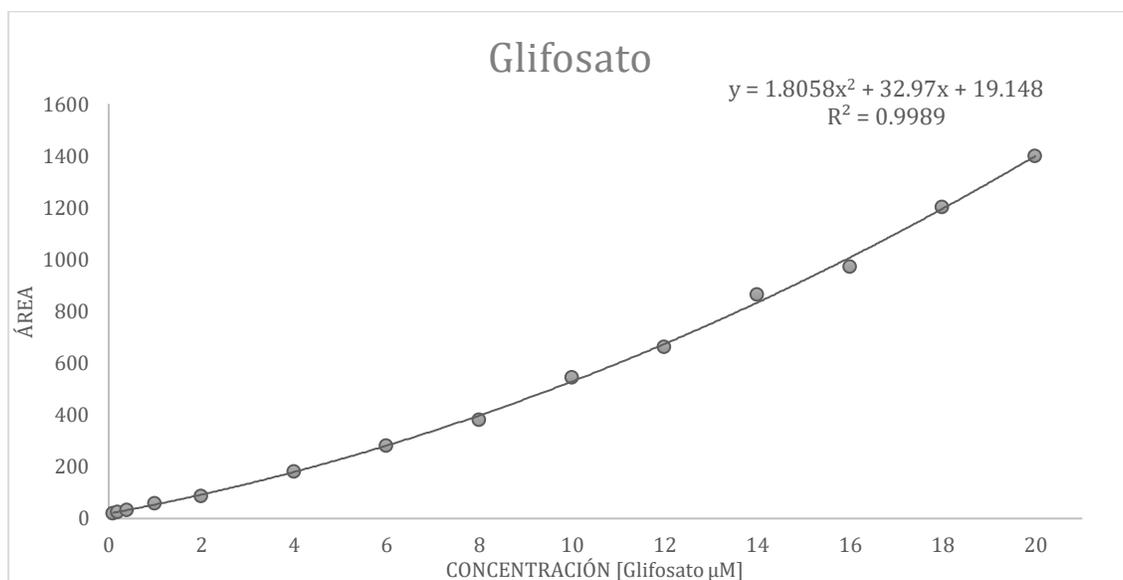


Figura 5. Curva de calibración de Glifosato

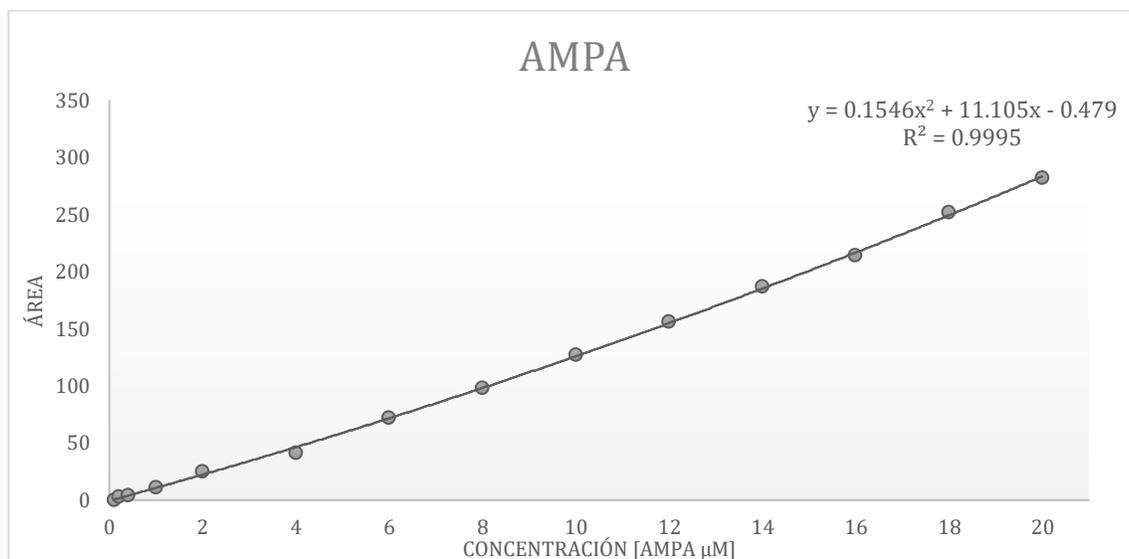


Figura 6. Curva de calibración para AMPA.

Con la finalidad de evaluar la sensibilidad del método se determinó la relación señal-ruido a la concentración de 1 μM. En el Cuadro 3 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 $1 \mu\text{M}$.

Cuadro 3. Relación señal ruido.

Compuestos	Concentración	Relación Señal/Ruido)
Glifosato	$1 \mu\text{M}$	52.5
AMPA	$1 \mu\text{M}$	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 $0.1\text{-}20 \mu\text{M}$. La figura 9 muestra la reproducibilidad de la cuantificación de glifosato de distintas inyecciones a la misma concentración.



Reproducibilidad de curva de glifosato

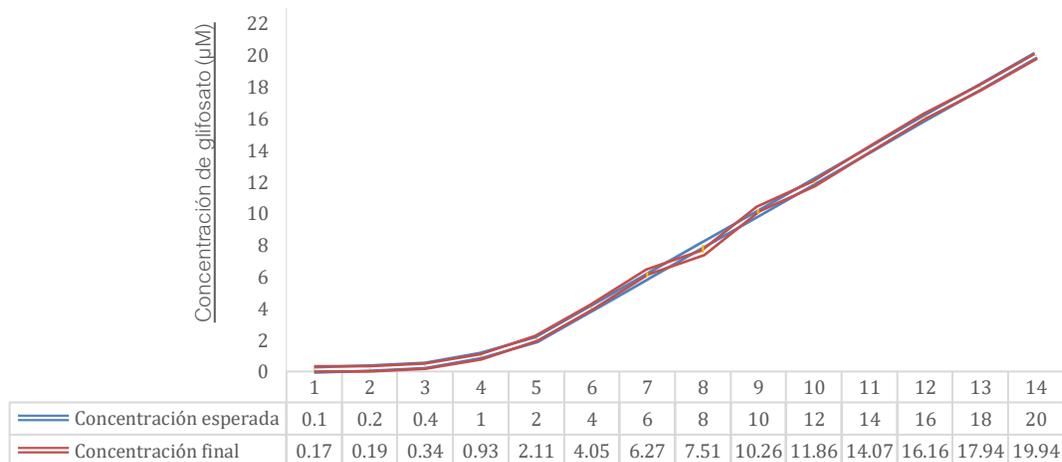


Figura 7. En azul la concentración que fue preparada para la inyección de la curva, en naranja la concentración cuantificada por el LC-MS/MS (el resultado del promedio de tres distintas inyecciones).

Reproducibilidad de curva de AMPA

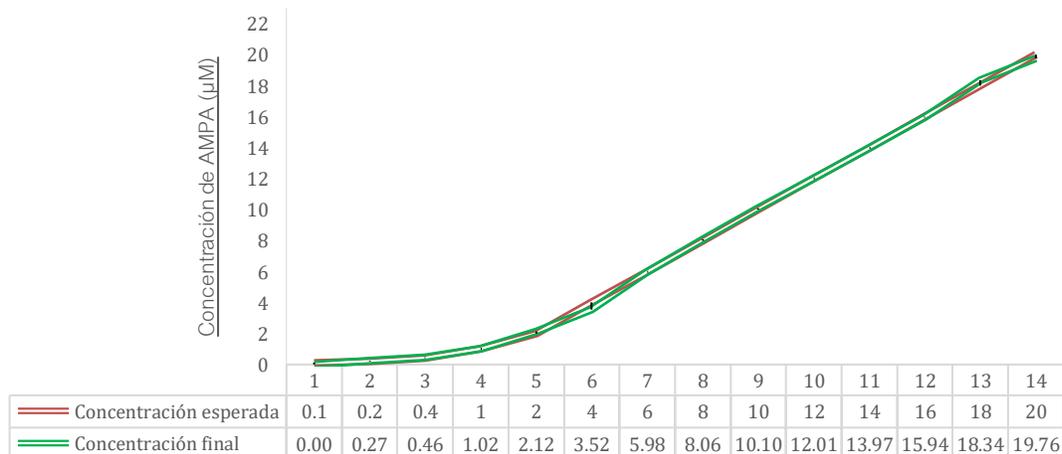


Figura 8. En línea naranja la concentración preparada para inyección en el equipo, y en verde el valor real cuantificado por el equipo LC-MS/MS. Promedio de dos inyecciones.

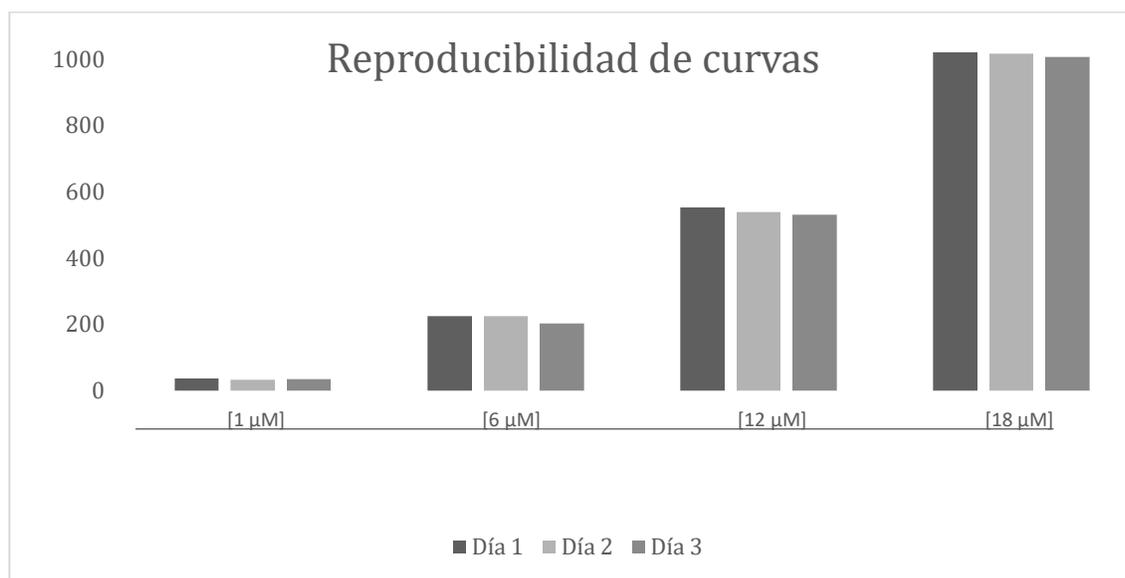


Figura 9. Reproducibilidad en la cuantificación de glifosato de cuatro distintas concentraciones analizadas en tres diferentes días.

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.



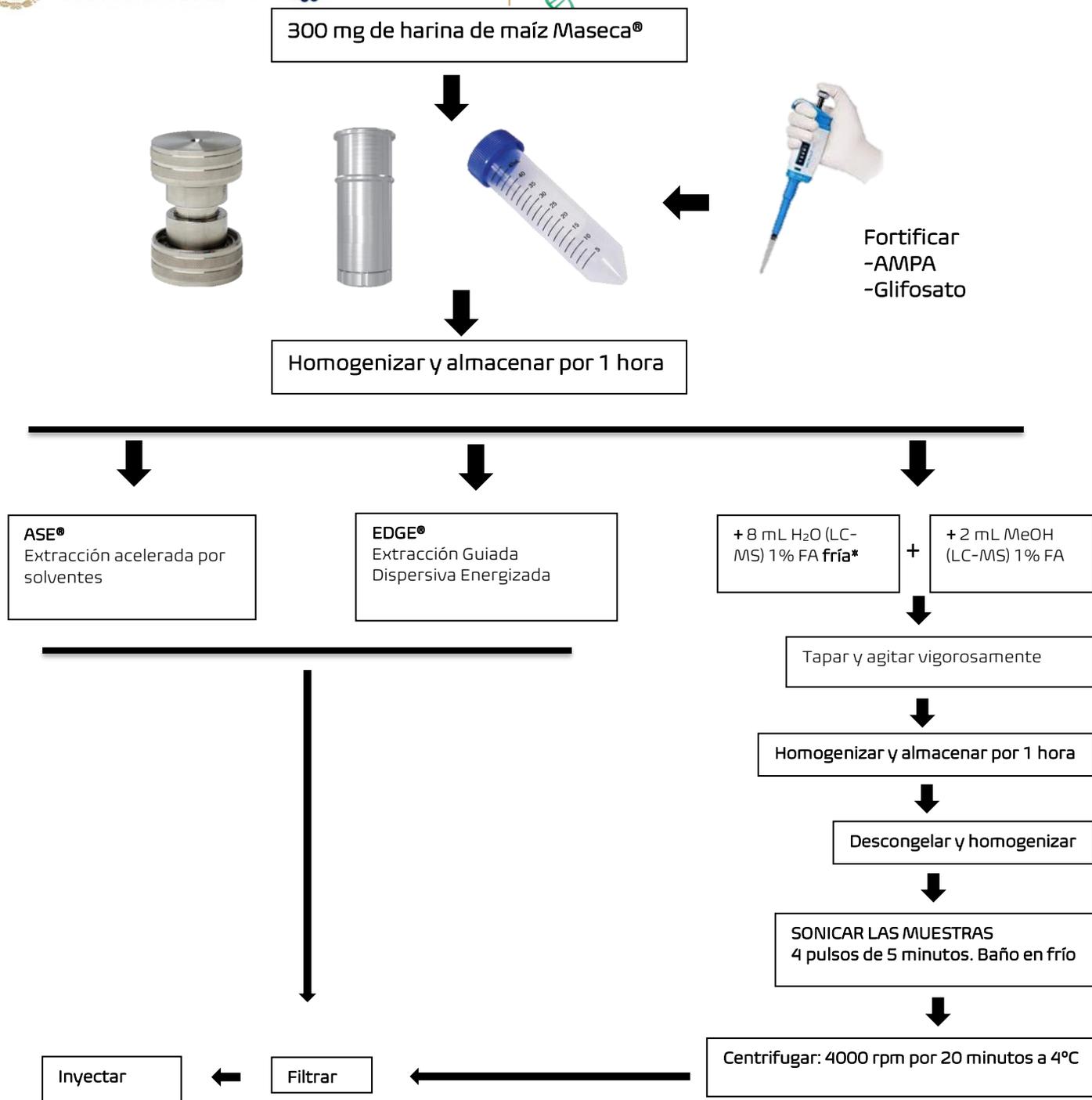


Figura 10. Esquema de trabajo usado para la extracción de muestras para AMPA y glifosato por los distintos sistemas (EDGE, ASE, ultrasonicación).



GOBIERNO DE
MÉXICO



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. Los sonidos se propagan por medio de ondas de compresión y expansión, y generan la suficiente presión como para romper las fuerzas de cohesión de las moléculas, separándolas para crear una micro cavidad o burbuja en donde, generalmente existen pequeñas partículas en disolución, gases disueltos o microburbujas. Estas burbujas crecen en varios ciclos acústicos hasta que logran una medida crítica e inestable en la que pueden absorber y saturarse de energía, en donde ya no pueden mantener su estabilidad y el líquido que la rodea entra violentamente dentro de la burbuja, ocasionando su implosión.

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 ultrasonicador programando pulsos de 5 minutos (Figura 11).





GOBIERNO DE
MÉXICO



Figura 11. A) Ultrasonicador B) Muestras para ser procesadas en el ultrasonicador.

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 (Figura 12 A).
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 (Figura 12 B).
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 (Figura 12 B).

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 cierre la válvula estática.





GOBIERNO DE
MÉXICO



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.

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.



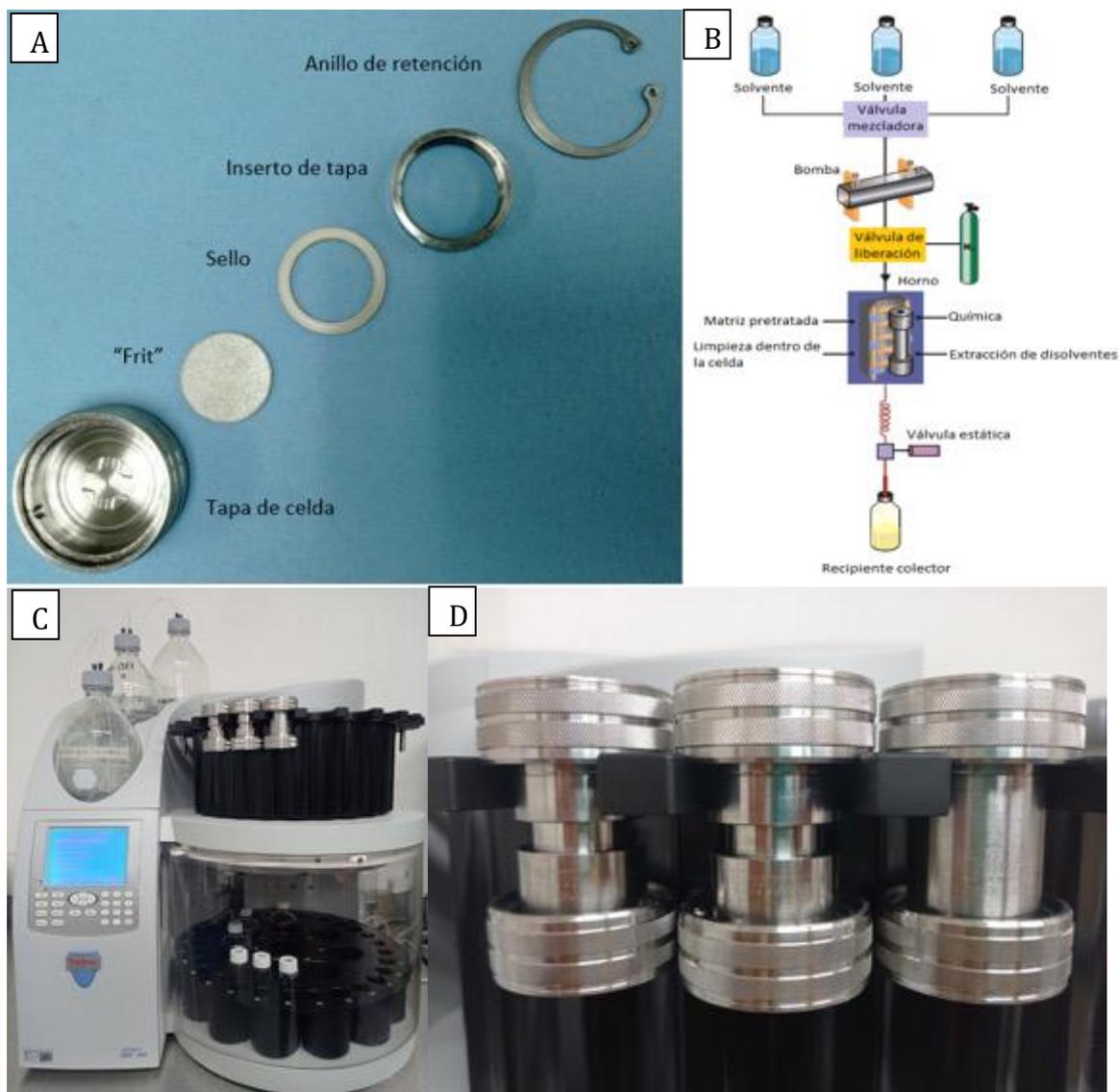


Figura 12. A) Piezas de celda de ASE. B) Flujo de trabajo de equipo ASE (Caricatura modificada del manual de procedimientos). C) Equipo montado. D) Celdas ensambladas.





GOBIERNO DE
MÉXICO



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).

Métodos

-Extracción dispersiva energizada: extrae compuestos orgánicos semi-volátiles del suelo, grasa de alimentos y los ftalatos de plásticos.

-SPE Energizado dispersivo: alternativa al método QuEChERS para la extracción y limpieza más efectivas de matrices difíciles.

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 (Figura 13B).

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





GOBIERNO DE
MÉXICO



CONACYT
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología



INECOL
INSTITUTO DE ECOLOGÍA, A. C.

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 (Figura 13A).

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 (Figura 13C).



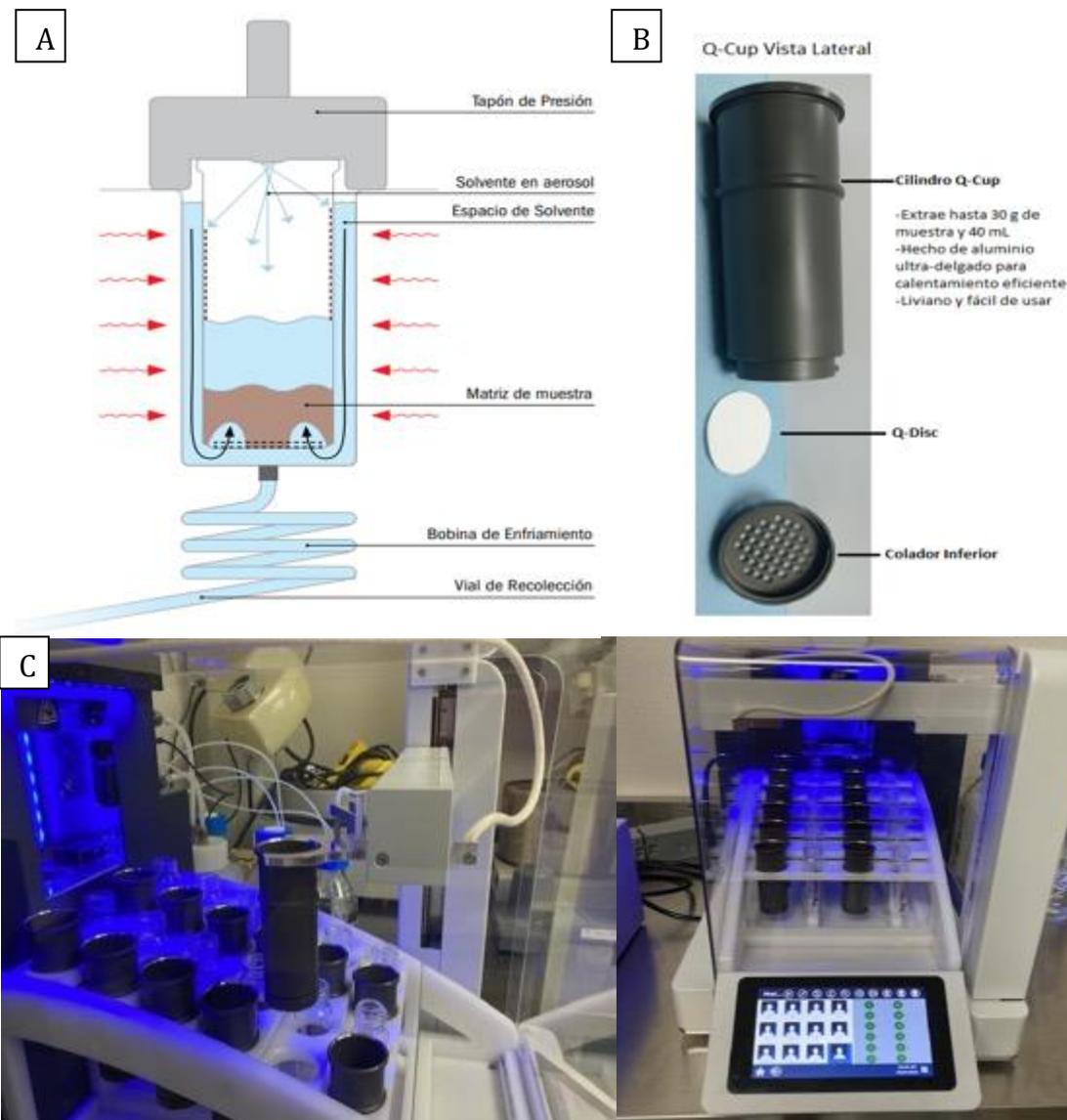


Figura 13. A) Flujo de trabajo del equipo EDGE (Imagen tomada del manual de funcionamiento). B) Piezas de Q-Cup. C) Equipo montado, vistas lateral (izquierda) y frontal (derecha).

El Cuadro 4 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 4) y 80 mL para las condiciones restantes (C, F, I y L del Cuadro 4). 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 5 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 4. 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 5. 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 la 6 se muestran los resultados de la extracción de glifosato con los sistemas evaluados y las condiciones usadas, volúmenes y proporciones de disolventes. La figura 14 muestra la representación gráfica de los datos, se puede observar que los sistemas de extracción por ASE y sonicación muestran los valores más altos de recuperación con 109.19% y 93%, respectivamente, con 80:20 H2O-MeOH acidificado con 1% de ácido fórmico.

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 H2O-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

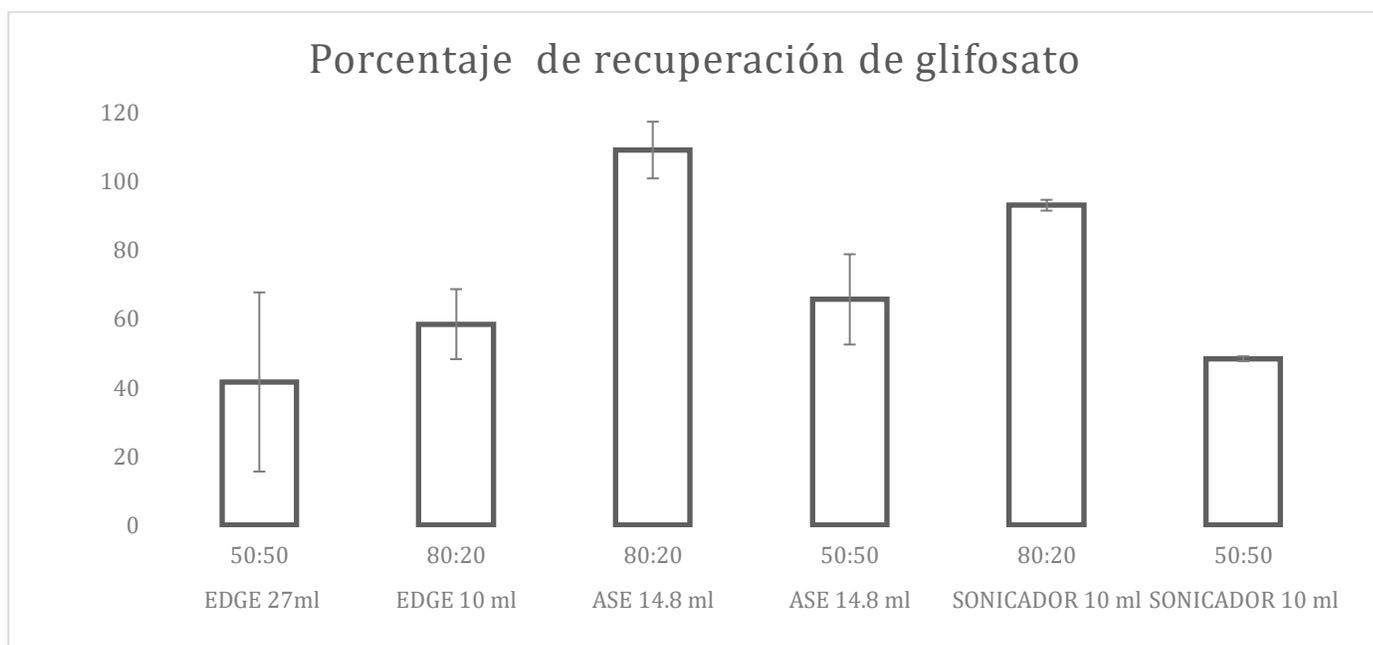


Figura 14. Porcentaje de recuperación de glifosato de maíz fortificado.





Cuadro 7. Métodos de detección de maíz fortificado con AMPA

SISTEMA	FASE MÓVIL	PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN DE AMPA	DESV. STD
SONICADOR 10 mL	100% H2O	9.70	0.24
SONICADOR 10 mL	80:20 H2O-MeOH + 1 % FA	7.35	0.39
SONICADOR 10 mL	50:50 H2O-MeOH + 1 % FA	0.00	0.00

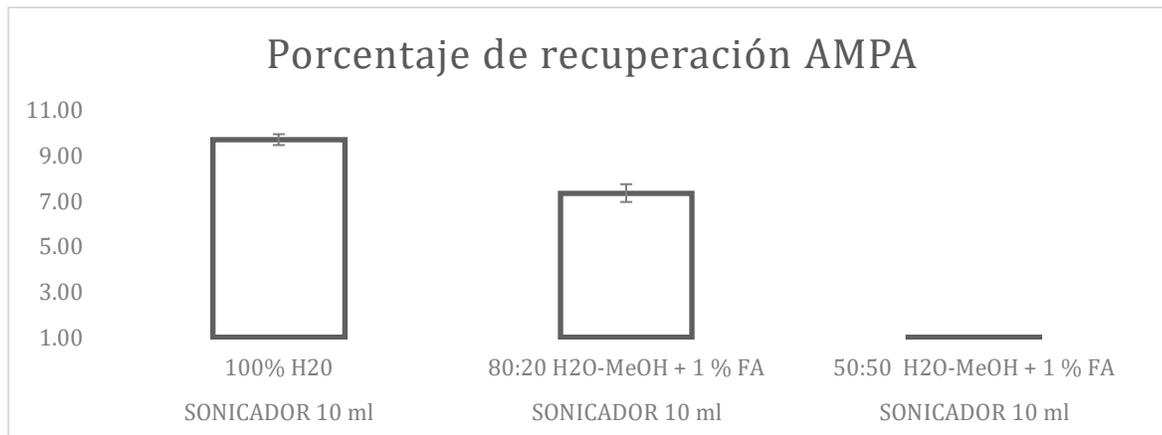


Figura 15. Porcentaje de recuperación de AMPA en harina fortificada





GOBIERNO DE
MÉXICO



Discusión

La metodología desarrollada en este trabajo permite tener un porcentaje bueno de extracción para glifosato con todos los métodos (ASE, EDGE, SONICACIÓN). Sobresale 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 muestras muy rápido y 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%.





**GOBIERNO DE
MÉXICO**



CONACYT
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología



INECOL
INSTITUTO DE ECOLOGÍA, A. C.

Conclusiones

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



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.

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.





GOBIERNO DE
MÉXICO



CONACYT
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología



INECOL
INSTITUTO DE ECOLOGÍA, A.C.

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. Instituto de 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.





GOBIERNO DE
MÉXICO



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.

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.





GOBIERNO DE
MÉXICO



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.

