

Información Importante

La Universidad Santo Tomás, informa que el(los) autor(es) ha(n) autorizado a usuarios internos y externos de la institución a consultar el contenido de este documento a través del catálogo en línea, página web y Repositorio Institucional del CRAI-USTA, así como en las redes sociales y demás sitios web de información del país y del exterior con las cuales tenga convenio la Universidad.

Se permite la consulta a los usuarios interesados en el contenido de este documento, para todos los usos que tengan **finalidad académica**, siempre y cuando mediante la correspondiente cita bibliográfica se le dé crédito al trabajo de grado y a su autor, nunca para usos comerciales.

De conformidad con lo establecido en el Artículo 30 de la Ley 23 de 1982 y el artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, la Universidad Santo Tomás informa que “los derechos morales sobre documento son propiedad de los autores, los cuales son irrenunciables, imprescriptibles, inembargables e inalienables.”

**Centro de Recursos para el Aprendizaje y la Investigación, CRAI-USTA
Universidad Santo Tomás, Bucaramanga**

**Implementación de una técnica de cromatografía líquida de alta eficiencia para
detección de glifosato en suelos, lixiviados, tomate (*Solanum lycopersicum*) y albahaca
(*ocimum basilicum*)**

Eliana Marcela Bernal Barreto

Trabajo de grado para optar el título de Químico Ambiental

Director

Ciro Eduardo Roza Correa

Químico, M.Sc

Ricardo Restrepo Manrique

Biólogo, Esp.

Universidad Santo Tomás, Bucaramanga

División de Ingenierías y Arquitectura

Facultad de Química Ambiental

2020

Dedicatoria

A Dios, quien en medio de tantas dificultades nunca me ha abandonado, a quien siempre he acudido y en esta etapa que me permitió vivir, me enseñó más de lo que esperaba.

A mis padres Luis y Elsa, siempre creyeron en mi ciegamente, en mis capacidades y en la persona que formaron, para ellos siempre serán mis logros y todo lo que vendrá, no sería nadie sin su guía y apoyo permanente.

A mis tíos Rafael y Guillermo, por su esfuerzo, desveladas y arduo trabajo, por ustedes puedo decir que tengo 3 padres, por ellos también he llegado a este punto, gracias por todo el apoyo, sin ellos no estaría acá. Mi agradecimiento es infinito hacia ustedes dos.

A mi director Ciro, no se alcanza a imaginar lo agradecida que estoy de haberlo encontrado en este camino tan duro, gracias por esa guía constante, por la paciencia y sobre todo por creer en mí.

A mis hermanas a quienes espero dar el ejemplo correcto y adecuado de esfuerzo para verlas ser mejor de lo que yo puedo ser, esa sería mi recompensa con ustedes.

Agradecimientos

Agradezco a la Universidad Santo Tomás seccional Bucaramanga por su apoyo económico en el marco del proyecto de la X convocatoria.

A mis directores por su disposición y ayuda intelectual en la elaboración, corrección y crítica de este trabajo.

A mis profesores por toda su contribución y entrega a lo largo de mi formación profesional.

Al departamento de laboratorio y ciencias básicas por el préstamo y disponibilidad del equipo de cromatografía y material requerido.

Contenido

	Pág.
Introducción	13
1. Objetivos	15
1.1 Objetivo General	15
1.2 Objetivos Específicos	15
2. Marco Referencial	16
2.1 Marco Teórico.	16
2.2 Estado del Arte	18
3. Método	24
3.1. Análisis Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia con Arreglo de Diodos	26
3.1.1. Derivatización	26
3.1.2. Determinación de glifosato	27
3.1.3. Cuantificación	27
3.1.4. Análisis estadístico del método	27
3.2. Preparación de muestras	27
3.2.1. Extracción de glifosato de suelos	27
3.2.2. Extracción de glifosato de plantas.....	28
4. Resultados y Discusión	29
5. Conclusiones	43
Referencias Bibliográficas	44

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1 <i>Muestras de suelos</i>	40
Tabla 2. <i>Muestras de lixiviados</i>	41
Tabla 3 <i>Muestras de plantas</i>	42

Lista de figuras

	Pág.
<i>Figura 1.</i> Molécula Glifosato	16
<i>Figura 2.</i> Diagrama de componentes para un equipo de HPLC	17
<i>Figura 3.</i> Reacción de derivatización del glifosato con FMOC-Cl.	29
<i>Figura 4.</i> Derivados de FMOC-Cl.....	30
<i>Figura 5</i> Cromatograma blanco FMOC-Cl	30
<i>Figura 6.</i> Cromatograma Glifosato.....	31
<i>Figura 7.</i> Variación del tiempo en la derivatización	32
<i>Figura 8.</i> Variación de la agitación en la derivatización	33
<i>Figura 9.</i> Variación del pH en la derivatización.....	34
<i>Figura 10.</i> Variación de la concentración FMOC-Cl en la derivatización.....	35
<i>Figura 11.</i> Concentración vs área glifosato 0,5-50 ppm	36
<i>Figura 12.</i> Curvas de calibración por triplicado	37
<i>Figura 13.</i> Resultados cuantificación	38

Lista de apéndices

Apéndice A. Concentración vs área glifosato 0,5-50 ppm.....	48
Apéndice B. Curvas de calibración triplicado.....	48
Apéndice C. Resultados cuantificación.	49

Glosario

Ácido desoxirribonucleico (ADN): moléculas de interior de la célula que contienen información genética y la transmiten de una generación a otra (NIH, 2019).

Ácido aminometilfosfónico (AMPA): principal metabolito del glifosato (OMS, 2004).

Biosíntesis: proceso de diferentes pasos con acción catalítica enzimática donde los sustratos se convierten productos complejos en organismos vivos (Alberts, 2007).

Cloruro de fluorenilmetil oxicarbonil (Fmoc): éster de cloroformiato.

Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC): técnica analítica utilizada para separar los componentes de un analito (Miranda & Martín, 2013).

Enolpiruvilshikimato fosfato sintetasa (EPSPS): enzima de la ruta metabólica de shikimato (USDA, n.d.).

Glifosato: ingrediente activo de algunos herbicidas de amplio espectro (MONSANTO, 2018).

Herbicida: compuesto químico que causa una disrupción en la fisiología o metabolismo de una planta por el tiempo suficiente para matarla o reducir su crecimiento (Anzalone, 2008).

Límite de cuantificación (LOQ): cantidad más pequeña de un analito que se pueda cuantificar por un instrumento (Quino, Ramos, & Guisbert, 2007).

Límite de detección (LOD): concentración del elemento que producirá un cociente de la señal/ruido, amplitud de la señal y el ruido de la línea de fondo; concentración más baja que se puede distinguir a partir del cero (Quino et al., 2007).

Quelante: compuesto químico que se une con firmeza a los iones metálicos (NIH, 2019).

Resumen

El glifosato es el producto agroquímico más utilizado actualmente por la industria agropecuaria, sus resultados sobre la inhibición de plantas indeseadas y su selectividad han hecho de este producto el más usado en la actualidad (Madrid, 2011); sin embargo, en países como Colombia se considera también para la erradicación de cultivos ilícitos (Solomon et al., 2005).

Diferentes estudios han demostrado que el glifosato y su metabolito secundario AMPA, acarrear problemas a largo plazo sobre la salud (enfermedad de Párkinson, enfermedad celiaca) (Samsel & Seneff, 2013) y el medio ambiente (Mantilla et al., 2012), en Colombia no se ha planteado hasta el momento una metodología de detección en suelos y plantas.

Teniendo en cuenta esto, se planteó una metodología para la detección de glifosato en un equipo de cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD). Para esto, se realizó una curva de calibración, la cual arrojó un coeficiente de determinación (R^2) de 0,9975, para garantizar la reproducibilidad del método se hizo la curva por duplicado y triplicado donde se obtuvieron resultados de R^2 de 0,9994 y 0,9987 respectivamente; igualmente, se analizó un patrón externo de una concentración conocida de 20ppm de RoundUp®. Con los datos obtenidos se establecieron límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ).

Establecidas las condiciones para la detección de glifosato, se procedió a determinarlo en muestras reales, en este caso en suelos, lixiviados y plantas de tomate y albahaca, los cuales se les realizó el respectivo pretratamiento de extracción y luego el análisis los cuales arrojaron concentraciones del pesticida analizado.

Palabras Clave: Glifosato, AMPA, HPLC-DAD, agroquímico, curva de calibración, LOD, LOQ.

Abstract

Glyphosate is the most widely used agrochemical product currently by the agricultural industry, its results on the inhibition of unwanted plants and its selectivity have made this product the most widely used today (Madrid, 2011); however, in countries like Colombia it is also considered for the eradication of illicit crops (Solomon et al., 2005).

Different studies have shown that glyphosate and its secondary metabolite AMPA, cause long-term problems on health (Parkinson's disease, celiac disease) (Samsel & Seneff, 2013) and the environment (Mantilla et al., 2012). , in Colombia, a detection methodology in soils and plants has not been proposed so far.

Taking this into account, a methodology for the detection of glyphosate was proposed in a high-efficiency liquid chromatography equipment with a diode array detector (HPLC-DAD). For this, a calibration curve was carried out, which yielded a determination coefficient (R^2) of 0.9975, to guarantee the reproducibility of the method, the curve was made in duplicate and triplicate where R^2 results of 0.9994 were obtained and 0.9898 respectively; Likewise, an external standard of a known concentration of 20ppm of RoundUp® was analyzed. With the obtained data, limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were established.

Once the conditions for glyphosate detection were established, it was determined in real samples, in this case in soils, leachates, and tomato and basil plants, which underwent the respective extraction pretreatment and then the analysis, which showed concentrations of pesticide analyzed.

Key Word- Glyphosate, AMPA, HPLC-DAD, agrochemical, calibration curve, LOD, LOQ.

Introducción

El glifosato es el compuesto activo del herbicida comercial Roundup® ampliamente utilizado en la industria agrícola con el fin de prevenir el crecimiento de plantas invasoras que afectan la salud del cultivo; el ingrediente activo del herbicida afecta la enzima EPSP (5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintetasa) la cual es responsable del crecimiento, sin embargo, esta enzima no está presente en humanos y animales por lo cual el producto es seguro en caso de posible contacto directo (Monsanto.2018).

El glifosato es un herbicida de amplio espectro no selectivo, es un ácido orgánico débil y su estructura química está formada por una fracción de glicina y otra de fosfonometil (Monroy, Cortés, & Sicard, 2005). Con una alta capacidad de traslocación basipetal, lo que indica que se transporta rápidamente de las hojas (primer contacto del herbicida con la planta) hasta el tallo (Jayasumana, Gunatilake, & Senanayake, 2014).

En su acción herbicida, el glifosato es un quelante de metales sistémicos que ejerce una acción sobre la enzima EPSP inhibiendo la vía metabólica del ácido shikímico (Johal & Huber, 2009) en la biosíntesis del triptófano, tirosina y fenilalanina; este proceso sólo se presenta en plantas, hongos y bacterias.

El uso indiscriminado del glifosato en la industria agrícola ha venido en crecimiento y más en un país como Colombia, donde se usa también para la erradicación de cultivos ilícitos. Se dice que sólo el 14% del glifosato del país se usa para la erradicación de cultivos de amapola, cocaína y marihuana (Solomon et al., 2005).

Estudios han demostrado que el glifosato puede ser dañino para los humanos, animales y el ambiente. En humanos se han reportado casos como el desarrollo de párkinson (Caballero et al., n.d.), enfermedad celíaca (Samsel & Seneff, 2013), deficiencia de Manganese (Samsel & Seneff, 2015), deficiencias renales (Jayasumana et al., 2014) y daños en el ADN (Monroy et al., 2005). La enfermedad celíaca puede traer consigo el desarrollo de anemia y cáncer de tipo linfoma Non-Hodgkin (Samsel & Seneff, 2013).

En el ambiente el glifosato puede afectar el suelo al causarle infertilidad, ya que se adsorbe rápidamente en las fracciones minerales. La sorción del glifosato puede ser un proceso reversible, lo cual regula la vida media del producto, igualmente, la movilidad en el suelo está ligado a factores ambientales como la escorrentía llegando a afectar fuentes de aguas superficiales como subterráneas. (De Gerónimo, Aparicio, & Costa, 2018).

En Colombia no hay muchos estudios sobre el glifosato por tal razón en el presente proyecto se implementó la técnica analítica de cromatografía líquida de alta resolución para la determinación de glifosato en suelos, lixiviados y plantas en el proyecto “Fitorremediación de suelos contaminados con glifosato y sus efectos socioeconómicos en la vereda los aceites del municipio de Tame, Arauca” de X convocatoria interna USTA.

1. Objetivos

1.1. Objetivo General

Implementar la técnica analítica de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) para determinar la concentración de glifosato presente en suelos, lixiviados y plantas de tomate y albahaca.

1.2. Objetivos Específicos

- Establecer las condiciones óptimas para la derivatización del glifosato y la extracción en las muestras de suelos y plantas de tomate y albahaca.
- Implementar la técnica analítica cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de arreglo de diodos para el análisis de glifosato en el laboratorio de investigaciones de la universidad Santo Tomás.

2. Marco Referencial

2.1. Marco Teórico.

El glifosato [N- (fosfonometil)glicina] (*Figura 1*) es un herbicida organofosforado de amplio espectro con una acción no selectiva, comúnmente usado en la industria agrícola y como control de vegetación en áreas que no han sido cultivadas (Wigfield & Lanouette, 1990)(Islas, Rodriguez, Mendoza-Huizar, Pérez-Moreno, & Carrillo, 2014). El glifosato es un ácido, usado como isopropilamina, en su presentación, físicamente se percibe como un polvo altamente soluble en agua debido a su característica de sal altamente polar. En su molécula presenta una estructura de grupos ácidos como es el caso del fosfonato y ácido carboxílico, al igual que un grupo básico como una amina secundaria (Albers, Banta, Hansen, & Jacobsen, 2009).

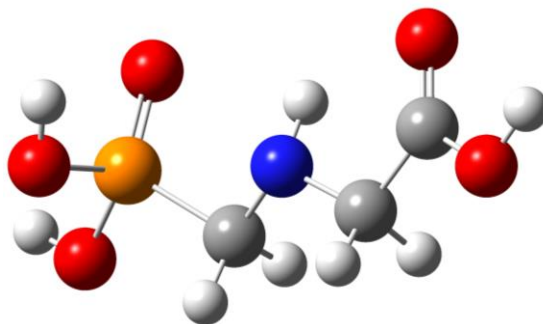


Figura 1. Molécula Glifosato.

La cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) es una clase de cromatografía por elusión, su uso se considera versátil y por lo tanto es el más utilizado. La técnica es utilizada para separar y aislar diferentes analitos biológicos, inorgánicos y orgánicos. La cromatografía líquida puede clasificarse de acuerdo a su tipo de fase estacionaria o su mecanismo de separación, los cuales son: Cromatografía de partición, cromatografía de adsorción, cromatografía iónica,

cromatografía de exclusión molecular, cromatografía de afinidad y cromatografía quirál (Skoog, West, Holler, & Crouch, 2015).

La cromatografía líquida de alta eficiencia es un tipo de cromatografía que combina una fase móvil líquida y una fase estacionaria finalmente dividida. Con el fin de obtener velocidades de flujo satisfactorias, el líquido debe ser presurizado en libras por pulgada cuadrada (Skoog et al., 2015).

Un equipo de cromatografía líquida de alta eficiencia está equipado (*Figura 2.*) básicamente de una fase móvil (disolvente), una válvula reguladora de disolvente, una bomba que regula la presión de paso de la fase móvil por la columna, válvulas de retención de salida y entrada, una jeringa de purga del analito, un filtro, una válvula de inyección, la columna y finalmente, el detector, que puede ser de arreglo de diodos o de índice de refracción (Skoog et al., 2015).

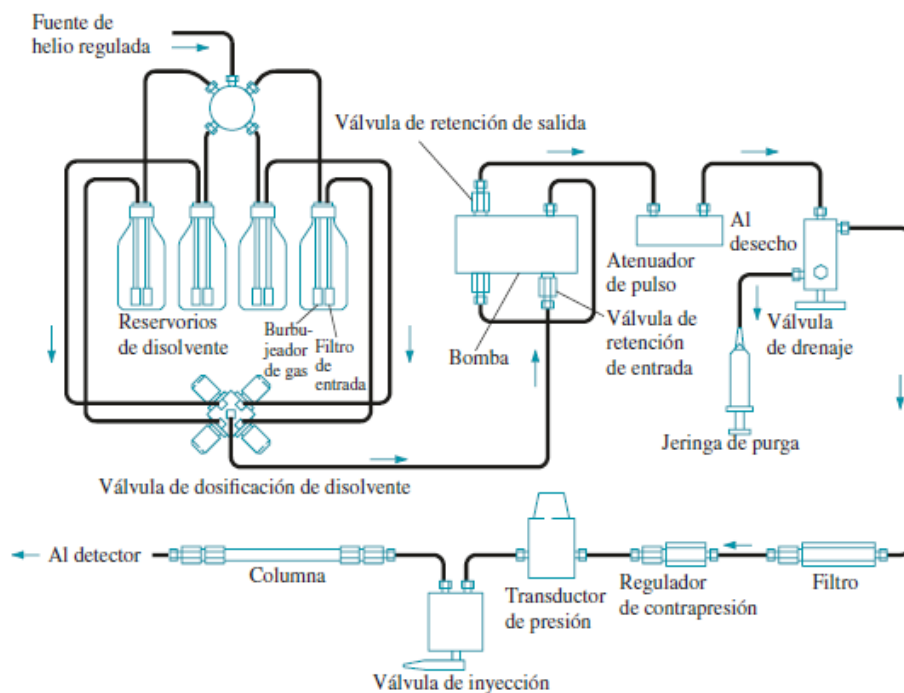


Figura 2. Diagrama de componentes para un equipo de HPLC.
Fuente: (Skoog et al., 2015).

La elución de un disolvente o mezcla de disolventes de composición constante se denomina elución isocrática y la elución por gradiente es aquella en la que la composición de disolvente se cambia de manera continua o escalonada, las válvulas de dosificación regulan e introducen los disolventes de la fase móvil a diferentes velocidades (Skoog et al., 2015).

2.2. Estado del Arte

Diferentes estudios han demostrado que el glifosato puede ser dañino para los humanos, animales y el ambiente, a pesar de que el fabricante asegure que el producto es selectivo y no afecta a los seres humanos o animales. Sin embargo, un estudio realizado en Estados Unidos por Mariah Caballero, Solmaz Amiri, Justin T. Denney, Pablo Monsivais, Perry Hystad y Ofer Amram en el estado de Washington, demuestran una correlación que existe entre la exposición prolongada al producto de Roundup® y las altas tasas de personas con enfermedad de Parkinson y como consecuencia final, una muerte prematura; encontraron que existe una posibilidad de un 33% de desarrollo de la enfermedad para individuos que han tenido un contacto directo con el producto en comparación a quienes no están expuestos, una proporción de probabilidades de 1.33,95% (Caballero et al., n.d.).

Como resultado de una investigación llevada a cabo en Estados Unidos por Anthony Samsel y Stephanie Seneff, donde buscaron la relación entre el desarrollo de la enfermedad celíaca o intolerancia al gluten y la exposición al uso de glifosato, monitoreando la concentración del producto en comida y orina de la persona, encontraron que esta enfermedad desarrolla otras enfermedades como fallas renales, tiroides y cáncer debido a los desórdenes alimenticios que causa, los síntomas que se desarrollan debido a la acción quelante que el glifosato tiene sobre los minerales de hierro, cobalto, cobre y molibdeno, impidiendo la absorción por parte del cuerpo, así

mismo, lo investigadores encontraron una inhibición de la enzima P450, responsable del metabolismo de los fármacos antineoplásicos y el metabolismo de algunos xenobióticos, así mismo, el glifosato se hace responsable de la disminución de aminoácidos esenciales como triptófano, selenometionina, tirosina y metionina.

Finalmente, concluyen que las propiedades del glifosato afectan o inciden en el desarrollo de la enfermedad celíaca por interrumpir la ruta de síntesis de ácido shikímico, alterar el balance entre patógenos y la biota benéfica en el intestino, acción quelante de metales y la inhibición de enzima citocromo P450 (Samsel & Seneff, 2013).

El manganeso es un nutriente importante en la dieta regular humana, los bajos niveles de este elemento puede acarrear el desarrollo de diferentes enfermedades especialmente a nivel neurológico e intestinal como es el caso de patologías neurodegenerativas como Alzheimer y Parkinson. Es por esto que los investigadores Anthony Samsel y Stephanie Seneff estudiaron la relación entre el glifosato y sus implicaciones en la reducción de Mn, se enfocaron En el alimento suministrado a reces, el cual constaba de plantas provenientes de semillas genéticamente modificadas Roundup®-Ready y tratadas con el pesticida Roundup® cuyo ingrediente activo es glifosato. Una de las implicaciones del uso de este tipo de semillas en conjunto con el pesticida, es el efecto reductor que el glifosato tiene sobre los niveles de Mn en las plantas de manera significativa “el superóxido dismutasa Mn protege las mitocondrias del daño oxidativo y la disfunción mitocondrial es una característica clave del autismo y Alzheimer” (Samsel & Seneff, 2015). Finalmente, los autores concluyen que proponen la quelación del Mn por parte del glifosato como una supresión de enzimas CYP como una de las posibles causas del aumento de pacientes con patologías neurodegenerativas (Samsel & Seneff, 2015).

Las enfermedades renales pueden ser causadas por múltiples factores, en muchos de esos casos son causadas por lo que consumimos, es el caso de una investigación llevada a cabo en Sri Lanka por los investigadores Channa Jayasumana, Sarath Gunatilake y Priyantha Senanayake, donde quisieron evaluar la correlación entre el creciente desarrollo de enfermedades renales en una población afectada por el uso de glifosato y consumo de agua con altos niveles de dureza. Encontraron que a pesar de que el glifosato no se asocia a este tipo de enfermedades, al encontrarse con un factor geoambiental local y la presencia de algunos metales nefrotóxicos, desarrolla la capacidad de afectar negativamente los tejidos renales de las personas que manipulen el producto y la población cercana a este tipo de actividad (Jayasumana et al., 2014).

En Colombia se han realizado estudios citotóxicos y genotóxicos sobre los efectos de diferentes concentraciones de glifosato sobre el ADN, es por esto que los investigadores Claudia Milena Monroy, Andrea Carolina Cortés, Diana Mercedes Sicard, Helena Groot de Restrepo hallaron que a células GM38 a una concentración de 4.0-6.5 mM de glifosato y las células HT1080 a 4.75-5.75Mm causan un daño importante al ADN (Monroy et al., 2005).

El análisis de glifosato en 12 suelos de uso agrícola en Argentina, especialmente donde se usan semillas transgénicas de soya, algodón y maíz fueron la base de la investigación de Eduardo De Gerónimo, Virginia C. Aparicio, José L. Costa donde crearon un modelo para estimar el coeficiente de sorción de glifosato y así medir más fácilmente las propiedades del suelo, los datos de equilibrio de adsorción se presentaron por medio de isothermas de Freundlich. Los resultados arrojaron que el pH y los contenidos de arcillas son los principales parámetros que rigen la adsorción de glifosato en suelos y una poca correlación con el aluminio intercambiable (De Gerónimo et al., 2018).

Con la finalidad de determinar la contaminación por glifosato en muestras de suelo y lodos los autores Lisi Suna,b,c, Deyang Konga,b, Weidong Gud, Xinyan Guoa,b, Wenqi Taoa,b, Zhengjun Shana,b, Ying Wangc, Na Wang tomaron muestras en suelos de China, utilizaron la técnica de HPLC para la detección con detector de fluorescencia, la extracción de glifosato la hacen usando fosfato de sodio y citrato de trisodio acuoso, ajustan el pH a 9 y seguidamente realizan una derivatización con FMOC-Cl debido a que la molécula de glifosato no puede ser identificada por un detector de fluorescencia.

Para el experimento usaron concentraciones de glifosato estándar de 0,1 y 0,5 mg/L para conocer la concentración óptima de FMOC-Cl, los resultados arrojan que concentración ideal para FMOC-Cl es de 1g/L pues presenta una mayor respuesta en cualquier concentración de glifosato; el tiempo ideal de derivatización lo encontraron a las 4 horas de transcurrida la reacción, también usaron hexano para purificar las muestras por el método de extracción líquido-líquido.

Para la validación del método, hicieron una curva de calibración con concentraciones de glifosato que fue desde 0.005-0.5 ppm obteniendo un coeficiente de correlación ≥ 0.999 , en las muestras este rango está reflejado en concentraciones equivalentes a 0.025-2.5 mg/Kg, el LOD es de 0.01mg/Kg y LOQ de 0.04mg/Kg. Finalmente, los autores concluyen que el método usado, con HPLC acoplado a un detector de fluorescencia para la detección de glifosato, en comparación con el método tradicional de LC/MS-MS y GC-MS/MS, es económico, simple y sensible (Sun et al., 2017).

El objetivo clave de la investigación desarrollada por Bruno Molero da Silva, Fernanda Benetti y Maria Olímpia Oliveira Rezende se basó en comparar dos métodos analíticos para la determinación de glifosato y AMPA. Los métodos utilizados para la detección fueron HPLC-UV y GC-MS, las muestras de agua, suelo y sedimentos las tomaron en Brasil. Encontraron que HPLC-

UV es un método eficiente para la determinación de glifosato en todas las muestras y elimina el paso de extracción y limpieza; el método de GC-MS también es eficiente para la determinación y su ventaja sobre HPLC-UV es que tanto AMPA como glifosato se pueden identificar simultáneamente. El LOD y LOQ hallado en HPLC-UV para muestras de suelo y sedimento fue de 0.040mg/Kg y 0,120mg/Kg, respectivamente. Finalmente, concluyen que ambos métodos son eficientes y sensibles, sin embargo, HPLC-UV es más rápido y económico con respecto a GC-MS (Silva, Benetti, & Rezende, 2015).

El objetivo del estudio desarrolla por Bruno Molero da Silva, Paulo Roberto das Dores da Silva y Maria Olímpia Oliveira Rezen es el desarrollo de una metodología analítica verde adecuada para la determinación de glifosato en muestras de suelo, para ello los investigadores escogieron el método de determinación HPLC-UV debido a que puede eliminarse el paso de limpieza de la muestra donde se utilizan solventes orgánicos dañinos para la salud humana y el ambiente. El método lo describen como una alternativa eficiente con un LOD y LOQ de 9.93µg/L y 30.1µg/L, respectivamente. Los autores concluyen que los datos de LOQ y LOD obtenidos validan que el método es adecuado para detectar y cuantificar herbicidas a diferentes niveles de concentración (Mangoni & Constantino, 2015).

La determinación de AMPA y glifosato por un método simple y selectivo como el HPLC-UV, es el objetivo de los investigadores Gabriela Islas, José A. Rodriguez, Luis H. Mendoza-Huizar, Fidel Pérez-Moreno y Gabriela Carrillo para muestras de suelo, para su desarrollo, utilizaron una pre-columna derivatizadora con 1,2-naftoquinona-4-sulfonato (NQS). Validaron el método por medio de un patrón interno y la construcción de una curva de calibración; obtuvieron valores de LOD y LOQ de 3.29 Se/b₁ y 10 Se/b₁ respectivamente. Concluyen que el método cromatográfico con pre-columna derivatizadora es una alternativa para la cuantificación de AMPA

y glifosato en muestras de suelo. El método es sensible y confiable para el análisis del herbicida en muestras reales de suelos (Islas et al., 2014).

Con el fin de conocer el mejor método de detección de glifosato de muestras de suelo y lodos por medio de la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), los investigadores Jamilu Garba¹, Abd Wahid Samsuri, Radziah Othman, Muhammad Saiful Ahmad Hamdani utilizaron una precolumna derivatizadora para glifosato y AMPA, el agente derivatizante que utilizaron fue FMOC a una concentración de 0,02M, buffer de borato y dietiléter para eliminar FMOC sin reaccionar. En este caso, querían conocer la diferencia entre los detectores de fluorescencia (FLD) y arreglo de diodos (DAD) para así saber cuál de los dos era el más apropiado para muestras de suelos y lodos. Encontraron que el límite de detección para muestras de suelos por medio de HPLC-FLD es de 0,132 mg/Kg, mientras que para HPLC-DAD el LOD para suelos es de 0,122 mg/Kg, ambos detectores arrojaron una alta linealidad ($R^2 \geq 0,995$). Los autores concluyen que el método es confiable para la determinación cuantitativa de glifosato y que el detector con mayor sensibilidad es el de arreglo de diodos (Jamilu Garba¹, Abd Wahid Samsuri^{2,*}, Radziah Othman² & 1Zamfara, 2018).

Para cuantificar glifosato y AMPA en muestras acuosas, es necesario escoger la técnica adecuada de detección, es por esto que los investigadores Emanuella M. Pimenta,^a Fabio F. da Silva,^b Érica S. Barbosa,^a Ane P. Cacique,^a Douglas L. Cassimiro,^a Gevany P. de Pinhoa and Flaviano O. Silvério hicieron una comparativa entre los métodos de detección HPLC-ICP-MS/MS y HPLC-DAD teniendo en cuenta la dificultad que presentan las moléculas de glifosato y AMPA por su alta polaridad, baja solubilidad en solventes orgánicos y ausencia de grupos cromóforos. Para los análisis fue necesario establecer las condiciones de reacción e identificación, donde para HPLC-DAD es necesario una etapa previa de derivatización lo cual hace un poco más costoso el

método, para HPLC-ICP-MS/MS no se hace necesario este paso, además que este detector se utiliza para determinar heteroátomos de los compuestos, para el caso del glifosato y AMPA se detecta el fósforo, ahora el uso de MS/MS elimina las interferencias de la muestras, así aumenta la selectividad del método. Finalmente, concluyen que ambos métodos son efectivos, sin embargo, el método de HPLC-ICP-MS/MS es mucho más rápido y selectivo con respecto a HPLC-DAD debido a que obvia el paso de la derivatización; con respecto a los límites de detección, para ICP-MS/MS fue de 27-218 µg/L y para HPLC-DAD fue de 1-8 mg/L, con estos datos se observa que el límite de detección respecto a cada detector es 36.5 veces menor (Emanuella M. Pimenta et al., 2020).

3. Método

El presente trabajo de grado se desarrolló en el marco del proyecto “Fitorremediación de suelos contaminados con glifosato y sus efectos socioeconómicos en la vereda los aceites del municipio de Tame, Arauca” en el cual se contaminaron suelos con glifosato para fitorremediación con albahaca y tomate, adicionalmente se evaluó la capacidad de retención de glifosato en el suelo, en el presente proyecto se va a implementar la metodología de Cromatografía Líquida de Alta Resolución para análisis de suelos, lixiviados y plantas albahaca y tomate.

3.1. Descripción de las muestras

La contaminación inducida de los suelos se dio en dos etapas, y en ambas ocasiones se doparon con una concentración de 5ppm, el primer dopaje se realizó el 24 de marzo de 2018, 20 días luego de la siembra de las plantas de albahaca y tomate; el segundo dopaje se hace el 30 de abril de 2018.

La recolecta de las muestras de suelos se hizo de acuerdo con las fechas de contaminación, para las plantas se hacía cuando moría totalmente, los lixiviados se recolectaban con la periodicidad de los riegos los cuales se hacían día por medio y se les proporcionaba una cantidad de 100 mililitros de agua en cada riego.

Las muestras de suelo son las siguientes:

La muestra de suelo control tomate (dopaje 1) y suelo control tomate (dopaje 2) son muestras de suelo sin adición de glifosato para la planta de tomate; la muestra de suelo control albahaca (dopaje 1) y suelo control albahaca (dopaje 2) son muestras de suelo sin adición de glifosato para la planta de albahaca; la muestra de suelo albahaca (dopaje 1) es una muestra una adición de glifosato de 5 ppm; la muestra de suelo albahaca (dopaje 2) es una muestra de suelo con una segunda adición de glifosato de 5 ppm; la muestra de suelo tomate (dopaje 1) es una muestra una adición de glifosato de 5 ppm; la muestra de suelo tomate (dopaje 2) es una muestra de suelo con una segunda adición de glifosato de 5 ppm.

Las muestras de lixiviado son las siguientes:

La muestra la lixiviado de suelo control (dopaje 1) y lixiviado suelo control (dopaje 2) son muestras sin adición de glifosato; la muestra de lixiviado suelo albahaca (dopaje 1) es una muestra que se recolectó luego del primer dopaje de 5 ppm de glifosato del suelo de albahaca; la muestra de lixiviado suelo albahaca (dopaje 2) es una muestra que se recolectó luego del segundo dopaje

de 5 ppm de glifosato del suelo de albahaca; la muestra de lixiviado suelo tomate (dopaje 1) es una muestra que se recolectó luego del primer dopaje de 5 ppm de glifosato del suelo de tomate; la muestra de lixiviado suelo tomate (dopaje 2) es una muestra que se recolectó luego del segundo dopaje de 5 ppm de glifosato del suelo de tomate.

Las muestras de plantas son las siguientes:

La muestra de albahaca (dopaje 1) es una muestra de planta de albahaca a la cual en el suelo se le hizo una adición de glifosato a una concentración de 5 ppm; la muestra de albahaca (dopaje 2) es una muestra de la planta a la cual en el suelo se le hizo una segunda adición de glifosato a una concentración 5 ppm; la muestra de glifosato tomate es una muestra de la planta de tomate a la cual se le hizo en su suelo, dos adiciones de glifosato a una concentración de 5 ppm.

3.2. Análisis Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia con Arreglo de Diodos:

El análisis de glifosato no se puede realizar por HPLC-DAD, para poderlo realizar se debe hacer una derivatización como se describe a continuación.

3.2.1. Derivatización: para la derivatización se utilizó FMOC-Cl como agente derivatizador, se tomaron 400 microlitros de los patrones de glifosato analítico, seguidamente se le añadieron 700 microlitros de una solución FMOC-Cl y 400 microlitros de una solución 0,05M de buffer de borato de sodio. Se agitó levemente para homogenizar los reactivos, la reacción se conservó por 12 horas en un frasco ámbar y por último se procedió a analizar por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC-DAD).

Para hallar las condiciones favorables de la derivatización del glifosato fue necesario variar el tiempo de reacción entre 1-48h, así mismo, se experimentó con la agitación, la cantidad de buffer de borato y la concentración de FMOC-Cl.

3.2.2. Determinación de glifosato: La determinación del glifosato se llevó a cabo en un equipo Agilent HP-1200 equipado con un detector de arreglo de diodos. Para la separación se utilizó una columna Zorbax C-18 (150* 4.6 mm; 5mm) a 40°C de temperatura, se usó como fase móvil acetonitrilo, agua y 0,05M de fosfato monopotásico (KH_2PO_4) en una proporción 30:70% con un flujo de 0,7mL/min. Se inyectaron 20 microlitros de patrones y muestras, la lectura se hizo a una longitud de onda de 206 nanómetros.

3.2.3. Cuantificación: Para la cuantificación del glifosato, y la implementación del método planteado se realizó una curva de calibración con patrones analíticos de glifosato en un rango de 3-40ppm, se garantizó la repetitividad y reproducibilidad del método por duplicado y triplicado, así mismo se hizo una validación externa preparando una solución de 20 ppm de glifosato comercial RoundUp® (363 g/L).

3.2.4. Análisis estadístico del método: los análisis se realizaron por triplicado para así poder hacer los cálculos correspondientes de desviación estándar, así mismo, se busca garantizar la reproducibilidad, repetitividad, sensibilidad y exactitud de la metodología planteada, adicionalmente se evaluaron los límites de detección y cuantificación (LOD y LOQ).

3.3. Preparación de muestras:

Para el análisis de glifosato en suelos y plantas se hace necesario un pretratamiento de las muestras como se muestra a continuación.

3.3.1. Extracción de glifosato de suelos: la extracción del glifosato en los suelos se realizó tomando 2 gramos de suelo pesados en un vidrio reloj, se transfirió la muestra a un tubo de centrífuga de 25 mililitros y se le añadieron 20 mililitros de una solución 0.01M de KH_2PO_4 , se dejó de 2 horas en shaker a 4.000 rpm para homogenizar la muestra, una vez homogenizada se

llevó por 10 minutos a la centrífuga a 10.000 rpm para acelerar la decantación del suelo y poder tomar la muestra de 400 microlitros del sobrenadante donde se encuentra el glifosato extraído, posteriormente se hizo el proceso de derivatización.

3.3.2. Extracción de glifosato de plantas: se tomaron las muestras de las plantas de tomate y albahaca, cada una se homogenizaron con un procesador y se pesaron 5 gramos de cada muestra en un vidrio reloj, luego, cada muestra se transfirió a un tubo de centrífuga de 50 mililitros, se añadieron 20 mililitros de agua desionizada, se homogenizaron las muestras en vórtex, seguidamente, se centrifugaron a 5000 rpm por 10 minutos con la finalidad de decantar la muestra sólida de las plantas. Se agregaron 1,5 mililitros de agua acidulada y 0,50 mililitros del sobrenadante de las plantas en tubos de centrífuga de 15 mililitros y se homogenizaron en vórtex, seguidamente, se tomaron los 400 microlitros de la muestra para derivatización.

3.3.3. Tratamiento para lixiviados: para la determinación de glifosato en las muestras de lixiviados no fue necesario un pretratamiento, ya que la molécula de glifosato es altamente polar lo que la hace muy soluble en agua y a su vez tiene una alta movilidad en los suelos, por lo tanto, se infiere que el pesticida se encontrará en la muestra líquida resultante de cada riego y no habrá necesidad de un tratamiento previo al análisis. Teniendo en cuenta lo anterior, se procedió a tomar los 400 microlitros directamente de la muestra para la derivatización y determinación del pesticida.

4. Resultados y Discusión

4.1. Derivatización del glifosato

La reacción se lleva a cabo entre el FMOC-Cl y el glifosato (*Figura 3*), se da entre el grupo éster cloroformiato del FMOC-Cl y el grupo amino del glifosato, obteniendo el compuesto FMOC-Glifosato más ácido clorhídrico. La reacción ocurre en un medio alcalino que se da por el buffer de borato (KH_2PO_4) a pH 9. La molécula derivatizada finalmente tiene una propiedad polar por parte del glifosato y una parte no polar del FMOC-Cl, agregándole un grupo cromóforo para facilitar su detección.

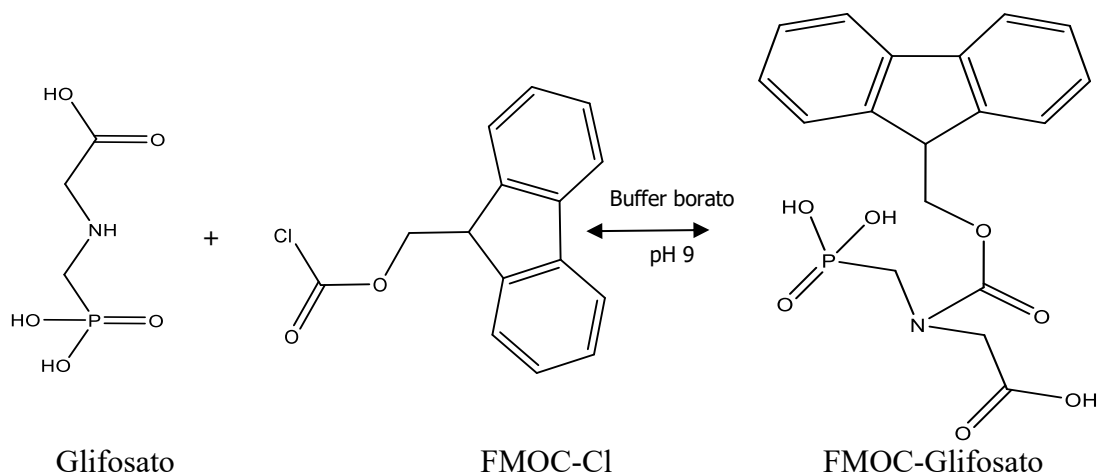


Figura 3. Reacción de derivatización del glifosato con FMOC-Cl.

El FMOC-Cl es un agente protector muy reactivo (*Figura 4*) al ser preparado en acetonitrilo puede formar FMOC-H, por otra parte, el glifosato se prepara en agua de tal forma que en este medio puede formarse FMOC-OH, lo cual dificulta la derivatización, así mismo en reacción de FMOC con el glifosato con un medio de agua y acetonitrilo, reacciona con el buffer de borato formando el complejo FMOC-borato.

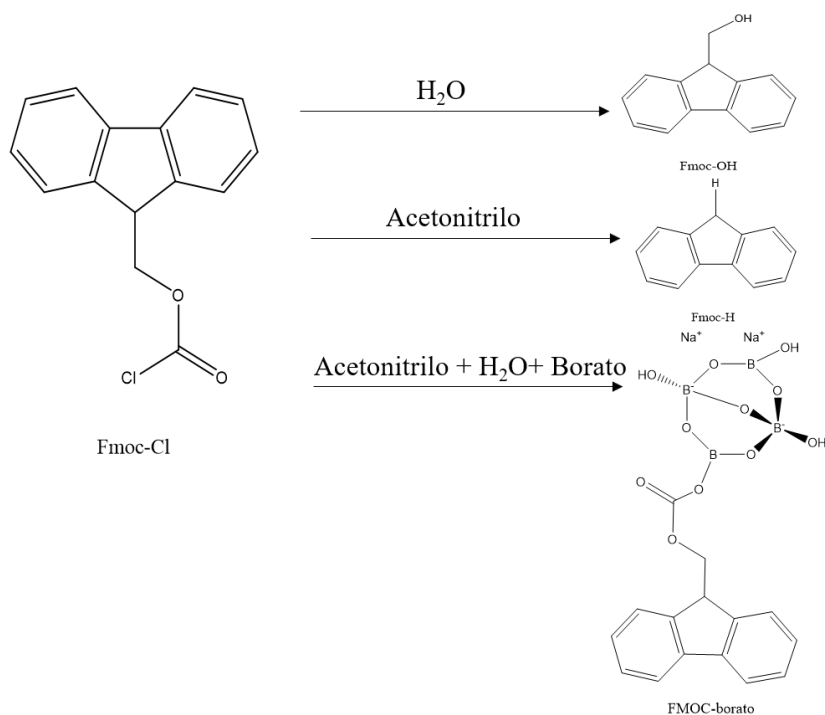


Figura 4. Derivados de Fmoc-Cl.

Para verificar la calidad del Fmoc-Cl se pasó como blanco de Fmoc-Cl con buffer de borato 0,05 M de la reacción de derivatización (Figura 5).

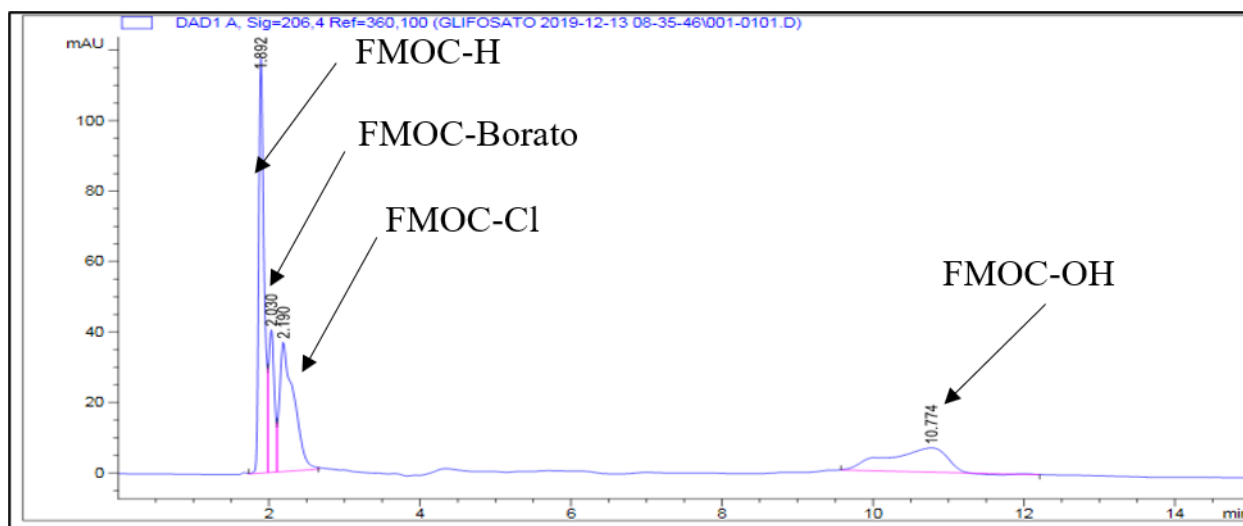


Figura 5 Cromatograma blanco Fmoc-Cl.

En el cromatograma correspondiente al blanco, las señales obtenidas evidencian la presencia de FMOC-Cl junto con sus derivados de FMOC-H y FMOC-Borato (1,892, 2,030 y 2,190 min) y FMOC-OH (10,174 min). Teniendo en cuenta estos resultados se procedió a realizar la derivatización obteniendo el cromatograma a continuación (*Figura 6*).

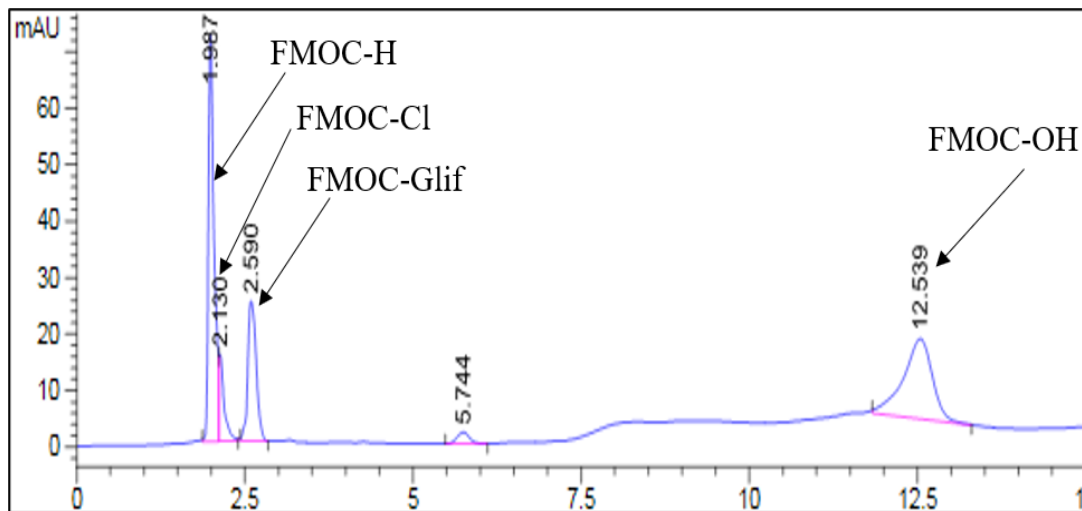


Figura 6. Cromatograma Glifosato.

En el cromatograma de derivatización del glifosato analítico, las señales obtenidas en los tiempos de retención de 1,987 y 2,130 minutos corresponden a FMOC-H y FMOC-Cl respectivamente, la registrada a 12,539 minutos corresponde a FMOC-OH como en la (*Figura 5*).

Esta información verifica que la señal correspondiente al tiempo de retención registrado a 2,590 minutos es de FMOC-Glifosato donde siempre se registró en un rango entre 2,5 hasta 2,8 minutos; se observa una señal definida y resuelta indicando confiabilidad en la cuantificación del glifosato bajo estas condiciones.

Para hallar las condiciones favorables para la derivatización de glifosato se consideraron las variables tiempo, agitación, pH y adición de FMOC-Cl, como se describe a continuación.

Como primera variable se consideró el tiempo de reacción entre 1 hora hasta 72 horas, este rango se toma teniendo en cuenta que en la literatura se reportan diferentes tiempos de reacción (Figura 7).

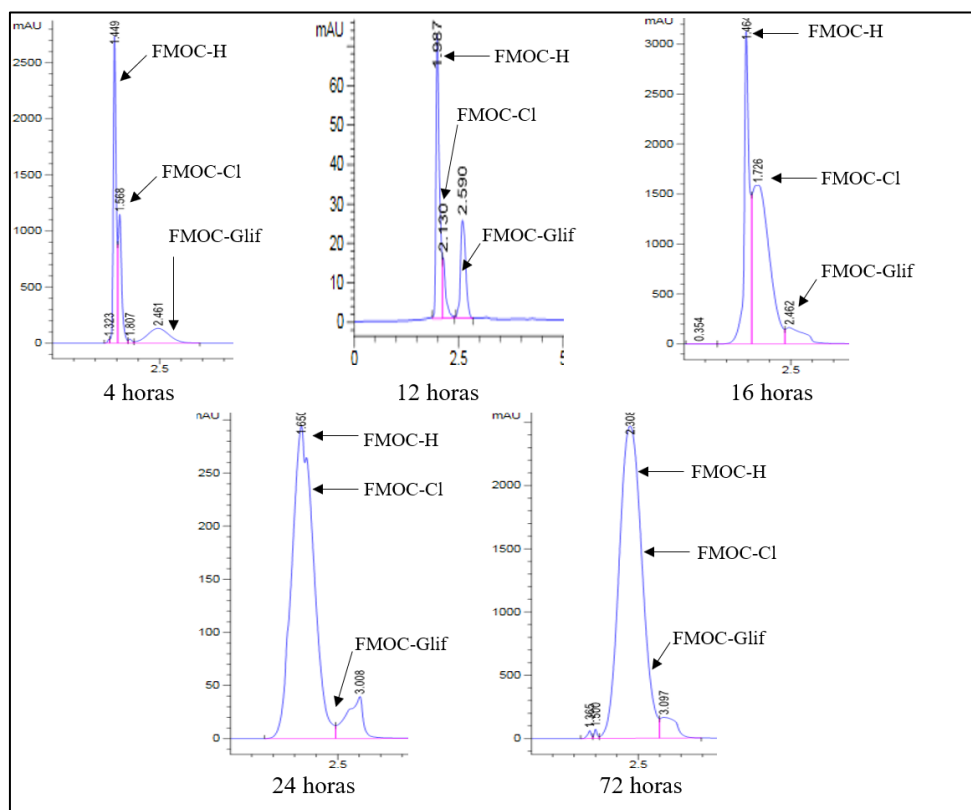


Figura 7. Variación del tiempo en la derivatización.

Como se aprecia en los resultados obtenidos en todas las reacciones está presente la señal de Fmoc-Glifosato, adicionalmente con el paso del tiempo hay una pérdida de resolución de los picos debido al solapamiento de las señales, a menos de 12 horas la señal se puede identificar, sin embargo, es una banda muy ancha de baja resolución e intensidad, lo que indica que la reacción apenas está iniciando. Mientras que a 16, 24 y 72 horas se observa un pico más ancho y la señal se solapa. Por tal razón, se concluye que el tiempo de derivatización es de 12 horas.

Otra variable que se tuvo en cuenta fue la agitación, ya que en la literatura es otro parámetro que tienen en cuenta en las derivatizaciones reportadas, se trabajó con agitación de 3.500 rpm en un shaker y sin agitación.

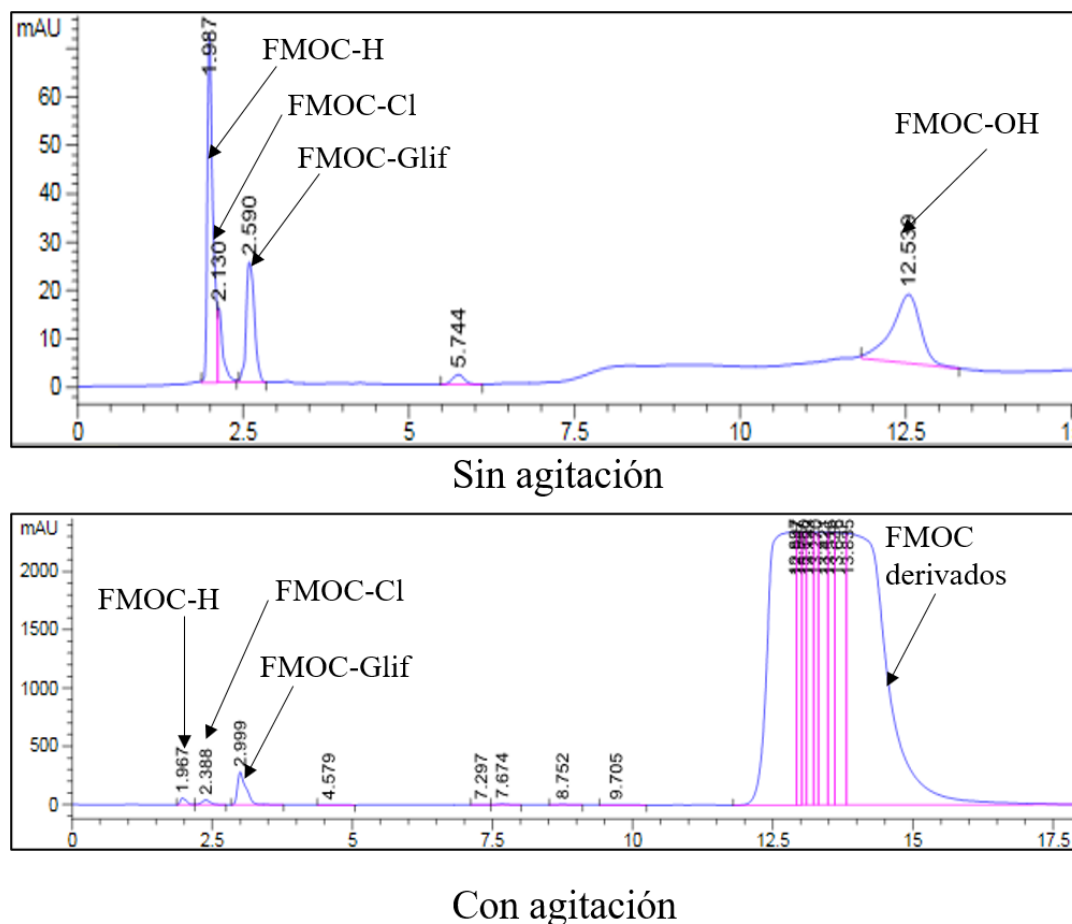


Figura 8. Variación de la agitación en la derivatización.

Como se puede apreciar en los resultados (Figura 8) la señal de FMOC-Glifosato aparece como un pico definido a 2.590 minutos sin agitación, mientras que con agitación se observa un pico ancho y de baja intensidad en el tiempo de retención donde sale el FMOC-Glifosato que evidencia deficiencias en la derivatización, también se puede observar una banda muy ancha entre 12,5 y 15 minutos que corresponde al FMOC y sus derivados, mientras que sin agitación podemos ver con

claridad la señal de FMOC-Glifosato, pues está mucho más resulta y es posible cuantificar con seguridad, por lo que se decide hacer el proceso de derivatización sin agitación.

También se tuvo en cuenta el pH en el cual se lleva a cabo la derivatización, ya que medio de reacción es ácido (pH=2), se adicionó buffer de borato a una concentración de 0,05M hasta llevar a un pH de 9 como aparece en algunas referencias de la literatura (*Figura 9*).

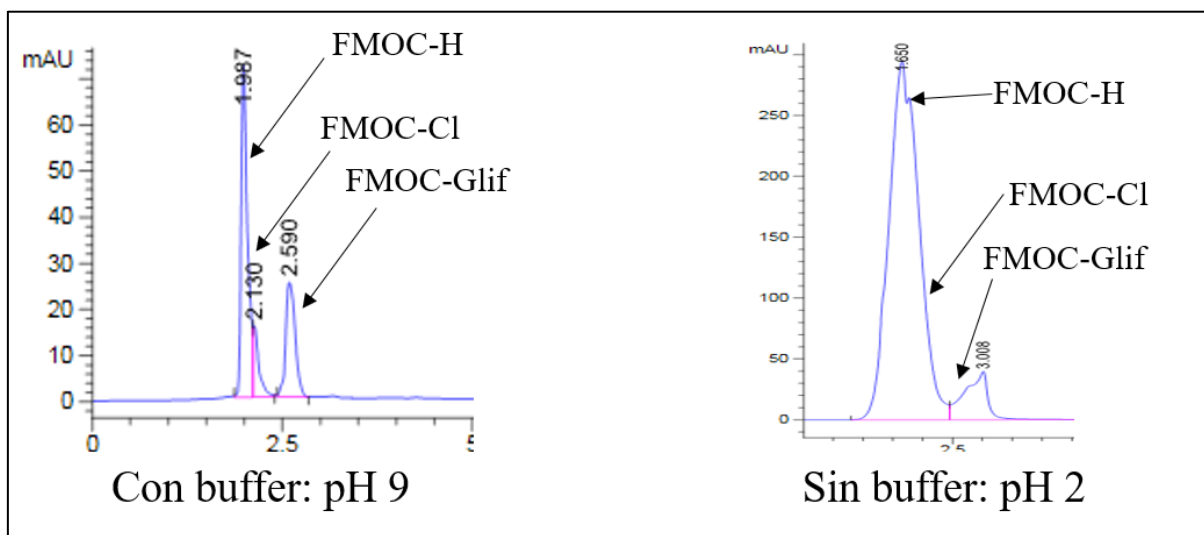


Figura 9. Variación del pH en la derivatización.

Como se puede apreciar la derivatización a pH básico (*Figura 9*) se presenta dos picos uno entre 1,5 y 3,0 minutos, el primer pico sale como una banda aguda con dos máximos solapados que corresponde al FMOC-H y el FMOC-Cl, mientras que el segundo pico corresponde al FMOC-Glifosato y aparece como una banda aguda y definida, mientras que sin buffer la señal de FMOC-Glifosato sale como una banda ancha con baja intensidad, la señal de FMOC es muy ancha solapando el FMOC-H y FMOC-Cl, con esto se confirma que la derivatización se debe realizar ajustando el pH a 9 adicionando buffer de borato 0,05 M.

Por último, se varió la concentración de FMOC-Cl ya que los picos de FMOC-Cl salen con más intensidad que el FMOC-Glifosato, lo cual quiere decir que esta adicionando un exceso de

FMOC-Cl para garantizar la derivatización completa del glifosato tanto en los patrones como en las muestras de suelos, lixiviados y plantas.

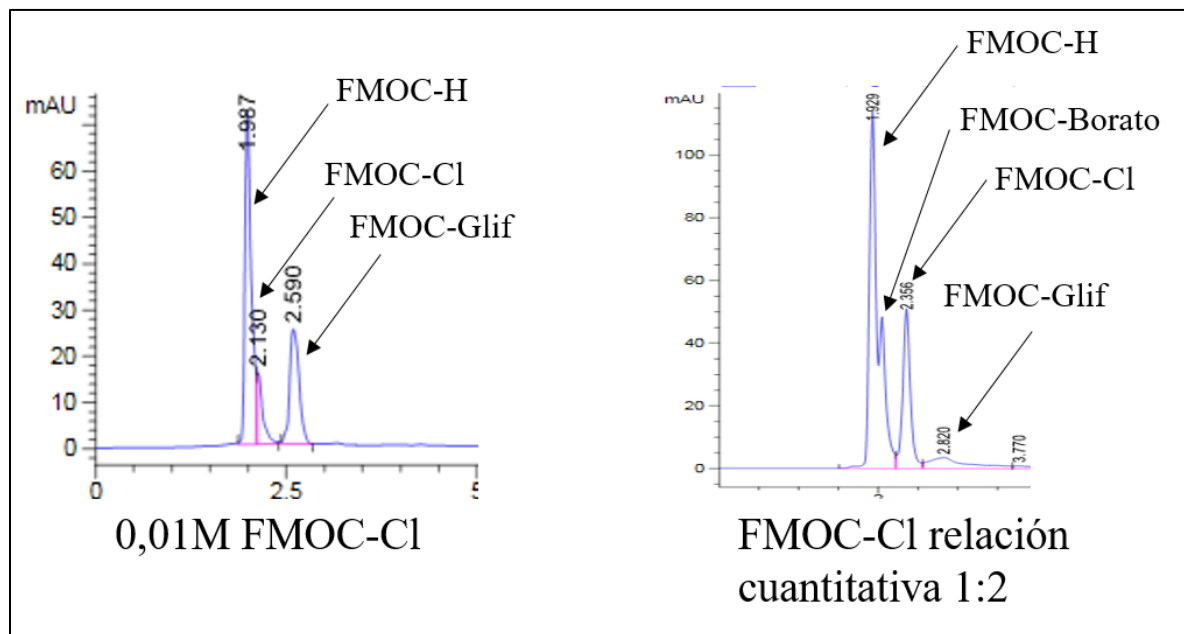


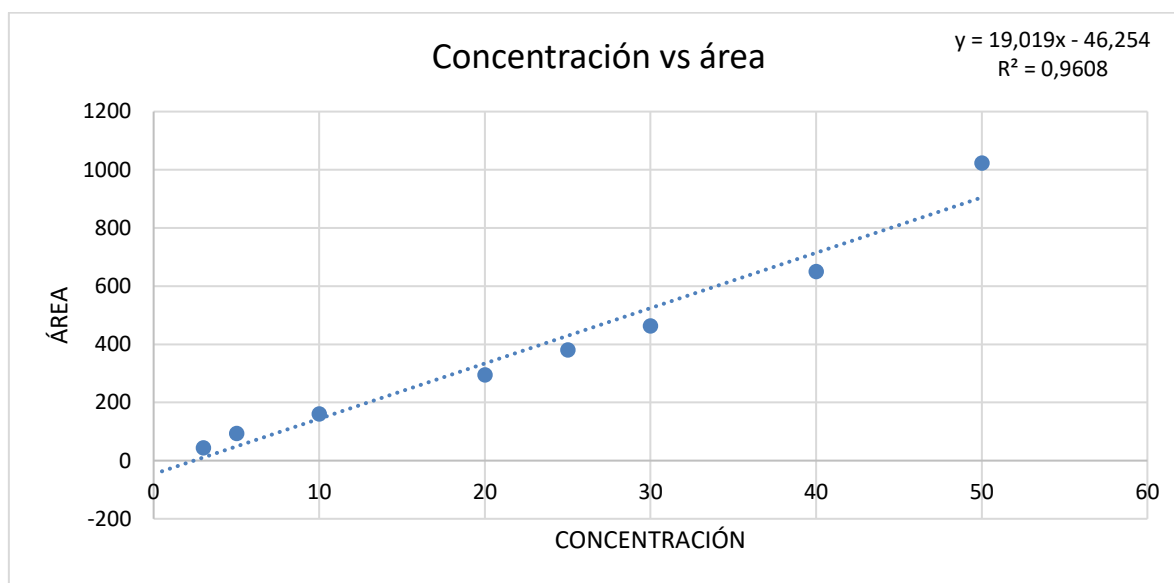
Figura 10. Variación de la concentración FMOC-Cl en la derivatización.

Para la derivatización se tuvo en cuenta la variación de la concentración del FMOC-Cl, se trabajó con una concentración de 0,01M y una relación cuantitativa 1:2 entre glifosato y FMOC-Cl. Esta variación se hizo con el fin de disminuir la intensidad en los picos de FMOC-Cl y que sea más intensa la señal de FMOC-glifosato, sin embargo, como se aprecia en los resultados la relación 1:2 presenta una baja intensidad en la señal del FMOC-Glifosato, por lo que la derivatización no se estaba dando completa. Por tal razón la derivatización se va a realizar a una concentración de 0,01M de FMOC-Cl.

Teniendo en cuenta todas las variables, se concluye que para obtener una derivatización completa y óptima es necesario contar 12 horas de reacción, sin agitación, con ajuste de pH a 9 con buffer de borato 0,05M y una concentración 0,01M de FMOC-Cl.

4.2. Cuantificación de glifosato:

Una vez establecidas las condiciones de la derivatización el siguiente paso es establecer el rango lineal de cuantificación, para lo cual se va a patrones hasta que no sea detectable el glifosato (límite de detección) y hasta que se pierda el carácter lineal (límite de cuantificación) (*Figura 11*). La tabla con los valores de la gráfica se encuentra en el (Apéndice A).



*Figura 11.*Concentración vs área glifosato 0,5-50 ppm.

Los resultados obtenidos en la *Figura 11* evidencia que para las condiciones de derivatización, una concentración de 0,5 y 1ppm no es posible identificar glifosato ya que en algunos ensayos salieron las señales correspondientes y en otros no, por lo que se establecen como un límite de detección (LOD), así mismo para una concentración de 50 ppm ocurre que se pierde la linealidad de la recta, esto incide en que se pierde sensibilidad y exactitud del método, por lo que a concentraciones mayores de 40 ppm se recomienda hacer dilución de la muestra.

Finalmente se establece que el límite de detección (LOD) que arroja el método utilizado es de 0,5 y 1 ppm, ya que es la mínima cantidad que es posible detectar bajo las condiciones del método planteado, así mismo el límite de cuantificación (LOQ) es de 40 ppm.

Estas concentraciones se tomaron con la finalidad de establecer la linealidad del método, por lo que finalmente se decide cuantificar bajo un rango de 3-40 ppm.

La curva de calibración se preparó con los patrones derivatizados de glifosato de concentraciones de 3 ppm hasta 40ppm (*Figura 12*), obteniendo los siguientes resultados analizados por triplicado. La tabla con los valores de la gráfica se encuentra en el (Apéndice B).

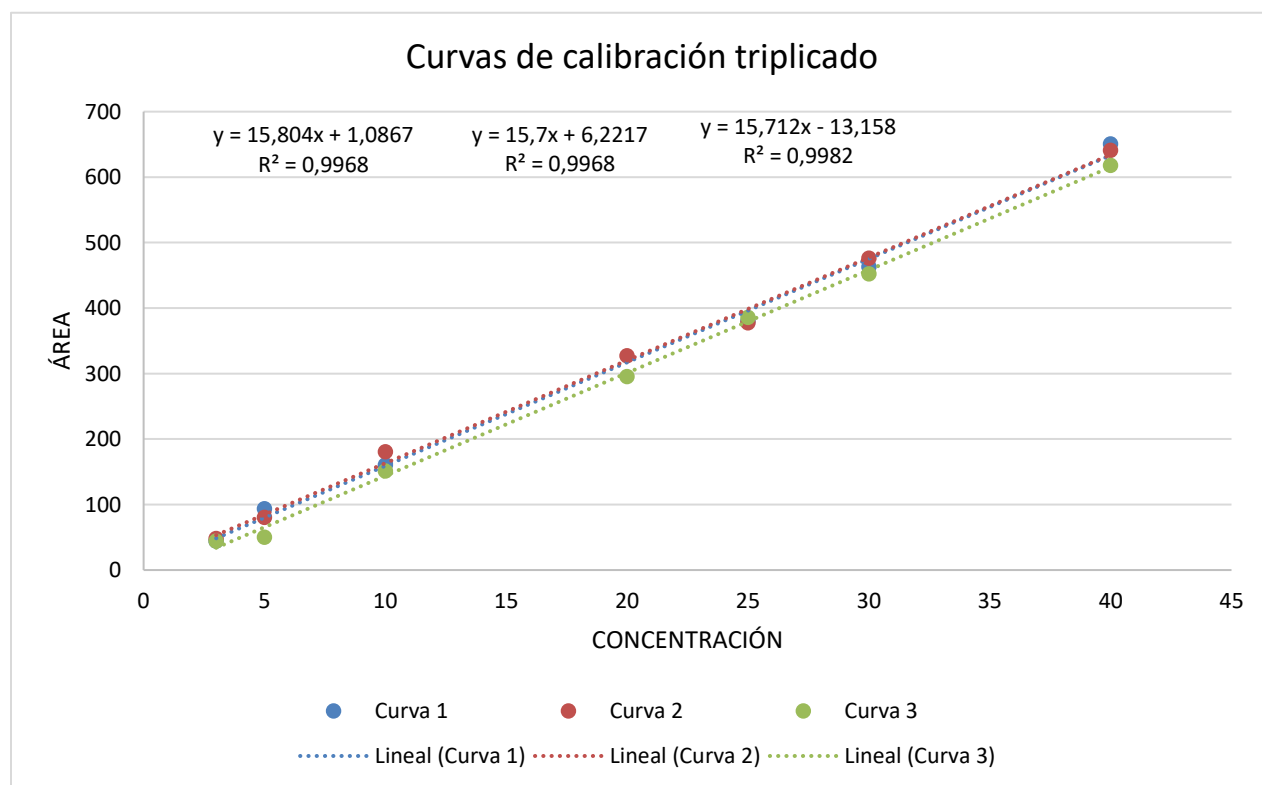


Figura 12. Curvas de calibración por triplicado

Los datos obtenidos de la curva indica que el método utilizado para la determinación de glifosato es repetible, reproducible y lineal. Es repetible y reproducible ya que los 3 ensayos para las derivatizaciones se presentan una tendencia lineal, los ensayos se hacen en las fechas de noviembre

13, diciembre 5 y diciembre 10 de 2019. Con estos resultados se realizó una curva de calibración con los promedios para cuantificar las muestras de suelos, lixiviados y plantas (*Figura 13*). La tabla con los valores correspondientes a la gráfica se encuentra en el (Apéndice C),

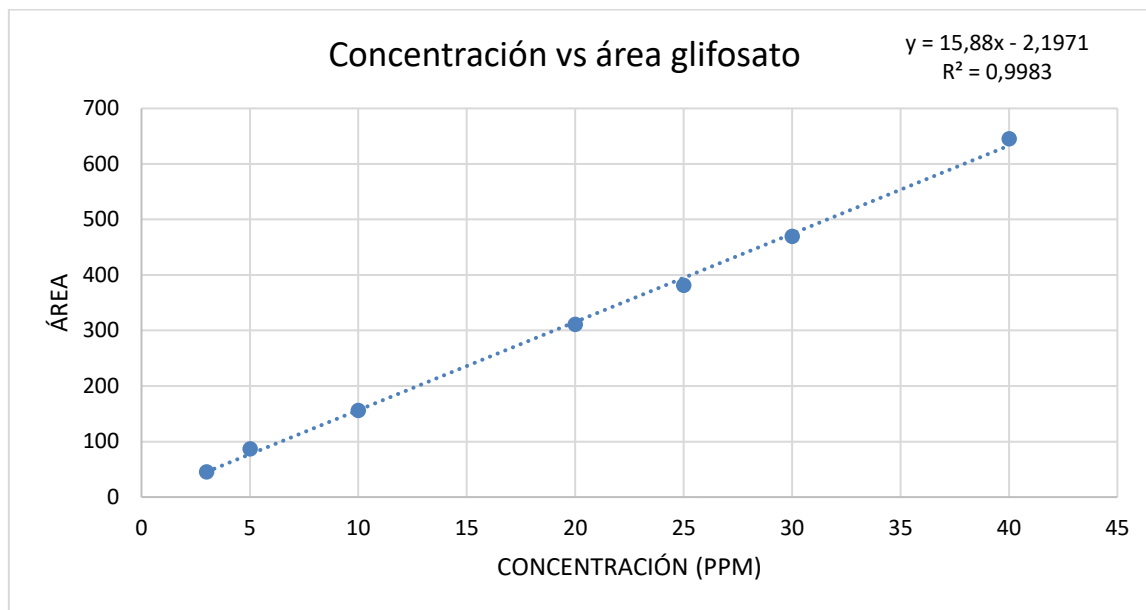


Figura 13. Resultados cuantificación glifosato.

Como se puede apreciar en los resultados (*Figura 13*) el coeficiente de correlación (R) es de 0,9992 evidenciando un excelente carácter predictivo. Bajo estas condiciones, se procede a cuantificar las muestras de lixiviados, suelos y plantas utilizando la ecuación de la recta obtenida de los promedios (*Ecuación 1*).

$$y = 15,88 (x) - 2,1971$$

Ecuación 1. Ecuación de la recta glifosato

4.2.1. Validación interna: con la finalidad de validar el método utilizado, se preparó una muestra de 15ppm de glifosato analítico el cual se derivatizó bajo las condiciones ya establecidas,

se obtuvo una señal de 234,983 con este dato se cuantificó utilizando la *Ecuación 1* y se obtuvo una concentración de 14,935 ppm de glifosato.

El porcentaje de error de la concentración obtenida se calculó con la *Ecuación 2*

$$\% \text{ error} = \frac{(\text{valor teórico} - \text{valor real})}{\text{valor teórico}} \times 100$$

Ecuación 2. Ecuación porcentaje de error

Al reemplazar los datos en la ecuación se obtuvo un porcentaje de error de 0,43%, con este dato se infiere que el método utilizado es exacto y preciso, ya que el valor real es muy cercano al valor real.

4.2.2. Validación externa con RoundUp®: como validación externa del método se utilizó una muestra de RoundUp®, se preparó una concentración teórica de 20 ppm y teniendo en cuenta la concentración del producto especificada por el fabricante es de 363 gramos por litro. Se obtuvo una señal de área de 291,21613 y haciendo el despeje en la *Ecuación 1* obtenemos una concentración real de 18,477 ppm.

Ahora, para calcular el porcentaje de error para la muestra de RoundUp® se utiliza la *Ecuación 2*, el cual se obtiene 7,62% así que se concluye que el método es exacto y preciso para la cuantificación de muestras de glifosato.

4.3. Muestras de suelo, lixiviados y plantas de albahaca y tomate:

Una vez la validada la metodología de cuantificación de glifosato se procedió a evaluar las muestras de suelo, lixiviados y plantas de albahaca y tomate como se describe de la siguiente forma.

4.3.1. Muestras de suelo: a las muestras de suelos suministradas y descritas en el numeral 3.1 se les realizó la extracción de la metodología 3.2.1, los resultados de las muestras de suelo se observan en la Tabla 1.

Tabla 1 *Muestras de suelos*

Muestras	Área (mAU)	Concentración (ppm)
Suelo control tomate (dopaje 1)	-	0.000
Suelo control tomate (dopaje 2)	-	0.000
Suelo control albahaca (dopaje 1)	-	0.000
Suelo control albahaca (dopaje 2)	-	0.000
Suelo albahaca (dopaje 1)	128,54568	8,233
Suelo albahaca (dopaje 2)	94,20224	6,070
Suelo tomate (dopaje 1)	171,70996	10,951
Suelo tomate (dopaje 2)	109,24514	7,017

Nota: * Descripción muestras de suelos utilizados, área de la curva de los cromatogramas y la concentración de cada suelo.

Los resultados de las muestras de suelos se cuantificaron teniendo en cuenta *Ecuación 1* y con estos resultados se observa que las muestras de suelo control tomate (dopaje 1), suelo control tomate (dopaje 2), suelo control albahaca (dopaje 1) y suelo control albahaca (dopaje 2), no presentaron concentración de glifosato.

Las muestras de suelos dopadas con glifosato tanto para albahaca y tomate presentaron concentraciones de glifosato. En las muestras de suelos de albahaca (dopaje 1) y albahaca (dopaje 2) la concentración de glifosato disminuye, esto se debe a que entre dopaje 1 y dopaje 2 paso un mes y durante este tiempo se regaron las muestras y parte del pesticida se va en lixiviado.

Para la muestra de suelo tomate (dopaje 1) y suelo tomate (dopaje 2), se observa el mismo comportamiento que para las muestras de suelo de albahaca, la concentración de glifosato en suelo se ve disminuida para el segundo dopaje, esto se debe al riego de la muestra y que parte del pesticida se va en el lixiviado.

Adicionalmente, se puede apreciar que la concentración de glifosato en el suelo de albahaca es menor que en el suelo de tomate, tanto para el dopaje 1 como para el dopaje 2.

4.3.2. Muestras lixiviados: a las muestras de lixiviados suministrados y descritos en el numeral 3.1 se les realizó la extracción de la metodología 3.2.2, los resultados de las muestras de lixiviados se observan en la Tabla 2.

Tabla 2. *Muestras de lixiviados*

Muestra	Área (mAU)	Concentración (ppm)
Lixiviado suelo control (dopaje 1)	-	0,000
Lixiviado suelo control (dopaje 2)	-	0,000
Lixiviado suelo albahaca (dopaje 1)	56,46491	3,694
Lixiviado suelo albahaca (dopaje 2)	180,41887	11,499
Lixiviado suelo tomate (dopaje 1)	10,88969	0,824
Lixiviado suelo tomate (dopaje 2)	582,59161	36,825

Nota: * Descripción muestras de lixiviados utilizados, área de la curva de los cromatogramas y la concentración de cada lixiviado.

Para las muestras de lixiviados se cuantificó teniendo en cuenta la *Ecuación 1*. Las muestras de lixiviado suelo control (dopaje 1) y lixiviado suelo control (dopaje 2) no presentaron señal en el tiempo de retención del glifosato, dato que está acorde a los resultados obtenidos para el suelo control.

En las muestras de lixiviado suelo albahaca se puede apreciar como el glifosato aumenta la concentración en el lixiviado entre el dopaje 1 y dopaje 2, lo cual es acorde a lo obtenido en el suelo ya que la concentración de glifosato disminuye.

En el caso del lixiviado suelo tomate Dopaje 1 la concentración obtenida está por debajo de límite de detección, dato que es acorde con los resultados del suelo ya que el glifosato quedo retenido en el suelo. Mientras que en lixiviado suelo tomate Dopaje 2 presentó la concentración de glifosato más alta que en el suelo.

En las muestras de lixiviado suelo tomate (dopaje 2) hay una mayor concentración de glifosato que en las muestras de albahaca, lo cual quiere decir que hay menor retención en el suelo y planta de tomate. Las concentraciones en lixiviados aumentan con el paso del tiempo debido a la periodicidad de riego y la capacidad de retención del suelo.

4.3.3. Muestras de plantas: a las muestras de plantas suministradas y descritos en el numeral 3.1 se les realizó la extracción de la metodología 3.2.3, los resultados de las muestras de plantas se observan en la (Tabla 3).

Tabla 3 *Muestras de plantas*

Muestra	Área (mAU)	Concentración (ppm)
Albahaca (dopaje 1)	201,47104	12,825
Albahaca (dopaje 2)	269,22906	17,092
Tomate (dopaje 2)	16,22081	1,159

Nota: * Descripción muestras de plantas utilizadas, área de la curva de los cromatogramas y la concentración de cada planta.

Para las concentraciones de las muestras de plantas se cuantificaron con respecto a la *Ecuación 1*. En la muestra de albahaca (dopaje 1) y albahaca (dopaje 2) se observó una concentración alta de glifosato lo que indica que la planta entre más tiempo pase más glifosato puede absorber y esto puede estar ligado al crecimiento de la planta.

En el caso del tomate se presentó un problema en el crecimiento, debido a la alta concentración del pesticida, de tal forma que para realizar el análisis de tomate se combinaron las muestras de dopaje 1 y 2 para obtener una muestra representativa (29,267 gramos), aun así, la concentración de glifosato fue de 1,159 ppm y está por debajo del límite de cuantificación, pero en el límite de detección.

5. Conclusiones

Las condiciones óptimas de la derivatización son un tiempo de 12 horas, sin agitación, con un pH de 9 y una concentración 0,01M de FMOC-Cl para realizar el análisis de glifosato por cromatografía líquida de alta resolución con un detector de arreglo de diodos.

La curva de calibración del glifosato cumple con los criterios de calidad al ser reproducible, repetible y lineal. El límite de detección está por debajo de 3 ppm y el máximo de cuantificación en 50 ppm, el rango lineal de cuantificación fue de 3 a 40 ppm y la curva de calibración obtenida fue $Y = 15,88 X - 2,1971$ con un coeficiente de correlación de 0,9992.

Se pudo cuantificar el contenido de glifosato presente en lixiviados, suelos y albahaca, en el caso del tomate la concentración fue muy baja. En el suelo se pudo evaluar la capacidad de absorción del glifosato, en el lixiviado el efecto del riego en la movilidad del glifosato y en las plantas la capacidad de absorción.

Referencias Bibliográficas

- Albers, C. N., Banta, G. T., Hansen, P. E., & Jacobsen, O. S. (2009). The influence of organic matter on sorption and fate of glyphosate in soil - Comparing different soils and humic substances. *Environmental Pollution*, 157(10), 2865–2870. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.04.004>
- Alberts, B. (2007). Molecular biology of the cell. In B. Alberts, A. D. Johnson, J. Lewis, D. Morgan, M. Raff, K. Roberts, & P. Walter (Eds.) (6th ed., p. 1430). New York: W.W. Norton & Company. Retrieved from <https://books.google.com.co/books?id=AGebDwAAQBAJ&printsec=frontcover&dq=Molecular+biology+of+the+cell&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjGq87V6LHpAhVPm-AKHeIZBpwQ6AEIQDAC#v=onepage&q=Molecular+biology+of+the+cell&f=false>
- Anzalone, A. (2008). *Herbicidas: Modos y mecanismos de acción en plantas*. (A. Anzalone, Ed.) (Primera ed). Universidad Centroccidental “Lisandro Alvarado.” Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/259175751_Herbicidas_Modos_y_mecanismos_de_accion_en_plantas
- Caballero, M., Amiri, S., Denney, J. T., Monsivais, P., Hystad, P., & Amram, O. (n.d.). Estimated Residential Exposure to Agricultural Chemicals and Premature Mortality by Parkinson ' s Disease in Washington State, 1–11. <https://doi.org/10.3390/ijerph15122885>
- De Gerónimo, E., Aparicio, V. C., & Costa, J. L. (2018). Glyphosate sorption to soils of Argentina. Estimation of affinity coefficient by pedotransfer function. *Geoderma*, 322(January), 140–148. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2018.02.037>

- Emanuella M. Pimenta, A., Fabio F. da Silva, B., Érica S. Barbosa, A., Ane P. Cacique, A., Douglas L. Cassimiro, A., Pinhoa, G. P. de, & Silvério, and F. O. (2020). Quantification of Glyphosate and AMPA by HPLC-ICP-MS/MS and HPLC-DAD: A Comparative Study, *31*(2), 298–304.
- Islas, G., Rodriguez, J. A., Mendoza-Huizar, L. H., Pérez-Moreno, F., & Carrillo, E. G. (2014). Determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in soils by HPLC with pre-column derivatization using 1,2-naphthoquinone-4-sulfonate. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, *37*(9), 1298–1309. <https://doi.org/10.1080/10826076.2013.789801>
- Jamilu Garba¹, Abd Wahid Samsuri ^{2,*}, Radziah Othman², M. S. A. H., & Zamfara. (2018). Simplified method for derivatization of extractable glyphosate and aminomethylphosphonic acid and their determination by high performance liquid chromatography Jamilu. *Turkish Journal Park Academic*, *1*(April), 19–30.
- Jayasumana, C., Gunatilake, S., & Senanayake, P. (2014). Glyphosate , Hard Water and Nephrotoxic Metals : Are They the Culprits Behind the Epidemic of Chronic Kidney Disease of Unknown Etiology in Sri Lanka ? *Environmental Research and Public Health*, *11*, 2125–2147. <https://doi.org/10.3390/ijerph110202125>
- Johal, G. S., & Huber, D. M. (2009). Glyphosate effects on diseases of plants, *31*, 144–152. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2009.04.004>
- Madrid, M. L. A. N. J. S. L. (2011). HERBICIDA GLIFOSATO : USOS , TOXICIDAD Y REGULACIÓN, 23–28.
- Mangoni, A. P., & Constantino, V. R. L. (2015). Desenvolvimento de metodologia verde por HPLC/UV para determinação de glifosato em amostras ambientais de solo. *Eclética Química*,

40, 192–203.

Mantilla, J. F. G., Ochoa, D. M., González, C. A., Figueredo, D. E., Marin, C. M., Olmos, C., ...

Jiménez, A. (2012). *Contaminación de las agua con glifosato y sus efectos tóxicos en ictiofauna nativa de Colombia*.

Miranda, A., & Martín, O. (2013). Cromatografía líquida (HPLC). Retrieved from <https://www.ucm.es/data/cont/docs/650-2013-12-02-gases líquidos.pdf>

Monroy, C. M., Cortés, A. C., & Sicard, D. M. (2005). Citotoxicidad y genotoxicidad en células humanas expuestas in vitro a glifosato. *Revista Biomédica*, 25(3), 12. Retrieved from <https://www.redalyc.org/pdf/843/84325309.pdf>

MONSANTO. (2018). ¿Qué es el Glifosato? Retrieved from <https://www.monsanto.com/products/>

NIH. (2019). NIH: Instituto Nacional del Cáncer. Retrieved from <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario/def/adn>

OMS. (2004). Hojas de información sobre sustancias químicas. Retrieved from <https://www.who.int/ipcs/publications/icsc/es/>

Quino, I., Ramos, O., & Guisbert, E. (2007). DETERMINACION DEL LIMITE DE DETECCION INSTRUMENTAL (LDI) Y LIMITE DE CUANTIFICACION INSTRUMENTAL (LCI) EN ELEMENTOS TRAZA DE AGUA SUBTERRANEA. *Revista Boliviana de Química*, 24.

Samsel, A., & Seneff, S. (2013). Glyphosate , pathways to modern diseases II : Celiac sprue and gluten intolerance, 6(4), 159–184. <https://doi.org/10.2478/intox-2013-0026>

Samsel, A., & Seneff, S. (2015). Glyphosate, pathways to modern diseases III: Manganese, neurological diseases, and associated pathologies. *Surgical Neurology International*, 6(45), 83. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4392553/>

- Silva, B. M. da, Benetti, F., & Rezende, M. O. O. (2015). Comparative Study of Glyphosate and AMPA Determination in Environmental Samples by Two Green Methods. *OALib*, 02(06), 1–11. <https://doi.org/10.4236/oalib.1101553>
- Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2015). *Fundamentos de Química Analítica*. (E. de la M. Lugo & J. M. T. Flores, Eds.) (9th ed.). México D.F: CENGAGE Learning.
- Solomon, K. R., Anadón, A., Cerdeira, A. L., Marshall, J., Limited, M. A., Kingdom, U., & Sanín, L. H. (2005). 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.
- Sun, L., Kong, D., Gu, W., Guo, X., Tao, W., Shan, Z., ... Wang, N. (2017). Determination of glyphosate in soil/sludge by high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1502, 8–13. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.04.018>
- Wigfield, Y. Y., & Lanouette, M. (1990). Simplified liquid chromatographic determination of glyphosate and metabolite residues in environmental water using post-column fluorogenic labelling. *Analytica Chimica Acta*, 233(C), 311–314. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)83495-9](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)83495-9)

Apéndices

Apéndice A. Concentración vs área glifosato 0,5-50 ppm.

Concentración vs área glifosato	
Concentración	Área
0,5	-
1	-
3	44,18635
5	93,52005
10	160,75313
20	295,33508
25	380,36493
30	463,02957
40	650,48303
50	1022,84589

Apéndice B. Curvas de calibración triplicado.

Concentración vs área triplicados			
Concentración	Área (1)	Área (2)	Área (3)
3	44,18635	48,26481	44,32357
5	93,52005	80,39752	50,36723
10	160,75313	180,65073	151,31512
15	234,98373	205,81145	190,08678
20	-	327,16061	295,33508
25	380,36493	377,65146	385,87515
30	463,02957	476,43085	452,54813
40	650,48303	641,03491	617,76257

Apéndice C. Resultados cuantificación.

Resultados cuantificación	
Concentración	Área
3	45,591576
5	86,958785
10	156,03413
20	311,24785
25	381,297180
30	469,730210
40	645,758970