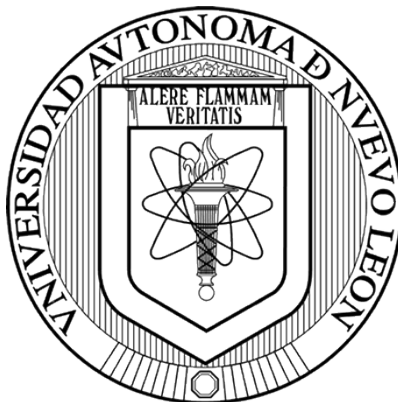


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**DESARROLLO DE UN MÉTODO PARA EL ANÁLISIS DE GLIFOSATO,
ÁCIDO AMINOMETILFOSFÓNICO Y GLUFOSINATO EN AGUA EMPLEANDO
EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA DISPERSIVA Y CROMATOGRAFÍA DE
LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN**

Por

Q.C.B. OLGA CATALINA RODRÍGUEZ MARTÍNEZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de MAESTRÍA EN
CIENCIAS con Orientación en Química Biomédica

Agosto, 2025

**Desarrollo de un método para el análisis de glifosato, ácido
aminometilfosfónico y glufosinato en agua empleando extracción en fase
sólida dispersiva y cromatografía de líquidos de alta resolución**

Aprobación de tesis:



Dra. C. Rocío Castro Ríos

Directora de Tesis



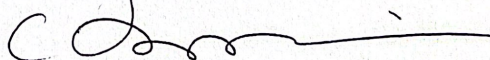
Dra. C. Marsela Garza Tapia

Codirectora de Tesis



Dra. C. Magdalena Escobar Saucedo

Miembro de la Comisión



Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez

Subdirector de Estudios de Posgrado

Agradecimientos

A Dios, por todas las bendiciones que me da, por permitirme alcanzar una meta más en mi carrera profesional e iluminar cada paso de mi camino.

A mis padres y hermanos, por su apoyo, sus sabios consejos y por enseñarme a no rendirme.

Agradezco a mi novio, Haniel Antonio, quien siempre me procuró y me motivó en cada etapa de este logro. Gracias por tu amor incondicional y por tus valiosos consejos.

Con admiración a mi asesora, la Dra. Rocío Castro, por su paciencia y las enseñanzas brindadas en química analítica. Muchas Gracias por confiar en mi para realizar este trabajo, por sus palabras de aliento y motivación.

A mi comisión de tesis por sus valiosas aportaciones en el área de química analítica y por su apoyo constante.

Agradezco a la T.L.C. Carolina Núñez por su valiosa ayuda en la parte experimental de este trabajo. Gracias por todas las risas y momentos compartidos en el laboratorio.

A mis compañeros y amigos de Química Analítica, gracias por celebrar este logro conmigo, por brindarme consejos y escucharme en cada momento.

RESUMEN

Q.C.B. Olga Catalina Rodríguez Martínez

Fecha de graduación: Agosto, 2025

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

Título de estudio: Desarrollo de un método para el análisis de glifosato, ácido aminometilfosfónico y glufosinato en agua empleando extracción en fase sólida dispersiva y cromatografía de líquidos de alta resolución.

Número de páginas: 103

Área de estudio: Química Analítica

**Candidata para el grado de
Maestría en Ciencias Orientación
en Química Biomédica**

Propósito y método de estudio: El objetivo de este trabajo fue desarrollar un método de extracción en fase sólida dispersiva (DSPE) con cromatografía líquida de alta resolución con detector de fluorescencia (HPLC-FL) para la determinación de glifosato, ácido aminometilfosfónico y glufosinato. Se seleccionaron las mejores condiciones de separación cromatográfica con soluciones estándar de cada analito previamente derivatizados con 9-fluorenilmetilcloroformiato. Se probaron distintas composiciones de la fase móvil (FM), además, se modificó la temperatura de columna y flujo, tomando como criterios la resolución y el tiempo de análisis. Una vez establecido el sistema cromatográfico, se determinaron las mejores condiciones de extracción con soluciones a 25 µg/L. Finalmente, se aplicó al análisis de muestras de agua.

Las condiciones establecidas para la separación cromatográfica fueron las siguientes: utilizando una columna de Atlantis dC18 con elución en gradiente, FM agua:acetonitrilo con 0.75% de ácido fórmico, flujo de 0.3 mL/min y temperatura de columna 45°C. Las mejores condiciones para la extracción mediante DSPE incluyeron el uso de Oasis HLB como fase extractante, agitación tipo vórtex, tiempo de extracción y de desorción de 1 min, 50 µL de acetonitrilo como solvente de desorción, pH 10 y NaCl al 2.5%p/v.

Contribuciones y conclusiones: El método propuesto se validó, mostrando linealidad en un rango de concentraciones de 0.05-0.6 µg/L, es exacto, preciso y sensible. El límite de cuantificación fue de 0.05 µg/L, inferior a los límites máximos establecidos por la EPA (0.7 µg/L) y la UE (0.1 µg/L). El método de DSPE-HPLC-FL permite preconcentrar a los analitos y procesar hasta 30 muestras simultáneamente. Es un método rápido, simple y económico por lo que constituye una nueva alternativa a los métodos reportados en la literatura.



Dra. C. Rocío Castro Ríos

Directora de Tesis

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Plaguicidas	1
1.1.1 Clasificación de los herbicidas	3
1.2 Glifosato y glufosinato	4
1.3 Normatividad	9
1.4 Propiedades fisicoquímicas de los analitos	10
1.5 Métodos de análisis	12
1.6 Métodos de extracción	17
1.6.1 Extracción en Fase Sólida Dispersiva	18
1.7 Antecedentes	22
2. JUSTIFICACIÓN	24
3. OBJETIVO GENERAL	25
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
5. MATERIAL Y MÉTODOS	27
5.1 Reactivos	27
5.2 Equipos	29
5.3 Materiales	30
5.4 Preparación de soluciones	31
5.5 Metodología	32
5.5.1 Desarrollo y validación del método cromatográfico	32
5.5.1.1 Establecimiento de las condiciones de separación cromatográfica	32
5.5.1.2 Validación del sistema cromatográfico	34
5.5.1.2.1 Linealidad	34
5.5.1.2.2 Precisión	35
5.5.1.2.3 Exactitud	35

5.5.1.2.4	Límites de detección y cuantificación	35
5.5.2	Establecimiento de las condiciones de extracción mediante DSPE	36
5.5.3	Evaluación del desempeño del método desarrollado	38
5.5.4	Aplicación del método DSPE-HPLC-FL a muestras de agua	39
6.	RESULTADOS	41
6.1	Desarrollo y validación del sistema cromatográfico	41
6.1.1	Establecimiento de las condiciones de separación cromatográfica	41
6.1.2	Validación del sistema cromatográfico	44
6.1.2.1	Linealidad	44
6.1.2.2	Precisión	46
6.1.2.3	Exactitud	46
6.1.2.4	Límites de detección y cuantificación	47
6.2	Establecimiento de las condiciones de extracción mediante DSPE	48
6.3	Evaluación del método desarrollado	55
6.4	Aplicación del método DSPE-HPLC-FL a muestras de agua	60
7.	DISCUSIÓN	64
7.1	Desarrollo y validación del método cromatográfico	64
7.1.1	Establecimiento de las condiciones de separación cromatográfica	65
7.1.2	Validación del sistema cromatográfico	67
7.2	Establecimiento de las condiciones de extracción mediante DSPE	68
7.3	Evaluación del método desarrollado	77

7.4 Aplicación del método DSPE-HPLC-FL a muestras de agua	82
8. CONCLUSIONES	89
9. PERSPECTIVAS	90
10. BIBLIOGRAFÍA	91

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Propiedades fisicoquímicas del glifosato, AMPA y glufosinato	11
II	Selección de métodos reportados para el análisis de glifosato, AMPA y glufosinato en muestras de agua mediante cromatografía de líquidos de alta resolución con detección por fluorescencia (HPLC-FL)	15
III	Condiciones de partida del sistema cromatográfico	33
IV	Condiciones iniciales de extracción mediante DSPE	37
V	Condiciones finales de separación cromatográfica	43
VI	Resultados obtenidos del análisis de regresión por mínimos cuadrados para la evaluación de la linealidad del sistema cromatográfico	45
VII	%DER obtenidos en cada nivel de concentración de los derivados de los analitos para la evaluación de la precisión del sistema cromatográfico	46
VIII	Límites de detección y cuantificación obtenidos para la validación del sistema cromatográfico	47
IX	Resultados obtenidos de la preparación de tubos de extracción	48
X	Condiciones óptimas de extracción para el método de DSPE desarrollado	54
XI	Resultados obtenidos del análisis de regresión por mínimos cuadrados para la evaluación de la linealidad del método DSPE-HPLC-FL desarrollado	56
XII	%DER obtenidos en cada nivel de concentración para la evaluación de la precisión del método DSPE-HPLC-FL desarrollado	56

XIII	Límites de detección y cuantificación obtenidos para la validación del método DSPE-HPLC-FL desarrollado	58
XIV	Resultados obtenidos para el análisis de la mezcla acuosa de los derivados de los analitos a 0.3 µg/L con el método DSPE-HPLC-FL	58
XV	Análisis de agua embotellada con y sin pretratamiento adicionada a una concentración de 0.4 µg/L de los analitos derivatizados	62
XVI	Análisis de agua de río con y sin pretratamiento adicionada a una concentración de 0.4 µg/L de los analitos derivatizados	63
XVII	Comparación de resultados del método TC-IL-DLLME-HPLC y DSPE-HPLC-FL	81
XVIII	Comparación del método propuesto con otros métodos reportados en la literatura	86

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Distribución por tipo de plaguicidas en México durante 2018	2
2	Mecanismo de acción del glifosato basado en el bloqueo de síntesis de aminoácidos inhibiendo la vía enzimática del Shikimato	5
3	Mecanismo de acción del glufosinato basado en la inhibición enzimática de la glutamina sintetasa	8
4	Estructura química de los herbicidas	10
5	Esquema de la reacción de derivatización del glifosato, AMPA y glufosinato utilizando FMOC-Cl en medio alcalino	13
6	Esquema de un procedimiento general de extracción en fase sólida dispersiva	19
7	Cromatogramas obtenidos para estándares derivatizados (500 µg/L) con la columna Atlantis dC18 y las condiciones descritas en la Tabla III	42
8	Cromatograma obtenido para una mezcla de derivados (20 µg/L) con la columna Atlantis dC18 y las condiciones descritas en la Tabla III	44
9	Curvas de calibración obtenidas para FMOC-GLI, FMOC-AMPA y FMOC-AMPA, durante la validación del sistema cromatográfico	45
10	Curvas de correlación entre la concentración real y la concentración calculada para FMOC-GLI, FMOC-AMPA y FMOC-GLUF	47
11	Cromatogramas obtenidos con el método HPLC-FL (Tabla V) para la extracción de una mezcla de	49

	derivados (25 µg/L) con distintas fases extractantes, bajo las condiciones de DSPE descritas en la Tabla IV	
12	Comparación de la respuesta obtenida para los derivados de los analitos con los adsorbentes evaluados	50
13	Comparación de la respuesta obtenida para los derivados de los analitos con diferentes sistemas de agitación	50
14	Comparación de la respuesta obtenida para los derivados de los analitos con diferentes tiempos de extracción	51
15	Comparación de la respuesta obtenida para los derivados de los analitos con diferentes tiempos de desorción	51
16	Comparación de la respuesta obtenida para los derivados de los analitos con diferentes solventes de desorción	52
17	Comparación de la respuesta obtenida para los derivados de los analitos con diferentes volúmenes de desorción	52
18	Comparación de la respuesta obtenida para los derivados de los analitos con diferentes pH	53
19	Comparación de la respuesta obtenida para los derivados de los analitos con diferentes concentraciones de NaCl	53
20	Cromatograma obtenido para una mezcla de derivados (0.6 µg/L) analizada con el método de DSPE-HPLC-FL propuesto	54
21	Curvas de calibración obtenidas de la extracción de soluciones estándar de los analitos derivatizados tratados con el método propuesto (0.05 a 0.6 µg/L)	55

22	Curvas de correlación entre la concentración real y la concentración calculada para FMOC-GLI, FMOC-AMPA y FMOC-AMPA para la evaluación de exactitud del método DSPE-HPLC-FL desarrollado	57
23	Esquema del procedimiento del método de DSPE propuesto	59
24	Cromatogramas obtenidos para el análisis de agua embotellada con el método DSPE-HPLC-FL sin adicionar y adicionada a 0.4 µg/L	60
25	Cromatogramas obtenidos para el análisis de agua río con el método DSPE-HPLC-FL sin adicionar y adicionada a 0.4 µg/L	61
26	Gráfico de la recuperación de los derivados de los analitos en el análisis de agua embotellada adicionada con y sin pretratamientos	62
27	Gráfico de la recuperación de los derivados de los analitos en el análisis de agua de río adicionada con y sin pretratamientos	63

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

μ DSPE	Extracción en fase sólida microdispersiva
μ g/L	Microgramo por litro
ACN	Acetonitrilo
AESA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
AMPA	Ácido aminometilfosfónico
C18	Sílice unida a octadecilo
CG	Cromatografía de gases
COFEPRIS	Comisión Federal para la Protección Contra Riesgos Sanitarios
DEA	Dietilamina
DL50	Dosis letal para el 50% de la población
DOF	Diario Oficial de la Federación
DSPE	Extracción en fase sólida dispersiva
IARC	Agencia Internacional para la Investigación sobre el cáncer
IDA	Ingesta Diaria Admisible
IL	Líquido iónico
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FMOC-Cl	9-fluoroenilmetilcloroformiato
FR	Fase inversa
GS	Glutamina sintetasa
g/L	Gramo por litro
g/mol	Gramo por mol
HILIC	Cromatografía líquida de interacción hidrófila
IC	Cromatografía iónica
HPLC-FL	Cromatografía de líquidos de alta resolución con detección de fluorescencia
HPLC-MS	Cromatografía de líquidos de alta resolución con espectrometría de masas

HPLC-UV	Cromatografía de líquidos de alta resolución con detección de ultravioleta-visible
LLE	Extracción líquido-líquido
LMR	Límites máximos de residuos
LOD	Límites de detección
LOQ	Límites de cuantificación
kg/Ha	Kilogramo por hectárea
mg/kg	Miligramo por kilogramo
MeOH	Metanol
MHB	Ácido 4-metilfosfinico-2-hidroxibutanoico
MMC	Cromatografía de modo mixto
MPA	Ácido 2-(hidroximetilfosfiril) acético
mPa	Milipascal
MPB	Ácido 4-fosfonobutírico
MPPA	Ácido 3-(hidroximetilfosfinil) propanoico
MS	Espectrometría de masas
MSDP	Dispersión de matriz en fase sólida
OGM	Organismos genéticamente modificados
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPA-2-ME	2-mercaptoetanol
PPA	Plaguicidas polares aniónicos
PPOB	Ácido 4-[hidroxi(metil)fosfiril]-2-oxobutanoico
RFC	Cromatografía de fase inversa
QuPPe	Método rápido para plaguicidas polares (Quick Polar Pesticides method)
SBSE	Extracción por sorción con barra agitadora
SNC	Sistema nervioso central
SPE	Extracción en fase sólida
SPME	Microextracción en fase sólida
UE	Unión Europea

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Plaguicidas

Un plaguicida es una sustancia empleada para controlar cualquier plaga que se presente durante la producción agropecuaria, de acuerdo con la definición establecida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) (FAO, 2022). Los plaguicidas se clasifican según el tipo de plaga a la cual atacan, como insecticidas, fungicidas, molusquicida, ovicida, herbicida, acaricida, nematocida, entre otros (Del Puerto et al., 2014).

El empleo a nivel mundial de plaguicidas se duplicó entre 1990 y 2022 a 4 millones de toneladas en total, con una tasa de crecimiento anual de más del 4% a partir del año 2015 (Mohd et al., 2023). Uno de los grupos de plaguicidas más utilizados a nivel mundial son los herbicidas, los cuales son empleados en la agricultura para el control de las malezas de las plantas que pueden crecer en los cultivos y afectar la calidad de los productos agropecuarios.

Tanto en México como a nivel mundial, el uso de los herbicidas es aceptado entre los productores agrícolas, debido a que facilitan el control y combaten malezas no deseadas en los cultivos. El consumo de plaguicidas en México ha aumentado de forma constante, tal que, en 1994 de 31.1 mil toneladas consumidas, de las cuales 11.2 mil fueron de herbicidas, la cifra aumentó a 55.8 mil toneladas en 2015, de las cuales 26.9 mil toneladas correspondieron a herbicidas y defoliantes. En 2018, la producción total de plaguicidas en el país llegó a 123.5 mil toneladas según datos del CEDRSSA (2020). En la Figura 1 se muestra un gráfico de la distribución de su producción, en la cual se observa que el 27.5% del total correspondió a herbicidas y defoliantes (CEDRSSA, 2020).

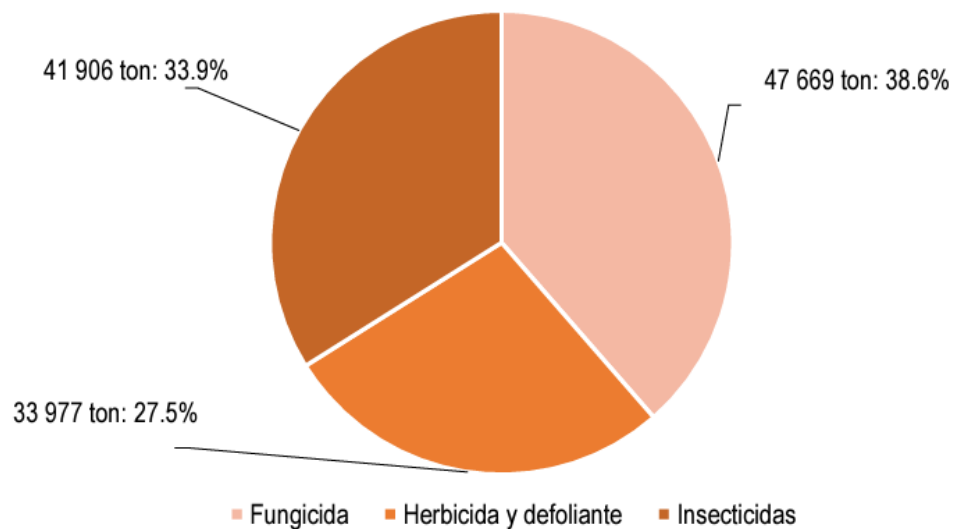


Figura 1. Distribución por tipo de plaguicidas en México durante 2018 (CEDRSSA, 2020)

1.1.1 Clasificación de los herbicidas

Los herbicidas pueden clasificarse según el momento de etapa de aplicación, su capacidad para afectar determinadas plantas (selectividad), su mecanismo de acción y su familia química.

En cuanto a la etapa de aplicación, los herbicidas son clasificados como pre-siembra, pre-emergencia y post-emergencia. Los herbicidas pre-siembra se caracterizan por ser volátiles y son aplicados previo a la siembra del cultivo, a diferencia de los herbicidas pre-emergentes que son aplicados posterior a la siembra, pero antes de que aparezcan las malezas, mientras que, los herbicidas post-emergentes son utilizados después de que aparezcan las malezas y los cultivos (Mohd et al., 2023).

Los herbicidas selectivos; son aquellos que son elaborados para destruir plantas específicas, sin afectar los cultivos. En cambio, los herbicidas no selectivos se utilizan cuando es necesario limpiar completamente la tierra de toda vegetación o en casos donde las malezas no están cerca de los cultivos. Algunos ejemplos son el paraquat, diquat, picloram, amitrol y el glifosato (Mohd et al., 2023).

El mecanismo por el cual el herbicida destruye a las malezas es conocido como su mecanismo de acción, dentro de esta clasificación se encuentran: los inhibidores del desarrollo de plántulas, de la fotosíntesis, de la división celular, así como de la síntesis de pigmentos, lípidos o aminoácidos, y herbicidas que dañan las membranas celulares (Mohd et al., 2023).

Otra clasificación de los herbicidas se basa en la familia química a la que pertenecen. Los principales grupos son: triazinas, dinitroanilinas, fenoxiacéticos, cloroacetamidas, sulfonilureas, bipiridilos, ácidos fosfónicos y ácidos fosfínicos. Los fosfonatos son aniones de ácidos fosfónicos, mientras que los fosfinatos son aniones de ácidos fosfínicos. Dentro de estas familias, se encuentran al glifosato y el glufosinato de amonio, lo cuales son dos de los herbicidas más utilizados en

la producción agropecuaria a nivel mundial (Mohd et al., 2023; Harsági & Keglevich, 2021).

El glifosato y el glufosinato actúan inhibiendo la síntesis de aminoácidos y son herbicidas no selectivos de amplio espectro, ya que pueden eliminar una amplia gama de plantas. En la actualidad, se suelen estudiar juntos ya que son herramientas importantes en la agricultura y poseen un mecanismo de acción similar.

1.2 Glifosato y glufosinato

El glifosato, o N-fosfonometilglicina, es el herbicida con mayor aplicación en los cultivos a nivel mundial. Se inició su comercialización desde 1974 con el nombre de Roundup® para el control de malezas (Conahcyt, 2020).

El glifosato, anteriormente, era utilizado en la fase pre-emergencia; sin embargo, con la incorporación de organismos genéticamente modificados (OGM), los cuales son resistentes a glifosato, también se empezó a utilizar en la fase post-emergencia (Masci et al., 2024).

Su uso aumentó un 1500% a partir de 1996 con la comercialización y siembra de maíz, algodón y soya genéticamente modificados resistentes al glifosato, es decir, que no mueren al aplicarles este herbicida. Actualmente, cerca de la mitad de su consumo está destinado a cultivos OGM. En México, se ha documentado que su consumo en la agricultura se encuentra entre 1.5 a 4.3 kg/Ha (Conahcyt, 2020).

El glifosato es un herbicida sistémico y no selectivo que actúa bloqueando la vía enzimática de Shikimato. En la Figura 2 se ilustra su mecanismo de acción, el cual se basa en inhibir la 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa, lo que bloquea la síntesis de aminoácidos como la fenilalanina, triptófano y la tirosina, que son esenciales para el crecimiento de la planta. Al no producirse estos

aminoácidos se detiene la síntesis de proteínas en las células vegetales, lo que provoca la muerte de la planta (Soares et al., 2021).

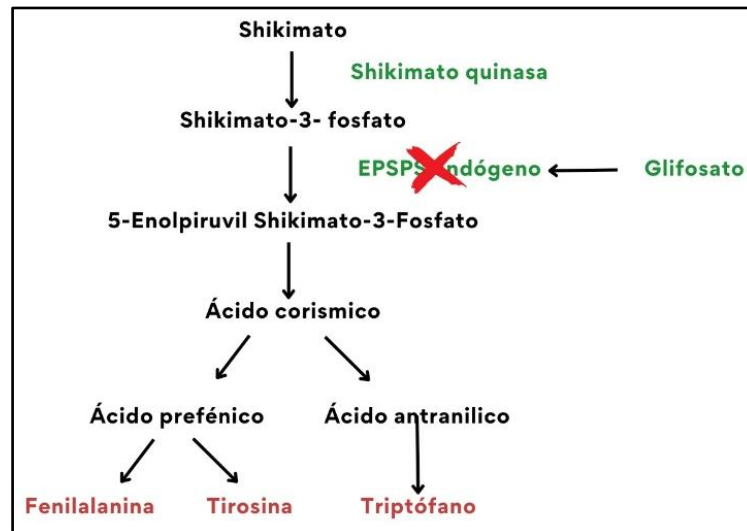


Figura 2. Mecanismo de acción del glifosato basado en el bloqueo de la síntesis de aminoácidos inhibiendo la vía enzimática del Shikimato (Bayer de México, 2018)

La principal forma de exposición para seres humanos se da por la ingesta de restos del herbicida en vegetales, frutas y animales. El aumento en el uso de cultivos OGM ha elevado la contaminación por glifosato, esta exposición puede ocasionar daños en la salud, causando autismo, trastorno por déficit de atención con hiperactividad, cáncer, daño renal, daño en el sistema nervioso central, causando enfermedades como Parkinson o Alzheimer, además de un incremento en la irritación de ojos y piel (Singh et al., 2024).

En 2015, se incluyó al glifosato en el grupo 2A de la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC), como un probable agente cancerígeno humano, fundamentándose en pruebas de carcinogenicidad humana. Los estudios mostraron una correlación positiva entre el glifosato y el linfoma no Hodgkin. En 2016, la FAO y la OMS evaluaron conjuntamente residuos

de plaguicidas en los alimentos y concluyeron que es poco probable que las personas expuestas al glifosato por la dieta, en las concentraciones aceptadas según la norma, presenten carcinogénesis; por lo tanto, decidieron no incluirlo como compuesto cancerígeno (Singh et al., 2024).

En 2016, la Comisión Europea estableció que no había evidencia suficiente para clasificar al glifosato como carcinógeno, por lo que se extendiendo su permiso de uso hasta 2022. La decisión para una nueva renovación se pospuso en 2022 y en noviembre de 2023, se autorizó su utilización hasta 2033, fundamentándose en un dictamen de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (AESA) (Masci et al., 2024).

Aunque agencias como la AESA, la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA) y la OMS no han declarado evidencia de los posibles efectos cancerígenos, su uso ha sido restringido o prohibido en muchos países. Esta decisión se ha tomado debido a la existencia de numerosos reportes *in vitro* e *in vivo* donde se ha encontrado que el glifosato actúa como disruptor endocrino (modificando la actividad hormonal y los procesos reproductivos), aumenta el estrés oxidativo y tiene efectos citotóxicos y genotóxicos (Lorenz, et al., 2021; Peillex & Pelletier, 2020).

En México, en febrero de 2023 se decretó en el Diario Oficial de la Federación (DOF) que el uso del glifosato disminuiría gradualmente, con una prohibición total para el 31 de marzo de 2024. Sin embargo, el gobierno decidió posponer su prohibición ante la falta de alternativas para el sector agrícola (DOF, 2023).

Por otra parte, existe evidencia de toxicidad de este herbicida para peces, aves, anfibios, abejas y otros animales, y también se ha observado un impacto ambiental debido a su persistencia en las partículas del suelo (Singh et al., 2024).

La biodegradación del glifosato se produce por dos vías principales: una catalizada por una enzima oxidasa, que rompe el enlace carbono-nitrógeno para formar el ácido aminometilfosfónico (AMPA), y la otra vía, esta mediada por la

enzima C-P liasa, través de la ruptura del enlace carbono-fosforo, lo que da lugar a la formación de sarcosina y glicina (Venditti et al.,2023). De los productos de degradación del glifosato, el AMPA es el único metabolito persistente, por lo que es crucial monitorearlo. (Masci et al., 2024).

Como producto de degradación, el AMPA suele coexistir con el glifosato. Este metabolito está ampliamente presente en el aire de las áreas agrícolas, aguas superficiales, sedimentos y aguas subterráneas poco profundas. Según un estudio realizado por Battglin y cols. (2014), de 3,732 muestras ambientales analizadas, solo el 2.3% contenía glifosato sin la presencia de su metabolito, el AMPA. Actualmente, no hay datos epidemiológicos acerca de la exposición al AMPA a través de los cuerpos de agua, y los estudios toxicológicos *in vitro* en células humanas y animales son muy limitados (Battglin et al., 2014; Grandcoin & Baurès, 2017).

El glufosinato de amonio (D, L-fosfinotricina o ácido 2-amino-4-(hidroximetilfosfinil)butanoico) ocupa el segundo lugar en el uso de herbicidas a nivel mundial, es un herbicida no selectivo y post-emergencia (Han et al., 2016).

Comercializado por primera vez en los Estados Unidos y Canadá en 1993-1994, su uso ha aumentado, especialmente para combatir el número creciente de malezas resistentes a glifosato. Es de uso común en América del Sur, especialmente para la elaboración de algodón resistente al glifosato, también es utilizado para el cultivo de arroz, huertos y viñedos en Brasil (Takano & Dayan, 2020).

En la Figura 3 se presenta el mecanismo de acción del glufosinato, basado en la inhibición competitiva de la enzima glutamina sintetasa (GS). El glufosinato actúa sobre la enzima GS, clave en el metabolismo del nitrógeno la producción de glutamina. Al inhibir esta enzima se produce un incremento en los niveles de amoníaco y una deficiencia de glutamina, un aminoácido esencial para el crecimiento de las plantas. Esto causa clorosis en las hojas, detención del crecimiento y puede llevar a la muerte de la planta (Takano & Dayan, 2020).

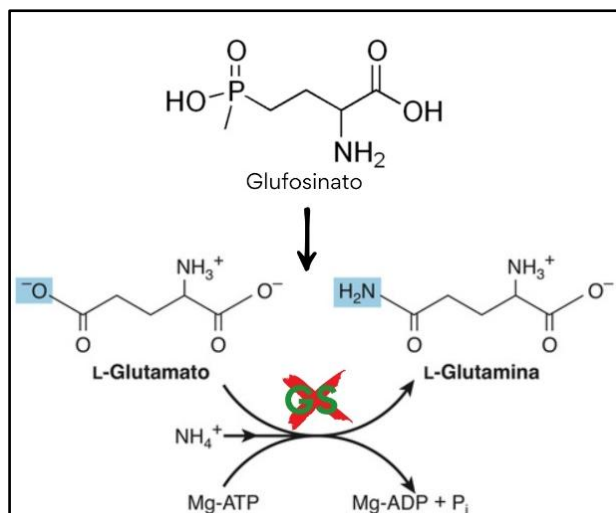


Figura 3. Mecanismo de acción del glufosinato basado en la inhibición enzimática de la glutamina sintetasa (Bayer de México, 2018)

Las plantas pueden descomponer al glufosinato formando cinco metabolitos principales: ácido 4-[hidroxi(metil)fosfíril]-2-oxobutanoico (PPOB), ácido 3-(hidroximetilfosfinil)propanoico (MPPA), ácido 2-(hidroximetilfosfíril)acético (MPA), ácido 4-metilfosfinico-2-hidroxibutanoico (MHB) y ácido 4-fosfonobutírico (MPB) (Takan & Dayan, 2020).

La OMS clasificó al glufosinato como moderadamente tóxico. Una exposición aguda al glufosinato puede provocar, en la etapa inicial, síntomas gastrointestinales como náuseas, vómitos, diarrea y dolor abdominal, seguidos de depresión respiratoria, fiebre e hipotensión. Además, el glufosinato puede tener efectos en el sistema nervioso central (SNC), causando convulsiones y pérdida de la memoria (Kim & Park, 2022; Nguyen et al., 2022).

1.3 Normatividad

El aumento en el uso de glifosato y glufosinato ha generado una gran preocupación por su posible toxicidad, lo que ha llevado a un incremento en los estudios sobre sus impactos en la salud humana y en el ambiente (Singh et al., 2024).

En 2016, la AESA determinó un valor de Ingesta Diaria Admisible (IDA) de 0.5 mg/kg de peso corporal de glifosato, basado en un estudio realizado en conejos. Por otra parte, la OMS y la FAO establecieron la dosis letal para el 50% de la población (DL50), que corresponde a la dosis necesaria para que una sustancia cause la muerte al 50% de los sujetos analizados, de 5600 mg/kg de peso corporal para la vía oral y >2000 mg/kg de peso corporal para la vía dérmica (FAO/WHO, 2016). En México, la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) estableció para el glifosato un valor de IDA de 0.3 mg/kg, pero no ha establecido un nivel máximo permitido para el glufosinato.

También, el glifosato y el glufosinato se han encontrado como agentes contaminantes en el medio ambiente y alimentos (Leyva et al., 2023), esto ha llevado a que organismos nacionales e internacionales generen regulaciones para los residuos de glifosato y glufosinato en agua y alimentos.

El *Codex Alimentarius* ha establecido los límites máximos de residuos (LMR) para el glifosato en alimentos, por ejemplo, se estableció un LMR de 20 mg/kg en soya, 6 mg/kg en maíz, 0.05 mg/kg en leches, mientras que, para el glufosinato de amonio se ha establecido un valor de 2 mg/kg en soya, 0.1 mg/kg en maíz y 0.02 mg/kg en leches (FAO/WHO *Codex Alimentarius*, 2024).

Además, en Estados Unidos la EPA, ha establecido un valor de LMR en agua potable de 0.7 mg/L para el glifosato, mientras que, para el glufosinato no se ha establecido (U.S. EPA, 2024). La Unión Europea (UE), no ha definido una concentración máxima permitida específica para el glifosato y glufosinato en

agua; sin embargo, en su directiva 2020/2184 establece una concentración máxima permitida en agua de 0.1 µg/L por plaguicida individual y de 0.5 µg/L para la suma de todos los plaguicidas presentes en la muestra (European Parliament & Council of the European Union, 2020).

1.4 Propiedades fisicoquímicas de los analitos

En la Figura 4 se muestran las estructuras químicas del glifosato, AMPA y glufosinato. Se observa que los tres compuestos presentan una estructura de tipo lineal y carecen grupos cromóforos. Asimismo, tienen una estructura zwitteriónica, lo que les proporciona la capacidad de formar complejos con iones metálicos. Tanto el glifosato como el glufosinato, tienen un grupo amino, un grupo carboxilo y un grupo fosforilado en su estructura (Singh et al., 2024; Soares et al., 2021).

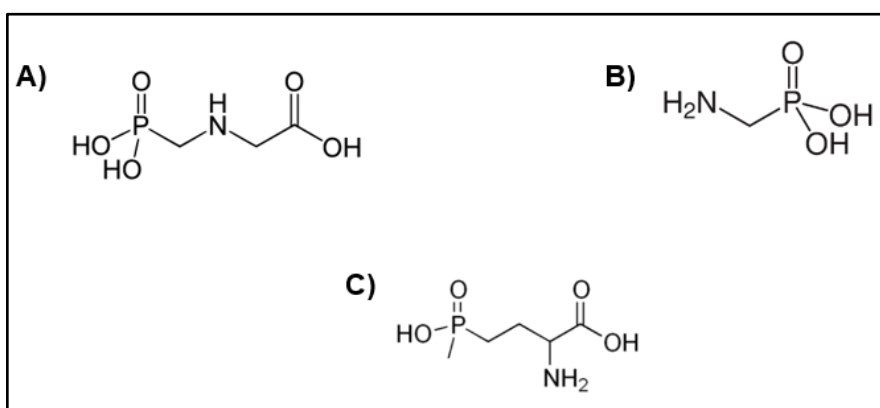


Figura 4. Estructura química de los herbicidas. A) glifosato, B) AMPA y C) glufosinato

En la Tabla I se presenta un resumen de las propiedades fisicoquímicas del glifosato, AMPA y glufosinato.

Tabla I. Propiedades fisicoquímicas del glifosato, AMPA y glufosinato (NCBI, 2024)

	Glifosato	AMPA	Glufosinato
Fórmula molecular	C ₃ H ₈ NO ₅ P	CH ₆ NO ₃ P	C ₅ H ₁₂ NO ₄ P
Nombre IUPAC	N-(fosfonometil) glicina	Ácido aminometil fosfónico	Ácido 2-amino-4-[hidroxi(metil) fosforil] butanoico
Peso molecular (g/mol)	169.07	111.04	181.13
Presión de vapor (mPa)	0.013	-	0.039
Solubilidad en agua (g/L)	1050	-	1370
Constantes de disociación (pKa)	2.0, 2.5, 5.6 y 10.6	5.9, 10.8	<2, 2.9 y 9.8
Constante de distribución o Relación de partición (log P_{o/w})	-4.6	-4.7	-5

Como puede observarse en la Tabla I, los tres compuestos presentan valores negativos de Log P_{o/w}, lo que indica que tienen una mayor afinidad por el agua, siendo el glufosinato el más hidrófilo, con un log P_{o/w} de -5.0. Estos compuestos son altamente solubles en agua y poco solubles en solventes orgánicos. También, presentan una baja presión de vapor, lo cual refleja que tienen baja volatilidad.

Por otra parte, presentan propiedades ácido-base con varios grupos ionizables, el glifosato tiene tres grupos ácidos y uno alcalino, mientras que el AMPA y el glufosinato tienen, cada uno, dos grupos ácidos y uno alcalino, los valores de pKa se muestran en la Tabla I. En consecuencia, en el rango entre pH 2 y 9, los tres analitos tienen tanto cargas positivas como negativas. A pH de 2.0

a 2.4, el zwitterion predominante tiene una carga negativa y una positiva. Por lo tanto, los analitos tienen una alta tendencia a formar complejos metálicos quelantes y a adherirse a los componentes de la matriz y las superficies del instrumento de análisis, lo que plantea grandes desafíos para el proceso analítico, especialmente para los pasos de extracción, limpieza y medición (Amberger et al., 2023).

Las propiedades físicas y químicas de estos compuestos, como su baja volatilidad, alta hidrofiliidad, junto con la ausencia de un grupo cromóforo, hacen que su extracción y detección sean complejas.

1.5 Métodos de análisis

Debido al aumento en el uso de estos herbicidas y sus posibles riesgos en la salud humana por la contaminación en agua, suelos y alimentos, ha crecido el interés en la búsqueda y el desarrollo de técnicas para su análisis.

Para la determinación del glifosato, AMPA y glufosinato se ha reportado el uso de la cromatografía de líquidos de alta resolución con detección ultravioleta-visible (HPLC-UV) (Khrolenko, 2005) y cromatografía de líquidos de alta resolución con detección de fluorescencia (HPLC-FL) (Wang, 2016). Debido a que estos herbicidas no presentan en su estructura grupos funcionales cromóforos que absorban la radiación UV, el análisis mediante estas técnicas requiere un paso de derivatización para la detección de estos compuestos.

Para el análisis por HPLC-FL, se ha utilizado principalmente la derivatización pre-columna con el 9-fluoroenilmetilcloroformiato (FMOC-Cl), que es la base del método recomendado por la Norma ISO 16308:2014 para análisis de agua potable, subterráneas y superficiales. En medio básico, a pH entre 9-9.5, el FMOC-Cl reacciona con aminas primarias y secundarias formando los derivados fluorescentes a través de una sustitución nucleofílica aromática. En la

Figura 5 se presenta la reacción que se produce en este proceso de derivatización.

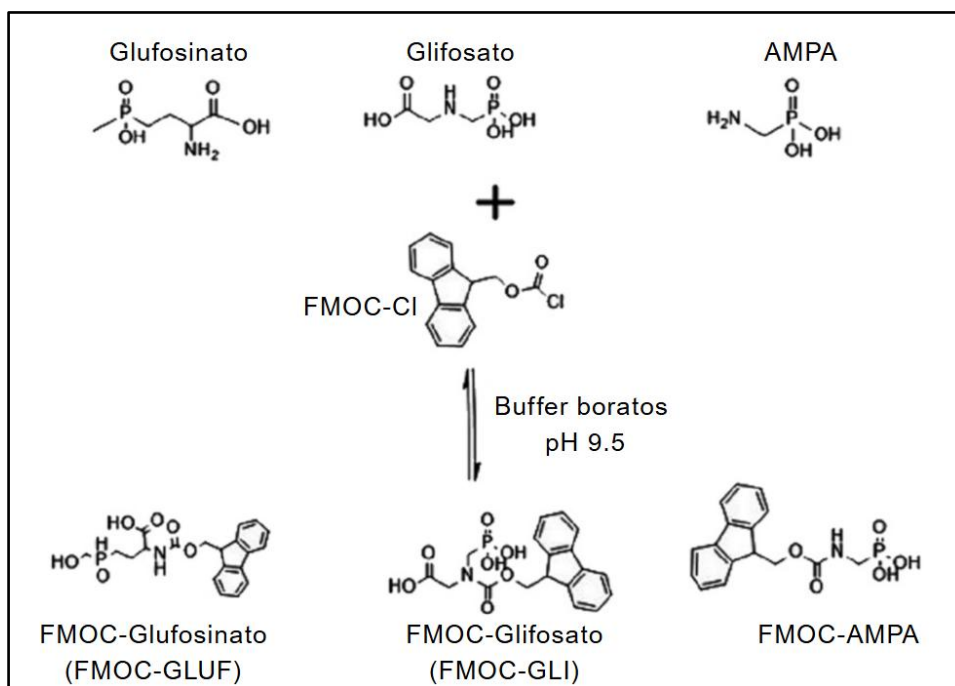


Figura 5. Esquema de la reacción de derivatización del glifosato, AMPA y glufosinato utilizando Fmoc-Cl en medio alcalino (Campanale et al., 2022)

También se emplea la derivatización post columna con o-ftaldialdehído en presencia de 2-mercaptoetanol (OPA-2-ME) en buffer de boratos, que es la base del Método 547 de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos. (De Miranda & Masini, 2014; Oliveira et al., 2019).

Debido a que el glifosato es una amina secundaria, no reacciona directamente con OPA y 2-ME, por lo que debe ser sometido a un tratamiento con hipoclorito para ser oxidado a glicina antes de la reacción con el reactivo fluorogénico. Oliveira y cols. (2019) destacan que la ventaja de este método sobre el que utiliza Fmoc-Cl es que la reacción es rápida y puede hacerse en línea con la separación. Sin embargo, Martín y cols. (2023), mencionan que este proceso de derivatización post columna genera un volumen muerto adicional debido a los tubos de reacción requeridos, lo que reduce la eficiencia de la separación y provoca variaciones en la línea base.

Otras técnicas que se han utilizado incluyen la cromatografía de gases (CG) con detección fotométrica de llama, o con detección de espectrometría de masas (CG-MS) y la electroforesis capilar acoplada a espectrometría de masas (Wimmer et al., 2020; Zhang et al., 2019). Sin embargo, debido a la baja volatilidad de los analitos, su derivatización mediante acilación, esterificación simultánea o trialkylsilylación es obligatoria en el caso de la CG (Oliveira et al., 2019)

También se han desarrollado metodologías eficientes para la determinación del glifosato, AMPA y glufosinato que involucran la cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a la espectrometría de masas en tándem (HPLC-MS/MS), el uso de esta técnica mejora la selectividad en la detección de los analitos (Martin et al., 2023). Aunque algunos autores, como Alonso y cols. (2022) han reportado que la HPLC-FL presenta una mayor sensibilidad para el análisis de glifosato y AMPA en muestras de agua dulce.

Como se ha mencionado anteriormente, los herbicidas se aplican en cultivos, suelos y sistemas acuáticos. Como consecuencia, pueden ingresar indirectamente a las aguas superficiales a través de la escorrentía o lixiviación, lo que provoca contaminación de los cuerpos de agua (Mohd et al., 2023) que son esenciales al proporcionar el agua para el consumo humano. El uso intensivo de herbicidas puede exponer a plantas, animales y humanos a efectos en las funciones del ecosistema y las comunidades microbianas en el medio ambiente.

Debido a esto, se han desarrollado diversos métodos para la determinación del glifosato, AMPA y glufosinato en distintas muestras de agua. En la Tabla II se presenta una selección de métodos de HPLC-FL desarrollados para la determinación de los analitos en muestras de agua.

Tabla II. Selección de métodos reportados para el análisis de glifosato, AMPA y glufosinato en muestras de agua mediante cromatografía de líquidos de alta resolución con detección por fluorescencia (HPLC-FL)

<i>Muestra</i>	<i>Tratamiento de muestra</i>	<i>Columna cromatográfica</i>	<i>Fase móvil</i>	<i>Analitos</i>	<i>LD (µg/L)</i>	<i>LOQ (µg/L)</i>	<i>Referencia</i>
Agua de río	Derivatización pre-columna con FMOC-Cl y extracción en resina de intercambio aniónico IRA-900 y	ACE 5 C18, 250 × 4.6 mm, 5 µm	Fase A: H ₃ PO ₄ 0.05% (pH 2.9) Fase B: ACN	Glifosato AMPA Glufosinato	0.2 0.4 0.2	0.4 0.8 0.4	Gabardo, Corderio & Peralta, 2024
Agua dulce superficial de ríos	Derivatización pre-columna con FMOC-Cl	Hypersil gold C18, 250 x 4.6 mm, 5 µm	Fase A: buffer de NH ₄ CH ₃ CO ₂ 5 mM (pH 9.5) Fase B: ACN	Glifosato AMPA	No reportado	0.25 1	Alonso et al., 2022
Agua de río	Filtración/liofilización y derivatización post-columna con OPA-2-ME	PRP-X100, 250 x 4.1 mm, 10 µm	Fase A: MeOH Fase B: KH ₂ PO ₄ 10 mM (pH 2.1)	Glifosato AMPA Glufosinato	No reportado	0.5 0.2 0.3	Pires et al., 2020
Agua potable y de pozo	Derivatización con FMOC-Cl y TC-IL-DLLME	Atlantis dC18 150 x 2.1 mm, 3 µm	Fase A: NH ₄ HCO ₃ 5 mM pH 3 Fase B: ACN	Glifosato AMPA	0.27 0.22	0.82 0.67	Padilla et al., 2017

Agua de mar	Derivatización con FMOCCl	Zorbax SB C18 150 x 4.6 mm, 5 μ m	Fase A: NH ₄ HCO ₃ 5 mM pH 9 Fase B: MeOH	Glifosato AMPA	0.24 0.06	0.8 0.2	Wang et al., 2016
Aguas superficiales	Derivatización con FMOCCl y liofilización	Gemini C18 150 x 4.6 mm, 5 μ m	Fase A: buffer de amonio/amoniaco (pH 9.5) Fase B: ACN	Glifosato AMPA	0.058 0.108	No reportado	Ramírez, Bellmund & Gardinalli, 2014
Agua potable	Derivatización con FMOCCl, SPE con resina de intercambio catiónico y evaporación con rotavapor.	Gravity C18 250 x 4 mm, 5 μ m	Fase A: H ₃ PO ₄ 0.1% Fase B: ACN	Glifosato AMPA	0.012 0.014	No reportado	Küstters & Gerhartz, 2010
Agua de río	Derivatización con FMOCCl y SPE de intercambio iónico	Kromasil 100 NH ₂ 250 x 4.6 mm, 5 μ m	Fase A: buffer de fosfatos (pH 5.5) Fase B: ACN	Glifosato AMPA	0.1 0.3	No reportado	Corbera, Hidalgo & Salvadó, 2006
Agua potable y subterránea	Derivatización con FMOCCl-SPE intercambio iónico	Kromasil 100, 30 x 4.6, 10 μ m/ Hypersil APS, 250 x 4.6 mm, 5 μ m	Fase A: buffer de fosfatos (pH 5.5) Fase B: ACN	Glifosato AMPA	No reportado	0.02 0.02	Hidalgo et al., 2004

ACN: acetonitrilo; GLI: glifosato; GLUF: glufosinato; MeOH: metanol; TC-IL-DLLME: microextracción líquido-líquido asistida por temperatura utilizando líquidos iónicos

1.6 Métodos de extracción

La determinación de analitos a niveles traza en muestra complejas, como agua, suelos o alimentos, es esencial para la evaluación y el monitoreo ambiental de compuestos que pueden ser nocivos para la salud. Pocas técnicas analíticas son lo suficientemente sensibles para la detección directa de los analitos traza en muestras. Por esta razón, se requiere de un paso de aislamiento o preconcentración del analito antes de su detección (Spiegel et al., 2014).

Hasta ahora, se ha propuesto métodos de análisis de herbicidas que utilizan principalmente la extracción líquido-líquido (LLE) y la extracción en fase sólida (SPE) y; sin embargo, su uso en algunos casos requiere pretratamientos adicionales.

Las principales desventajas de la LLE son que demandan de mucho tiempo y trabajo, lo que conlleva una exposición prolongada a vapores de reactivos químicos nocivos, principalmente los disolventes orgánicos. Además, los múltiples pasos involucrados durante el desarrollo de extracción, aumenta el riesgo de pérdida de analito y contaminación. Por tal razón, la búsqueda de alternativas ecológicas, automatizadas, sin disolventes o que empleen una cantidad mínima de estos se ha convertido en uno de los temas más populares de investigación en química analítica en los últimos años (Spiegel et al., 2014).

La SPE presenta ventajas sobre la LLE, como el requerimiento de menores cantidades de disolventes, menos tiempo de operación y menor complejidad, proporcionando una mejor eficacia y selectividad.

Con la finalidad de acelerar y miniaturizar el proceso de extracción por SPE, se han desarrollado algunas variantes como la microextracción en fase sólida (SPME), dispersión en fase sólida de matriz (MSPD), extracción en fase sólida por intercambio iónico (IE-SPE, extracción por sorción con barra agitadora (SBSE), y extracción en fase sólida dispersiva (DSPE). Estas técnicas se han

vuelto en algunas de las más utilizadas para la preparación de muestras sólidas o líquidas (Scigalski & Kosobucki, 2020).

1.6.1 Extracción en Fase Sólida Dispersiva

La DSPE es una técnica que ha sido utilizada desde el año 2003, cuando Anastassiades y cols. (2003) la reportaron para la extracción de plaguicidas en productos agrícolas. Desde entonces, se ha empleado con éxito para la extracción, aislamiento y limpieza durante el pretratamiento analítico de muestras (Faraji et al., 2019).

La DSPE es una técnica de limpieza rápida, fácil, barata, eficiente, robusta y segura, que permite analizar varias muestras simultáneamente y reduce las cantidades empleadas de adsorbentes y disolventes (Islas et al., 2017). En la Figura 6 se presenta un esquema de los pasos involucrado en un procedimiento de DSPE, el cual implica la adición de una cantidad determinada de un adsorbente o fase extractante directamente a la muestra, seguida de una dispersión que favorece el contacto entre los compuestos de interés y la fase de extracción, esto permite alcanzar de forma rápida el equilibrio de extracción. Posteriormente, la fase extractante con los analitos adsorbidos en su superficie, se separa mediante centrifugación o filtración y los compuestos extraídos se eluyen del adsorbente con la adición de un disolvente afín a ellos (Islas et al., 2017).

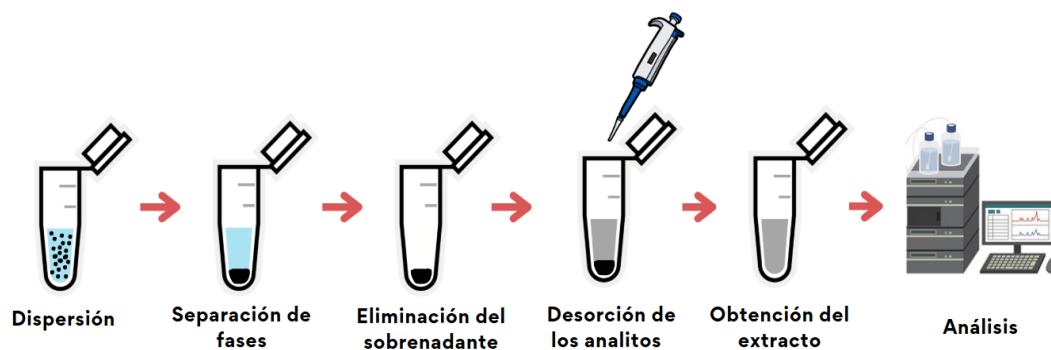


Figura 6. Esquema de un procedimiento general de extracción en fase sólida dispersiva

La DSPE es una técnica de extracción y limpieza a micro y macroescala, utilizado en diversas metodologías analíticas como procedimiento para la eliminación de interferencias potenciales (clean-up) que podrían afectar la determinación posterior de los analitos (Islas et al., 2017).

En la DSPE los volúmenes de muestra y solventes, así como la cantidad de extractante sólido pueden ajustarse con el fin de garantizar la sensibilidad del análisis, así como para reducir costos y residuos. Por ello, se considera una técnica de bajo costo en comparación con otras clásicas como LLE y SPE (Islas et al., 2017). Recientemente, se implementó una versión miniaturizada, la extracción en fase sólida microdispersiva (μ DSPE), que utiliza volúmenes de muestra y solventes en el orden de los microlitros y cantidades muy bajas de fase extractante.

Las principales variables que afectan la eficiencia de la extracción en DSPE son el tipo y cantidad de adsorbente, el tipo y volumen del solvente utilizado para la desorción, el sistema de agitación, el tiempo de extracción y de desorción, el pH y en algunos casos la presencia de sales, especialmente cuando los compuestos tienen carga (Islas et al., 2017).

Uno de los pasos críticos de la DSPE es la selección del adsorbente, ya que es necesario considerar las propiedades fisicoquímicas para garantizar una

interacción óptima entre el adsorbente y los analitos, asegurando la selectividad en la extracción y favoreciendo la preconcentración de los compuestos de interés presentes en las muestras (Islas et al., 2017). Además, idealmente el adsorbente debe cumplir con las siguientes características (Socas-Rodríguez et al., 2015):

1. Debe permitir la desorción de los compuestos de interés.
2. Debe ser poroso y tener una alta superficie específica.
3. Alta pureza
4. Debe ser químicamente estable en las muestras, en los solventes utilizados y en el rango de pH de trabajo.

Los adsorbentes más utilizados en DSPE incluyen partículas de sílice en fase ligada, materiales carbonosos, adsorbentes poliméricos, adsorbentes de reconocimiento molecular, partículas inorgánicas y de estructuras orgánicas metálicas (Ścigalski & Kosobucki, 2020; Socas-Rodríguez et al., 2015).

Los adsorbentes de sílice en fase ligada son los más utilizados como fase extractante, pueden ser polares, no polares o de intercambio iónico. Son materiales fáciles de sintetizar, económicos y rígidos, con buena resistencia a la contracción y a la expansión, además de ser fácilmente modificables (Islas et al., 2017; Ścigalski & Kosobucki, 2020).

El octadecilsilano (C18) es la fase ligada más utilizada en RP-DSPE, particularmente útil para fines de limpieza. (Socas-Rodríguez et al., 2015). En 2008, el Laboratorio Europeo de Referencia para Métodos de Residuos Únicos desarrolló el método Quick Polar Pesticides (QuPPE), este método implica el uso de metanol acidificado e involucra el uso de la RP-DSPE para la eliminación de interferencias no polares (Liao et al., 2022; Manzano et al., 2020).

Los adsorbente de fase normal, también pueden basarse en sílice, algunos ejemplos son el gel de sílice, aminopropilo, cianopropilo, diol, etc.; sin embargo, estos materiales se han usado poco en DSPE en comparación con C18 (Socas-Rodríguez et al., 2015).

Entre los adsorbentes carbonosos más utilizados se encuentra el grafito y el grafeno. El grafito es un alótropo de carbono cristalino natural con una estructura hexagonal. Se utiliza ampliamente debido a su gran área superficial, lo que le confiere una alta capacidad de adsorción. Además, presenta buena resistencia mecánica, eléctrica y térmica y es químicamente inerte. El grafeno, es un derivado del grafito, consiste en una lámina bidimensional de átomos de carbono dispuestos en una estructura hexagonal. Debido a que los anillos de carbono que lo forman presentan propiedades aromáticas, este adsorbente tiene un sistema de electrones π deslocalizados, lo que le confiere la utilidad de interactuar con otros compuestos aromáticos (Ścigalski & Kosobucki, 2020).

Los adsorbentes de polímeros porosos basados en resinas orgánicas reticuladas forman perlas de diámetro uniforme con tamaños de poro regulares. Sus ventajas incluyen diversidad funcional y estabilidad fisicoquímica, especialmente en presencia de agua, además de exhibir áreas superficiales muy elevadas. Algunos ejemplos incluyen la poliamida en polvo dispersivo y el copolímero de polivinilpirrolidona-divinilbenceno (PVP-DVB) (Ścigalski & Kosobucki, 2020).

Entre las fases extractantes inorgánicas, los adsorbentes más comunes son alúmina y Florisil, su gran aplicabilidad se debe a su alta capacidad para eliminar sustancias interferentes polares en etapas de limpieza. Además, se han propuesto otros materiales como hidróxidos dobles laminares hechos de magnesio y aluminio, nanopartículas esféricas de ferrita de bario, entre otros (Socas-Rodríguez et al., 2015).

1.7 Antecedentes

En el Departamento de Química Analítica de la Facultad de Medicina de la UANL, Padilla y cols. (2017) desarrollaron un método para la determinación del glifosato y AMPA en matrices de agua mediante microextracción líquido-líquido dispersiva basada en líquido iónico asistida por temperatura. Los compuestos se derivatizaron utilizando el reactivo FMOC-Cl y se cuantificaron por HPLC-FL. El método presentó buenos resultados con % Recuperación de 75 a 99%. Sin embargo, este método es complejo y laborioso, ya que involucra cambios de temperatura durante el paso de extracción y además no se contempló el análisis del glufosinato.

Por otra parte, diversos estudios han reportado el uso del método QuPPE modificado que añade un paso de purificación/limpieza con DSPE. Schäfer y cols. (2024) desarrollaron un método de extracción con metanol acidificado con ácido fórmico 1% (método QuPPE), se adicionó EDTA y una etapa de limpieza con ACN, posteriormente se realizó una DSPE con octadecilsilano como fase adsorbente. Con este método se logró la extracción de 11 plaguicidas polares, entre ellos el glifosato, AMPA y glufosinato, en productos de origen animal y vegetal, incluidas frutas, verduras, legumbres, cereales, hígado y leche. Sin embargo, este procedimiento no involucra la extracción directa de los analitos mediante DSPE, únicamente es utilizada como etapa de limpieza (Schäfer et al., 2024).

Dong y cols. (2024) compararon el uso de la SPE y DSPE con distintas fases adsorbentes para el análisis de glifosato, glufosinato y AMPA en alimentos. En este estudio se evaluaron distintos métodos de purificación, incluyendo C18 SPE, HLB SPE, PRiME HLB SPE y C18 DSPE, se observó que tanto con C18 SPE y C18 DSPE no se alcanzó una eficiencia de purificación satisfactoria. Con la modalidad HLB SPE y PRiME HLB SPE se obtuvieron los mejores resultados, por tanto, utilizaron la tecnología PRiME HLB SPE como método de purificación

(Dong et al., 2024). Sin embargo, en este estudio no se incluyó el análisis de otras fases adsorbentes en la modalidad de DSPE.

Anteriormente, Wang y cols. (2021) desarrollaron un método para la determinación de glifosato, AMPA y glufosinato en té empleando DSPE con Carbón grafitizado-Polivinilpirrolidina como fase extractante para la eliminación de interferencias en la matriz causada por los polifenoles (Wang et al., 2021).

CAPÍTULO 2

JUSTIFICACIÓN

En la actualidad, el glifosato y el glufosinato son los herbicidas más utilizados a nivel mundial para el control de las malezas. Diversos estudios han demostrado la toxicidad de estos herbicidas y del AMPA tanto para seres humanos como para la biota. Además, el uso de estos compuestos ha aumentado en los últimos años y por esto resulta necesario monitorear su presencia en el agua.

El análisis de estos herbicidas es complicado debido a la ausencia de grupos cromóforos, lo cual dificulta la detección y su alta hidrofiliidad hace difícil su extracción de matrices acuosas, por lo que los métodos de análisis son, en general, largos y complejos.

Por ello, es necesario explorar alternativas que permitan desarrollar métodos sensibles, selectivos y sencillos, capaces de analizar estos analitos de manera confiable. La DSPE en combinación con HPLC puede ser una alternativa eficaz para el análisis de herbicidas hidrofílicos.

CAPÍTULO 3

OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un método para el análisis de glifosato, ácido aminometilfosfónico y glufosinato en agua empleando extracción en fase sólida dispersiva y cromatografía de líquidos de alta resolución.

CAPÍTULO 4

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Desarrollar y validar un método de HPLC para la determinación glifosato, AMPA y glufosinato.
2. Establecer las condiciones de extracción mediante DSPE para el análisis de glifosato, AMPA y glufosinato.
3. Evaluar el desempeño del método desarrollado.
4. Aplicar el método de DSPE-HPLC propuesto al análisis de muestras de agua.

CAPÍTULO 5

MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Reactivos

Acetonitrilo grado HPLC, J.T. Baker.

Ácido aminometilfosfónico (99%), Aldrich.

Ácido bórico ($\geq 95\%$), Sigma Aldrich.

Ácido clorhídrico (36.5%), Jalmeq.

Ácido etilendiaminotetraacético disódico (99%), Laboratorios Monterrey.

Ácido fórmico ($\geq 98\%$), Sigma Aldrich.

Adsorbente Accu Bond SCX, Agilent.

Adsorbente Carbón activado Norit, Sigma-Aldrich.

Adsorbente Florisil, EMD.

Adsorbente Oasis HLB, Waters.

Agua destilada, bidestilada y desionizada, Laboratorios Monterrey.

Cloruro de sodio ($\geq 99.5\%$), EMSURE.

Formiato de amonio ($\geq 99\%$), Fluka Analytical.

Glifosato (99.9%), Fluka Analytical.

Glufosinato de amonio ($\geq 99\%$), Sigma Aldrich.

hidróxido de sodio ($\geq 98\%$), Fluka Chemika.

Metanol grado HPLC, J.T. Baker.

Tetraborato de sodio (99%), Sigma Aldrich.

5.2 Equipos

Agitador tipo vórtex, Scientific Industries Genie 2.

Balanza analítica, OHAUS Pioneer.

Balanza semianalítica, AND GX-200,

Baño de ultrasonido, Branson 3510.

Bomba de vacío, Fisher Scientific.

Cromatógrafo de líquidos de alta resolución, Waters Alliance 2695. Equipado con una bomba de cuaternaria, desgasificador en línea, automuestreador, horno de columna, detector UV-Vis de longitud de onda variable y detector de fluorescencia.

Potenciómetro, Thermo Scientific, Orion Star A211.

Purificador de agua, Pure Lab Flex, Elga.

5.3 Materiales

Bulbo para pipeta Pasteur.

Columna Atlantis dC18, 150 mm x 2.1 mm, 3 μ m, Waters.

Espátulas.

Frascos reservorios para fase móvil de 100 y 500 mL con tapa rosca.

Matraces volumétricos de 5, 10, 25, 50 y 500 mL.

Membranas para filtración para disolvente de Nylon 0.45 μ m, Millipore.

Pipetas automáticas de 20 a 200 μ L, Eppendorf.

Pipeta automática de 100 a 1000 μ L, Eppendorf.

Papel Parafilm M.

Pipetas Pasteur.

Sistema de filtración, Pall Corporation.

Tubos centrifuga 0.75 mL con filtros de membrana Nylon 0.45 μ m, Eppendorf.

Vasos de precipitados de 10, 50, 100 y 250 mL.

Viales de vidrio ámbar con inserto de 400 μ L con tapón de rosca y septum de teflón/silicón.

Viales de vidrio ámbar de 2 mL con tapón de rosca y septum de teflón/silicón.

Viales de vidrio ámbar de 15 y 40 mL con tapón de rosa y septum de teflón/silicón.

5.4 Preparación de soluciones

Se prepararon soluciones madre de glifosato, AMPA y glufosinato con una concentración de 1 mg/mL en agua desionizada. Estas soluciones se almacenaron a 4°C en oscuridad, por un periodo no mayor a un mes. Las soluciones de trabajo se prepararon por dilución de la solución madre en agua desionizada y se almacenaron a 4°C en oscuridad y se preparó fresca semanalmente.

La solución FMOC-Cl fue preparada a una concentración de 1 mg/mL con acetonitrilo (ACN) grado HPLC. La solución se conservó a 4°C en oscuridad y se preparó fresca semanalmente.

El buffer de boratos 50 mM fue preparado pesando 0.163 g de tetraborato de sodio y 0.028 g de ácido bórico, posteriormente se disolvieron en 25 mL de agua desionizada a 50°C y se ajustó a pH 9.5 con NaOH. La solución se conservó a 4°C en oscuridad y se preparó fresca semanalmente.

5.5 Metodología

5.5.1 Desarrollo y validación del método cromatográfico

Para el análisis de los compuestos de interés se utilizó un cromatógrafo de líquidos de alta resolución Alliance 2965 (Waters), equipado con desgasificador en línea, bomba cuaternaria, automuestreador, horno de columna, detector de arreglo de diodos (2996) y detector de fluorescencia (2474).

5.5.1.1 Establecimiento de las condiciones de separación cromatográfica

Para establecer las condiciones de separación cromatográfica se utilizaron soluciones acuosas de estándar de glifosato, AMPA y glufosinato a una concentración de 500 µg/L, las cuales fueron previamente derivatizadas con el reactivo FMOC-Cl de acuerdo con el procedimiento establecido por Padilla y cols. (2017). Brevemente, 800 µL de la solución estándar de los analitos se adicionaron con 100 µL de buffer de boratos (50 mM, pH 9.5) y 100 µL de reactivo FMOC-Cl; la mezcla se dejó reaccionar por 1 hora a 40°C y finalmente, la reacción se detuvo con 20 µL de ácido fórmico al 90%.

Como condiciones de partida se tomaron las condiciones cromatográficas establecidas por el grupo de trabajo, las cuales se muestran en la Tabla III (Padilla, et al., 2017), se evaluaron diferentes composiciones de fase móvil, flujo y temperatura. La selección de las mejores condiciones de separación para el análisis de los compuestos se realizó mediante una inspección visual de los cromatogramas obtenidos, considerando los tiempos de retención (t_R) de cada analito y la resolución (R) entre las señales cromatográficas.

Tabla III. Condiciones de partida del sistema cromatográfico (Padilla et al., 2017)

Columna	Atlantis dC18 (150 mm x 2.1 mm, 3 μ m)	
Fase móvil	A: Formiato de amonio (5 mM, pH 3) B: ACN	
Flujo	0.3 mL/min	
Gradiente	Tiempo (min)	%ACN
	0	30
	5.8	38
	13.8	38
	13.9	100
	24	100
	25	30
	35	30
Temperatura de columna	45°C	
Volumen de inyección	5 μ L	
Detección por fluorescencia	λ_{exc} = 260 nm λ_{emi} = 310 nm	

λ_{exc} : longitud de onda de excitación

λ_{emi} : longitud de onda de emisión

5.5.1.2 Validación del sistema cromatográfico

Una vez establecidas las condiciones del sistema cromatográfico, se realizó la validación, para lo cual se evaluó la linealidad, precisión, exactitud y se establecieron los límites de detección y de cuantificación, tomando como base la guía de la Eurachem (Eurachem, 2014). Para realizar la validación se utilizaron soluciones preparadas a partir de los derivados de FMOC-Glifosato (FMOC-GLI), FMOC-AMPA y FMOC-Glufosinato (FMOC-GLUF) en un rango de concentraciones de 5 a 40 µg/L.

5.5.1.2.1 Linealidad

Para evaluar la linealidad del sistema cromatográfico, se construyó una curva de calibración por estándar externo utilizando 5 niveles de concentración de los derivados de los analitos (5, 10, 20, 30, y 40 µg/L), por triplicado.

Con los resultados obtenidos, se realizó un análisis de regresión lineal por el método de mínimos cuadrados. Con la Ecuación 1 se calcularon los factores de respuesta (FR) y con la Ecuación 2 se obtuvo el porcentaje de desviación estándar relativa (%DER) de los mismos. Finalmente, se evaluó el coeficiente de correlación (r) y el coeficiente de determinación (r²). El análisis de los datos se realizó con el programa Microsoft Excel 2016.

Ecuación 1

$$FR = \frac{\text{Área de la señal}}{\text{Concentración del estándar}}$$

Donde:

FR = factor de respuesta

Ecuación 2

$$\%DER = \frac{s}{\bar{x}} \times 100$$

Donde:

%DER = Porcentaje de desviación estándar relativa

s = desviación estándar

$\bar{x}$ = media

5.5.1.2.2 Precisión

La precisión se evaluó con el %DER de las respuestas obtenidas para cada nivel de concentración de la curva de calibración, el %DER se calculó utilizando la Ecuación 2.

5.5.1.2.3 Exactitud

La exactitud se evaluó mediante un análisis de correlación entre la concentración calculada para los estándares de la curva de calibración y su concentración real, la concentración de los estándares fue calculada utilizando la ecuación de la recta. Con estos datos se realizó el análisis de regresión y se evaluó el valor de la pendiente, el coeficiente de correlación y el coeficiente de determinación.

5.5.1.2.4 Límites de detección y cuantificación

Los límites de detección y de cuantificación se determinaron tomando como base el procedimiento descrito por la Guía para la Validación de procedimientos analíticos ICH Q2 (European Medicines Agency, 2023), que involucra la relación señal/ruido de los cromatogramas del estándar más bajo de la curva de calibración, mediante las ecuaciones 3 y 4.

Ecuación 3 $LD = 3 (S/N)$

Ecuación 4 $LC = 10 (S/N)$

Donde:

LD = límite de detección

LC = límite de cuantificación

S/N = relación señal/ruido

5.5.2 Establecimiento de las condiciones de extracción mediante DSPE

Una vez establecido el método cromatográfico, se establecieron las condiciones de extracción mediante DSPE. Los parámetros evaluados fueron:

- Fase extractante
- Sistema de agitación
- Tiempo de extracción y desorción
- Solvente de desorción
- Volumen de desorción
- pH
- Adición de NaCl

Para el desarrollo del método de DSPE se utilizó una mezcla acuosa de glifosato, AMPA y glufosinato a una concentración de 25 µg/L, la cual fue previamente derivatizada con el reactivo FMOC-Cl.

El primer paso en el desarrollo del procedimiento de DSPE fue la estandarización en la preparación de los tubos que se utilizarán para la extracción con la cantidad deseada de adsorbente y para ello se evaluó el uso de una suspensión de este. Se pesaron 200 mg de fase extractante en un vial de vidrio de 15 mL, se añadieron 5 mL de ACN y la mezcla se llevó a agitación en baño de

ultrasonido durante 5 min. A un tubo de centrifuga de 0.75 mL con filtro de membrana Nylon 0.45 μm , previamente pesado, se añadieron 0.5 mL de la suspensión (equivalente a 20 mg de fase extractante). Los tubos se centrifugaron, posteriormente se desechó el sobrenadante y el adsorbente se dejó secar toda la noche. Al día siguiente los tubos se pesaron nuevamente. Para evaluar la eficiencia del proceso, este procedimiento se realizó 10 veces y se realizó una prueba t de Student para comparar la media obtenida con la cantidad de adsorbente esperada. Además, se determinó el %DER, para evaluar la reproducibilidad del procedimiento.

El procedimiento general de DSPE consistió en añadir 0.5 mL de agua desionizada a los tubos de extracción con la fase extractante, con el objetivo de acondicionarlos. Los tubos se sometieron a agitación, luego se centrifugaron y se desechó el sobrenadante. Después se añadieron 0.5 mL del estándar o muestra, los tubos fueron mezclados, centrifugados y el sobrenadante fue nuevamente desechado. Finalmente, se añadió el solvente de desorción, se agitó en vórtex, se centrifugó y se recuperó el extracto para su análisis. En cada etapa los tubos se centrifugaron a 8000 rpm por 5 min. Las condiciones iniciales de extracción se muestran en la Tabla IV.

Tabla IV. Condiciones iniciales de extracción mediante extracción en fase sólida dispersiva

Variable	Condición inicial
Sistema de agitación	Vórtex
Tiempo de extracción	1 min
Tiempo de desorción	1 min
Solvente	ACN
Volumen de desorción	100 μL
pH	2.4
Adición de NaCl	Sin adición

Para optimizar cada variable, los experimentos se realizaron por triplicado, con las áreas obtenidas mediante el análisis por HPLC-FL se calculó el %DER y se realizó un ANOVA de un factor para comparar el efecto de las condiciones evaluadas. Se consideró un nivel de significancia de $p < 0.05$. El análisis se realizó con el programa Microsoft Excel 2016.

Para la selección de la fase extractante se evaluó el uso de los siguientes adsorbentes: Carbón activado Norit, SCX (Strong Cation eXchange), Florisil y Oasis HLB (Hydrophilic-Lipophilic Balanced). Estas fases fueron seleccionadas con base a reportes en la literatura y por su afinidad a los compuestos. Cada adsorbente fue probado individualmente por triplicado, mediante extracciones de una mezcla derivatizada de los analitos a 25 µg/L

Una vez seleccionada la fase extractante, se continuó con la selección del sistema de agitación, así como el tiempo de extracción y de desorción. Los sistemas de agitación evaluados fueron mediante vórtex y ultrasonido. Para evaluar el tiempo de extracción se probó durante 1, 3 y 5 min, mientras que, para determinar el tiempo de desorción se evaluó durante 1, 1.5 y 2 min.

Posteriormente, se realizó la selección de solvente y volumen de desorción, los solventes evaluados fueron: ACN, metanol y agua; y para el volumen de desorción se probaron 50, 100 y 150 µL.

Para evaluar el efecto de pH en la eficiencia de la extracción se probaron tres valores 2.4, 7 y 10.

Finalmente, se evaluó el efecto de la fuerza iónica. Para ello, se compararon las respuestas de los analitos derivatizados (25 µg/L) en extracciones sin NaCl con las obtenidas al añadir NaCl al 2.5 y 5 %p/v a las soluciones estándar derivatizadas.

5.5.3 Evaluación del desempeño del método desarrollado

Para la cuantificación de los analitos se utilizó una curva de calibración de los estándares extraídos derivatizados a cinco niveles de concentración: 0.05, 0.1, 0.2, 0.4 y 0.6 µg/L, preparados por triplicado. Con las áreas obtenidas se evaluó la linealidad, precisión, exactitud y se determinaron los límites de detección y cuantificación.

Para evaluar la linealidad se determinó el %DER de los factores de respuesta y se realizó un análisis de regresión por mínimos cuadrados. Para evaluar la precisión se calculó el %DER del área obtenida en cada nivel de concentración. Para la exactitud se realizó un análisis de correlación entre la concentración real de los estándares y la concentración obtenida con la ecuación de la recta. Finalmente, los límites de detección y cuantificación se estimaron con las ecuaciones 3 y 4, respectivamente.

El desempeño del método desarrollado se evaluó analizando una mezcla acuosa de los derivados FMOC-GLI, FMOC- AMPA y FMOC-GLUF a 0.3 µg/L, por triplicado. Los parámetros considerados fueron la exactitud, precisión y el factor de enriquecimiento (FE). Para la exactitud se calculó la recuperación en porcentaje (% R) utilizando la Ecuación 5.

Ecuación 5: $\% \text{ Recuperación} = \frac{\text{Cantidad de analito en fase extractante}}{\text{Cantidad de analito inicial}} \times 100$

Para evaluar la precisión se calculó el %DER con la Ecuación 2. Mientras que, el factor de enriquecimiento (FE) se calculó con la Ecuación 6.

Ecuación 6: $FE = \frac{\text{Área extracto}}{\text{Área solución inicial}}$

5.5.4 Aplicación del método DSPE-HPLC-FL a muestras de agua

Para evaluar la aplicabilidad del método desarrollado al análisis de muestras de agua, se analizó una muestra de agua embotellada y agua de río utilizada para riego de cultivos. La muestra de río fue colectada del Río Ramos ubicado en Allende, Nuevo León, México; en el área conocida como Río Raíces (25°15'24.6"N 100°00'57.4"W). El agua embotellada fue de una marca nacional y fue adquirida en una tienda de conveniencia. Una vez recolectadas, fueron almacenadas en refrigeración hasta su análisis.

Las muestras se filtraron por gravedad con papel Whatman. Se probaron dos métodos de pretratamiento de muestra. El primero consistió en acidificar la muestra con HCl 12 M a un pH cercano a 1, se dejó reposar por 1 h. Transcurrido este tiempo la muestra se neutralizó con NaOH 10 M y se realizó la derivatización. El segundo procedimiento consistió en la acidificación de la muestra, reposar por 1 h, derivatizar y adicionar una alícuota de EDTA 1 M con el fin de obtener una concentración final de 0.04 M.

Las muestras se analizaron sin adicionar y adicionadas, estas últimas añadiendo la mezcla acuosa de los analitos a una concentración de 0.4 µg/L. Se aplicó el método DSPE-HPLC-FL desarrollado y se calculó el % Recuperación y el % DER para cada analito.

CAPÍTULO 6

RESULTADOS

6.1 Desarrollo y validación del método cromatográfico

6.1.1 Establecimiento de las condiciones de separación cromatográfica

En la Figura 7 se presentan los cromatogramas obtenidos para los derivados FMOC-GLI, FMOC-AMPA y FMOC-GLUF utilizando la columna Atlantis dC18, con las condiciones presentadas en la Tabla III.

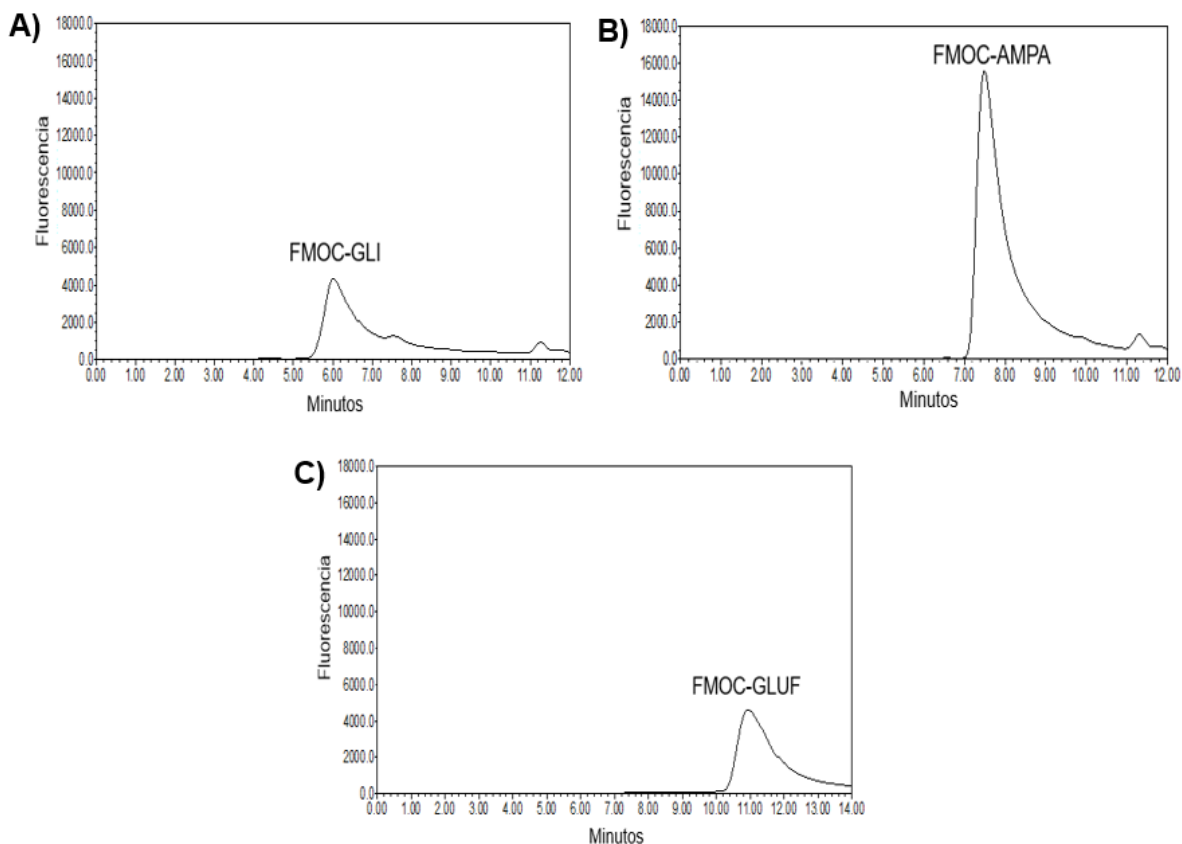


Figura 7. Cromatogramas obtenidos para estándares derivatizados (500 µg/L) con la columna Atlantis dC18 y las condiciones descritas en la Tabla III. A) Fmoc-GLI (t_R = 6.01 min; factor de asimetría = 4.64), B) Fmoc-AMPA (t_R = 7.49 min; factor de asimetría = 5.13) y C) Fmoc-GLUF (t_R = 10.93 min; factor de asimetría = 3.82)

A partir de estos resultados, se decidió modificar la composición de la fase móvil. En la Tabla V se presentan las mejores condiciones de separación cromatográfica obtenidas y en la Figura 8 se presenta un cromatograma obtenido para una mezcla de los derivados. Este sistema cromatográfico fue utilizado para todos los análisis.

Tabla V. Condiciones finales de separación cromatográfica

Columna	Atlantis dC18 (150 mm x 2.1 mm, 3 μ m)	
Fase móvil	A: Ácido fórmico 0.75% B: ACN con fórmico 0.75%	
Flujo	0.3 mL/min	
Gradiente	Tiempo (min)	%ACN
	0	30
	5.8	38
	11.5	38
	11.6	100
	21	100
	22	30
	32	30
Temperatura de columna	45°C	
Volumen de inyección	5 μ L	
Detección por fluorescencia	λ_{exc} = 260 nm λ_{emi} = 310 nm	

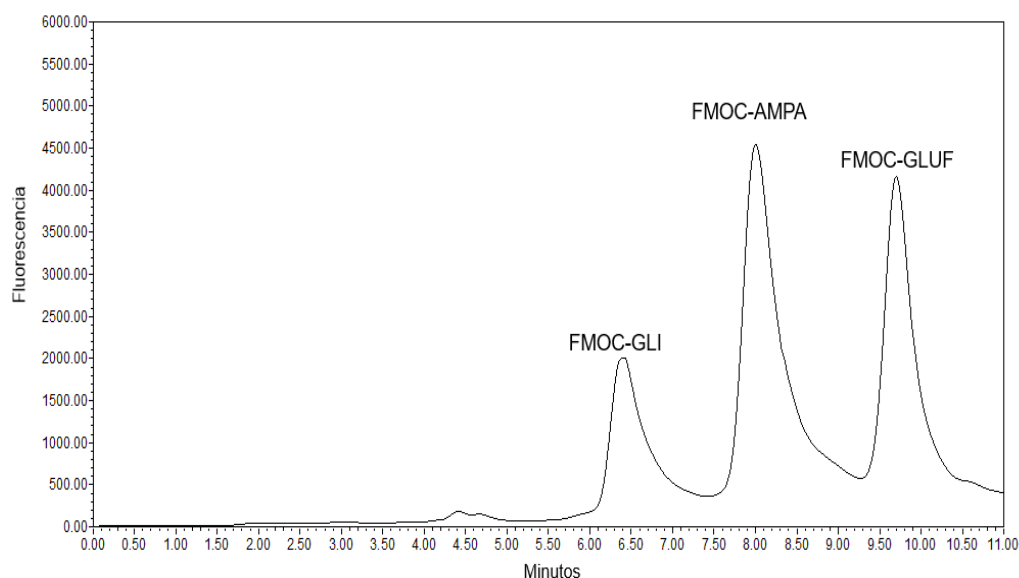


Figura 8. Cromatograma obtenido para una mezcla de derivados (20 $\mu\text{g/L}$) con la columna Atlantis dC18 y las condiciones descritas en la Tabla III. A) FMOC-GLI ($t_R = 6.33$ min), B) FMOC-AMPA ($t_R = 7.95$ min) y C) FMOC-GLUF ($t_R = 9.65$ min)

6.1.2 Validación del sistema cromatográfico

Una vez establecido el sistema cromatográfico (Tabla V), se realizó la validación. Los parámetros incluidos fueron linealidad, precisión, exactitud y límites de detección y de cuantificación.

6.1.2.1 Linealidad

En la Figura 9 se presentan las curvas de calibración obtenidas a 5 niveles de concentración (5, 10, 20, 30 y 40 $\mu\text{g/L}$) para FMOC-GLI, FMOC-AMPA y FMOC-GLUF. Además, en la Tabla VI se muestra la ecuación de la recta, el valor de r , el r^2 y el %DER de FR obtenidos para cada curva de calibración.

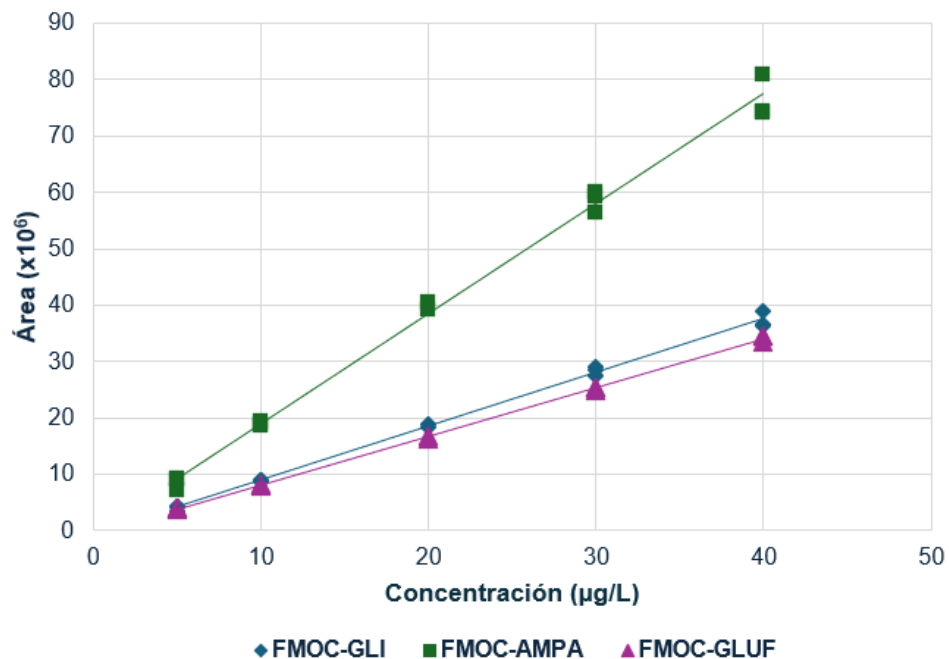


Figura 9. Curvas de calibración obtenidas para FMOC-GLI (♦), FMOC-AMPA (■) y FMOC-GLUF (▲), durante la validación del sistema cromatográfico

Tabla VI. Resultados obtenidos del análisis de regresión por mínimos cuadrados para la evaluación de la linealidad del sistema cromatográfico

	FMOC-GLI	FMOC-AMPA	FMOC-GLUF
Ecuación de la recta	$y = 952705x - 570084$	$y = 1929187x - 596610$	$y = 862361x - 471442$
r	0.9985	0.9973	0.9996
r²	0.9971	0.9946	0.9992
%DER de FR	6.88	8.11	3.39

6.1.2.2 Precisión

En la Tabla VII se presentan los valores de %DER obtenidos de las respuestas en cada nivel de concentración para los estándares derivatizados de glifosato, AMPA y glufosinato.

Tabla VII. %DER obtenidos en cada nivel de concentración de los derivados de los analitos para la evaluación de la precisión del sistema cromatográfico

Concentración (µg/L)	%DER		
	FMOC-GLI	FMOC-AMPA	FMOC-GLUF
5	9.65	13.25	4.04
10	0.84	2.35	1.61
20	1.96	2.33	1.55
30	2.87	3.24	1.48
40	3.87	4.96	1.76

6.1.2.3 Exactitud

En la Figura 10 se muestran las curvas de correlación obtenidas entre la concentración real y la calculada para cada nivel de concentración de los derivados de los analitos, también se presentan los valores de pendiente (m) y r^2 obtenidos, para cada uno de ellos.

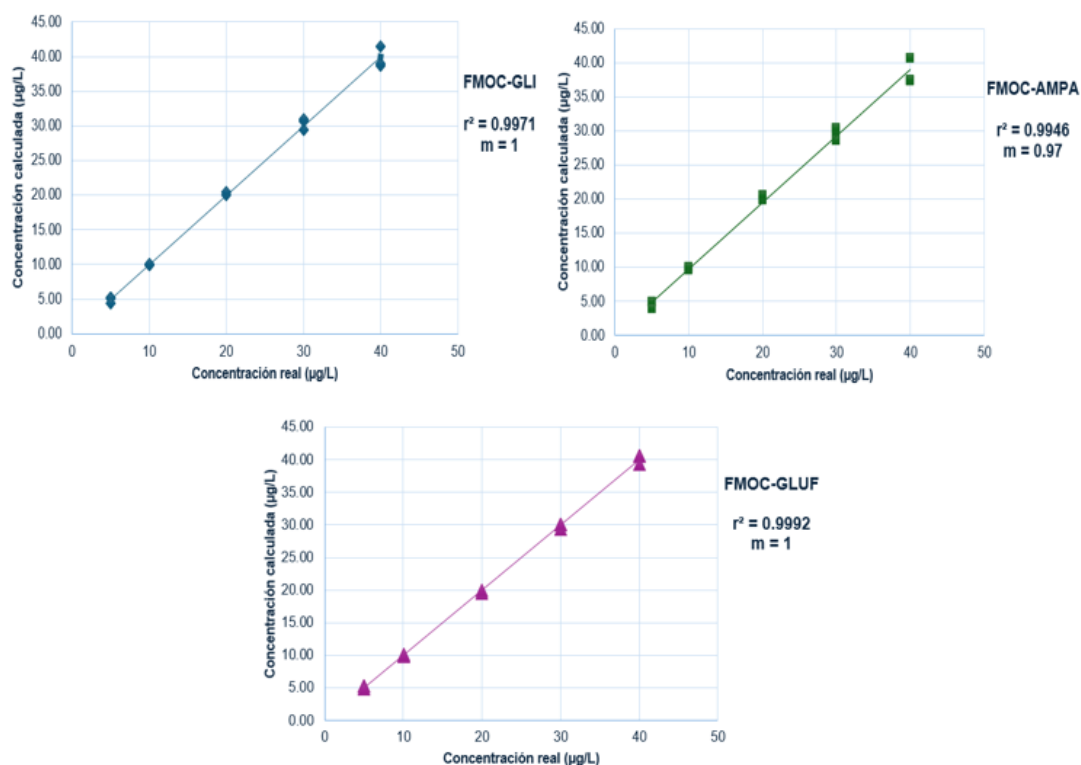


Figura 10. Curvas de correlación entre la concentración real y la concentración calculada para FMOc-GLI (◆), FMOc-AMPA (■) y FMOc-GLUF (▲)

6.1.2.4 Límites de detección y cuantificación

Los valores de LD y LC obtenidos para FMOc-GLI, FMOc-AMPA y FMOc-GLUF se muestran en la Tabla VIII.

Tabla VIII. Límites de detección y cuantificación obtenidos para la validación del sistema cromatográfico

PARÁMETRO	FMOc-GLI	FMOc-AMPA	FMOc-GLUF
LD (µg/L)	1.17	0.62	1.17
LC (µg/L)	3.89	2.06	3.90

6.2 Establecimiento de las condiciones de extracción mediante DSPE

En la Tabla IX, se muestran los resultados obtenidos de la evaluación del procedimiento de preparación de los tubos de extracción a partir de una suspensión de fase extractante.

Tabla IX. Resultados obtenidos de la preparación de tubos de extracción

	Cantidad de fase extractante (mg)
Tubo 1	18.0
Tubo 2	18.7
Tubo 3	19.8
Tubo 4	20.2
Tubo 5	20.3
Tubo 6	20.0
Tubo 7	20.6
Tubo 8	20.6
Tubo 9	20.7
Tubo 10	20.0
Media	19.9
DS	0.0009
%DER	4.4178
Prueba t Student	$p = 0.7014$

DS: Desviación estándar

En la Figura 11 se muestran los cromatogramas obtenidos de la evaluación de los adsorbentes: SCX, Florisil y Oasis HLB. Con la fase de carbón activado Norit no se logró la recuperación de los derivados.

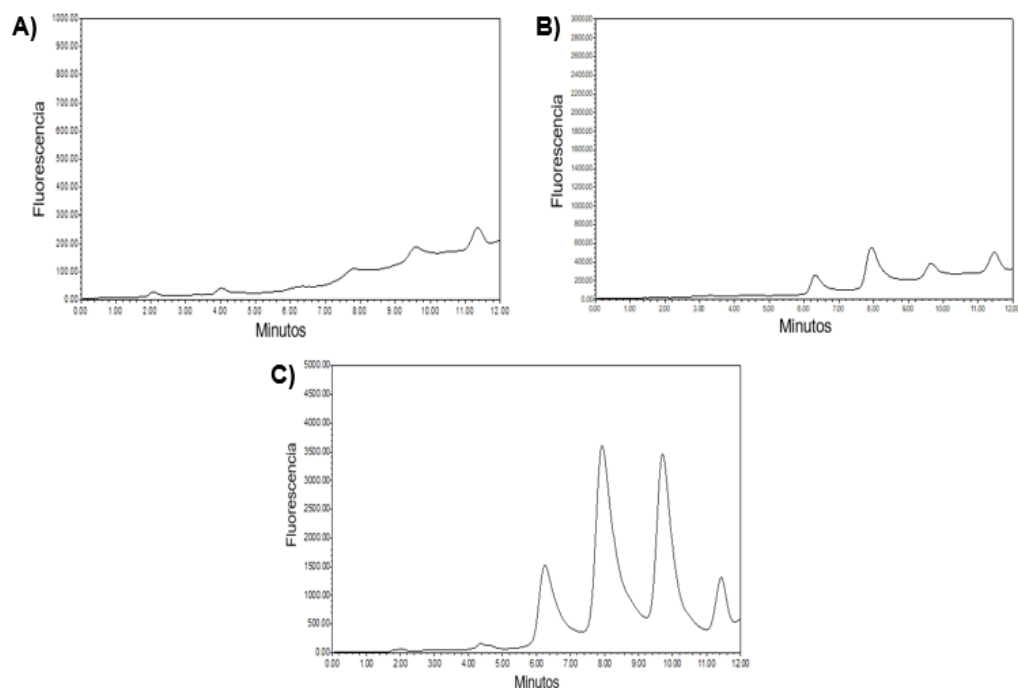


Figura 11. Cromatogramas obtenidos con el método HPLC-FL (Tabla V) para la extracción de una mezcla de derivados (25 $\mu\text{g/L}$) con distintas fases extractantes, bajo las condiciones de DSPE descritas en la Tabla IV. A) Fase SCX, B) Fase Florisil y C) Fase Oasis HLB

En la Figura 12 se muestra un gráfico comparativo de las respuestas obtenidas con cada fase extractante, así como los resultados del análisis estadístico con los valores de p obtenidos para cada analito.

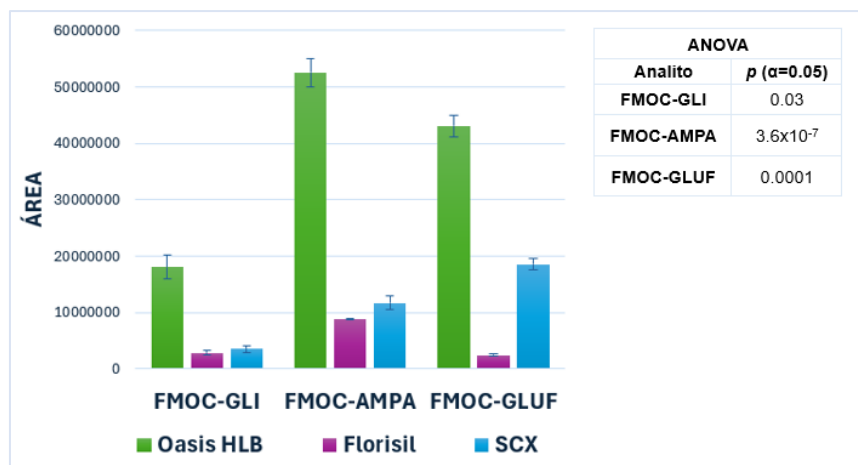


Figura 12. Comparación de la respuesta obtenida para los derivados de los analitos con los adsorbentes evaluados

La Figura 13 muestra las áreas obtenidas usando vórtex y ultrasonido como sistema de agitación.

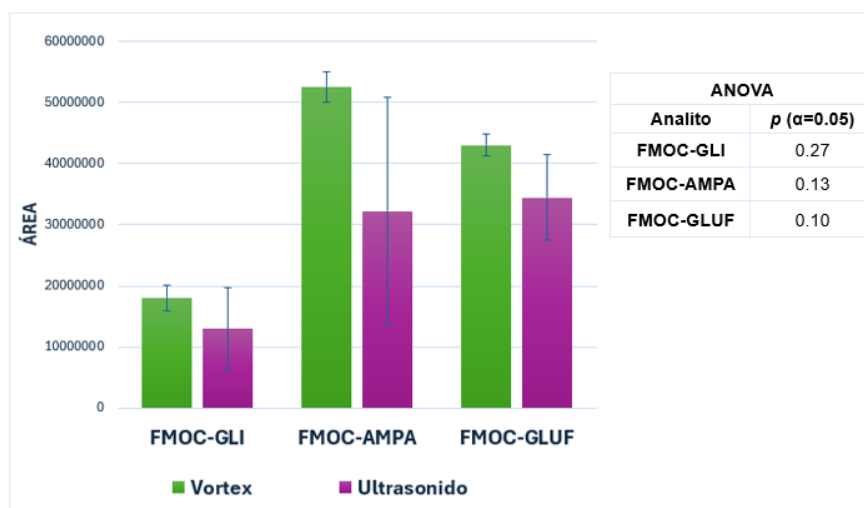


Figura 13. Comparación de la respuesta obtenida para los derivados de los analitos con diferentes sistemas de agitación

Los resultados de la evaluación de los tiempos de extracción y desorción de presentan en las Figuras 14 y 15, respectivamente.

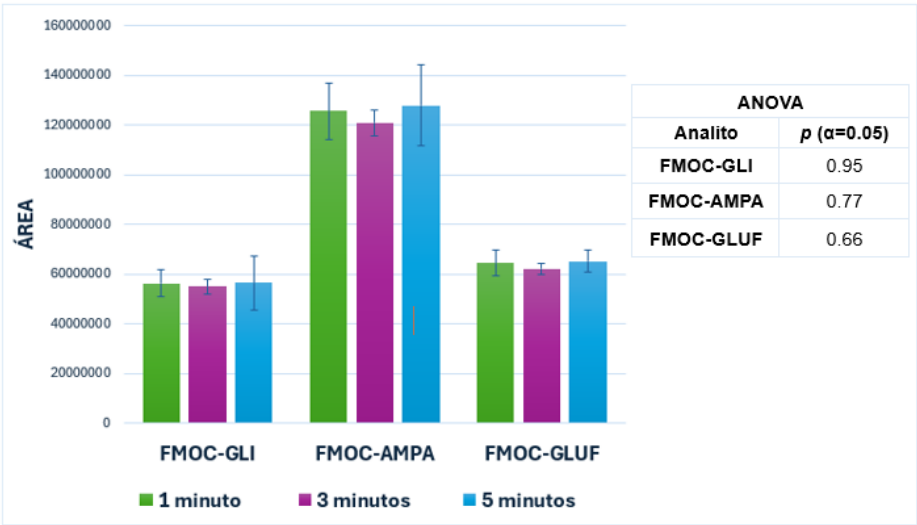


Figura 14. Comparación de la respuesta obtenida para los derivados de los analitos con diferentes tiempos de extracción

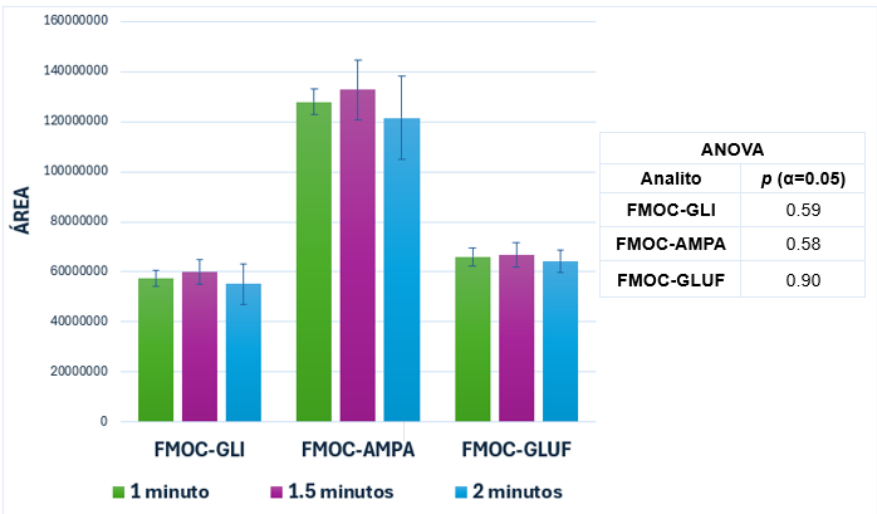


Figura 15. Comparación de la respuesta obtenida para los derivados de los analitos con diferentes tiempos de desorción

En la Figura 16 y 17 se presentan los resultados obtenidos para la evaluación del solvente y volumen de desorción, respectivamente.

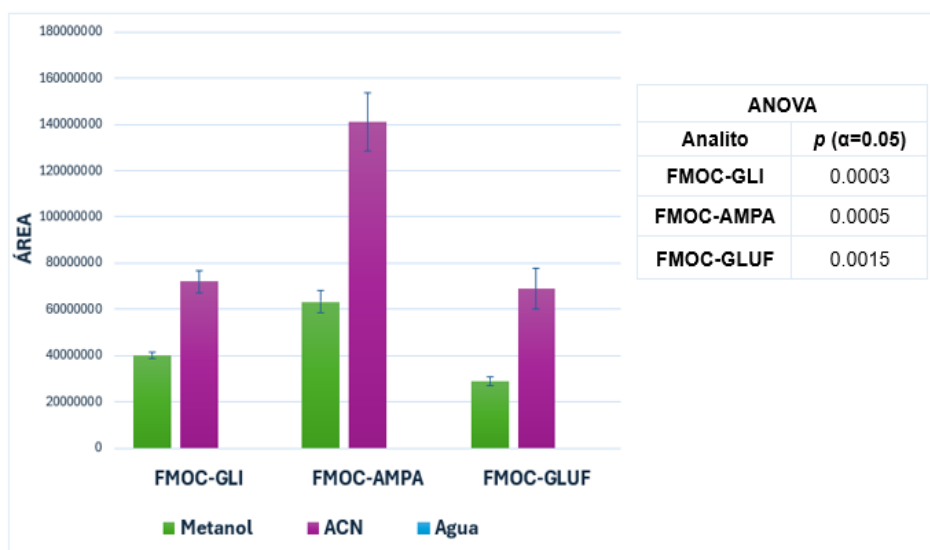


Figura 16. Comparación de la respuesta obtenida para los derivados de los analitos con diferentes solventes de desorción

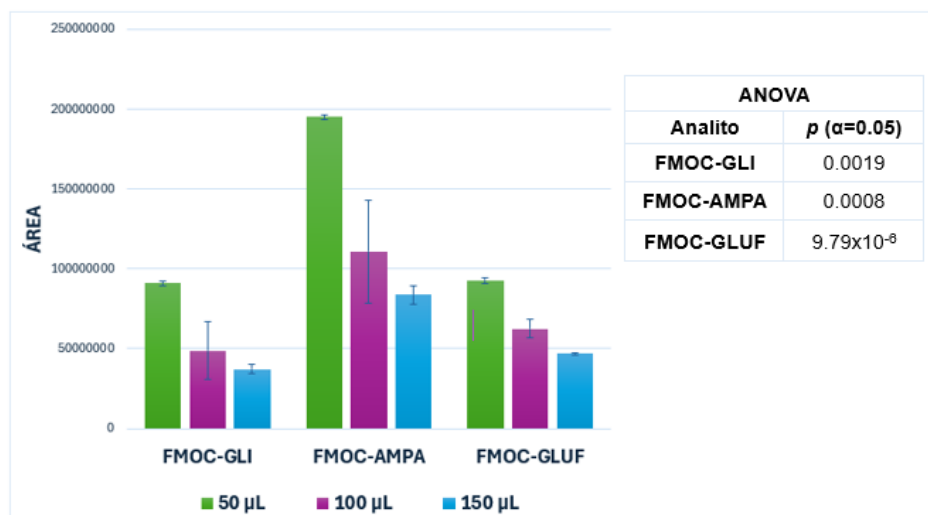


Figura 17. Comparación de la respuesta obtenida para los derivados de los analitos con diferentes volúmenes de desorción

Finalmente, los resultados de la evaluación del efecto de pH y el efecto de la fuerza iónica mediante la adición de NaCl se muestran en las Figuras 18 y 19 respectivamente.

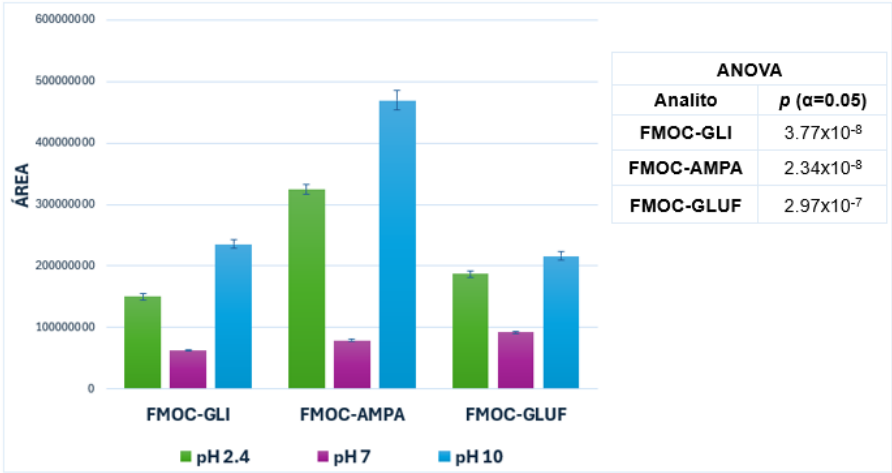


Figura 18. Comparación de la respuesta obtenida para los derivados de los analitos con diferentes pH

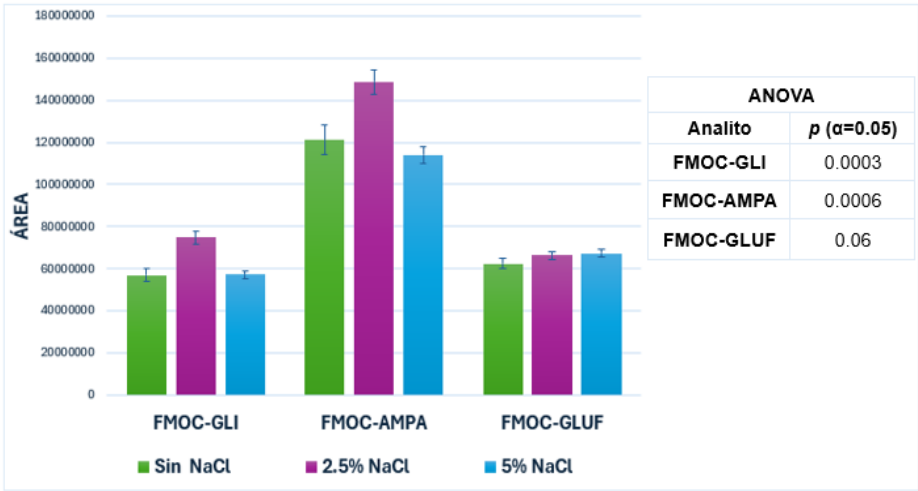


Figura 19. Comparación de la respuesta obtenida para los derivados de los analitos con diferentes concentraciones de NaCl

Las mejores condiciones de extracción mediante DSPE se presentan en la Tabla X y en la Figura 20 se presenta un cromatograma obtenido para una mezcla de los derivados con el método de HPLC-DSPE desarrollado.

Tabla X. Condiciones óptimas de extracción para el método de DSPE desarrollado.

Variable	Condición inicial
Fase extractante	Oasis HLB
Tipo de agitación	Vórtex
Tiempo de extracción	1 min
Tiempo de desorción	1 min
Solvente	ACN
Volumen de desorción	50 µL
pH	10
Adición de NaCl	2.5%

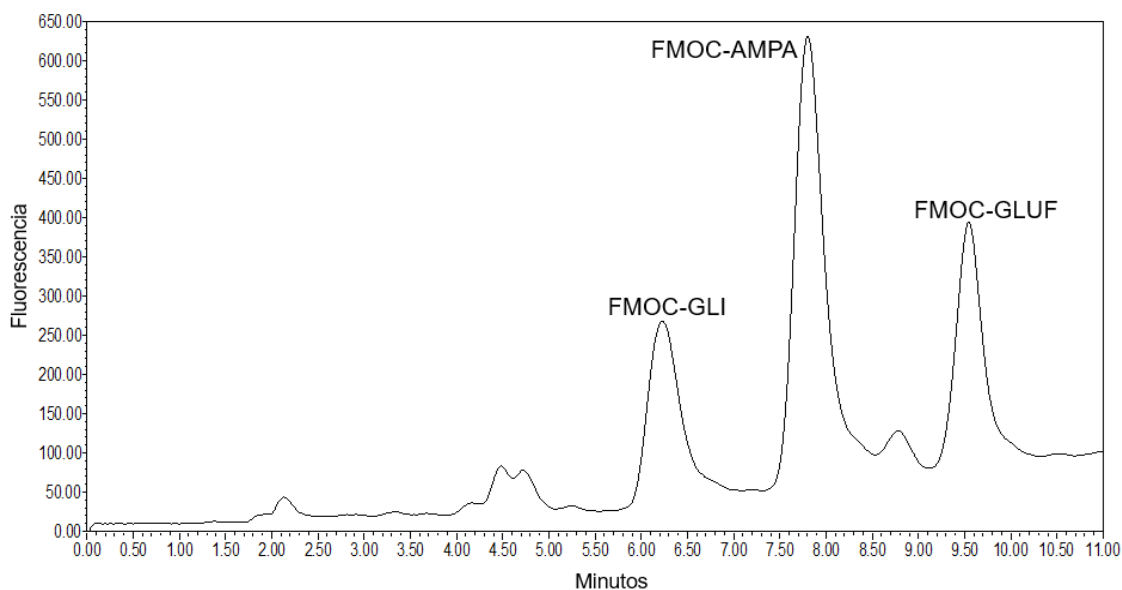


Figura 20. Cromatograma obtenido para una mezcla de derivados (0.6 µg/L) analizada con el método de DSPE-HPLC-FL desarrollado

6.3 Evaluación del método desarrollado

En la Figura 21 se presentan las curvas de calibración construidas a 5 niveles de concentración de los estándares derivatizados extraídos a 0.05, 0.1, 0.2, 0.4 y 0.6 $\mu\text{g/L}$, por triplicado. Además, en la Tabla XI se muestra la ecuación de la recta, el valor de r , el r^2 y el %DER de FR obtenidos para cada curva de calibración.

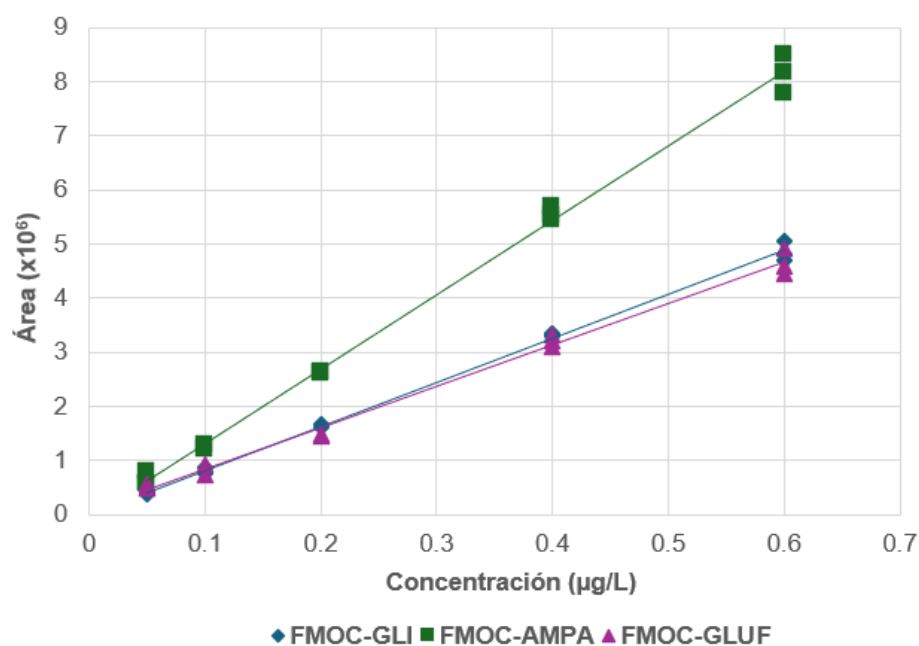


Figura 21. Curvas de calibración obtenidas de la extracción de soluciones estándar de los analitos derivatizados tratados con el método propuesto (0.05 a 0.6 $\mu\text{g/L}$) FMOC-GLI ($\blacklozenge$), FMOC-AMPA ($\blacksquare$) y FMOC-GLUF ($\blacktriangle$)

Tabla XI. Resultados obtenidos del análisis de regresión por mínimos cuadrados para la evaluación de linealidad del método DSPE-HPLC-FL desarrollado

	FMOC-GLI	FMOC-AMPA	FMOC-GLUF
Ecuación de la recta	$y=8154220x+7604.80$	$y=13775358x-70435.82$	$y=7629379x-92719.31$
r	0.9988	0.9982	0.9965
r²	0.9976	0.9964	0.9931
%DER de FR	4.22	9.63	15.99

En la Tabla XII se presentan los valores de %DER obtenidos para las respuestas en cada nivel de concentración para los estándares extraídos de FMOC-GLI, FMOC- AMPA y FMOC-GLUF.

Tabla XII. %DER obtenidos en cada nivel de concentración para la evaluación de la precisión del método DSPE-HPLC-FL desarrollado

Concentración (µg/L)	%DER		
	FMOC-GLI	FMOC-AMPA	FMOC-GLUF
0.05	5.37	21.35	8.46
0.1	9.83	5.08	16.65
0.2	2.05	0.17	0.95
0.4	1.19	2.13	3.30
0.6	3.81	4.47	5.34

En la Figura 22 se muestran las curvas de correlación entre la concentración real y la calculada para cada nivel de concentración de los derivados de los analitos, también se presentan los valores de pendiente (m) y r^2 obtenidos.

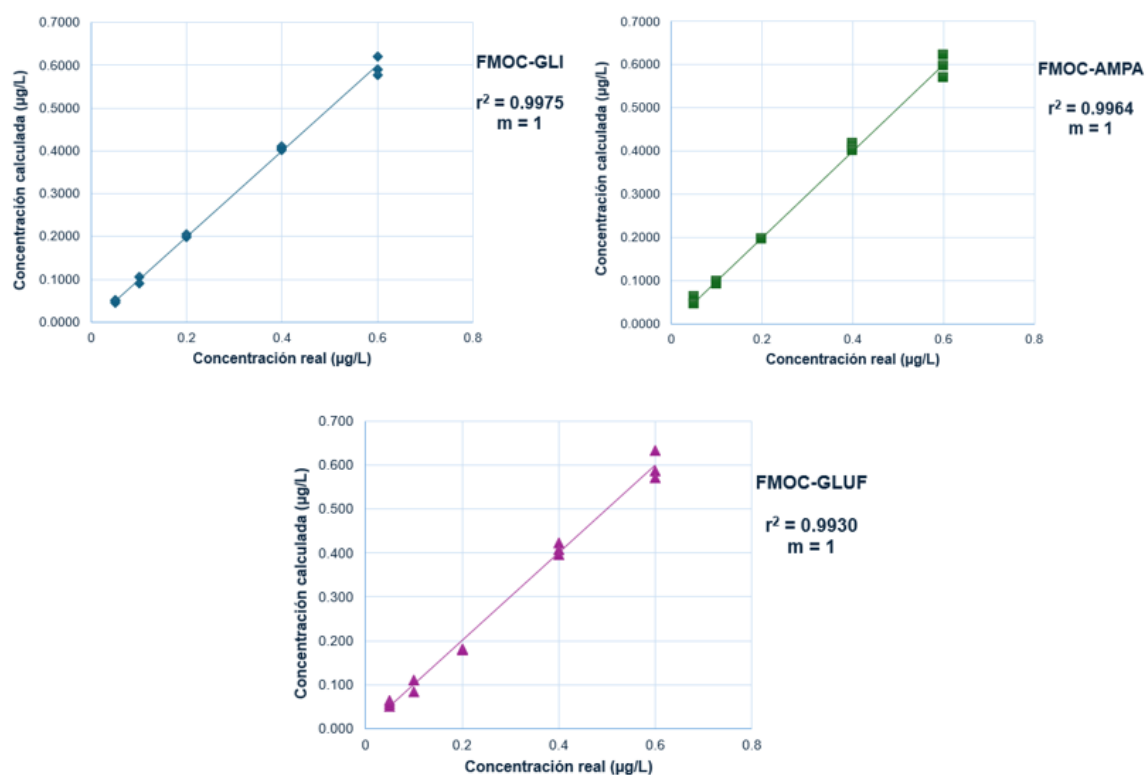


Figura 22. Curvas de correlación entre la concentración real y la concentración calculada para FMOC-GLI (♦), FMOC-AMPA (■) y FMOC-GLUF (▲) para la evaluación de exactitud del método DSPE-HPLC-FL desarrollado

Los valores de LD y LC obtenidos para FMOC-GLI, FMOC-AMPA y FMOC-GLUF se muestran en la Tabla XIII.

Tabla XIII. Límites de detección y cuantificación obtenidos para la validación del método DSPE-HPLC-FL desarrollado

PARÁMETRO	FMOC-GLI	FMOC-AMPA	FMOC-GLUF
LD (µg/L)	0.0048	0.0038	0.0036
LC (µg/L)	0.05	0.05	0.05

En la Tabla XIV se presentan los resultados obtenidos para el análisis de la mezcla acuosa de los derivados de los analitos a una concentración 0.3 µg/L con el método DSPE-HPLC-FL desarrollado.

Tabla XIV. Resultados obtenidos para el análisis de la mezcla acuosa de los derivados de los analitos a 0.3 µg/L con el método DSPE-HPLC-FL

Analito	Concentración real (µg/L)	Concentración calculada (µg/L)	%R	%DER	Factor de enriquecimiento
FMOC-GLI	0.3	0.2533	84.44	5.73	15.80
FMOC-AMPA	0.3	0.2841	94.70	4.17	8.43
FMOC-GLUF	0.3	0.2773	92.44	5.06	8.17

En la Figuras 23 se muestra a manera de resumen un diagrama de flujo del método de DSPE desarrollado .

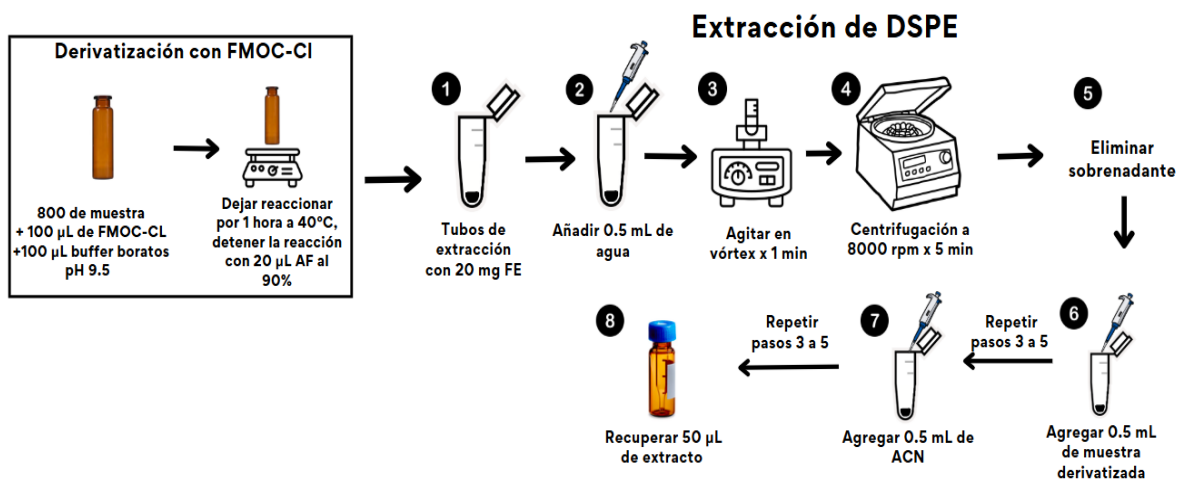


Figura 23. Esquema del procedimiento del método de DSPE propuesto

6.4 Aplicación del método DSPE-HPLC-FL a muestras de agua

En la Figuras 24 y 25 se muestran los cromatogramas obtenidos para las muestras de agua extraídas con el método DSPE-HPLC desarrollado.

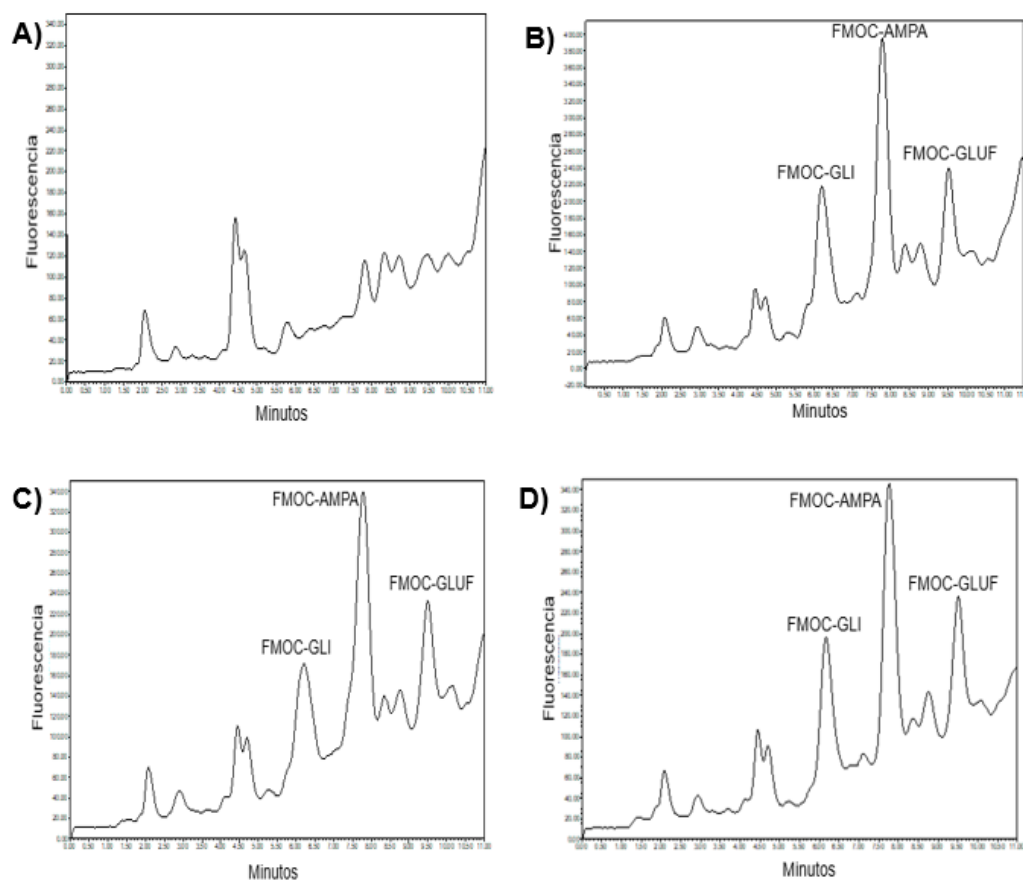


Figura 24. Cromatogramas obtenidos para el análisis de agua embotellada con el método DSPE-HPLC-FL sin adicionar y adicionada a 0.4 $\mu\text{g/L}$. A) Sin adicionar, B) Sin pretratamiento y adicionada, C) Acidificada y adicionada, D) Acidificada + EDTA y adicionada

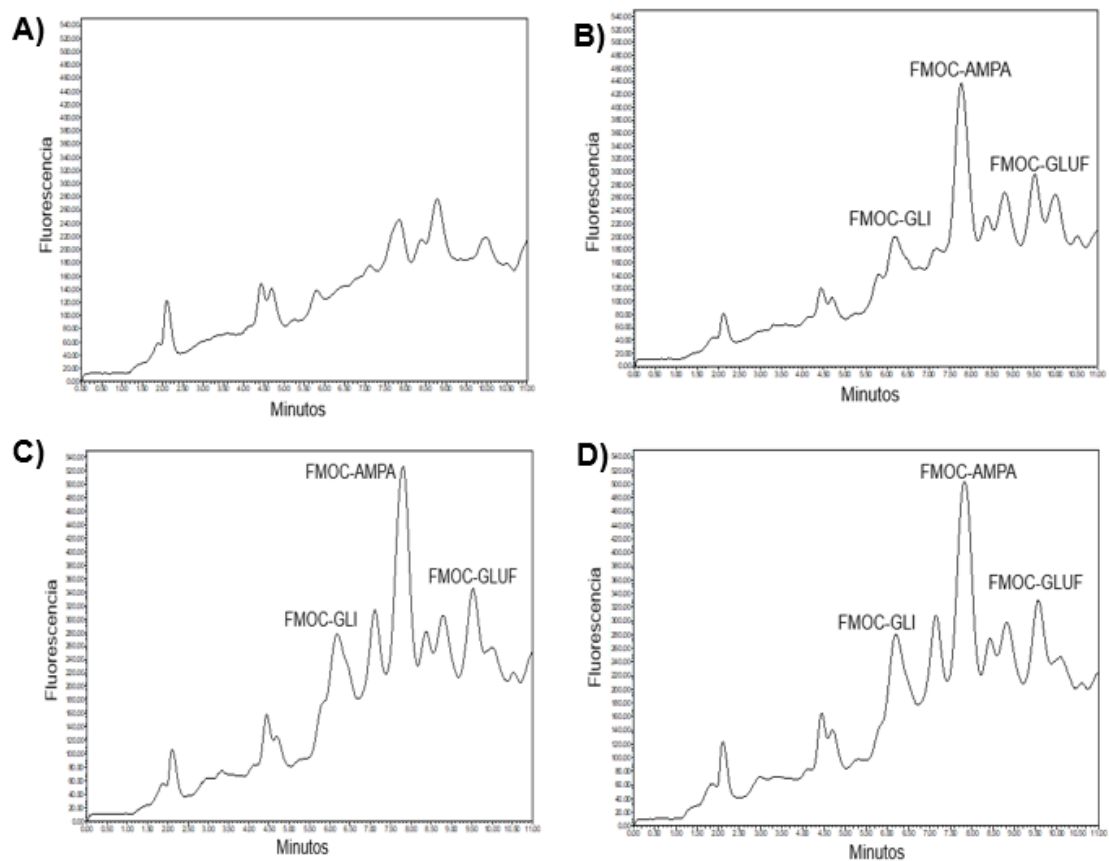


Figura 25. Cromatogramas obtenidos para el análisis de agua río con el método DSPE-HPLC-FL sin adicionar y adicionada a 0.4 µg/L. A) Sin adicionar, B) Sin pretratamiento y adicionada, C) Acidificada y adicionada, D) Acidificada + EDTA y adicionada

En la Tabla XV se presentan los resultados obtenidos del análisis de agua embotellada con y sin pretratamiento. Para visualizar mejor los resultados se construyó un gráfico con los % R el cual se muestra en la Figura 26.

Tabla XV. Análisis de agua embotellada con y sin pretratamiento adicionada a una concentración de 0.4 µg/L de los analitos derivatizados

Analito	Pretratamiento	% R	% DER
FMOC-GLI	Sin pretratamiento	152.24	114.16
	Acidificación	92.24	22.93
	Acidificación + EDTA	88.90	3.64
FMOC-AMPA	Sin pretratamiento	144.46	90.29
	Acidificación	111.80	12.94
	Acidificación + EDTA	103.78	8.06
FMOC-GLUF	Sin pretratamiento	91.54	77.87
	Acidificación	70.53	7.55
	Acidificación + EDTA	75.44	8.66

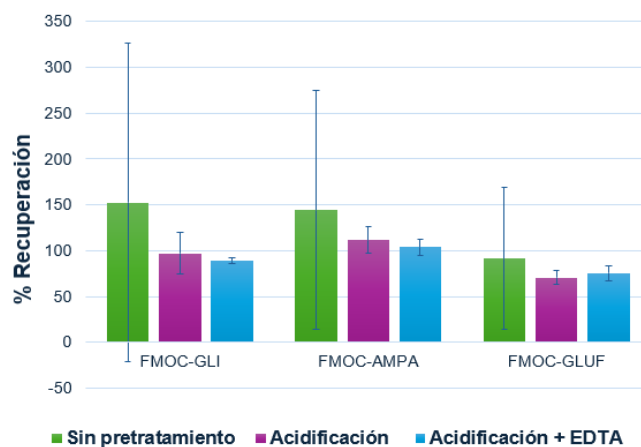


Figura 26. Gráfico de la recuperación de los derivados de los analitos en el análisis de agua embotellada adicionada con y sin pretratamientos

En la Tabla XVI y en la Figura 27 se presentan los resultados del análisis agua de río con y sin pretratamiento.

Tabla XVI. Análisis de agua de río con y sin pretratamiento adicionada a una concentración de 0.4 µg/L de los analitos derivatizados

Analito	Pretratamiento	% R	% DER
FMOC-GLI	Sin pretratamiento	44.86	19.06
	Acidificación	91.31	17.85
	Acidificación + EDTA	73.73	22.37
FMOC-AMPA	Sin pretratamiento	105.47	20.38
	Acidificación	120.43	4.68
	Acidificación + EDTA	98.02	23.84
FMOC-GLUF	Sin pretratamiento	45.29	11.03
	Acidificación	60.52	3.18
	Acidificación + EDTA	52.54	15.33

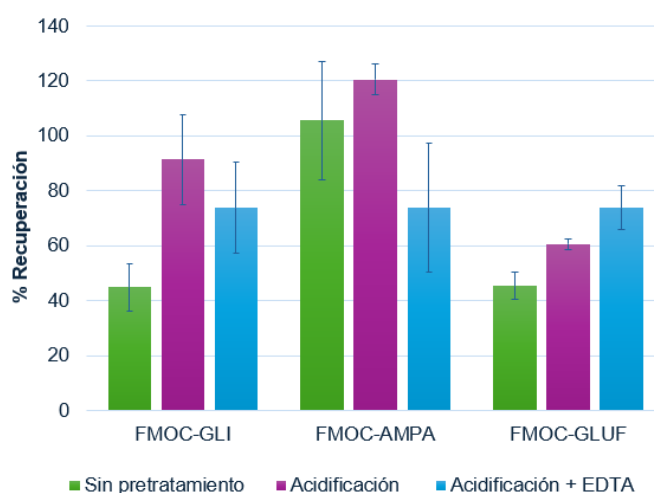


Figura 27. Gráfico de recuperación de los derivados de los analitos en el análisis de agua de río adicionada con y sin pretratamientos

CAPÍTULO 7

DISCUSIÓN

7.1 Desarrollo y validación del método cromatográfico

Para realizar el desarrollo del método de extracción en fase sólida dispersiva, fue necesario primero implementar el método cromatográfico que permitiera la determinación de los analitos.

El glifosato, AMPA y glufosinato son compuestos altamente polares sin grupos cromóforos en su estructura, por tanto, para llevar a cabo el desarrollo del método fue necesario realizar una derivatización utilizando el reactivo FMOC-Cl. La reacción de derivatización se realizó bajo las condiciones establecidas anteriormente por el grupo de trabajo, la cual se basa en hacer reaccionar a los analitos con el FMOC-Cl en un medio alcalino por una hora a 40°C, para posteriormente finalizar la reacción con ácido fórmico (Padilla et al., 2017).

7.1.1 Establecimiento de las condiciones de separación cromatográfica

En la Tabla III se muestran las condiciones iniciales de la separación cromatográfica utilizadas por Padilla y cols., (2017). Se empleó una columna Atlantis dC18, que tiene una fase estacionaria con ligandos C18 bifuncionales, diseñada para utilizar fases móviles altamente acuosas, incluso hasta un 100% de agua. Aunque los analitos tienen una gran hidrofiliidad, el proceso de derivatización con Fmoc-Cl genera un cambio estructural que incrementa significativamente el carácter hidrofóbico de los analitos, lo que favorece su retención en la fase estacionaria C18 (Campanale et al., 2022).

En la Figura 7, se presentan los cromatogramas obtenidos con las condiciones iniciales de trabajo, como puede observarse se logró una adecuada retención de los derivados, con diferentes tiempos de retención. Sin embargo, en estas condiciones las señales cromatográficas presentaron coleo con factores de asimetría >3.82 . Este coleo puede atribuirse a interacciones electrostáticas de los grupos silanol residuales de la fase estacionaria con los derivados Fmoc-GLI, Fmoc-AMPA y Fmoc-GLUF. Estas interacciones provocan asimetría de los picos y disminución de la respuesta de los analitos (Ehling et al., 2015).

Cabe señalar que la diferencia entre los resultados obtenidos y los reportados anteriormente por el grupo de trabajo, se debe a la presencia del líquido iónico que se empleó para la microextracción líquido-líquido. Múltiples estudios han demostrado que el uso de líquidos iónicos mejora la retención de los analitos a la columna, ya que disminuye las interacciones no deseadas con los grupos silanol libres, esto reduce significativamente el coleo de los picos cromatográficos (Navarro Fernández, 2013; Peris García, 2019). En este caso Padilla y cols., (2017) emplearon el tetrafluoroborato de 1-decil-3-metilimidazolio (DMIM-BF₄) como líquido iónico, lo cual mejoró las señales de los compuestos.

Debido a que en este trabajo no se contempló el uso de líquidos iónicos, decidimos modificar la composición de la fase móvil del método. Ehling y cols., (2015) desarrollaron un método para la determinación de glifosato y AMPA en ingredientes nutricionales y leche. En su estudio, los autores mencionan que el coleo en las señales correspondientes a los derivados es debido a la presencia de grupos fosfatos libres de los analitos derivatizados. Estos grupos fosfato pueden unirse a los sitios metálicos activos en la columna e interaccionar con los grupos silanol libres, generando asimetría en los picos cromatográficos (Ehling, et al., 2015)

Zhang y cols. (2014) reportaron algunos los mecanismos responsables del coleo en los picos cromatográficos de compuestos que tienen en su estructura grupos fosfato y plantearon una alternativa con el fin de disminuir el coleo de las señales. Analizaron las interacciones silanofílicas, interacciones metal-fosfato y el efecto del pH de la fase móvil. En su estudio concluyen que, el uso de una fase móvil a un pH bajo (<2) favorece la repulsión electrostática entre los grupos silanol y fosfato, ambos con carga negativa, manteniendo los grupos silanol protonados ($-\text{Si-OH}$), lo que reduce significativamente el problema de coleo en los picos cromatográficos (Zhang, et al., 2014).

Por otra parte, se ha demostrado que cuando se incrementa la fuerza iónica, los iones presentes en la fase móvil compiten con los iones de los analitos por los sitios silanol ionizados. Esta competencia disminuye la interacción no deseada entre los analitos y la fase estacionaria, lo que mejora la forma de los picos cromatográficos (McCalley, et al., 2015).

La fuerza iónica puede incrementarse con disolventes acuosos que contengan sales buffer, como el formiato y acetato de amonio, también es posible aumentar la fuerza iónica adicionando ácidos como el ácido fórmico o acético a la fase móvil, e incluso mediante la adición de ácidos más fuertes como el ácido trifluoroacético (McCalley, et al., 2015).

Con el propósito de facilitar la preparación de la fase móvil, disminuir el pH y aumentar la fuerza iónica, se decidió adicionar únicamente ácido fórmico tanto

a la fase A (agua desionizada) como a la fase B (ACN). Para evaluar su efecto, se ajustó la concentración de ácido fórmico en la fase móvil, probando condiciones de 0.25% (pH 2.5), 0.5% (pH 2.35) y 0.75% (pH 2.26).

En la Figura 8 se muestran los cromatogramas obtenidos utilizando 0.75% de ácido fórmico, a partir de estos resultados se observa que a esta concentración de ácido fórmico se disminuye el coeluto en los picos cromatográficos. Aunque trabajar a un pH <2 puede ser lo ideal, un pH ligeramente superior (pH 2.26), puede ser suficiente para reducir las interacciones secundarias. Además, es importante evitar trabajar a condiciones extremadamente ácidas, ya que esto puede comprometer la integridad de la columna.

7.1.2 Validación del sistema cromatográfico

Una vez seleccionadas las mejores condiciones de separación, se realizó la validación del sistema cromatográfico. Se evaluó la linealidad, precisión, exactitud y los límites de detección y cuantificación.

Para evaluar la linealidad se construyó una curva de calibración por estándar externo a 5 niveles de concentración (5, 10, 20, 30 y 40 µg/L) de los derivados de los analitos, por triplicado. En la Figura 9 se muestran las curvas de calibración obtenidas, como puede observarse presentan una tendencia lineal dentro del intervalo de concentración evaluado. En la Tabla V se presentan los valores de r y r^2 , los cuales fueron mayores a 0.995 y 0.990, respectivamente. También se muestran los %DER de los FR los cuales fueron menores a 8.11%.

De acuerdo con Christian (2009), valores de r y r^2 superiores a 0.99, indican una excelente linealidad, ya que refleja un alto grado de correlación entre las variables instrumentales medidas. Asimismo, la U.S. EPA (1999), establece que un %DER de los FR menor a 25% es aceptable para considerar que un

método es lineal. Por tanto, con base a estos criterios y los resultados obtenidos, se puede considerar que el método es lineal.

La precisión del sistema cromatográfico se evaluó con el %DER de las respuestas obtenidas en cada nivel de concentración de la curva de calibración. Como criterio de aceptación se utilizó el establecido por la Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (AOAC), que indica un valor de %DER menor al 21% para concentraciones cercanas a 10 µg/L (AOAC, 2016). En la Tabla VI se presentan los %DER obtenidos en cada nivel de concentración, se muestra que todos los valores cumplen con el criterio de aceptación, el FMOC-GLI presentó %DER inferiores a 9.65%, FMOC-AMPA menores a 13.25% y FMOC-GLUF por debajo del 4.04%, por lo que se consideró que el método cromatográfico fue preciso.

Para evaluar la exactitud del sistema cromatográfico, se analizó la correlación entre la concentración real y la concentración obtenida sustituyendo la respuesta obtenida para nivel de concentración. En la Figura 10 se muestran las curvas de correlación obtenidas, como puede verse las tres curvas presentan un valor de pendiente cercano a 1 y r^2 superiores a 0.99, lo que indica que la concentración obtenida mediante la curva de calibración es cercana a la concentración real. Por tanto, el sistema cromatográfico fue considerado exacto.

Finalmente se establecieron los límites de detección y cuantificación del método que fueron calculados considerando la relación señal/ruido, de acuerdo con el procedimiento descrito por la Guía para la Validación de procedimientos analíticos ICH Q2 (European Medicines Agency, 2023). Para el FMOC-GLI los límites de detección y de cuantificación fueron de 1.17 µg/L y 3.89 µg/L, respectivamente. Para el FMOC-AMPA fueron de 0.62 µg/L y 2.06 µg/L. Mientras que, para el FMOC-GLUF fueron de 1.17 µg/L y 3.90 µg/L. Estos valores son menores al LMR de 0.7 mg/L, establecido por la US EPA para el glifosato en agua (U.S. Environmental Protection Agency, 2024). Sin embargo, los límites de detección y cuantificación obtenidos son mayores a la concentración máxima permitida de 0.1 µg/L establecida por la UE para plaguicidas individuales en agua

(European Parliament & Council of the European Union, 2020). Debido a esto, es necesario incluir un procedimiento de preparación de muestra que permita preconcentrar los analitos.

7.2 Establecimiento de las condiciones de extracción mediante DSPE

El primer paso en un procedimiento de DSPE es la preparación de los tubos de extracción. De manera habitual esto se hace pesando el adsorbente directamente en el tubo de extracción. Sin embargo, este procedimiento puede ser laborioso y en algunas ocasiones la fase extractante es un polvo fino difícil de manejar. Como alternativa, en este proyecto se evaluó la posibilidad de preparar los tubos a partir de una suspensión del adsorbente.

La suspensión se preparó pesando una cantidad determinada del adsorbente y se añadió un volumen definido de acetonitrilo. A cada tubo de extracción se agregó un volumen de la suspensión equivalente a 20 mg de adsorbente. Se pesó cada tubo antes y después de la adición de la suspensión para determinar la cantidad de adsorbente en cada tubo.

Los resultados de la evaluación de este modo de preparación se muestran en la Tabla X. La cantidad de fase extractante esperada en cada tubo era de 20 mg, como se observa todos los tubos presentaron valores cercanos al esperado con una media de 19.9 mg. Se realizó una prueba t de Student y se encontró que la cantidad promedio de fase en la muestra corresponde estadísticamente ($p > 0.05$) a los 20 mg deseados. Además, se obtuvo un %DER de 4.41%, lo que mostró que el procedimiento es reproducible. Considerando estos resultados, fue el proceso que se utilizó para preparar los tubos para el proceso de extracción.

Una vez establecido el modo de preparación de los tubos, se establecieron las mejores condiciones de extracción. A partir de una mezcla acuosa de los derivados a 25 µg/L se evaluó el tipo de fase extractante, sistema de agitación, tiempo de agitación, solvente y volumen de desorción, pH y adición de NaCl.

Evaluar el tipo de adsorbente en la DSPE es crucial debido a que afecta la eficiencia del proceso, es necesario considerar las propiedades fisicoquímicas de los analitos y de la fase extractante para asegurar la selectividad de la extracción (Islas et al., 2017). En este trabajo se evaluaron cuatro adsorbentes que fueron: Carbón activado, SCX, Florisil y Oasis HLB, estos fueron seleccionados considerando su composición y su afinidad por los analitos o sus derivados.

En la Figura 11 se muestran los cromatogramas obtenidos de la extracción de los derivados con cada fase, a excepción de la fase de carbón activado Norit, ya que con este adsorbente no se logró la recuperación de los mismos bajo las condiciones evaluadas. Esta fase extractante es un adsorbente compuesto principalmente de carbono con una gran área superficial y fuerte capacidad de sorción. Se ha utilizado principalmente como paso de limpieza, para la eliminación de interferencias orgánicas no polares, tales como: pigmentos, lípidos o compuestos fenólicos. Con este adsorbente no se logró la recuperación de los derivados bajo las condiciones evaluadas, esto se atribuyó a que los derivados FMOC-GLI, FMOC-AMPA y FMOC-GLUF contienen un anillo aromático que les permite interaccionar con la fase extractante mediante interacciones hidrofóbicas, dificultando la recuperación (Socas et al., 2015).

Por otra parte, como puede verse en la Figura 11a la fase SCX mostró las respuestas de menor intensidad, lo que nos indica que presenta una baja recuperación de los derivados. Esta fase SCX es un adsorbente de intercambio catiónico fuerte, compuesta a base de sílice ligada a ácido fenilsulfónico y está diseñada para la retención de cationes. Como se mencionó anteriormente, los analitos son moléculas zwitteriónicas, con grupos amino, fosfato y carboxilato que pueden ionizarse y retenerse en intercambiadores de cationes o aniones según el valor de pH (De Llasera, et al., 2005).

Para que los analitos puedan ser retenidos en intercambiadores de cationes es necesario que el grupo amino ($-\text{NH}_3^+$) se protone, lo que se logra a un pH extremadamente ácido (pH 1.5 a 2) (De Llasera, et al., 2005). Sin embargo,

al derivatizar los analitos, estos reaccionan con el FMOC-Cl a través de una sustitución nucleofílica con el grupo amino (Campanale, et al., 2022), lo que ocasiona que los analitos ya no puedan adquirir carga positiva. Por otra parte, los grupos fosfato y carboxilato son grupos ácidos, que tampoco pueden adquirir carga positiva. En consecuencia, los derivados no pueden ser retenidos en fases de intercambio catiónico. Adicionalmente, se analizó primero realizar la extracción mediante DSPE y posteriormente derivatizar; sin embargo, no se logró la recuperación de los analitos bajo las condiciones evaluadas.

Nomura y cols. (2020), desarrollaron un método para la determinación de glifosato en orina humana mediante SPE utilizando dos tipos de fases extractantes la SCX y la NH_2 (intercambio catiónico débil), el análisis se llevó a cabo sin derivatización con el uso de HPLC-MS/MS. Este procedimiento puede ser complicado ya que involucra dos pasos de SPE, además en su estudio mencionan que utilizaron un equipo automatizado de SPE, que aumenta el costo de análisis.

En la Figura 11b se observa que con el adsorbente Florisil aumento las respuestas obtenidas en comparación con la fase SCX, sin embargo, no fueron las mejores. La fase Florisil es un adsorbente compuesto principalmente por silicato de magnesio sintético diseñada para la retención de compuestos polares (Agilent Technologies, 2025). El método EPA 3620C recomienda utilizar Florisil como fase de limpieza para el análisis de plaguicidas polares (U.S. Environmental Protection Agency, 2000). A pesar de ello, esta fase no resultó efectiva. Los analitos son compuestos altamente hidrofílicos; sin embargo, al derivatizarlos los compuestos cambian su polaridad, volviéndose más hidrofóbicos (Masci et al., 2024), lo que disminuye su afinidad por esta fase extractante.

Watanabe S. (2004), desarrolló un método para la determinación de glifosato, glufosinato y MPPA en frutas y hortalizas por SPE-CG. Para la extracción se utilizó una columna de resina de intercambio aniónico y posterior a la derivatización, se realizó una purificación con un cartucho Florisil para la eliminación de interferencias polares; sin embargo, en su estudio utiliza este

adsorbente como paso de limpieza, no es utilizada para la retención de los derivados.

Finalmente, como puede observarse en la Figura 11c las mejores respuestas se obtuvieron con la Oasis HLB, lo que demuestra una mayor recuperación de los derivados. El adsorbente Oasis HLB es una fase polimérica compuesta por divinilbenceno (hidrofóbico) y copolímero de N-vinilpirrolidona (hidrofilico), diseñada para la retención de compuestos polares, intermedios y no polares (Jeon, Schäffer, & Smith, 2017). Como se mencionó anteriormente, la polaridad de los analitos cambia al ser derivatizados con el reactivo FMOC-Cl, lo que aumenta su afinidad hacia este adsorbente mediante interacciones hidrofóbicas, obteniendo las respuestas más altas.

Cabe mencionar que el uso de Oasis HLB para la extracción de los analitos o como paso de limpieza mediante SPE para el análisis de estos compuestos ya ha sido reportado anteriormente en la literatura. Chamkasem y Harmon, (2016) determinaron glifosato, glufosinato y AMPA en soya y maíz mediante HPLC/MS-MS utilizando un paso de SPE Oasis HLB para retener partículas en suspensión e interferencias apolares.

Por otra parte, Pérez y cols., (2022) desarrollaron un método para la determinación de glifosato y AMPA en vinos. El primer paso en la etapa de preparación de muestra fue la extracción de los compuestos utilizando un adsorbente con Polímeros de Impresión Molecular (SPE-MIP). Tras la extracción los analitos se derivatizaron con FMOC-Cl y se utilizó un cartucho Oasis HLB de 200 mg para la limpieza y concentración de los compuestos. El análisis se realizó por HPLC-MS/MS. A pesar de que adsorbentes como MIP posee una alta selectividad en matrices complejas, aumentan los costos del análisis. Además, como se mencionó anteriormente, realizar dos pasos de SPE aumenta la complejidad del análisis.

Por tanto, con base a estos resultados se seleccionó la Oasis HLB como fase extractante, ya que este adsorbente permitió recuperar a los tres analitos con las mejores respuestas.

En la DSPE, la agitación es utilizada para acelerar el proceso de adsorción, lo que disminuye el tiempo de equilibrio, de extracción y de desorción. Se han utilizado distintos sistemas de agitación, como la agitación magnética, las ondas ultrasónicas y el vórtex (Badawy et al., 2022).

En este trabajo, se evaluó el uso del vórtex y el ultrasonido. En la Figura 13 se presenta una comparación de la respuesta obtenida para los diferentes sistemas de agitación, así como los valores de p obtenidos del ANOVA de un factor. Como puede observarse las repuestas más altas fueron obtenidas utilizando el vórtex. Al realizar el análisis estadístico se observó que no había una diferencia estadísticamente significativa entre las respuestas ($p > 0.05$). Sin embargo, esto se atribuye a que la reproducibilidad fue menor al utilizar ultrasonido (%DER >57%), debido a una falta de homogeneidad en la agitación en los tubos de extracción y como consecuencia disminuye la eficiencia de la extracción.

Por tanto, se continuó trabajando con agitación por vórtex, ya que ofrece una agitación homogénea y controlada. Además, en la literatura se ha reportado que generalmente se utiliza el vórtex para agitación en DSPE (Anastassiades et al., 2003; Denžić Lugomer et al., 2024 & Wang et al., 2021).

El tiempo de extracción es un factor importante para asegurar la adsorción suficiente de los analitos en la fase extractante. En la DSPE y en otras técnicas de enriquecimiento, es esencial determinar el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio, es decir, donde se obtiene la mayor cantidad de analitos adsorbidos sobre la superficie de la fase extractante. Se ha reportado en la literatura que, al aumentar el tiempo de extracción la eficiencia mejora significativamente (Liu et al., 2019 & Zhou et al., 2014). Por tal razón, los tiempos de extracción probados fueron 1, 3 y 5 min.

En la Figura 14, se muestra una comparación de la respuesta obtenida con los diferentes tiempos de extracción probados. Como se puede observar para los tres analitos, un aumento en el tiempo de extracción no produce un aumento significativo en la respuesta. A diferencia de otras técnicas de extracción, en la

DSPE la dispersión del adsorbente en la muestra incrementa la superficie de contacto, facilitando el intercambio entre fases, lo que permite alcanzar de forma rápida el equilibrio de extracción (Dugheri et al., 2021 & Islas et al., 2017), lo que contribuye positivamente a la disminución en los tiempos de análisis. Por tanto, con base a estos resultados se decidió mantener 1 min como tiempo de extracción.

La desorción de los compuestos de la fase extractante es un paso crucial en las técnicas de extracción en fase sólida por adsorción, la elución con solventes es el método más utilizado e importante en el enriquecimiento de muestras ambientales. La desorción también se considera una etapa de equilibrio, por lo tanto, es necesario un tiempo para alcanzar el equilibrio de desorción de los analitos de la fase extractante (Zhou et al., 2014). Para desorber los analitos, se probó 1, 1.5 y 2 min.

En la Figura 15 se muestra la variación en la respuesta de los analitos según el tiempo de desorción evaluado. Como se observa, tampoco hubo una diferencia estadísticamente significativa en las respuestas ($p > 0.05$) y los %DER fueron bajos en los tres tiempos evaluados. Debido a que no se presentan diferencias significativas en la desorción de los analitos y con el fin de tener un método de preparación de muestra lo más sencillo y corto posible, se estableció 1 min como tiempo de desorción.

La selección del solvente de desorción es fundamental en el desarrollo de la DSPE, se debe considerar la selectividad del solvente por los analitos de interés durante la extracción y la partición (Reis et al., 2020), ya que, de esto depende la eficiencia de la desorción, en función a las propiedades fisicoquímicas de los solventes y los compuestos de interés (Zhou et al., 2014). En este trabajo, se evaluó agua, metanol y ACN como solventes de desorción.

En la Figura 16, se muestra el análisis de la respuesta obtenida con los solventes de desorción evaluados. Como se puede observar, con el agua no se lograron recuperar los analitos, debido al carácter más hidrofóbico de los derivados. Por otra parte, se obtuvo una mayor respuesta de los derivados con

el ACN que con metanol, esto debido a que el ACN presenta una menor polaridad (Badawy et al., 2022), aumentando su afinidad a los analitos. Además, se ha demostrado que ACN proporciona una mayor estabilidad de los compuestos derivatizados (Susano et al., 2024). Por lo tanto, se seleccionó el ACN como solvente de desorción.

Asimismo, se evaluó el volumen de desorción, se probaron 50, 100 y 150 μL . En la Figura 17, se muestra la comparación de las respuestas obtenidas de los derivados con los diferentes volúmenes probados. Tal como se observa, hay mayor respuesta a un volumen de 50 μL y se demostró que hay diferencia estadísticamente significativa en los volúmenes evaluados ($p < 0.05$). Además, los %DER fueron mejores con el volumen de 50 μL , con valores menores a 1.88%.

Una reducción del volumen de solvente conduce a una mayor concentración de los analitos, lo que resulta en un incremento de la respuesta obtenida. Esta estrategia permite la preconcentración de los analitos (Ago et al., 2024), contribuyendo significativamente a la sensibilidad del método. Con base en estos hallazgos la condición óptima en cuanto al volumen de desorción fue de 50 μL .

El pH puede ser uno de los factores más críticos en el procedimiento de la DSPE, ya que afecta la eficiencia de la separación. Las recuperaciones más altas se alcanzan cuando el pH de la solución proporciona a los analitos el medio óptimo para interactuar con la fase extractante (Badawy et al., 2022 & Zhou et al., 2014).

En este trabajo, se evaluó el efecto del pH en la extracción, a un pH ácido de 2.4, pH neutro y pH básico de 10. Como se mencionó anteriormente, la solución acuosa con glifosato, AMPA y glufosinato a 25 $\mu\text{g/L}$ fue derivatizada, una vez terminada la reacción esta solución presentó un pH de 2.4, por tanto, esta solución fue ajustada a pH 7 y 10 con una solución de NaOH 10 M.

En la Figura 18, se presenta una comparación de la respuesta obtenida con los diferentes pH probados, se muestra que las áreas de los picos cromatográficos fueron mayores a pH 10 y se observó una diferencia estadísticamente significativa en los valores de pH evaluados ($p < 0.05$).

Las respuestas más altas se obtuvieron a pH 10, ya que los derivados FMOC-GLI, FMOC-AMPA y FMOC-GLUF son más estables en condiciones básicas que ácidas. Wang y cols. (2016) demostraron que la intensidad de fluorescencia de los productos derivados aumenta significativamente con el pH, siendo la óptima en un rango de 9-10. Esto debido a que, en un medio ácido o neutro, los derivados son susceptibles a descomposición o hidrólisis, lo que disminuye las respuestas de las señales.

Finalmente, se evaluó la eficiencia de la extracción al aumentar la fuerza iónica con la adición de NaCl. Se probó sin la adición de NaCl, con 2.5% y 5% de NaCl. En la Figura 19, se presenta una comparación de la respuesta obtenida con las diferentes concentraciones de NaCl evaluadas, como puede observarse las respuestas aumentaron a 2.5% de NaCl; sin embargo, las respuestas disminuyeron a 5% de NaCl. En el análisis estadístico se demostró una diferencia estadísticamente significativa en las respuestas de los derivados FMOC-GLI y FMOC-AMPA.

Badawy y cols. (2022), menciona que la solubilidad de los analitos disminuye al aumentar la fuerza iónica mediante la adición de sales. Durante este proceso, los iones de la sal son atraídos por el agua, lo que reduce la disponibilidad de los analitos para la solvatación por el efecto “*salting out*”, aumentando de esta manera la recuperación de los analitos. Esto se demostró experimentalmente, dado que se observó un aumento significativo las señales con 2.5% de NaCl, por tanto, esta fue la mejor condición para la DSPE.

La disminución en las respuestas con el aumento de la concentración de NaCl a 5%, se puede atribuir a que una mayor cantidad de sólidos disueltos en la solución que aumenta la viscosidad del medio, ocasionando una dispersión

menos efectiva entre el adsorbente y los analitos, por tanto, una disminución en la eficiencia de extracción.

A manera de resumen, se muestran las condiciones finales de extracción en la Tabla X y en la Figura 20, se muestra un cromatograma obtenido de una mezcla de los derivados 0.6 µL con el método DSEP-HPLC.

7.3 Evaluación del método desarrollado

Para la cuantificación de los analitos se construyó una curva de calibración a 5 niveles de concentración (0.05, 0.1, 0.2, 0.4 y 06 µg/L) con estándares de los analitos sometidos al método de análisis propuesto. Esta estrategia permite realizar la cuantificación considerando las pérdidas ocurridas durante el proceso de extracción. Para la linealidad de la curva extraída, se construyeron gráficas del área en función de la concentración, se calcularon los factores de respuesta y se realizó un análisis de regresión lineal. En la Figura 21 se muestran las curvas de calibración obtenidas, en las cuales se observa una tendencia lineal dentro del intervalo de concentración evaluado para los tres analitos. En la Tabla XI se muestran que se obtuvieron valores de r y r^2 mayores a 0.99 y %DER de los FR menores a 15.99% (ver Tabla XI). Se tomó como referencia los mismos criterios descritos anteriormente. Christian (2009) establece que valores de r y r^2 superiores a 0.99 indican una excelente linealidad y la U.S. EPA (1999), establece que un %DER de los FR menor a 25% es aceptable para considerar que un método lineal. Con base en estos resultados, se consideró que la curva de calibración es lineal y es confiable para la cuantificación de los analitos.

La precisión se evaluó con el % DER de las respuestas obtenidas en cada nivel de concentración. Se tomó en cuenta el criterio de aceptación establecido por la AOAC, la cual indica un valor de % DER menor a 30% para concentraciones cercanas a 1 µg/L (AOAC, 2016). En la Tabla XII se muestran

los %DER, como se observa los valores obtenidos son menores al criterio de aceptación, por lo que consideró que el método es preciso.

Para evaluar la exactitud, se estableció la correlación entre la concentración real y la concentración para los estándares de la curva de calibración. En la Figura 22 se observa que las curvas de correlación construidas tienen una pendiente igual a 1 y r^2 superiores a 0.99, lo que indica que la concentración obtenida mediante la curva de calibración es cercana a la concentración. Por lo tanto, el método se considera exacto.

Además, para el cálculo del límite de detección se utilizó el procedimiento descrito por la Guía para la Validación de procedimientos analíticos ICH Q2 (European Medicines Agency, 2023), en la Tabla XIII. Para el límite de cuantificación se consideró el primer nivel de concentración de la curva de calibración el cual fue de 0.05 µg/L. Los límites de cuantificación determinados por el método propuesto fueron menores al LMR establecido por la US EPA para el glifosato de 0.7 mg/L en agua (U.S. Environmental Protection Agency, 2024) y cercanos a la concentración máxima permitida de 0.1 µg/L para cada plaguicida establecida por la UE (European Parliament & Council of the European Union, 2020).

Además, estos resultados son similares e incluso mejores que algunos de los métodos reportados en la literatura. López y cols. (2023) determinaron glifosato, AMPA y glufosinato en muestras de agua superficial (obtenidas de aguas y ríos), agua mineral embotellada, agua de grifo y agua de pozo; las muestras se filtraron con filtros de jeringa de politetrafluoroetileno hidrófilo, mediante SPE en línea con HPLC-MS/MS. En su estudio se determinaron los límites de cuantificación mediante la relación señal/ruido, obteniendo valores de 0.01, 0.005 y 0.02 µg/L para el glifosato, AMPA y glufosinato, respectivamente.

Pires y cols., (2020) desarrollaron un método para el análisis de glifosato, AMPA y glufosinato en muestras de agua de río mediante HPLC-FL, utilizando la liofilización como método de preconcentración tras la derivatización con OPA.

Con este método obtuvieron límites de cuantificación para el glifosato, AMPA y glufosinato de 0.2, 0.5 y 0.3 µg/L, respectivamente.

Como se mencionó anteriormente, en el Departamento de Química Analítica de la Facultad de Medicina UANL, Padilla y cols. (2017) desarrollaron un método de TC-IL-DLLME con HPLC-FL, en el cual obtuvieron límites de detección para el FMOC-GLI y FMOC-AMPA de 0.27 y 0.22 µg/L, respectivamente. Mientras que se obtuvieron límites de cuantificación de 0.82 y 0.67 µg/L. Como se observa, Con el método propuesto en este trabajo se lograron obtener mejores resultados.

Una vez establecida la curva de calibración para la cuantificación de los derivados extraídos con el método DSPE, se realizó la evaluación del método. Se analizó por triplicado una mezcla acuosa de los derivados a una concentración de 0.3 µg/L y se evaluó la exactitud, precisión y se determinó el factor de enriquecimiento.

Para la exactitud se calculó el % R de los derivados a una concentración de 0.3 µg/L, se calculó la concentración mediante la curva de calibración establecida. En la Tabla XIV, se muestran los % R obtenidos para cada analito, los cuales fueron de 84.44, 94.70 y 92.44% para el FMOC-GLI, FMOC-AMPA y FMOC-GLUF, respectivamente. Estos resultados se encuentran dentro del rango recomendado por la UE en la guía sobre métodos analíticos para plaguicidas SANTE/2020/12830 Rev.1 (European Commission, 2021), en la cual se establece un valor aceptable de 70-120%.

Los % R obtenidos presentan un desempeño similar que algunos de los métodos reportados en la literatura mediante HPLC-FL. Pires y cols. (2022) reportaron para glifosato % R de 74, 84 y 82% a concentraciones de 0.2, 0.6 y 1 µg/L, respectivamente. Mientras que, para el glufosinato a concentraciones de 0.3, 1.2 y 2.0 µg/L se obtuvieron % R de 72, 86, 94 %. Además, las recuperaciones obtenidas en este trabajo son parecidos a métodos reportados con otro sistema de detección. En métodos como HPLC-MS/MS, Campanale y cols. (2022) reportaron % R entre 81-113%. Mientras que en otros métodos que

emplean HPLC-DAD, CG-MS/MS, Electroforesis capilar-MS y Colorimetría mostraron % R de 64.1-102.7 (Khrolenko & Wieczorek, 2005), 71-102 (Steinborn et al., 2016), 87.2-99.5 (Wimmer, 2020) y 96.17-105.12 (Li, et al., 2023), respectivamente.

A partir de la comparación realizada con otros métodos desarrollados y debido a que los resultados obtenidos cumplen con los criterios recomendados por la UE, el método se consideró exacto.

Para evaluar la precisión, se determinó el %DER para cada derivado a una concentración de 0.3 µg/L, en la Tabla XIV se muestra que se obtuvieron valores de 5.73, 4.17 y 5.06% para FMOC-GLI, FMOC-AMPA y FMOC-GLUF, respectivamente. Del mismo modo, estos valores cumplen con los criterios establecidos por la UE en la guía SANTE/2020/12830 Rev.1 (European Commission, 2021), en la cual se establece un valor aceptable de ≤20%. Además, la US EPA en el Método 547, considera un valor aceptable de 85-115% en una concentración de 0.25 µg/L. Por tanto, el método se consideró preciso. Asimismo, estos resultados son similares a los obtenidos con otras técnicas de detección y cuantificación como HPLC-DAD, HPLC-MS/MS, CG-MS/MS, Electroforesis capilar-MS y Colorimetría en las cuales se reportaron % DER de 3.6-21 (Khrolenko & Wieczorek, 2005), <15 (Campanale et al., 2022), 7-16 (Steinborn et al., 2016), 1-11 (Wimmer et al., 2020) y 2.36-5.13 (Li, et al., 2023), respectivamente.

El factor de enriquecimiento se calculó mediante la relación entre el área inicial de los derivados de la mezcla acuosa sin extracción y el área final de los derivados después de aplicar el método DSPE desarrollado a una concentración de 0.3 µg/L. En la Tabla XIV se muestran los FE obtenidos, como puede observarse estos fueron de 15.80, 8.43 y 8.17 para el FMOC-GLI, FMOC-AMPA y FMOC-GLUF, respectivamente. Estos resultados nos indican que el método DSPE fue capaz de preconcentrar los analitos al menos ocho veces, lo que contribuye a la sensibilidad del método.

Tabla XVII. Comparación de resultados del método TC-IL-DLLME-HPLC y DSPE-HPLC-FL

Método	Analito	Concentración (µg/L)	% R	% DER	Factor de enriquecimiento	Límites de cuantificación (µg/L)
TC-IL- DLLME- HPLC	FMOC-GLI	25.9	92.00	7.10	5.5	0.82
	FMOC-AMPA	26.4	94.00	1.70	5.6	0.67
DSPE- HPLC-FL	FMOC-GLI	0.3	84.44	5.3	15.80	0.05
	FMOC-AMPA	0.3	94.70	4.17	8.43	0.05
	FMOC-GLUF	0.3	92.44	5.06	8.17	0.05

En la Tabla XVII se presenta una comparación de los resultados obtenidos y los reportados por Padilla y cols., (2017). Como puede observarse, los FE y los límites de cuantificación alcanzados son mejores con el método de DSPE desarrollado en este trabajo para glifosato y para AMPA. Estos resultados permiten considerar el método propuesto como una alternativa interesante para el análisis de estos herbicidas en agua.

7.4 Aplicación del método DSPE-HPLC-FL a muestras de agua

El método DSPE-HPLC-FL desarrollado se aplicó a una muestra de agua embotellada y una de río. Las muestras se analizaron y como puede verse en las Figuras 23 a y 24 a, no se detectó la presencia de ninguno de los analitos. Para evaluar el efecto de la matriz en el análisis se tomaron alícuotas que fueron adicionadas con una mezcla acuosa de los analitos a 0.4 µg/L. A partir de las concentraciones obtenidas, se calculó el % R y el % DER para evaluar la precisión y la exactitud.

Previamente se ha reportado, que hay un efecto matriz en las muestras de agua analizadas. Se ha demostrado que, por su carácter ionizable, los analitos pueden presentar interacciones con compuestos orgánicos e inorgánicos. La presencia en muestras de agua de metales divalentes o trivalentes como Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , etc., resulta en la formación de complejos estables con los analitos, modificando la intensidad de la señal (Gros et al., 2019; Hanke, Singer & Hollender, 2008).

Ibañez y cols. (2006) propusieron un procedimiento que involucra la acidificación de la muestra a pH cercano a 1 y su posterior neutralización, con la finalidad de evitar la interacción de los analitos con los metales y romper los complejos formados. Por otra parte, Hanke, Singer & Hollender (2008), mencionan que además de la acidificación es necesaria la adición de EDTA

posterior a la derivatización, ya que los complejos pueden volver a formarse durante y después de la derivatización resultando en una disminución de la respuesta. En ese trabajo se analizaron las muestras sin un tratamiento previo, además, se evaluaron dos procedimientos de pretratamiento, el primero consistió en acidificar la muestra durante una hora con HCl y después llevarla a la neutralidad con NaOH. El segundo pretratamiento consistió en acidificar la muestra con HCl por una hora, llevar a la neutralidad y derivatizar, posteriormente se adicionó EDTA.

En la Figura 23b se presenta el cromatograma obtenido de la muestra embotellada adicionada y sin pretratamiento, se observa que las señales de los analitos son más altas con respecto a los cromatogramas de las Figuras 23c y 23d, los cuales corresponden al análisis de la muestra con pretratamiento. En la Tabla XVI, se muestra que los % R obtenidos sin pretratamiento fueron de 152.24, 144.46 y 91.54 % para el FMOC-GLI, FMOC-AMPA y FMOC-GLUF, respectivamente, lo que nos indica que la matriz tiene un efecto importante sobre el glifosato y el AMPA. Además, la reproducibilidad del análisis fue muy pobre con %DER superiores a 77.87%.

Estos resultados superan los criterios de aceptación recomendados por UE en la guía sobre métodos analíticos para plaguicidas SANTE/2020/12830 Rev.1 (European Commission, 2021), lo cuales son para el % R de 70-120 y para el % DER ≤ 20 . Esto demuestra que sin un pretratamiento previo los resultados no son exactos y ni reproducibles.

Del mismo modo ocurrió con el análisis de agua de río, tal como se muestra en la Figura 24b, sin un pretratamiento se observó una disminución en las respuestas de los analitos. Como puede verse, las recuperaciones variaron entre 44 y 105 % con %DER menores a 20 %. A pesar de que los resultados presentaron mejor reproducibilidad, los % R del FMOC-GLI y FMOC-GLUF, son menores al criterio recomendado por la UE, mencionados anteriormente. En las Figuras 23 y 24, se presentan los cromatogramas de las muestras con los

pretratamientos mencionados. Se observa que tanto acidificando las muestras como adicionando EDTA, mejoraron las señales de los analitos.

Para la evaluación de la exactitud, en la Tabla XVI se muestra que los % R obtenidos del análisis de agua embotellada con el primer pretratamiento, el cual fue acidificando la muestra. Como puede verse, los valores disminuyeron de 152.24 a 92.94 para FMOC-GLI, de 144.46 a 111.80 para FMOC-AMPA y de 91.54 a 70.53 para FMOC-GLUF. Se observó un comportamiento similar con el análisis adicionando EDTA, los % R disminuyeron a 88.90, 103.78 y 75.44. Por lo tanto, en el caso de la muestra de agua embotellada no hubo una diferencia significativa con los dos pretratamientos empleados.

En la Tabla XVII se muestran los % R obtenidos para la evaluación de la exactitud, para el análisis de la muestra de río acidificando. Tal como se muestra, los valores aumentaron de 44.86 a 91.31% para FMOC-GLI, de 105.47 a 120.43% para FMOC-AMPA y de 45.29 a 60.52% para FMOC-GLUF. Al adicionar EDTA también hubo un aumento en los % R a 73.73, 98.02 y 52.54 para FMOC-GLI, FMOC-AMPA y FMOC-GLUF; sin embargo, se logró una mejor recuperación cuando únicamente se acidificó la muestra. Por lo tanto, en el caso de la muestra de agua de río es más adecuado utilizar únicamente la acidificación de la muestra.

La guía sobre métodos analíticos para plaguicidas SANTE/2020/12830 Rev.1 (European Commission, 2021) sugiere recuperaciones en un intervalo de 70 al 120%. Como puede verse, todos valores de % R del agua embotellada cumplen con estos criterios con ambos tratamientos previos. En cuanto a la muestra de agua de río los valores de FMOC-GLI y FMOC-AMPA cumplen con el criterio. Mientras que, el FMOC-GLUF no cumplen con el criterio establecido para ambos pretratamientos de muestra. Sin embargo, en la UE no está especificada la concentración de trabajo. Además, se obtuvo un resultado superior acidificando la muestra, por lo que se consideró que el método presenta exactitud con este pretratamiento. Aunque, es necesario continuar trabajando en

el establecimiento de las mejores condiciones de pretratamiento de muestra con el objetivo de mejorar el % R del glufosinato.

En cuanto a la precisión, en la Tabla XVI se muestra que los valores de % DER obtenidos para el agua embotellada, como se observa los valores fueron de 7.5 a 22.93% acidificando la muestra y de 3.64 a 8.66% con la adición de EDTA. Los resultados para el agua de río fueron de 3.18 a 17.85% con la acidificación de la muestra y de 15.33 a 23.84% adicionando EDTA. Aunque acidificando la muestra se obtuvieron valores un poco superiores al valor recomendado por la UE y tomando como criterio el valor establecido por AOAC de $\leq 30\%$ para concentraciones cercanas a 1 $\mu\text{g/L}$, se consideró que el método es preciso.

En la Tabla XVIII, se presenta una comparación de los resultados obtenidos con otros métodos reportado en la literatura.

Tabla XVIII. Comparación del método DESPE-HPLC-FL propuesto con otros métodos reportados en la literatura

Muestra	Método	Analitos	Límite de cuantificación (µg/L)	% R	% DER	Referencia
Agua embotellada y de río	DSPE-HPLC-FL	Glifosato AMPA Glufosinato	0.5	60.52-120.43	3.18-22.93	Método propuesto
Agua de río	SPE-HPLC-FL	Glifosato AMPA Glufosinato	0.2	91-113	<18	Gabardo, Corderio & Peralta, 2024
Agua de río	SPE-HPLC-MS/MS	Glifosato AMPA Glufosinato	0.12 0.05 0.09	80-111	<8	López et al., 2023
Agua dulce superficial de ríos	HPLC-FL	Glifosato AMPA	0.25 1	No reportado	4	Alonso et al., 2022
Aguas subterráneas, superficial y de grifo	HPLC-MS/MS	Glifosato AMPA Glufosinato	0.025	81.5-120	1.2-13.1	Campanale et al., 2022
Aguas duras	HPLC-MS/MS	Glifosato AMPA	0.75 0.5	72.9-102	8-20	Ulrich & Lee, 2021

Agua potable	SPE-HPLC-MS/MS	Glifosato AMPA Glufosinato	10 15 10	78.3-99.4	2.4-9.1	Giang et al., 2020
Agua de río	Filtración/líofilización -HPLC-FL	Glifosato AMPA Glufosinato	0.2 0.5 0.3	72-94	1.8-9.1	Pires et al., 2020
Agua de escurrentía	HPLC-FL	Glifosato AMPA	16.9 5.6	90-123	21-25	Oliveira et al., 2019
Aguas superficiales	SPE-HPLC-MS/MS	Glifosato AMPA Glufosinato	0.0005 0.0003 0.0005	90.3-102.8	4-5.6	Guo et al., 2019
Agua de pozo	SPE-HPLC-MS/MS	Glifosato AMPA Glufosinato	0.6 0.2 0.1	70-105	<15	Demonte et al., 2018
Agua potable y de pozo	TC-IL-DLLME- HPLC-FL	Glifosato AMPA	0.82 0.67	53-98.8	1.2-2.5	Padilla et al., 2017

Con base a los datos presentados en la Tabla XVIII, el método desarrollado de DSPE-HPLC-FL presenta una eficiencia similar a los reportados en la literatura con buenos % R y % DER y límites de detección y cuantificación comparables. Además, la técnica de extracción es rápida, sencilla y permite el análisis simultaneo de muestras, en comparación con otras técnicas mostradas en la Tabla XVIII.

CAPÍTULO 8

CONCLUSIONES

- El modo de preparación de los tubos de extracción propuesto para realizar la DSPE, mostró resultados reproducibles y confiables, brindando una alternativa más sencilla y rápida que el método de pesado directo.
- El método de DSPE-HPLC propuesto para el análisis de glifosato, AMPA y glufosinato en muestras de agua demostró ser lineal, preciso y exacto, con límites de cuantificación 0.05 µg/L.
- Con el método de DSPE fue posible preconcentrar a los analitos lo que contribuyó significativamente a la sensibilidad del análisis, un aspecto crucial debido a las bajas concentraciones de los analitos en muestras. Además, con el método desarrollado fue posible procesar hasta 30 muestras de manera simultánea.
- El método de análisis propuesto es rápido, simple y económico por lo que constituye una nueva alternativa a los métodos reportados en la literatura.

CAPÍTULO 9

PERSPECTIVAS

- Aplicar el método DSPE-HPLC desarrollado a muestras de otras fuentes de agua.
- Evaluar la aplicación del método a distintas matrices, como alimentos, muestras biológicas y ambientales.
- Adaptar el método a HPLC-MS/MS para mejorar la selectividad de los analitos.

CAPÍTULO 10

REFERENCIAS

- Agilent Technologies. (s. f.). *Bond Elut Florisil: Magnesia-loaded silica gel for polar analytes*. Recuperado el 18 de junio de 2025 de Agilent Technologies.
- Ago, K. A., Kitte, S. A., Chirfa, G., & Gure, A. (2024). Ternary solvent based homogeneous liquid–liquid microextraction for the preconcentration of organochlorine pesticides from water and apple juice samples. *Analytical Methods*, 16(1), 128-139.
- Alonso, B., Griffero, L., Pereira, H. B., Pareja, L., & Parada, A. P. (2022). Determination of glyphosate and AMPA in freshwater and soil from agroecosystems by 9-fluorenylmethoxycarbonyl chloride derivatization and liquid chromatography-fluorescence detection and tandem mass spectrometry. *MethodsX*, 9, 101730.
- Amberger, M. A., Schröder, M., Kuballa, J., & Jantzen, E. (2023). Direct determination of glyphosate, aminomethylphosphonic acid and glufosinate in food samples with ion chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1687, 463631.
- Anastassiades, M., Lehotay, S. J., Štajnbaher, D., & Schenck, F. J. (2003). Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning

and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC international*, 86(2), 412-431.

AOAC International (2016). Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance.

Bayer de México, S.A. de C.V. (2018). *Solicitud de permiso de liberación al ambiente de algodón GlyTol® TwinLink® - GLT (GHB614 x T304-40 x GHB119) en programa piloto, en la región agrícola de Baja California y Sonora, ciclo PV-2018* [Archivo PDF]. Gobierno de México. Recuperado el 18 de junio de 2025 de: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/269381/Solicitud_Algodon_GLT_Piloto_Mex_Son_CP.pdf

Badawy, M. E., El-Nouby, M. A., Kimani, P. K., Lim, L. W., & Rabea, E. I. (2022). A review of the modern principles and applications of solid-phase extraction techniques in chromatographic analysis. *Analytical Sciences*, 38(12), 1457-1487.

Campanale, C., Triozzi, M., Massarelli, C., & Uricchio, V. F. (2022). Development of a UHPLC-MS/MS method to enhance the detection of Glyphosate, AMPA and Glufosinate at sub-microgram/L levels in water samples. *Journal of Chromatography A*, 1672, 463028.

Centro de Estudios para el Desarrollo Rural Sustentable y la Seguridad Alimentaria. (2020, junio 11). Uso y regulación de los herbicidas en México. *Centro de Estudios para el Desarrollo Rural Sustentable y la Seguridad Alimentaria*. Recuperado el 18 de junio de 2025 de: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/269381/Solicitud_Algodon_GLT_Piloto_Mex_Son_CP.pdf http://intra.cedrssa.gob.mx/post_n-uso-n-y-n-regulacinin-n-de-n-herbicidas-n-en-mn-xico.htm

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, 4995-5004.

Christian, G. D. (2004). *Química analítica* (6.^a ed.). McGraw-Hill.

Conacyt. (2020). Expediente científico sobre el glifosato y los cultivos GM. *Cons Nac Cienc y Tecnol*, 31.

Corbera, M., Hidalgo, M., & Salvadó, V. (2006). Extraction and preconcentration of the herbicide glyphosate and its metabolite AMPA using anion-exchange solid phases. *Microchimica Acta*, 153, 203-209.

De Miranda Colombo, S., & Masini, J. C. (2014). A sequential-injection reversed-phase chromatography method for fluorimetric determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid. *Analytical Methods*, 6(2), 490-496.

De la Federación, D. O. (2023). Decreto por el que se establecen diversas acciones en materia de glifosato y maíz genéticamente modificado. *Recuperado en septiembre de 2024 de: https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php*.

De Llasera, M. G., Gómez-Almaraz, L., Vera-Avila, L. E., & Peña-Alvarez, A. (2005). Matrix solid-phase dispersion extraction and determination by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection of residues of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in tomato fruit. *Journal of chromatography A*, 1093(1-2), 139-146.

Del Puerto Rodríguez, A. M., Suárez Tamayo, S., & Palacio Estrada, D. E. (2014). Efectos de los plaguicidas sobre el ambiente y la salud. *Revista Cubana de Higiene y epidemiologia*, 52(3), 372-387.

Denžić Lugomer, M., Bilandžić, N., Pavliček, D., & Novosel, T. (2024). Direct Determination of Glyphosate and Its Metabolites in Foods of Animal Origin by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Foods*, 13(15), 2451.

- Dong, J., Hu, Y., Su, X., Yao, Y., Zhou, Q., & Gao, M. (2024). Low-background interference detection of glyphosate, glufosinate, and AMPA in foods using UPLC-MS/MS without derivatization. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 416(7), 1561-1570. glufosinato y AMPA en alimentos mediante UPLC-MS/MS sin derivatización. *Química Analítica y Bioanalítica*, 416 (7), 1561-1570.
- Dugheri, S., Marrubini, G., Mucci, N., Cappelli, G., Bonari, A., Pompilio, I., ... & Arcangeli, G. (2021). A review of micro-solid-phase extraction techniques and devices applied in sample pretreatment coupled with chromatographic analysis. *Acta Chromatographica*, 33(2), 99-111.
- Ehling, S., & Reddy, T. M. (2015). Analysis of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in nutritional ingredients and milk by derivatization with fluorenylmethyloxycarbonyl chloride and liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(48), 10562-10568.
- Eurachem. (2014). The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. Recuperado el 18 de enero de 2025 de: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/269381/Solicitud_Algodon_GLT_Piloto_Mex_Son_CP.pdfhttps://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_EN.pdf
- European Commission. (2021). Guidance document on pesticide analytical methods for risk assessment and post-approval control and monitoring purposes. SANTE/2020/12830, Rev. 1 24. February 2021. Recuperado el 01 de junio de 2025 de: <https://www.eurl-pesticides.eu/docs/public/tmpl/article.asp?CntID=727>
- European Medicines Agency. (2023). *ICH Q2(R2) guideline on validation of analytical procedures* (EMA/CHMP/ICH/82072/2006). Committee for Medicinal Products for Human Use. Recuperado el 01 de junio de 2025 de:

<https://www.ema.europa.eu/en/ich-q2r2-validation-analytical-procedures-scientific-guideline>

- European Parliament; Council of the European Union. (2020, diciembre 23). *Directive (EU) 2020/2184 on the quality of water intended for human consumption (recast)*. *Official Journal of the European Union*, L 435, 1–62.
- FAO/WHO Codex Alimentarius. (2024). *Pesticide Detail: Chlorfenvinphos*. Codex Alimentarius. Recuperado el 20 de abril de 2025 de: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/269381/Solicitud_Algodon_GLT_Piloto_Mex_Son_CP.pdfhttps://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/dbs/pestres/pesticide-detail/es/?p_id=158
- FAO/WHO. (2016). *Pesticide residues in food 2016: Special Session of the Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues. Report 2016* (FAO Plant Production and Protection Paper No. 227). Food and Agriculture Organization of the United Nations
- Faraji, M., Yamini, Y., & Gholami, M. (2019). Recent advances and trends in applications of solid-phase extraction techniques in food and environmental analysis. *Chromatographia*, 82(8), 1207-1249.
- Gabardo, R. P., Cordeiro, G. A., & Peralta-Zamora, P. (2024). LC-FLD Determination of Glyphosate, AMPA and Glufosinate in Surface Water from the Paraná River Basin. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 35(9), e-20240047.
- Giang, L. T., Thien, T. L. T., & Yen, D. H. (2020). Studying method of underivatized determination glyphosate, glufosinate and their metabolites in drinking water. *Vietnam Journal of Chemistry*, 58(1), 74-79.
- Grandcoin, A., Piel, S., & Baurès, E. (2017). AminoMethylPhosphonic acid (AMPA) in natural waters: Its sources, behavior and environmental fate. *Water Research*, 117, 187-197.

- Gros, P., Ahmed, A. A., Kühn, O., & Leinweber, P. (2019). Influence of metal ions on glyphosate detection by FMOC-Cl. *Environmental monitoring and assessment*, 191, 1-12.
- Han, Y., Song, L., Zhao, P., Li, Y., Zou, N., Qin, Y., ... & Pan, C. (2016). Residue determination of glufosinate in plant origin foods using modified Quick Polar Pesticides (QuPPE) method and liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 197, 730-736.
- Hanke, I., Singer, H., & Hollender, J. (2008). Ultratrace-level determination of glyphosate, aminomethylphosphonic acid and glufosinate in natural waters by solid-phase extraction followed by liquid chromatography–tandem mass spectrometry: performance tuning of derivatization, enrichment and detection. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 391, 2265-2276.
- Harsági, N., & Keglevich, G. (2021). The hydrolysis of phosphinates and phosphonates: a review. *Molecules*, 26(10), 2840.
- Hidalgo, C., Rios, C., Hidalgo, M., Salvadó, V., Sancho, J. V., & Hernández, F. (2004). Improved coupled-column liquid chromatographic method for the determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid residues in environmental waters. *Journal of Chromatography A*, 1035(1), 153-157.
- Islas, G., Ibarra, I. S., Hernandez, P., Miranda, J. M., & Cepeda, A. (2017). Dispersive solid phase extraction for the analysis of veterinary drugs applied to food samples: a review. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2017(1), 8215271.
- Jeong, Y., Schäffer, A., & Smith, K. (2017). Equilibrium partitioning of organic compounds to OASIS HLB® as a function of compound concentration, pH, temperature and salinity. *Chemosphere*, 174, 297-305.
- Khrolenko, M. V., & Wieczorek, P. P. (2005). Determination of glyphosate and its metabolite aminomethylphosphonic acid in fruit juices using supported-liquid membrane preconcentration method with high-performance liquid chromatography and UV detection after derivatization with p-

- toluenesulphonyl chloride. *Journal of Chromatography A*, 1093(1-2), 111-117.
- Kim, H. Y., & Park, N. H. (2022). Diffusion-weighted imaging for detecting glufosinate ammonium intoxication: a case report. *Journal of the Korean Society of Radiology*, 83(6), 1354.
- Küstters, M., & Gerhartz, M. (2010). Enrichment and low-level determination of glyphosate, aminomethylphosphonic acid and glufosinate in drinking water after cleanup by cation exchange resin. *Journal of separation science*, 33(8), 1139-1146.
- Leyva-Morales, J. B., Cabrera, R., Bastidas-Bastidas, P. D. J., Valenzuela-Quintanar, A. I., Pérez-Camarillo, J. P., González-Mendoza, V. M., ... & Cruz-Acevedo, E. (2023). Validation and application of liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry method for the analysis of glyphosate, aminomethylphosphonic acid (AMPA), and glufosinate in soil. *Agriculture*, 13(6), 1131.
- Li, Q., Guo, Y., He, X., & Li, G. (2023). Sensitive and label-free colorimetric detection of glyphosate based on the suppression peroxidase-mimicking activity of Cu (II) ions. *Molecules*, 28(12), 4630.
- Liao, W. R., Wu, K. L., Chiang, K. H., Teng, C. E., & Chen, S. F. (2022). Analysis of highly polar pesticides in foods by LC-MS/MS. *Journal of Food and Drug Analysis*, 30(4), 538.
- López-Vázquez, J., Pérez-Mayán, L., Fernández-Fernández, V., Cela, R., & Rodríguez, I. (2023). Direct, automated and sensitive determination of glyphosate and related anionic pesticides in environmental water samples using solid-phase extraction on-line combined with liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1687, 463697.
- Lorenz, V., Rossetti, M. F., Dallegre, E., Milesi, M., & Varayoud, J. (2021). Glyphosate herbicide as endocrine disruptor and probable human

- carcinogen: current knowledge and future direction. *Frontiers in endocrinology*, 12, 772911.
- Lu, W., Liu, J., Li, J., Wang, X., Lv, M., Cui, R., & Chen, L. (2019). Dual-template molecularly imprinted polymers for dispersive solid-phase extraction of fluoroquinolones in water samples coupled with high performance liquid chromatography. *Analyst*, 144(4), 1292-1302.
- Manzano-Sánchez, L., Martínez-Martínez, J. A., Domínguez, I., Martínez Vidal, J. L., Frenich, A. G., & Romero-González, R. (2020). Development and application of a novel pluri-residue method to determine polar pesticides in fruits and vegetables through liquid chromatography high resolution mass spectrometry. *Foods*, 9(5), 553.
- Marín, J., Campillo, N., Hernández-Córdoba, M., Garrido, I., Fenoll, J., & Viñas, P. (2020). Liquid–liquid microextraction of glyphosate, glufosinate and aminomethylphosphonic acid for the analysis of agricultural samples by liquid chromatography. *Analytical Methods*, 12(15), 2039-2045.
- Martin, P. J., He, K., Blaney, L., & Hobbs, S. R. (2023). Advanced liquid chromatography with tandem mass spectrometry method for quantifying glyphosate, glufosinate, and aminomethylphosphonic acid using pre-column derivatization. *ACS Es&t Water*, 3(8), 2407-2414.
- Masci, M., Caproni, R., & Navigato, T. (2024). Chromatographic Methods for the Determination of Glyphosate in Cereals Together with a Discussion of Its Occurrence, Accumulation, Fate, Degradation, and Regulatory Status. *Methods and Protocols*, 7(3), 38.
- McCalley, D. V. (2015). Study of retention and peak shape in hydrophilic interaction chromatography over a wide pH range. *Journal of chromatography A*, 1411, 41-49.
- Miller, J. N., & Miller, J. C. (2005). Estadística y Quimiometría para Química Analítica, 4a Edición.

- Mohd Ghazi, R., Nik Yusoff, N. R., Abdul Halim, N. S., Wahab, I. R. A., Ab Latif, N., Hasmoni, S. H., ... & Zakaria, Z. A. (2023). Health effects of herbicides and its current removal strategies. *Bioengineered*, 14(1), 2259526.
- Nascimento, M. M., da Rocha, G. O., & de Andrade, J. B. (2021). Customized dispersive micro-solid-phase extraction device combined with micro-desorption for the simultaneous determination of 39 multiclass pesticides in environmental water samples. *Journal of Chromatography A*, 1639, 461781.
- National Center for Biotechnology Information (2024). PubChem Compound Summary for CID 3496, Glyphosate. Recuperado el 11 de septiembre de 2024 de: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Glyphosate>.
- National Center for Biotechnology Information (2024). PubChem Compound Summary for CID 4794, Glufosinate. Recuperado el 11 de septiembre de 2024 de: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Glufosinate>.
- National Center for Biotechnology Information (2024). PubChem Compound Summary for CID 14017, (Aminomethyl)phosphonic acid. Recuperado el 11 de septiembre de 2024 de: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Aminomethyl_phosphonic-acid.
- Navarro, J. J. F. (2013). Eliminación de la actividad silanofílica en cromatografía líquida en fase inversa mediante el uso de aditivos (Doctoral dissertation, Universitat de València).
- Nguyen, M. H., Nguyen, T. D., Vu, M. T., Duong, H. A., & Pham, H. V. (2022). Determination of Glyphosate, Glufosinate, and Their Major Metabolites in Tea Infusions by Dual-Channel Capillary Electrophoresis following Solid-Phase Extraction. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2022(1), 5687025.
- Oliveira Pereira, E. A., Freitas Melo, V., Abate, G., & Masini, J. C. (2019). Determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid by

sequential-injection reversed-phase chromatography: method improvements and application in adsorption studies. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 411, 2317-2326.

Padilla-Alonso, D. J., Garza-Tapia, M., Chávez-Montes, A., González-Horta, A., Waksman de Torres, N. H., & Castro-Ríos, R. (2017). New temperature-assisted ionic liquid-based dispersive liquid–liquid microextraction method for the determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in water samples. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 40(3), 147-155.

Peillex, C., & Pelletier, M. (2020). The impact and toxicity of glyphosate and glyphosate-based herbicides on health and immunity. *Journal of immunotoxicology*, 17(1), 163-174.

Pérez-Mayán, L., Castro, G., Ramil, M., Cela, R., & Rodríguez, I. (2022). Approaches to liquid chromatography tandem mass spectrometry assessment of glyphosate residues in wine. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 1-11.

Peris García, E. (2019). Widening the possibilities of liquid chromatography through the use of secondary equilibria with additives and hydrophilic interaction chromatography (Doctoral dissertation, Universitat de València).

Pires, N. L., Passos, C. J. S., Morgado, M. G., Mello, D. C., Infante, C. M. C., & Caldas, E. D. (2020). Determination of glyphosate, AMPA and glufosinate by high performance liquid chromatography with fluorescence detection in waters of the Santarém Plateau, Brazilian Amazon. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 55(9), 794-802.

Ramirez, C. E., Bellmund, S., & Gardinali, P. R. (2014). A simple method for routine monitoring of glyphosate and its main metabolite in surface waters using lyophilization and LC-FLD+ MS/MS. Case study: Canals with

influence on Biscayne National Park. *Science of the Total Environment*, 496, 389-401.

Sasano, R., Sekizawa, J., Saito, I., Harano, M., Katsumoto, K., Ito, R., ... & Akiyama, H. (2024). Simultaneous determination of glyphosate, glufosinate and their metabolites in soybeans using solid-phase analytical derivatization and LC-MS/MS determination. *Food Chemistry: X*, 24, 101806.

Ścigalski, P., & Kosobucki, P. (2020). Recent materials developed for dispersive solid phase extraction. *Molecules*, 25(21), 4869.

Sereshti, H., Jamshidi, F., Nouri, N., & Nodeh, H. R. (2020). Hyphenated dispersive solid-and liquid-phase microextraction technique based on a hydrophobic deep eutectic solvent: application for trace analysis of pesticides in fruit juices. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(6), 2534-2543.

Schäfer, A. K., Vetter, W., & Anastassiades, M. (2024). Analysis of highly polar anionic pesticides in food of plant and animal origin by ion chromatography and tandem mass spectrometry with emphasis on addressing adverse effects caused by matrix co-extractives. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 1-15.

Shinde, R., & Banerjee, K. (2022). Determination of highly polar and ionic pesticides in grape and pomegranate using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of AOAC International*, 105(5), 1341-1349.

Singh, R., Shukla, A., Kaur, G., Girdhar, M., Malik, T., & Mohan, A. (2024). Systemic analysis of glyphosate impact on environment and human health. *ACS omega*, 9(6), 6165-6183.

Soares, D., Silva, L., Duarte, S., Pena, A., & Pereira, A. (2021). Glyphosate use, toxicity and occurrence in food. *Foods*, 10(11), 2785.

- Socas-Rodríguez, B., Herrera-Herrera, A. V., Asensio-Ramos, M., & Hernández-Borges, J. (2015). Dispersive Solid-Phase Extraction. En J. L. Anderson, A. Berthod, V. Pino Estévez & A. M. Stalcup (Eds.), *Analytical Separation Science* (Vol. 3, pp. 209–213).
- Spietelun, A., Marcinkowski, Ł., de la Guardia, M., & Namieśnik, J. (2014). Green aspects, developments and perspectives of liquid phase microextraction techniques. *Talanta*, 119, 34-45.
- Steinborn, A., Alder, L., Michalski, B., Zomer, P., Bendig, P., Martinez, S. A., ... & Costa Pinheiro, N. (2016). Determination of glyphosate levels in breast milk samples from Germany by LC-MS/MS and GC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(6), 1414-1421.
- Takano, H. K., & Dayan, F. E. (2020). Glufosinate-ammonium: a review of the current state of knowledge. *Pest Management Science*, 76(12), 3911-3925.
- U.S. Environmental Protection Agency. (2024, December 12). *National primary drinking water regulations*. Recuperado el 11 de mayo de 2025 de <https://www.epa.gov/ground-water-and-drinking-water/national-primary-drinking-water-regulations>
- U.S. Environmental Protection Agency. (1999, March). *Protocol for EPA approval of alternate test procedures for organic and inorganic analytes in wastewater and drinking water*. Recuperado el 11 de mayo de 2025 de: <https://www.epa.gov>
- Venditti, S., Kiesch, A., & Hansen, J. (2023). Fate of glyphosate and its metabolite AminoMethylPhosponic acid (AMPA) from point source through wastewater sludge and advanced treatment. *Chemosphere*, 340, 139843.
- Wang, S., Liu, B., Yuan, D., & Ma, J. (2016). A simple method for the determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in seawater matrix with high performance liquid chromatography and fluorescence detection. *Talanta*, 161, 700-706.

- Wang, Y., Gao, W., Li, Y., Xiao, Y., Song, W., Yao, T., ... & Hou, R. (2021). Establishment of a HPLC–MS/MS detection method for glyphosate, glufosinate-ammonium, and aminomethyl phosphoric acid in tea and its use for risk exposure assessment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(28), 7969-7978.
- Watanabe, S. (2004). Simultaneous analysis of glyphosate and glufosinate in vegetables and fruits by GC-FPD. *Shokuhin eiseigaku zasshi. Journal of the Food Hygienic Society of Japan*, 45(1), 38-43.
- Wimmer, B., Pattky, M., Zada, L. G., Meixner, M., Haderlein, S. B., Zimmermann, H. P., & Huhn, C. (2020). Capillary electrophoresis-mass spectrometry for the direct analysis of glyphosate: method development and application to beer beverages and environmental studies. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 412, 4967-4983.
- Wirth, M. A., Schulz-Bull, D. E., & Kanwischer, M. (2021). The challenge of detecting the herbicide glyphosate and its metabolite AMPA in seawater—method development and application in the Baltic Sea. *Chemosphere*, 262, 128327.
- Zhang, J., Wang, Q., Kleintop, B., & Raglione, T. (2014). Suppression of peak tailing of phosphate prodrugs in reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 98, 247-252.
- Zhang, W., Feng, Y., Ma, L., An, J., Zhang, H., Cao, M., ... & Lian, K. (2019). A method for determining glyphosate and its metabolite aminomethyl phosphonic acid by gas chromatography-flame photometric detection. *Journal of Chromatography A*, 1589, 116-121.
- Zhou, Q., Wu, W., Xie, G., & Huang, Y. (2014). Enrichment and analysis of typically persistent organic pollutants at trace level using micro-solid phase extraction based on titanium dioxide nanotube arrays. *Analytical Methods*, 6(1), 295-301.