



GOBIERNO DE
MÉXICO



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)

Introducción

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) El éxito de su popularidad es especialmente por 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 de cuantificación son complejos y costosos (Botero et al., 2013; Chen et al., 2012).

En las últimas décadas este agroquímico ha generado controversia, ya que se considera causante de padecimientos de salud 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), 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.

El problema ante el uso excesivo de glifosato radica en que la exposición a este agente químico no solo se obtiene 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 en muchos alimentos, frescos (Jallow et al., 2017), procesados (Mann, 2021) fluidos humanos como orina (Zoller et al., 2020) y sangre (Woźniak et al., 2020; González et al., 2007).

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.

Objetivo





El objetivo de este trabajo es 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.

Desarrollo experimental

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.

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. Los métodos de identificación y cuantificación de glifosato y de AMPA se evaluaron por distintos métodos de extracción. Se decidió utilizar harina comercial de maíz por su alto grado de homogenización y su reducido tamaño de partícula. Se realizaron extracciones por distintos métodos y condiciones y las posteriores cuantificaciones de muestras enriquecidas (adicionadas con glifosato y AMPA) y no enriquecidas. Los métodos de extracción evaluados fueron sonicación, extracción acelerada por disolventes (ASE) y extracción guiada dispersiva energizada (EDGE).

Resultados

Curvas de calibración de glifosato y AMPA

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 1).

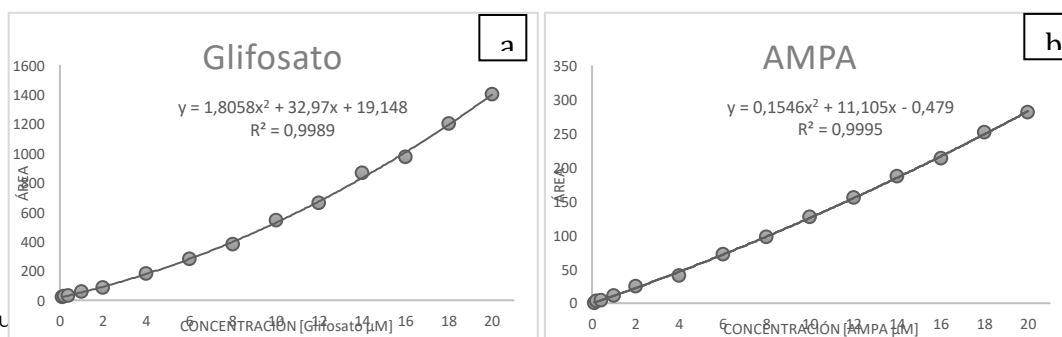


Figura 1. Cu

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).

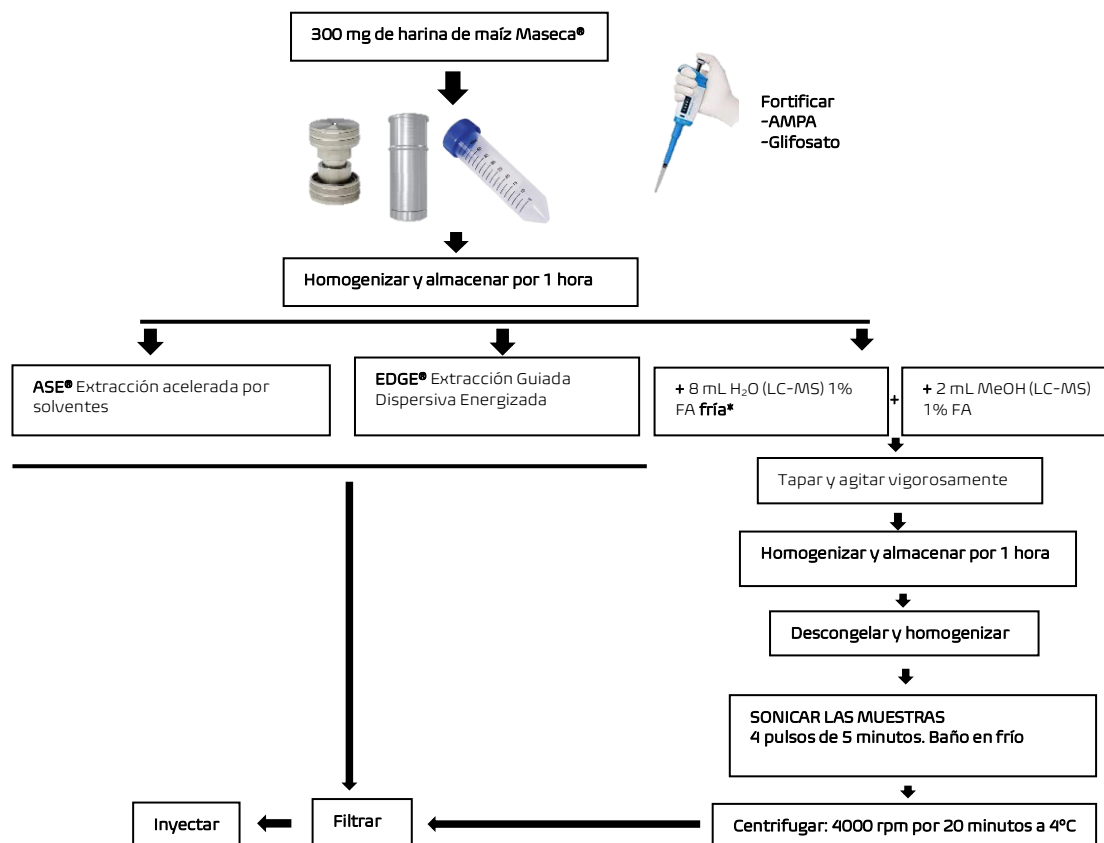


Figura 2. Esquema de trabajo usado para la extracción de muestras para AMPA y glifosato por los distintos sistemas (EDGE, ASE, ultrasonificación).

Se muestran los resultados de la extracción de glifosato con los sistemas evaluados y las condiciones usadas, volúmenes y proporciones de disolventes. La figura 3 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.

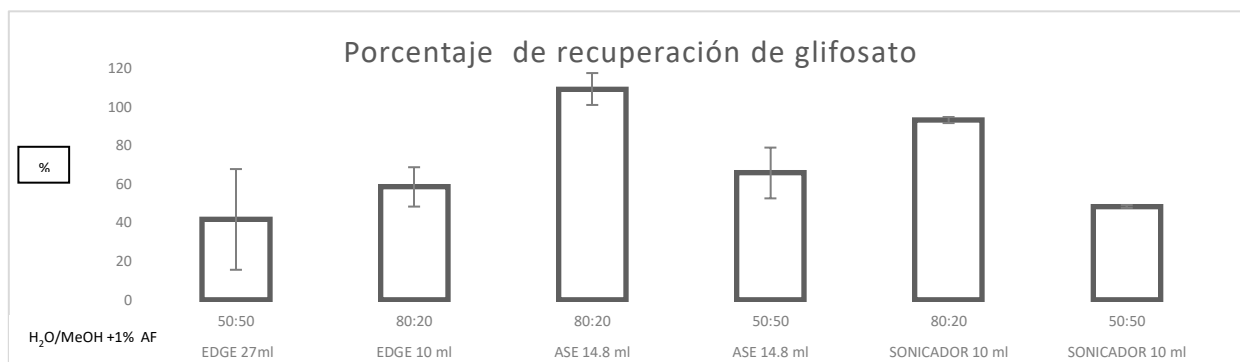


Figura 3. Porcentaje de recuperación de glifosato de maíz fortificado.

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. En la figura 4 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%.

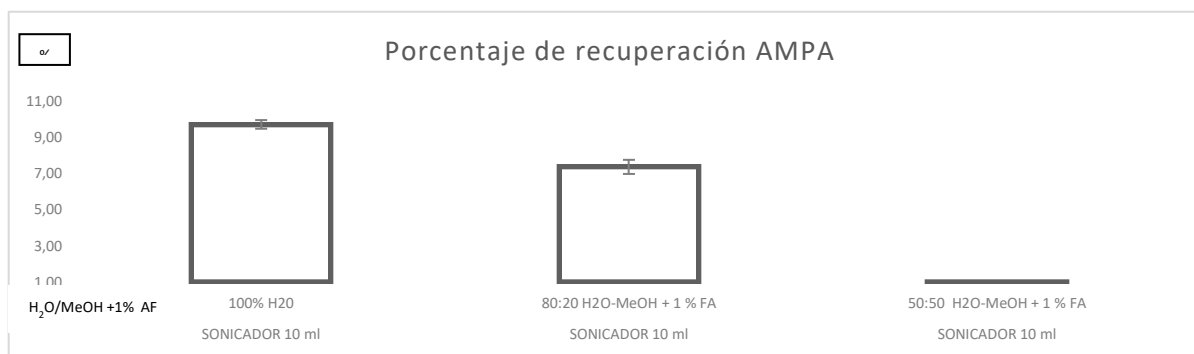


Figura 4. Porcentaje de recuperación de AMPA en harina fortificada

Discusión y conclusiones

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



GOBIERNO DE
MÉXICO



UPLC-MS-QqQ, que permite la detección y cuantificación de glifosato y del ácido aminometilfosfónico en matrices derivadas de granos de maíz

Literatura

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.

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.

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. Epub 2012 Dec 3. PMID: 23261284.

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.

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).

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.

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.

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*.

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.

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).

Valavanidis, A. (2018). "Glyphosate, the Most Widely Used Herbicide. Health and safety issues. Why scientists differ in their evaluation of its adverse health effects". Disponible en <http://chemtox-ecotox.org/ScientificReviews/>

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.





**GOBIERNO DE
MÉXICO**



CONACYT
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología



INECOL
INSTITUTO DE ECOLOGÍA, A. C.

Zoller, O., Rhyn, 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.

