

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA  
Facultad de Ciencias y Humanidades



Montaje y validación de un método de determinación y cuantificación de  
Glifosato mediante cromatografía líquida de alta resolución HPLC, con  
detector UV/Vis

Trabajo de graduación presentado por  
Fredy Eliezer Junior Vásquez González  
para optar al grado académico de Licenciado en Química

Guatemala  
2023



UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA  
Facultad de Ciencias y Humanidades



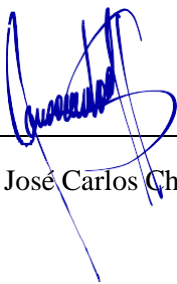
Montaje y validación de un método de determinación y cuantificación de  
Glifosato mediante cromatografía líquida de alta resolución HPLC, con  
detector UV/Vis

Trabajo de graduación presentado por  
Fredy Eliezer Junior Vásquez González  
para optar al grado académico de Licenciado en Química

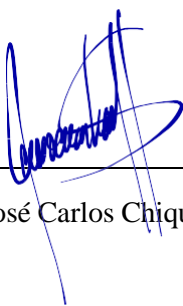
Guatemala  
2023




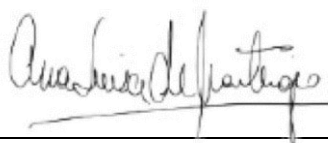
Vo. Bo.:

(f.)   
Lic. José Carlos Chiquín

Tribunal examinador:

(f.)   
Lic. José Carlos Chiquín

(f.)   
Licda. Irma Orellana

(f.)   
Licda. Ana Luisa Mendizábal

Fecha de aprobación: Guatemala, 19 de junio de 2023



## Prefacio

El camino para culminar este trabajo fue largo y agotador, pero lleno de experiencias que me ayudaron a crecer como persona y profesional. Tras cuatro años de carrera cultivé en mi un interés, principalmente, por la química orgánica, sin saber que a su lado crecía un interés por la química instrumental. Y eso es lo increíble de la química, que sus ramas se complementan de una manera espectacular.

Durante este tiempo conocí personas, tanto catedráticos como amigos, que fueron de gran apoyo en esos momentos en los que sentía que no podía más; o que me dieron un golpe de realidad para darme cuenta de que solo era un bache en el camino.

Agradezco primeramente a Dios, quien me dio la vida, y la oportunidad de realizar mis estudios en esta casa de estudios, y junto con ella la fuerza para poder culminarlos. Agradezco también a mis padres y mi hermano, quienes siempre me han dado su apoyo incondicional. Además de alentarme a seguir adelante, no rendirme, siempre dar lo mejor de mí y decirme de vez en cuando: *“como diría Mamimi: hágale...”*

Agradezco a mis catedráticos por sus enseñanzas y consejos, no solo dentro del salón de clases, si no fuera de ellas también. Como José Carlos Chiquín, quien fue un gran profesor, asesor, mentor, y amigo durante mi vida universitaria y espero que en el resto de mi vida también.

Agradezco también a cada amigo que me acompañó en este trayecto, Alessandra, Vini, Reyes, Mori, Diana, Estuardo, Sebas, Chewie, y a aquellos a quienes no menciono porque de ser así la lista no acaba.

Agradezco a mis compañeros de trabajo, a Mynor, la licenciada Julia Alicia, Javier, Eduardo, don Julito, Hillary, Linda, y al licenciado Raúl, por tenerme paciencia y darme ánimos en los momentos en los que lo necesité

Y, por último, pero no menos importante, quiero agradecerme a mí, por creer en mí, por hacer este trabajo duro, por no tomarme días libres cuando eran necesarios, por nunca renunciar, por siempre tratar de dar más, y por siempre ser yo.

*“Todo estará bien, y si no lo está, es porque esto aún no ha terminado.”* – Anónimo.

¡Gracias!

## Índice

Listado de figuras.....	X
Listado de cuadros .....	XIII
Resumen.....	XIV
I. Introducción .....	1
II. Objetivos .....	2
III. Justificación .....	3
IV. Marco teórico.....	4
A. Herbicidas.....	4
B. Métodos de extracción en el grano de café .....	6
C. Métodos de análisis .....	7
D. Validación de métodos de ensayo .....	8
E. Trompeta de Horwitz .....	9
F. Aplicaciones del método.....	11
V. Hipótesis .....	12
VI. Variables .....	13
VII. Metodología.....	14
1. Diagramas de flujo.....	18
VIII. Resultados .....	20
IX. Discusión de resultados.....	22
X. Conclusiones .....	25
XI. Recomendaciones .....	26
XII. Bibliografía .....	27
IX. Anexos .....	30
A. Datos obtenidos de las curvas de calibración para la validación del método de detección y cuantificación de glifosato. ....	30
B. Curvas de calibración para la validación del método de detección y cuantificación de glifosato .....	31
C. Cromatograma y espectros de masas para la identificación del pico de Glifosato .....	35
D. Cromatogramas de las soluciones de Glifosato para LOD y LOQ .....	38
E. Cromatogramas de las soluciones de Glifosato para curvas de calibración.....	43
1. Curva 1 .....	43

2.	Curva 2 .....	45
3.	Curva 3 .....	48
4.	Curva 4 .....	50
5.	Curva 5 .....	53
6.	Curva 6 .....	55
7.	Curva 7 .....	58
8.	Curva 8 .....	60
F.	Reacciones y mecanismos.....	63
G.	Cromatogramas de referencia.....	64
H.	Cálculos .....	69

## Listado de figuras

Figura 1 Estructura química del Glifosato .....	5
Figura 2: Trompeta de Horwitz.....	10
Figura 3: Diagrama de flujo para la derivatización de glifosato.....	18
Figura 4: Curva de calibración 1.....	31
Figura 5: Curva de calibración 2.....	31
Figura 6: Curva de calibración 3.....	32
Figura 7: Curva de calibración 6.....	32
Figura 8: Curva de calibración 5.....	33
Figura 9: Curva de calibración 6.....	33
Figura 10: Curva de calibración 7.....	34
Figura 11: Curva de calibración 8.....	34
Figura 12: Cromatograma de inyección de estandar de glifosato en cromatografo líquido UPLC. .....	35
Figura 13: Espectro de masas de solución de glifosato sin derivatizar.....	36
Figura 14: Espectro de masa para primer pico de cromatograma generado por cromatógrafo líquido UPLC. ....	37
Figura 15: Cromatograma para límite de detección de glifosato, solución a 4ppm, Pico de glifosato en 6.69min.....	38
Figura 16: Cromatograma para determinación de límite de detección y cuantificación de glifosato, solución a 4ppm. Pico de glifosato en 6.60min. ....	38
Figura 17: Cromatograma para límite de cuantificación de glifosato, solución a 10ppm, pico de glifosato en 7.24 min.....	39
Figura 18: Cromatograma para límite de cuantificación de glifosato, solución a 10ppm, pico de glifosato en 7.35 min.....	39
Figura 19: Cromatograma de solución de glifosato derivatizada a 0.01ppm .....	40
Figura 20: Cromatograma de solución de glifosato derivatizada a 0.02ppm .....	40
Figura 21: Cromatograma de solución de glifosato derivatizada a 0.04ppm .....	41
Figura 22: Cromatograma de solución de glifosato derivatizada a 0.06ppm .....	41
Figura 23: Cromatograma de solución de glifosato derivatizada a 0.08ppm .....	42
Figura 24: Cromatograma de solución de glifosato derivatizada a 0.1ppm .....	42
Figura 25: Cromatograma para solución a 20ppm.....	43
Figura 26: Cromatograma para solución a 30ppm.....	43
Figura 27: Cromatograma para solución a 40ppm.....	44
Figura 28: Cromatograma para solución a 50ppm.....	44
Figura 29: Cromatograma para solución a 100ppm.....	45
Figura 30: Cromatograma para solución a 20ppm.....	45
Figura 31: Cromatograma para solución a 30ppm.....	46
Figura 32: Cromatograma para solución a 40ppm.....	46
Figura 33: Cromatograma para solución a 50ppm.....	47
Figura 34: Cromatograma para solución a 100ppm.....	47

Figura 35: Cromatograma para solución a 20ppm.....	48
Figura 36: Cromatograma para solución a 30ppm.....	48
Figura 37: Cromatograma para solución a 40ppm.....	49
Figura 38: Cromatograma para solución a 50ppm.....	49
Figura 39: Cromatograma para solución a 100ppm.....	50
Figura 40: Cromatograma para solución a 20ppm.....	50
Figura 41: Cromatograma para solución a 30ppm.....	51
Figura 42: Cromatograma para solución a 40ppm.....	51
Figura 43: Cromatograma para solución a 50ppm.....	52
Figura 44: Cromatograma para solución a 100ppm.....	52
Figura 45: Cromatograma para solución a 20ppm.....	53
Figura 46: Cromatograma para solución a 30ppm.....	53
Figura 47: Cromatograma para solución a 40ppm.....	54
Figura 48: Cromatograma para solución a 50ppm.....	54
Figura 49: Cromatograma para solución a 100ppm.....	55
Figura 50: Cromatograma para solución a 20ppm.....	55
Figura 51: Cromatograma para solución a 30ppm.....	56
Figura 52: Cromatograma para solución a 40ppm.....	56
Figura 53: Cromatograma para solución a 50ppm.....	57
Figura 54: Cromatograma para solución a 100ppm.....	57
Figura 55: Cromatograma para solución a 20ppm.....	58
Figura 56: Cromatograma para solución a 30ppm.....	58
Figura 57: Cromatograma para solución a 40ppm.....	59
Figura 58: Cromatograma para solución a 50ppm.....	59
Figura 59: Cromatograma para solución a 100ppm.....	60
Figura 60: Cromatograma para solución a 20ppm.....	60
Figura 61: Cromatograma para solución a 30ppm.....	61
Figura 62: Cromatograma para solución a 40ppm.....	61
Figura 63: Cromatograma para solución a 50ppm.....	62
Figura 64: Cromatograma para solución a 100ppm.....	62
Figura 65: Reacción de derivatización de glifosato con cloruro de p-toluensulfonilo .....	63
Figura 66: Reacción entre AMPA y cloruro de p-toluensulfonilo.....	63
Figura 67: Propuesta de mecanismo de reaccion para la reacción de derivatización. ....	63
Figura 68: Posible ruta para la degradación del glifosato por oxidación húmeda (wet-air oxidation) .....	63
Figura 69: Posible ruta para la degradación del glifosato por fotodegradación .....	64
Figura 70: Comparación entre cromatograma de glifosato derivatizado (b) con cromatograma brindado por el análisis realizado por Khrolenko y Wieczorek (a) .....	64
Figura 71: Comparación de cromatograma del cloruro de p-toluensulfonilo e inyección de solución madre derivatizada 1. Picos en 3.95mins y 3.56mins, respectivamente. ....	66
Figura 72: Comparación de cromatograma del cloruro de p-toluensulfonilo e inyección de solución madre derivatizada 2. Picos en 3.95mins y 3.57mins, respectivamente. ....	67

Figura 73: Comparación de cromatograma del cloruro de p-toluensulfonilo e inyección de solución madre derivatizada 3. Picos en 3.95mins y 3.51mins, respectivamente. ....	68
Figura 74: Cromatograma de pruebas iniciales de inyección de solución de glifosato derivatizado para el montaje del método .....	68

## Listado de cuadros

Cuadro 1: Variables en la validación del método para la determinación de glifosato en granos de café.....	13
Cuadro 2: Cuadro de equipos utilizados .....	14
Cuadro 3: Cuadro de cristalería utilizada.....	14
Cuadro 4: Cuadro de reactivos utilizados .....	14
Cuadro 5: Volúmenes para soluciones hijas .....	15
Cuadro 6: Relación molar entre el glifosato y el agente derivatizante .....	17
Cuadro 7: Parámetros utilizados en el cromatógrafo HPLC con detector UV/Vis .....	18
Cuadro 8: Evaluación y determinación de LOD y LOQ.....	20
Cuadro 9: Evaluación de la linealidad a partir de los parámetros de las curvas de calibración realizadas.....	20
Cuadro 10: Evaluación de la repetibilidad y reproducibilidad a partir de la desviación estándar y coeficiente de variación del tiempo de retención para el glifosato .....	21
Cuadro 11: Evaluación de la repetibilidad y reproducibilidad a partir de la desviación estándar y coeficiente de variación de las áreas obtenidas para cada concentración utilizada en las curvas de calibración.....	21
Cuadro 12: Áreas del pico de glifosato por concentración y curva de calibración.....	30
Cuadro 13: Tiempos de retención del glifosato en cada curva de calibración.....	30
Cuadro 14: Condiciones de método cromatográfico utilizado por Khrolenko y Wieczorek.....	65
Cuadro 15: Comparación de tiempos de retención de agente derivatizante e inyección de solución madre derivatizada .....	68

## Resumen

El presente trabajo surgió de la necesidad de montar y validar un método para la detección y cuantificación de glifosato en café en un laboratorio de análisis de alimentos. La técnica empleada fue cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC) con un detector UV/VIS, utilizando cloruro de p-toluensulfonilo como agente derivatizante, para lograr la detección del glifosato. Se trabajó el método evaluando el límite de detección, límite de cuantificación, la linealidad, repetibilidad, y reproducibilidad, a partir de la variabilidad de los tiempos de retención y las áreas de los picos del analito en el cromatograma. Para esto, se llevaron a cabo 8 corridas en las que se evaluó estadísticamente que se cumpliera con estos criterios. La experimentación se realizó en un laboratorio de análisis de residuos de plaguicidas en alimentos, el cual cuenta con el equipo y material necesario para el montaje y validación del método. Se determinó que el límite de detección es de 5ppm y el límite de cuantificación es de 15ppm. Los  $R^2$  de 4 de las 8 repeticiones realizadas son menores a 0.98, criterio establecido por la OGA, por lo que carece de linealidad. Por otro lado, al evaluar la repetibilidad y reproducibilidad, se tomó en cuenta que el coeficiente de variación máximo aceptado es de 10.2% para la concentración de 20ppm, 9.6% para la de 30ppm, 9.2% para la de 40ppm, 8.9% para la de 50ppm, y 8.0% para la de 100ppm; según la ecuación de Horwitz. Lo cual no se cumple en las áreas obtenidas en los cromatogramas, por lo que el método no es repetible ni reproducible. Debido al que el método para la detección y cuantificación de glifosato mediante cromatografía líquida carece de linealidad, repetibilidad, reproducibilidad y robustez, no pudo montarse y validarse en el laboratorio.

## I. Introducción

Los herbicidas son sustancias formuladas para tratar plantas invasoras en los cultivos. Estos generalmente causan cambios hormonales que provocan falta de crecimiento en la planta que se desea eliminar (Espinoza, Hernández, & Morales, 2013). Una de las principales clasificaciones que se realizan en los herbicidas son por su persistencia, es decir, por el tiempo que permanece el residuo en la planta, el suelo y cuerpos de agua cercanos a la plantación. Entre estos están los residuales y los no residuales (López, 2016). También pueden clasificarse por su movilidad dentro de la planta. en esta clasificación pueden dividirse en Sistémicos y De contacto (Espinoza, Hernández, & Morales, 2013).

El glifosato es un herbicida altamente utilizado en Guatemala, este suele utilizarse en los cultivos de café y caña de azúcar (Mazariegos, 2007). Fue desarrollado para tratar hierbas y plantas perennes, que son aquellas que viven por más de dos años. El glifosato es un compuesto orgánico que contiene una glicina y un grupo fosfonometilo en su estructura. Tiene una apariencia líquida de color amarillo, posee un punto de ebullición de 106°C. Tiene una masa molar de 169.07g/mol con una densidad de 1.17g/mL y una solubilidad de 1050g/L en agua (Saenz, 2017).

El Glifosato se volatiliza al ser aplicado, facilitando su inhalación produciendo problemas respiratorios a largo plazo en los agricultores que lo utilizan. Este es un herbicida residual y sistémico, por lo que el consumo en altas concentraciones de los remanentes puede ocasionar daños hepáticos y renales. (Possidônio & Rodrigues, 2002). Por esta misma razón debe procurarse permanecer dentro de los límites de residuos de herbicidas en el producto final, ya que, según las asociaciones internacionales en productos como la caña de azúcar y el café los residuos de glifosato no deben superar una concentración 1ppm para la FDA en Estados Unidos y 0.1ppm para la Comisión de la Unión Europea (EC, 2005; Velez, 2011; ANACAFE, s.f.).

Finalmente, el estudio pretende proponer un método de determinación y cuantificación específico para glifosato, a partir de los de cromatografía líquida por HPLC con un detector de UV/VIS, en las instalaciones de un laboratorio de análisis de alimentos.

## **II. Objetivos**

### **A. Objetivo general**

- Montar y validar un método de detección y cuantificación de glifosato por medio de HPLC con detector UV/Vis.

### **B. Objetivos específicos**

- Determinar los límites de detección y cuantificación del método mediante las señales obtenidas en los cromatogramas.
- Verificar la linealidad, repetibilidad y reproducibilidad del método mediante la variabilidad de los tiempos de retención y las áreas de los picos de los cromatogramas.

### **III. Justificación**

El glifosato al ser altamente utilizado en cultivos de gran producción en Guatemala, como la planta del café y la caña, han generado problemas no solo en estos cultivos, provocando manchas amarillas en las hojas debido a la falta de producción de clorofila. Si no que también, puede ser tóxico para la vida acuática (Anzalone, Arizaleta, & Vargas, 2014).

Este herbicida está clasificado como sistémico y residual. Esto quiere decir, que al ser aplicado la planta lo absorbe y a través de su floema lo transporta por todo su organismo; que permanece en la planta y los productos extraídos de la misma por un largo periodo de tiempo. Estos remanentes al ser ingeridos en altas concentraciones pueden ser nocivos, y provocar irritaciones graves en el tracto digestivo (Possidônio & Rodrigues, 2002).

En Guatemala no existe una ley que regule el uso de glifosato en cultivos, y por ende tampoco existe una ley que regule la cantidad residual de glifosato en productos de consumo inmediato (ANACAFE, s.f.). Lo que afecta a los productores y exportadores de cultivos en los que se utiliza este herbicida, como el café y la caña, cuando desean ingresar su producto a otro país. Por lo que estos agricultores buscan laboratorios nacionales que lo puedan analizar y así certificar que su producto cumpla con las distintas normas establecidas en los países a los que exportan.

Por lo anteriormente mencionado se propone montar y validar un método para la detección y cuantificación de glifosato. Este busca cumplir con los criterios de linealidad, repetibilidad y reproducibilidad y robustez establecidos por la Oficina de Acreditación Guatemalteca (OGA, 2018). El montaje se llevará a cabo en un laboratorio de análisis de alimentos, que brinda servicios de tamizaje de plaguicidas. Sin embargo, este laboratorio no cuenta con un análisis de glifosato en su catálogo, siendo este trabajo una oportunidad de crecimiento para ellos.

## IV. Marco teórico

### A. *Herbicidas*

Los herbicidas son sustancias específicas para tratar plantas invasoras en los cultivos. Estos generalmente causan cambios hormonales que provocan la falta de crecimiento en la planta que se desea eliminar (Espinoza, Hernández, & Morales, 2013).

#### 1. Tipos

Al no existir un solo sistema para clasificar a los herbicidas, los sistemas de clasificación utilizan las distintas características que estos poseen, como su naturaleza química, la toxicidad, o bien el mecanismo de acción de estos (Espinoza, Hernández, & Morales, 2013).

Una de las principales clasificaciones que se realizan son por su persistencia, es decir, por el tiempo que permanece el residuo en la planta, el suelo y cuerpos de agua cercanos a la plantación. Entre estos están los residuales y los no residuales. Los residuales se aplican al suelo y muestran presencia cuando se realiza un análisis químico al suelo o al agua cercana. Por su parte los no residuales se degradan con el tiempo hasta el punto de no mostrar trazas en los análisis (López, 2016).

Otra manera de clasificar a los herbicidas es por su movilidad dentro de la planta. en esta clasificación pueden dividirse en Sistémicos y De contacto. Los sistémicos se caracterizan por entrar en la planta y esparcirse dentro de ella mediante el floema. Mientras que los de contacto solamente tiene efecto en la parte de la planta en la que fue aplicado (Espinoza, Hernández, & Morales, 2013).

Por otro lado, los herbicidas pueden clasificarse según su acción sobre la planta. en este caso pueden dividirse en Selectivos y No Selectivos. Los selectivos son aquellos que tienen efecto sobre una maleza en específico. Por su parte, los no selectivos eliminan una gran gama de familias de plantas (López, 2016).

#### 2. Aplicación

Los herbicidas pueden aplicarse tanto en el suelo como en el follaje, sin embargo, esto también dependerán del tipo de herbicida que se esté aplicando. Por ejemplo, si se aplica un herbicida de contacto, entonces este debe aplicarse en el follaje. Por su parte, los sistémicos deben aplicarse en el suelo para que la planta pueda absorberlos (FAO, 2019).

### 3. Glifosato

El glifosato es un herbicida altamente utilizado en Guatemala, este suele utilizarse en los cultivos de café y caña de azúcar (Mazariegos, 2007). Este fue desarrollado para tratar hierbas y plantas perennes, que son aquellas que viven por más de dos años. Este pertenece a los herbicidas Sistémicos y No selectivos, además, ha presentados residuos en la caña de azúcar y café, por lo que se considera un herbicida Residual (IPCS, 1994).

#### a. Propiedades y toxicidades

El glifosato es un compuesto orgánico que contiene una glicina y un grupo fosfometilo en su estructura. Tiene una apariencia líquida de color amarillo, posee un punto de ebullición de 106°C. Posee una densidad de 1.17g/mL. Este tiene una solubilidad de 1050g/L en agua (Saenz, 2017).

Este puede ser nocivo al ser ingerido, puede provocar irritaciones graves en el tracto respiratorio al ser inhalado y genera irritación ocular. Además, puede ser tóxico para la vida acuática (Possidônio & Rodrigues, 2002).

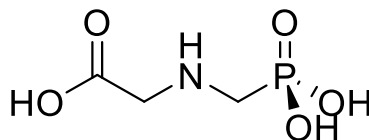


Figura 1 Estructura química del Glifosato

#### b. Legislación

Actualmente en Guatemala no existe una ley que regule el uso de glifosato en cultivos, y por ende tampoco existe una ley que regule la cantidad residual de glifosato en productos de consumo inmediato, como azúcar en el caso de la caña, como el café molido o en grano en el caso del cafeto. Sin embargo, si estos productos quieren exportarse deben cumplir con los límites de residuos internacionales. En el caso del café la concentración de restos de glifosato no debe superar 1ppm (ANACAFE, s.f.).

#### c. Plantas en las que se utiliza y sus efectos en ellas

El glifosato ayuda a contralar diversas especies de hierbas y malezas, a partir de su intervención en la ruta sintética del ácido shikímico. Este herbicida inhibe la enzima 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato-sintetasa (EPSPS), evitando la producción de aminoácidos aromáticos esenciales para el crecimiento de la planta (Salazar & Aldana, 2011).

Entre estas están: *Brachiaria mutica*, *Commelina diffusa*, *Cynodon dactylon*, *Cyperus flavus*, *Cyperus odoratus*, *Cyperus rotundus*, *Echinochloa colunum*, *Panicum maximum*, *Sorghum halepense*, y *Tinantia erecta* (Espinoza, Hernández, & Morales, 2013).

## *B. Métodos de extracción en el grano de café*

Para la extracción de Glifosato del grano de café no existe un método específico. A pesar de esto, existen otros métodos de extracción de herbicidas. Los cuales inician con una maceración de la muestra con el solvente que pueda arrastrar los herbicidas. Entre estos métodos se encuentran el método de Luke, el método de Mills, el método de Acetato de Etilo y el método de QuEChERS (Simó, 2018).

### 1. Método de Luke

Este método es uno de los más utilizados por los laboratorios para la extracción y determinación de residuos de plaguicidas organofosforados en plantas. Este es sumamente útil para aquellas muestras que no contienen grasas, como frutas, hortalizas, hojas y algunos granos. El método utiliza Acetona como para la extracción de los plaguicidas. Luego de macerar la muestra con este solvente, se realiza una separación líquido-líquido con diclorometano y éter de petróleo para recuperar la fase orgánica y concentrar a 2mL y reconstruir a 4mL con acetato de etilo (Amelin & Lavrukhina, 2017).

### 2. Método de Mills

Este método es utilizado en el análisis de residuos de plaguicidas organoclorados. A diferencia de Luke, Mills si funciona con muestras grasas, por lo que puede utilizarse en tejidos animales y vegetales. El método inicia con la maceración de la muestra utilizando acetonitrilo como solvente. Luego se realiza una separación líquido-líquido con éter de petróleo para recuperar la fase orgánica. Esta se limpia utilizando una columna de florisil activado. Para luego ser evaporada, y así eliminar el acetonitrilo. Posteriormente se reconstruye a 4mL con éter de petróleo (Camino, et al., 2011).

### 3. Método de acetato de etilo

El método de acetato de etilo se ha utilizado ampliamente para la determinación de plaguicidas en frutas y vegetales. Este método permite tener buenos resultados para una amplia gama de plaguicidas polares. Este método es catalogado como uno de los más limpios ya que el acetato de etilo es mucho menos contaminante que otros solventes utilizados en otros métodos como el diclorometano. La extracción inicia con la maceración de la muestra con acetato de etilo. El sobrenadante se filtra por sulfato de sodio anhidro. Luego se evapora para reconstruir con una mezcla 1:1 de ciclohexano y acetato de etilo (Krynitsky & Lehotay, 2003).

#### 4. Método de QuEChERS

El nombre de este método proviene de sus siglas en inglés, Quick, Easy, Cheap, Effective, Robust and Safe, (rápido, fácil, barato, efectivo, robusto y seguro, en español). Este método es utilizado para el análisis de residuos de plaguicidas en alimentos de distinto origen y naturaleza. El método inicia pesando de 2g a 10g, dependiendo del contenido de agua, de la muestra en un tubo de centrífuga. A este se le agregan 15mL de una solución de ácido acético en acetonitrilo al 1%, junto con una mezcla de acetato de sodio y sulfato de magnesio para retener el agua de la muestra. Luego de agitar y centrifugar, la muestra pasa por un proceso de limpieza mediante una extracción en fase sólida dispersiva de aminos primarias y secundarias, y de C18 para muestras con alta cantidad de grasa. Finalmente se filtra el sobrenadante a un vial para inyección en el cromatógrafo (Lehotay, Anastassiades, & Majors, 2010).

#### 5. Método QuPPE

El método QuPPE recibe su nombre por sus siglas en inglés, Quick Polar Pesticides. Este es una variante del método QuEChERS, modificado para la extracción de plaguicidas polares. Este consiste en tomar de 2g a 10g, dependiendo del contenido de agua, de la muestra en un tubo de centrífuga, para luego agregar 10mL de agua o metanol ácido, dependiendo del analito que se desea analizar. Después de agitar y centrifugar se filtra el sobrenadante a un vial para inyección en el cromatógrafo (Anastassiades, et al., 2015).

### C. Métodos de análisis

Para analizar los distintos extractos de plaguicidas, se utilizan tanto para identificación como cuantificación, el cromatógrafo de líquidos o HPLC, por sus siglas en inglés; y el cromatógrafo de gases (CG). Estos permiten un análisis exacto y preciso de las muestras complejas o con muchos analitos en ellas (Simó, 2018).

#### 1. HPLC

La cromatografía líquida es utilizada para identificar y cuantificar compuestos orgánicos, inorgánicos y bioquímicos. Consta de una fase móvil y una fase estacionaria, de distinta polaridad. Los analitos tienen diferente afinidad con la fase móvil, la cual los arrastra a lo largo de la columna. Esta afinidad con la fase móvil es la que determina el tiempo que cada compuesto tarda en recorrer toda la columna, empacada con la fase estacionaria, logrando así la separación de los componentes de una mezcla. Las aplicaciones de este método incluyen la cuantificación de compuestos tales como: proteínas, carbohidratos, analgésicos, antibióticos, lípidos, alcohol, entre otros (Skoog, West, Holler, & Crouch, 2015).

## 2. Cromatografía de gases (CG)

La cromatografía de gases es un proceso en el cual los componentes de una mezcla volátil se separan mediante el uso de una columna cromatográfica, en la que la muestra fue inyectada. Los componentes son arrastrados por la fase móvil, la cual es un gas inerte, mientras que poco a poco los componentes se van separando según su afinidad a la fase estacionaria, que se encuentra en la columna; y su comportamiento con el gradiente de temperaturas establecido. Para poder cuantificar los analitos, al cromatógrafo puede acoplarse un detector de ionización de llama, el cual combustiona la muestra que sale de la columna provocando una pirólisis, la cual forma iones y electrones conductores de electricidad, con la cual es posible cuantificar el analito (Skoog, West, Holler, & Crouch, 2015).

### *D. Validación de métodos de ensayo*

Una validación es el proceso de establecer parámetros y limitaciones de un método, confirmando que se han cumplido con los requisitos establecidos por la organización y laboratorio encargado de su aplicación. Esta confirmación se da por la presentación de evidencia objetiva en la que se prueba que el método es adecuado para su aplicación específica. Los parámetros por evaluar en una validación son: Límites de detección y cuantificación, linealidad, repetibilidad, reproducibilidad y robustez (OGA, 2018).

#### 1. Límite de detección (LOD)

El límite de detección es la cantidad mínima de analito que puede ser detectada por el equipo empleado. No debe ser necesariamente cuantificada. El rango de aceptación es que la señal detectada para el analito sea como mínimo tres veces mayor a la señal detectada por el ruido en la muestra (EURACHEM, 2014).

#### 2. Límite de cuantificación (LOQ)

El límite de cuantificación es la cantidad mínima de analito en la muestra que puede ser cuantificada con precisión y exactitud bajo las condiciones específicas del método. El rango de aceptación para el LOQ es que la señal detectada del analito en la muestra sea diez veces mayor a la señal detectada por el ruido de la muestra (EURACHEM, 2014).

#### 3. Linealidad

La linealidad es la capacidad de un método para brindar resultados directamente proporcionales a la concentración del analito analizado, dentro de un rango establecido. El resultado puede ser calculado en base a la altura o el área de un pico, en cromatogramas o espectros (EURACHEM, 2014).

#### 4. Repetibilidad

La repetibilidad es el grado de concordancia entre los resultados del método realizado bajo las mismas condiciones en cada una de las pruebas. Estas condiciones incluyen que el método fue trabajado por el mismo analista, utilizando el mismo equipo en cada repetición. Para que la repetibilidad sea válida, las repeticiones deben trabajarse dentro en un corto periodo de tiempo. Además, debe expresarse en términos cuantitativos de dispersión, como el coeficiente de variación o desviación estándar (EURACHEM, 2014).

#### 5. Reproducibilidad

La reproducibilidad es el grado de concordancia entre los resultados brindados por un método bajo distintas condiciones al las normales o estándar del método. Estas variaciones en las condiciones pueden ser cambios de variables como masa de la muestra, temperatura del ambiente o equipo, analista que trabaje la muestra o equipo utilizado. Para que la reproducibilidad sea válida deben especificarse las variaciones a realizar en el método. Esta se expresa en términos cuantitativos de dispersión, como el coeficiente de variación o desviación estándar (EURACHEM, 2014).

#### 6. Robustez

También conocida como Fortaleza o Resistencia del método, la robustez es la capacidad de un método analítico para no verse afectado por variaciones en los parámetros y condiciones del método. Esta provee un índice de confiabilidad y precisión en las condiciones normales de su uso (EURACHEM, 2014).

#### *E. Trompeta de Horwitz*

Con el propósito de normalizar el cálculo para la dispersión de resultados de medición de los métodos de ensayo, Horwitz propone en 1980 un modelo para la determinación de esta. Cabe resaltar que su objetivo inicial era dar un valor de referencia para evaluar los resultados de las pruebas interlaboratorios (Rivera & Rodriguez, 2010). El modelo propuesto es el siguiente:

*Ecuación 1: Ecuación de Horwitz*

$$CV = 2^{1-0.5 \log C}$$

Donde:

C: es la concentración del analito expresado adimensionalmente.

CV: coeficiente de variación, expresado en porcentaje.

(Rivera & Rodriguez, 2010)

La cual puede ilustrarse como la trompeta de Horwitz:

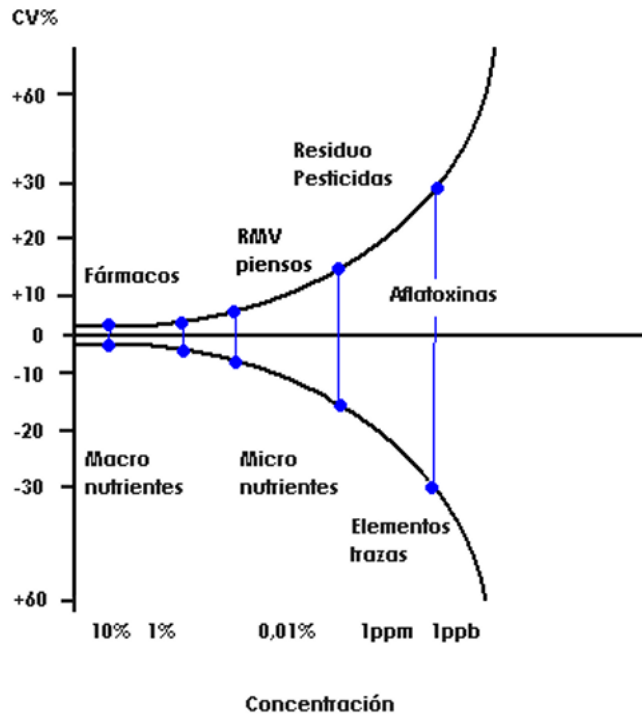


Figura 2: Trompeta de Horwitz

(Duffau, et al., 2010)

En esta puede observarse que el CV sugerido para el análisis de residuos de plaguicidas es de 16%, ya que se la concentración que toma de referencia es de 1ppm, que adimensionalmente se representa como  $1 \cdot 10^{-6}$  (Bernal & Duharte, 2019). Siguiendo los cálculos de ejemplo:

*Cálculo 1: Conversión de concentración a cifra adimensional.*

$$1ppm = 1 \frac{mg}{L} = 1 \frac{mg}{kg}$$
$$\frac{1mg}{kg} * \frac{1g}{1000mg} * \frac{1kg}{1000g} = 1 * 10^{-6}$$

*Cálculo 2: CV para concentración de 1ppm según la ecuación de Horwitz.*

$$CV = 2^{1-0.5 \log C}$$

$$CV = 2^{1-0.5 \log 1 \cdot 10^{-6}}$$

$$CV = 16$$

#### *F. Aplicaciones del método*

Un método para cuantificación y detección de glifosato montado y validado puede ser de utilidad para un óptimo control de calidad de productos provenientes de los cultivos en los que se utiliza este herbicida como lo son el cultivo de café y de caña de azúcar. Al momento de utilizarlo en estas matrices, es importante conocer y luego cumplir con los límites de residuos de glifosato establecidos por los países que reciban el producto. Ya que en Guatemala no se cuenta con un límite establecido para la regulación para el uso del glifosato.

## **V. Hipótesis**

1. El método montado es válido para su posterior uso en matriz, ya que cuenta con LOD, LOQ, linealidad, robustez, repetibilidad y reproducibilidad.
2. El método montado no es válido para su posterior uso en matriz, ya que no cuenta con LOD, LOQ, linealidad, robustez, repetibilidad y reproducibilidad.

## VI. Variables

*Cuadro 1: Variables en la validación del método para la determinación de glifosato en granos de café.*

<b>Variable</b>	<b>Def. conceptual</b>	<b>Def. operacional</b>
Concentración de glifosato	Cantidad de glifosato en la solución (Possidônio & Rodrigues, 2002).	Pasar la solución de glifosato por el HPLC.
Linealidad	Capacidad de un método para brindar resultados directamente proporcionales a la concentración de un analito dentro de un rango determinado (OGA, 2018).	Comportamiento lineal de los puntos de las curvas de calibración.
Repetibilidad	Nivel de concordancia de los resultados dados por el método luego de varias repeticiones sucesivas bajo las mismas condiciones (OGA, 2018).	Baja variación de un mismo resultado de tiempo de retención y área de pico en el cromatograma, realizando el método el mismo día.
Reproducibilidad	Nivel de concordancia de los resultados dados por el método luego de varias repeticiones sucesivas bajo distintas condiciones (OGA, 2018).	Baja variación de un mismo resultado realizando el método en distintos días.
Límite de Detección (LOD)	Cantidad mínima de un analito que puede ser detectada con las condiciones específicas del método a validar (OGA, 2018).	Concentración a la que la altura del pico generado por el detector el 3 veces más alta que el ruido.
Límite de Cuantificación (LOQ)	Cantidad mínima de un analito que puede ser cuantificada con el método a validar (OGA, 2018).	Concentración a la que la altura del pico generado por el detector el 10 veces más alta que el ruido.
Robustez	Estabilidad del resultado al variar condiciones en el procedimiento del método (OGA, 2018).	Baja variación de un mismo resultado variando condiciones en un paso del procedimiento

## VII. Metodología

### *Materiales y reactivos*

#### *Equipos*

*Cuadro 2: Cuadro de equipos utilizados*

Equipo	Marca	Incertidumbre
Micropipeta	BRAND	$\pm 10\mu\text{L}$
Balanza analítica	OHAUS	$\pm 0.0001\text{g}$
Potenciómetro	ISOLAB	$\pm 0.01$
Cromatógrafo líquido de alta resolución	MERCK HITACHI	-
Bomba	LaChrom L-7100	-
Detector UV/VIS	LaChrom L-7400	-
Horno	LaChrom L-7360	-
Columna	Merck Lichrocart C18	-
Estufa	Thermo Scientific	-

#### *Cristalería*

*Cuadro 3: Cuadro de cristalería utilizada*

Cristalería	Capacidad (mL)	Marca	Incertidumbre (mL)
Balón de aforo	5	Kimax	$\pm 0.08$
Balón de aforo	25	Kimax	$\pm 0.06$
Balón de aforo	250	Kimax	$\pm 0.24$
Beaker	10, 50	Kimax	

#### *Reactivos*

*Cuadro 4: Cuadro de reactivos utilizados*

Reactivo	Marca	Pureza
Glifosato	Sigma-Aldrich	>98%
Cloruro de p-toluensulfonilo	Sigma-Aldrich	>99%
Acetonitrilo grado HPLC	JT Baker	>99%
Fosfato de Potasio	JT Baker	>95%
Ácido Fosfórico	JT Baker	>98%
Hidróxido de sodio	JT Baker	>99%

## **Preparación de soluciones**

### *Soluciones de Glifosato*

Se preparó una solución madre de glifosato a 100ppm. Para esto se pesaron 25mg del estándar de glifosato en un Beaker de 10mL en una balanza analítica y se disolvió con agua ultrapura. La disolución se trasvasó a un balón de aforo de 250mL, se hicieron varios lavados al Beaker con agua ultrapura para pasar todo el glifosato al balón, cuidando de no pasar la línea de aforo. Una vez hechos los lavados, se llevó a volumen con la misma agua ultrapura.

Para las soluciones hijas se utilizaron balones de 5mL. Los volúmenes de las alícuotas para estas soluciones se tomaron con micropipeta, y se describen en el siguiente cuadro.

*Cuadro 5: Volúmenes para soluciones hijas*

Concentración de la solución [ppm]	Alícuota tomada de la solución [mL]	Volumen de aforo [mL]
1	0.05	5
2	0.10	
3	0.15	
4	0.20	
5	0.25	
10	0.50	
15	0.75	
20	1.0	
30	1.5	
40	2.0	
50	2.5	
100	*	

\*Se utilizó la solución madre como el quinto punto de la curva.

Estas soluciones se conservaron en cámara de refrigeración para evitar la degradación del glifosato.

### *Solución de cloruro de p-toluensulfonilo*

Se realizó una solución a 10000ppm del derivatizante cloruro de p-toluensulfonilo. Para esto se pesaron 250mg en un Beaker de 10mL en la balanza analítica. Estos se disolvieron con Acetonitrilo grado HPLC. La disolución se trasvasó a un balón de aforo ámbar de 25mL, se hicieron 3 lavados al Beaker con Acetonitrilo grado HPLC para pasar todo el derivatizante al balón; y se llevó a volumen de aforo con el mismo Acetonitrilo grado HPLC. Este se mantuvo en un congelador mientras no se utilizaba para evitar degradaciones del compuesto.

### *Solución de hidróxido de sodio 0.1M*

La solución de hidróxido de sodio a 0.1M se preparó pesando 0.4g de hidróxido de sodio granular en un Beaker de 50mL en la balanza analítica. Estos se disolvieron en 25mL de agua desmineralizada, teniendo precaución del aumento de temperatura. Luego de que se disolvieron, se trasvasó la disolución a un balón de 100mL. Se realizaron 3 lavados al Beaker con 25mL de agua desmineralizada pasándolos al balón de aforo. Finalmente, la solución se aforó a 100mL.

### *Buffer de fosfatos 0.2M, pH 9*

Para elaborar el buffer de fosfatos a pH 9 con concentración de 0.2M, se pesaron 1.74g de fosfato de potasio en un Beaker de 50mL en la balanza analítica. Luego se disolvieron en 10mL de agua ultrapura y se ajustó el pH a 9 goteando una solución de hidróxido de sodio 0.1M mientras se agitaba para homogenizar la solución, el pH se monitoreó con el potenciómetro. Cuando el potenciómetro marcó el pH de 9 se dejó de agregar la solución de hidróxido de sodio y se dejó agitando por 2 minutos más. Pasados los dos minutos se transfirió la solución a un balón de 25mL, haciendo 2 lavados con 5mL de agua ultrapura al Beaker. Finalmente se aforó a los 25mL. Esta solución se guardó en la cámara de refrigeración para conservar mejor.

### *Fase móvil*

#### *Buffer de fosfatos 0.03M, pH 2.7*

Para fabricar el buffer de fosfatos a 0.03M con pH 2.7, se pesaron 1.03g de fosfato de potasio en un frasco de fase móvil para HPLC. Luego se agregaron 100mL de agua ultrapura y se agitó hasta disolver. Luego con ayuda del potenciómetro se monitoreó el nivel de pH hasta que llegara a 2.7 mientras se le agregaban gotas de ácido fosfórico. Después de alcanzar el pH deseado, se agregaron otros 150mL de agua ultrapura y se agitó por 2 minutos. Por último, se dejó en baño ultrasónico por 10 minutos para desgasificar, y posteriormente se filtró por una membrana de nylon de 0.45 $\mu$ m y se conectó al cromatógrafo HPLC.

#### *Acetonitrilo*

Se agregaron 250mL de Acetonitrilo grado HPLC a un frasco de fase móvil para HPLC. Luego se dejó por 10 minutos en el baño ultrasónico para desgasificar, posteriormente se filtró por una membrana de nylon de 0.45 $\mu$ m y se conectó al cromatógrafo HPLC.

### **Derivatización**

En un Beaker de 10mL se agregaron, con micropipeta, 1mL de cada solución preparada del estándar de glifosato, 0.5mL de un buffer de fosfatos (0.04M, pH 9), y 0.2mL de cloruro de p-toluensulfonilo (10000ppm en acetonitrilo). Se calentó por 10 minutos en baño maría a 60°C y se agitó por un minuto. Finalmente se transfirió a un tubo Ependorf para almacenar la muestra (Corbera, Hidalgo, Salvado, & Wieczorek, 2005).

*Cuadro 6: Relación molar entre el glifosato y el agente derivatizante*

Concentración de Glifosato (ppm)	Moles de Glifosato en la reacción (mol)	Concentración de Cloruro de p-toluensulfonilo (ppm)	Moles de Cloruro de p-toluensulfonilo en la reacción (mol)	Relación molar (mol) Derivatizante : Glifosato
20	$1.18 \cdot 10^{-4}$	10000	0.05	422.68 : 1
30	$1.77 \cdot 10^{-4}$			281.78 : 1
40	$2.36 \cdot 10^{-4}$			211.33 : 1
50	$2.96 \cdot 10^{-4}$			169.07 : 1
100	$5.91 \cdot 10^{-4}$			84.54 : 1

### **Validación del método**

Con las soluciones preparadas al inicio se realizaron los puntos de prueba para examinar los parámetros de validación de métodos: LOD, LOQ, linealidad, repetibilidad, reproducibilidad y robustez. Para determinar el LOD y LOQ se realizaron las soluciones con concentraciones de 1 a 15ppm, tal y como se explica en el cuadro 5. Luego se inyectaron y a partir de las alturas de los picos se determinaron los límites de detección y cuantificación.

Ya con los LOD y LOQ determinados se procedió a construir una curva de calibración. Esta fue de 5 puntos los cuales fueron 20, 30, 40, 50 y 100ppm. Estas soluciones se realizaron en base al Cuadro 5. Esta curva de calibración se inyectó un total de 8 veces, se inyectaron 2 curvas por día en un lapso de 4 días. Con los cromatogramas obtenidos, se graficaron las curvas Área vs Concentración, colocando en cada concentración su área obtenida. Se evaluó su linealidad a partir de los parámetros de su regresión lineal y su forma.

Para evaluar la reproducibilidad, repetibilidad y robustez se calcularon los promedios, desviaciones estándar y coeficientes de variación de las áreas y tiempos de retención de todas las curvas. En el caso de la robustez fue necesario tomar en cuenta los cambios que sufría el método al realizar inyecciones en distintos días. Como el cambio en las condiciones del laboratorio entre días de trabajo y la preparación de nuevas soluciones hijas. El coeficiente de variación se calculó a partir de la división entre la desviación estándar y el promedio. Se tomó como dato aceptable si el coeficiente de variación era menor a 16% (Rivera & Rodríguez, 2010).

Además, se identificó cada pico del cromatograma, el del Glifosato y el del Cloruro de p-toluensulfonilo. Para el pico del glifosato se inyectó la solución madre sin derivatizar en un cromatógrafo líquido UPLC con detector de doble masas para corroborar que hubiera glifosato en la solución. Para identificar el pico del Cloruro de p-toluensulfonilo se inyectó el compuesto en solución para determinar su tiempo de retención. Con esto pudo identificarse el derivatizante en cada cromatograma de las curvas realizadas.

Cada parámetro evaluado se tomó y revisó bajo los criterios establecidos por la Oficina Guatemalteca de Acreditación (OGA), para la validación de métodos de ensayo.

### Parámetros para HPLC UV/Vis

Cuadro 7: Parámetros utilizados en el cromatógrafo HPLC con detector UV/Vis

HPLC		Detector UV/Vis	
Parámetro	Valor	Parámetro	Valor
Vol. Inyección	10µL	Tiempo de respuesta	0.5s
T. Columna	Ambiente	Rango de Absorbancia	1 AU
Fase móvil	Buffer fosfatos 0.03M pH 2.7 : Acetonitrilo (85:15 v/v)	Tiempo de corrida	10min
Flujo	1mL/min	Longitud de onda	240nm
Columna	Merck Lichrocart C18, 20cm x 0.46cm.		

#### 1. Diagramas de flujo

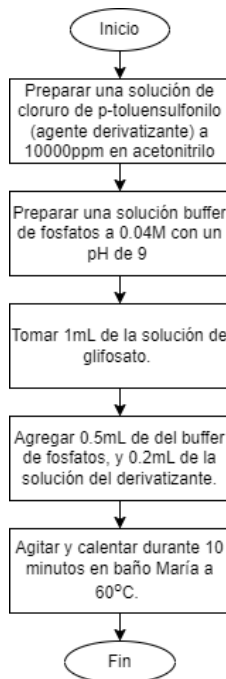
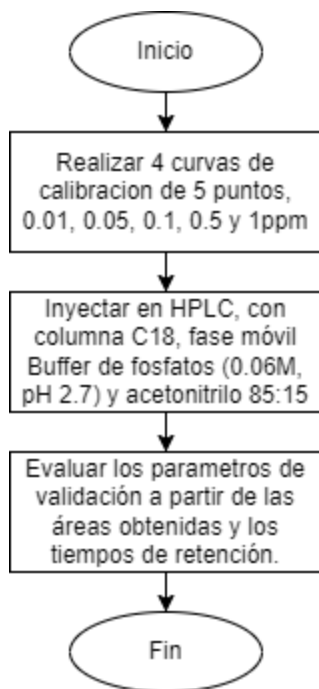


Figura 3: Diagrama de flujo para la derivatización de glifosato



*Figura 3: Diagrama de flujo para la validación del método por HPLC.*

## VIII. Resultados

Como primer punto se determinaron los LOD y LOQ del método. Se tomó como LOD la concentración cuyo pico fuera 3 veces más alto que el ruido, y como LOQ se tomó la concentración cuyo pico fuera 10 veces más alto que el ruido. Esta relación se determinó con la ecuación 2. Dichas concentraciones fueron 4 y 10ppm respectivamente. Cromatogramas en figuras 15 a 18.

*Cuadro 8: Evaluación y determinación de LOD y LOQ*

[c] (ppm)	Repetición	Altura pico (mV)	Altura ruido (mV)	Relación de alturas	Límite
4	1	80	61	2.6:1	Detección
	2	76	58	2.6:1	
10	1	154	30	10.2:1	Cuantificación
	2	120	30	8:1	

Cálculos en sección de Anexos (cálculos 3 y 4)

*Ecuación 2: Cálculo de relación de altura para determinar LOD y LOQ*

$$S = \frac{2H}{h}$$

Donde:

S: relación de alturas

H: altura del pico

h: altura del ruido

Como segundo punto se analizaron las curvas de calibración para evaluar la linealidad. Los datos se muestran en el cuadro siguiente, y las curvas se encuentran en la sección de Anexos (Figuras 4 a 11). Según la OGA para que el método sea válido el  $R^2$  debe ser mayor a 0.98, lo cual se cumple en las curvas 3, 6, 7 y 8.

*Cuadro 9: Evaluación de la linealidad a partir de los parámetros de las curvas de calibración realizadas*

Curva	Pendiente (unidad de área/ppm)	Intercepto (unidad de área)	$R^2$
1	135.16	1095.93	0.977
2	177.34	1391.02	0.972
3	241.81	-199.79	0.985
4	120.50	543.58	0.977
5	103.15	1370.00	0.962
6	232.26	-2220.55	0.984
7	229.04	-105.51	0.997
8	217.33	-580.19	0.982

El siguiente cuadro muestra el tiempo de retención promedio para el glifosato, junto con su desviación estándar y coeficiente de variación. Para la validación del método es importante que este criterio cuente con baja variabilidad. Ya que representa consistencia en la inyección de la muestra. Para estos datos se tomaron los tiempos de retención del cromatograma de cada concentración de las 8 curvas de calibración, las cuales pueden apreciarse en el Cuadro 13 en Anexos. Se toma como aceptable el coeficiente de variación si éste es menor al CV establecido para cada concentración, según la ecuación de Horwitz, la obtención de este valor se muestra en los Cálculos 5 a 9 en la sección de Anexos (Rivera & Rodríguez, 2010). Puede notarse que el CV del tiempo de retención es menor a este valor para cada concentración trabajada.

*Cuadro 10: Evaluación de la repetibilidad y reproducibilidad a partir de la desviación estándar y coeficiente de variación del tiempo de retención para el glifosato*

c [ppm]	Promedio (min)	Desviación estandar (min)	CV Obtenido	CV <sup>1</sup> Permitido	Cumple
20	6.48	0.11	2.0%	10.2%	Si
30	6.49	0.11	2.0%	9.6%	Si
40	6.48	0.10	2.0%	9.2%	Si
50	6.49	0.12	2.0%	8.9%	Si
100	6.42	0.24	4.0%	8.0%	Si

<sup>1</sup> CV calculado con la ecuación de Horwitz (Ecuación 1).

A continuación, se presentan los promedios, desviaciones estándar y coeficientes de variación de las áreas obtenidas del pico de glifosato para las distintas concentraciones trabajadas en 8 curvas de calibración. La validación inició evaluando la variabilidad de la respuesta del detector y de la inyección del analista. Esto a partir de las 8 inyecciones que se realizaron de la curva. Las áreas obtenidas en las 8 curvas pueden observarse en el Cuadro 12 en la sección de Anexos. Se toma como aceptable el coeficiente de variación si éste es menor al CV establecido para cada concentración, según la ecuación de Horwitz, la obtención de este valor se muestra en los Cálculos 4 a 8 en la sección de Anexos (Rivera & Rodríguez, 2010). Puede notarse que los CV de las áreas son mayores a este valor.

*Cuadro 11: Evaluación de la repetibilidad y reproducibilidad a partir de la desviación estándar y coeficiente de variación de las áreas obtenidas para cada concentración utilizada en las curvas de calibración*

[c] (ppm)	Promedio de área (unidades de área)	Desviación estándar (unidades de área)	CV	CV <sup>1</sup> Permitido	Cumple
20	3614.75	936.77	26%	10.2%	No
30	5545.38	1320.09	24%	9.6%	No
40	7884.88	1623.67	21%	9.2%	No
50	9149.13	1933.88	21%	8.9%	No
100	18312.63	4988.86	27%	8.0%	No

<sup>1</sup> CV calculado con la ecuación de Horwitz (Ecuación 1).

## IX. Discusión de resultados

En un laboratorio de análisis de alimentos, se propuso montar y validar un método para la detección y cuantificación de glifosato en café. Para lo cual se debieron evaluar los parámetros de límites de detección y cuantificación, linealidad, repetibilidad, reproducibilidad, y robustez. Para esto se realizaron 8 curvas de calibración, para poder generar una base de datos que brinde la evidencia requerida, según la OGA, para mostrar que el método es adecuado para el análisis de glifosato.

Al iniciar el montaje fue necesario confirmar el estado del estándar de glifosato, ya que por la degradación que sufre el glifosato se confirmó su presencia. Para esto se realizó una corrida en el cromatógrafo UPLC con detector de doble masas. Se inyectó una solución de glifosato sin derivatizar, a una concentración de 100ppm. El cromatograma presenta 2 picos (ver Figura 12), de los cuales el segundo corresponde a la molécula de glifosato. El espectro generado por el detector confirmó la presencia de glifosato (ver Figura 13). Este mostró que la masa del analito era de 172.85g/mol, la cual concuerda con la masa del Glifosato (169.07g/mol), ya que este detector funciona en negativo por lo que se le suma 1 a la masa original del analito por cada disociación que este tenga. Por su parte el primer pico muestra una masa de 142.81g/mol (ver Figura 14), la cual no coincide con ningún producto de degradación del glifosato, por lo que se desconoce la molécula a la que pertenece ese pico.

Ya confirmada la presencia de glifosato se procedió a identificar los picos de los cromatogramas generados por el cromatógrafo HPLC para el montaje del método. El primer pico significativo que se muestra en los cromatogramas corresponde al cloruro de p-toluensulfonilo. Esto se refleja en las figuras 71 a 73 y Cuadro 15, en las que se presenta el cromatograma de la inyección de la solución del derivatizante y las 3 repeticiones de la inyección de la solución madre derivatizada. Los tiempos de retención de este pico concuerda con el de la solución del derivatizante, que es aproximadamente en los 3 minutos y medio de la corrida.

El siguiente pico en identificarse fue el del glifosato. Al no haber estándar con el cual poder comparar la solución inyectada, se procedió a caracterizar el pico cuya área tuviera una relación proporcional a la concentración inyectada. Se observó que el tercer pico que aparece en el cromatograma presentaba este comportamiento, por lo que se determinó que este era el pico del glifosato. Esto puede verse reflejado en las figuras 25 a 64 en la sección de Anexos.

Como ya se mencionó, el glifosato tiende a degradarse con el paso del tiempo, y el principal compuesto generado por esta degradación es el ácido aminometilfosfónico, AMPA por sus siglas en inglés (Feng, Soric, & Boutin, 2020). Su degradación se puede deber a una fotodegradación o una oxidación húmeda, estas degradaciones se pueden apreciar en las figuras 68 y 69. En ambos casos la degradación se da por los radicales hidroxilos que se generan en el ambiente. El radical hidroxilo rompe el enlace entre el carbono y el nitrógeno del glifosato y forma AMPA. Los demás productos de la degradación varían según la ruta de degradación, por ejemplo, en la ruta de la oxidación húmeda se genera ácido glicólico, que posteriormente se degrada a ácido fórmico y dióxido de carbono. Por su parte en la ruta de la fotodegradación, el glifosato puede descomponerse en AMPA y ácido acético, o bien en sarcosina y ácido fosfórico (Feng, Soric, & Boutin, 2020). Es importante mencionar que el AMPA posee propiedades similares a las del glifosato, ya que al ser el producto principal de su degradación este mantiene en su estructura el grupo amino y el grupo

fosfato del glifosato. Por lo que es capaz de reaccionar con los derivatizantes de la misma manera que el glifosato. Prueba de esto es que, generalmente, en laboratorios que realizan análisis de glifosato, se reporta también el AMPA (Khrolenko & Wieczorek, 2005).

De la Figura 25 a la 64 puede notarse con claridad la presencia de un pico que se encuentra entre el pico del agente derivatizante y el del glifosato. Al comparar con el trabajo realizado por Khrolenko y Wieczorek (2005) en el que se trabajó el análisis de glifosato y AMPA bajo las mismas condiciones que el método evaluado en este trabajo (ver Cuadro 14); y tomar en cuenta las características descritas del AMPA, pudo verse que este pico podría ser generado por la derivatización del AMPA (ver Figura 66), ya que este aparece antes que el glifosato. Esto se ve reflejado en la Figura 70, el desfase en el tiempo de retención puede deberse al efecto matriz ocasionado por los jugos utilizados en el análisis de referencia. Es recomendable adquirir un estándar de AMPA para confirmar su presencia.

Ya con cada pico identificado, el primer parámetro que se evaluó fue el límite de detección (LOD) y cuantificación (LOQ). Para esto se realizaron pruebas a distintas concentraciones, diluyéndolas cada vez más hasta que el detector no fuera capaz de detectar el analito. Se inició con concentraciones de residuos entre 0.1 y 0.01ppm, como se muestra en las figuras 19 a 24. Sin embargo, el detector no fue capaz de captar el glifosato a estas concentraciones. Sin embargo, al trabajar con concentraciones más altas se obtuvieron mejores resultados, como puede observarse en las figuras 25 a 64. Se determinó que a concentraciones mayores a 4ppm el glifosato ya era detectado, siendo el LOD de 4ppm, ya que este pico era aproximadamente 3 veces más alto que el ruido. Luego se buscó el pico que fuera 10 veces más alto que el ruido para determinar el LOQ, el cual fue de 10ppm (ver Cuadro 8, Ecuación 2, figuras 15 a 18, y cálculos 3 y 4) (OGA, 2018).

Seguidamente se evaluó la linealidad. Como puede observarse en las figuras 4 a 11 las curvas 1, 2, 4 y 5 no presentan un comportamiento lineal, ya que en su mayoría hay al menos un punto que queda fuera de la tendencia. Esto se ve reflejado en el coeficiente de correlación (ver cuadro 9), en el que su valor es menor a 0.98, por lo que no cumplen con el mínimo aceptable para la OGA. A pesar de que las áreas presentan una relación proporcional con la concentración, no puede decirse que el método es lineal. Así que se procedió a determinar qué fue lo que ocasionó la falta de linealidad (OGA, 2018).

Dos factores que se tomaron en cuenta para entender la falta de linealidad fueron el estado del estándar de glifosato y la derivatización. El glifosato no puede ser detectado por UV/Vis, ya que esta molécula no cuenta con un grupo funcional que absorba luz en esta longitud de onda. Por lo que se somete al glifosato a una derivatización. En este caso se utilizó cloruro de p-toluensulfonilo, con un buffer de fosfatos como medio a una temperatura de 60°C, la reacción llevada a cabo se observa en la Figura 65. En esta figura puede verse que el acoplamiento del derivatizante a la molécula de glifosato se da en la amina. Los grupos carboxilo y fosfato no reaccionan con el cloruro de p-toluensulfonilo ya que los fosfatos requieren de condiciones más fuertes que las utilizadas para poder reaccionar, por ejemplo, una hidrólisis (Kamerlin, Sharma, Prasad, & Warshel, 2013). Por su parte los ácidos carboxílicos al estar en un medio alcalino se desprotonan. En el caso del ácido carboxílico del glifosato, al estar en el medio básico que proporciona el buffer se encuentra desprotonado, pero por su naturaleza este resuena, lo que dificulta su reacción. Las condiciones eran más favorables para que se genere una SN2 entre la amina del glifosato y el grupo sulfonilo del derivatizante, ya que la amina, a pesar de desprotonarse en el medio básico, es estable en este medio (ver figuras 65 y 67); por lo que no hubo subproductos

que afecten la linealidad (McMurry, 2008). Además, se buscó que reaccionará la mayor cantidad posible de glifosato, en el cuadro 6 se muestra la relación molar entre el derivatizante y el glifosato. En el cual se aprecia una diferencia de más de 80 veces la cantidad de derivatizante sobre glifosato, para cada concentración utilizada.

El otro factor que pudo afectar la linealidad fue la degradación del glifosato. Como se explicó con anterioridad, el AMPA tiene una estructura similar a la del glifosato, ya que conserva la amina y el grupo fosfato de este; lo que lo hace reaccionar de igual manera (Khrolenko & Wieczorek, 2005). Como puede observarse en la Figura 74, en las primeras pruebas realizadas para la optimización del método el posible pico del AMPA y del glifosato coeluyen, por lo que se estimó que la presencia de AMPA era la que afectaba la linealidad. Cabe mencionar que se mejoró el método de modo que estos dos analitos no coeluyeran. A pesar de esto, debido a la capacidad que poseen estos dos compuestos de formar quelatos, estos pueden reaccionar con el hierro del acero de la columna, quedándose retenidos por más tiempo. Lo que podría ocasionar la elevación en la línea base entre estos dos picos, como se puede apreciar en algunos cromatogramas de las curvas 1, 2, 4, y 5 que presentan un menor  $R^2$  (ver figuras 4, 5, 7, 8 y de la 25 a la 64), siendo este el factor que puede estar afectando la linealidad (Martino, 1998).

Los siguientes parámetros que se evaluaron fueron la repetibilidad y la reproducibilidad. En el Cuadro 10 puede apreciarse los CV para cada uno de los puntos de la curva en las repeticiones realizadas. Estas se evaluaron, realizando inyecciones en días distintos con nuevas soluciones. Como se ve en este Cuadro 11, los CV de las áreas de cada concentración trabajada sobrepasan el CV establecido según la ecuación de Horwitz, para cada una de estas (Rivera & Rodriguez, 2010). De igual manera, se tomó en cuenta la variabilidad del tiempo de retención. Para esto, del mismo modo que con el área de cada punto de las curvas, se tomaron los tiempos de retención de cada cromatograma para obtener un promedio y una desviación estándar de este. El tiempo de retención, como se muestra en el Cuadro 10, posee un CV aceptable, debajo del CV establecido según la ecuación de Horwitz para cada concentración. Sin embargo, como el área no cumple con este criterio el método no cuenta con repetibilidad y reproducibilidad. Debido a esto no se analizó si el método era robusto (EURACHEM, 2014).

Luego de evaluar cada parámetro según los lineamientos de la OGA, el método para la detección y cuantificación de glifosato por HPLC acoplado a un detector de UV/Vis no queda montado ni validado, debido a la falta de linealidad, repetibilidad, y reproducibilidad. Sin embargo, el trabajo fue un avance para el montaje y validación de un método para el análisis de glifosato en el laboratorio. Ya que, con las debidas mejoras en las condiciones del método se podrá agregar este a su catálogo de servicios.

## **X. Conclusiones**

1. El límite de detección (LOD) establecido para el método es de 4ppm, y el límite de cuantificación (LOQ) es de 10ppm.
2. El método propuesto no cuenta con linealidad, ya que 4 de las 8 repeticiones realizadas no presentan un  $R^2$  aceptable, mayor a 0.98.
3. El método no es repetible ni reproducible. Esto se debe a que los CV de las áreas obtenidas de los picos son mayores a los CV establecidos para cada concentración evaluada según la ecuación de Horwitz.
4. El método propuesto para la detección y cuantificación de glifosato mediante cromatografía líquida por HPLC con detector UV/Vis no es válido para la detección de glifosato en solución bajo las condiciones actuales, siendo evaluado bajo los criterios establecidos por la Oficina de Acreditación Guatemalteca (OGA).

## **XI. Recomendaciones**

Para la optimización del método se recomienda, como primer punto, conseguir estándar nuevo de glifosato. Esto con el propósito de evaluar el porcentaje de conversión de la reacción y la eficiencia de la derivatización. Ya que debido a la degradación del estándar que se tenía no fue posible evaluar este parámetro. Además de tener la capacidad de realizar un estudio de la vida media que tiene el glifosato en solución, y así lograr un estimado del tiempo de vida útil que posee esta solución. Ya que realizar una nueva solución stock cada vez que se realice el análisis generaría un gasto muy fuerte para el laboratorio en sus materiales de trabajo.

Cabe recomendar, como segundo punto, que se agregue el AMPA al análisis, ya que, por la facilidad del glifosato para degradarse, es posible que este compuesto esté presente en las muestras que se analicen. De este modo se podrá brindar un mejor y más completo análisis al cliente.

Finalmente, se recomienda que se reevalúen los parámetros para la validación del método, tales como LOD, LOQ, linealidad, repetibilidad, reproducibilidad, robustez, y porcentaje de recuperación. Así este puede ser montado y validado en las matrices en las que este herbicida se utiliza; como el café y la caña. Ya que al laboratorio y a sus clientes les interesa analizar sus cultivos a niveles de residuo. Debido a que, como ya se mencionó con anterioridad, los productos en los que el glifosato se aplica deben cumplir con las normas de residuos establecidas en cada país a los que se exportan. Además de poder iniciar los procesos para evaluar residuos en suelos y aguas que están aledañas a las plantaciones de estos productos, que siguen siendo de utilidad para las personas que viven a los alrededores.

## XII. Bibliografía

- Amelin, V., & Lavrukina, O. (2017). Food Safety Assurance Using Methods of Chemical Analysis. *Journal of Analytical Chemistry*, 1-46.
- ANACAFE. (s.f.). *Residue Limits (MRLs) for pesticide in green coffee beans*. Guatemala: ANACAFE.
- Anastassiades, M., Kolberg, D. I., Eichhorn, E., Benkenstein, A., Lukačević, S., Mack, D., . . . Barth, A. (2015). *Quick Method for the Analysis of numerous Highly Polar Pesticides in Foods of Plant Origin via LC-MS/MS involving Simultaneous Extraction with Methanol (QuPPE-Method)*. Retrieved from EURL-SRM: <https://www.eurl-pesticides.eu/docs/public/home.asp?LabID=200&Lang=EN>
- Anzalone, A., Arizaleta, M., & Vargas, J. (2014). Respuesta del cafeto (*Coffea arabica*) ‘ Catuaí’ a los herbicidas glifosato, clomazone, linuron, 2,4-D, metsulfuron-metil, rimsulfuron y clorimuron-etil. *Bioagro* , 3-12.
- Café, C. I. (2014). *Análisis comparativo de los precios mundiales del café y de los productos manufacturados*. Londres: Organización Internacional del Café.
- Camino, F., A., Z., Ruiz, J., Bermúdez, R., Ballesteros, O., Navalon, A., & Vílchez, J. U. (2011). UNE-EN ISO/IEC 17025:2005 accredited method for the determination of 121 pesticide residues in fruits and vegetables by gas chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Food Composition and Analysis*, 427-440.
- Corbera, M., Hidalgo, M., Salvado, V., & Wieczorek, P. (2005). Determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in natural water using the capillary electrophoresis combined with enrichment step. *Analytica Chimica Acta*, 3-7.
- Duffau, B., Rojas, F., Guerrero, I., Roa, L., Rodríguez, L., Soto, M., . . . Sandoval, S. (2010). *Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: “Aspectos generales sobre la validación de métodos”*. Santiago de Chile: Instituto de Salud Pública.
- Duicela, L. A., Farfán, D., García, J., Corral, R., & Chilán, W. (2004). *Post-cosecha y calidad del café arábigo*. Ecuador: INIAP.
- EC, E. C. (2005). *EU Pesticides Database*. Retrieved from <https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/products/?event=details&p=244>
- Espinoza, G., Hernández, C., & Morales, J. (2013). *Manual de Malezas y Catálogo de Herbicidas Para el Cultivo de la Caña de Azúcar en Guatemala*. Guatemala: CENGICAÑA.
- EURACHEM. (2014). *The Fitness for Purpose of Analytical Methods*. EU: EURACHEM.
- FAO. (2019). *FAOSTAT*. Retrieved from <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/>
- Feng, D., Malleret, L., Soric, A., & Boutin, O. (2020). Kinetic study of glyphosate degradation in wet air oxidation conditions. *Chemosphere*.

- Feng, D., Soric, A., & Boutin, O. (2020). Treatment technologies and degradation pathways of glyphosate: A critical review . *Science of The Total Environment*.
- INLASA. (2020). *inlasa.com*. Retrieved from <https://www.inlasa.com/>
- IPCS, I. P. (1994). *GLYPHOSATE*. Geneva: United Nations Environment Programm.
- Kamerlin, S., Sharma, P., Prasad, R., & Warshel, A. (2013). Why nature really chose phosphate. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 1-132.
- Khrolenko, M., & Wieczorek, 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. *Journal of Chromatography A*, 111-117.
- Krynitsky, A. J., & Lehotay, S. J. (2003). Overview of analytical technologies available to regulatory laboratories for determination of pesticide residues. *Handbook of Residue Analytical Methods for Agrochemicals*, John Wiley & Sons Ltd. U. S. A.
- Lehotay, S., Anastassiades, M., & Majors, R. (2010). The QuEChERs revolution. *LC GC Europe*.
- López, M. (2016). *DEAGRO*. Retrieved from <http://www.empresaagraria.com/distintos-tipos-herbicidas-cuando-aplicarlos/>
- Martino, D. (1998). *El herbicida Glifosato: su manejo más allá de la dosis por hectárea*. Montevideo: Unidad de Difusión e Información Tecnológica del INIA.
- Mazariegos, C. (2007). *COMPARACIÓN DE MEZCLAS DE HERBICIDAS EN EL CONTROL DE MALEZAS DE HOJA ANCHA, EN EL CULTIVO DE CAFÉ, EN FINCA CONCEPCIÓN CANDELARIA, SAN MARCOS*. Guatemala: Universidad Rafael Landívar.
- McMurry, J. (2008). *QUÍMICA ORGÁNICA*. México,D.F.: Cengage Learning.
- OGA, O. G. (2018). *Política de la Selección y Validación de Métodos de Ensayo*. Guatemala: OGA. Retrieved from chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/[https://oga.org.gt/wp-content/uploads/2021/04/OGA-GEC-016politica\\_seleccion\\_y\\_valid\\_metodos.pdf](https://oga.org.gt/wp-content/uploads/2021/04/OGA-GEC-016politica_seleccion_y_valid_metodos.pdf)
- Possidônio, O., & Rodrigues, T. (2002). GLIFOSATO: PROPRIEDADES, TOXICIDADE, USOS E LEGISLAÇÃO. *Quim. Nova*, 589-593.
- Rathinavelu, R., & Graziosi, G. (2005). *Posibles usos alternativos de los residuos y subproductos del café* . Italia: Organización Internacional del Café .
- Rivera, C., & Rodriguez, M. (2010). *Uso de la ecuación de Horwitz en laboratorios de ensayos NMX-EC-17025-IMNC-2006*. Chihuahua: Centro Nacional de Metrología.
- Saenz, J. (2017). *FICHA DE DATOS DE SEGURIDAD GLIFOSATO*. Lima: Agrolac Andina.

- Salazar, N., & Aldana, M. (2011). HERBICIDA GLIFOSATO: USOS, TOXICIDAD Y REGULACIÓN. *BIOtecnia*, 23-28.
- Simó, J. (2018). *MÉTODOS DE EXTRACCIÓN Y DETERMINACIÓN DE PLAGUICIDAS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES MASAS (GC-MS/MS) EN MUESTRAS DE ORIGEN VEGETAL*. España: UNIVERSIDAD NACIONAL DE EDUCACIÓN A DISTANCIA.
- Skoog, D., West, D., Holler, J., & Crouch, S. (2015). *Fundamentos de Química Analítica*. Mexico: Cengage Learning.
- Soto, L. R. (2005). *Guía buenas prácticas para la producción de café semi lavado y natural*. Guatemala: Anacafe.
- Velásquez, R. A. (2019). *Guía de variedades de café, Guatemala*. Guatemala: Anacafe.
- Velez, L. F. (2011). *Guía de capacitación para Baristas*. Colombia: Fideicomiso Programa de Promoción de Consumo.
- Wade, J. (2011). *Química Orgánica*. México: Pearson Educacion.
- Wu, C. (2017). Multiresidue method for the determination of pesticides in Oolong tea using QuEChERS by gas chromatography-triple quadrupole tandem mass spectrometry. *Food Chem*, 580–587.

## IX. Anexos

A. Datos obtenidos de las curvas de calibración para la validación del método de detección y cuantificación de glifosato.

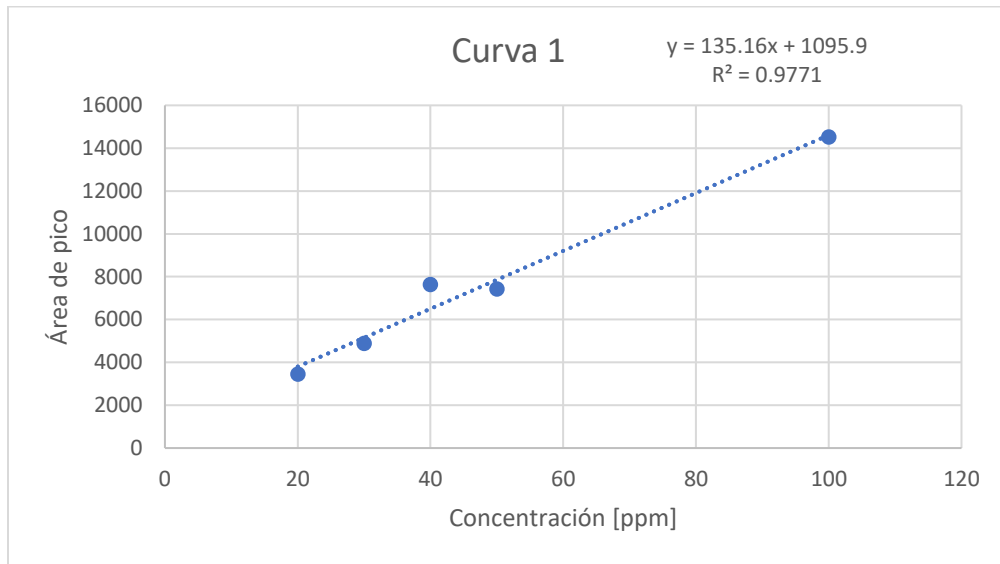
*Cuadro 12: Áreas del pico de glifosato por concentración y curva de calibración*

[c] (ppm)	A1 (unidad de área)	A2 (unidad de área)	A3 (unidad de área)	A4 (unidad de área)	A5 (unidad de área)	A6 (unidad de área)	A7 (unidad de área)	A8 (unidad de área)
20	3456	3897	4261	2142	2561	3282	4813	4506
30	4879	6539	7696	4709	4509	4607	7022	4402
40	7632	8951	10399	5348	6128	7362	8748	8511
50	7427	11605	10482	7116	7102	7866	10817	10778
100	14523	18525	24198	12324	11306	21522	23042	21061

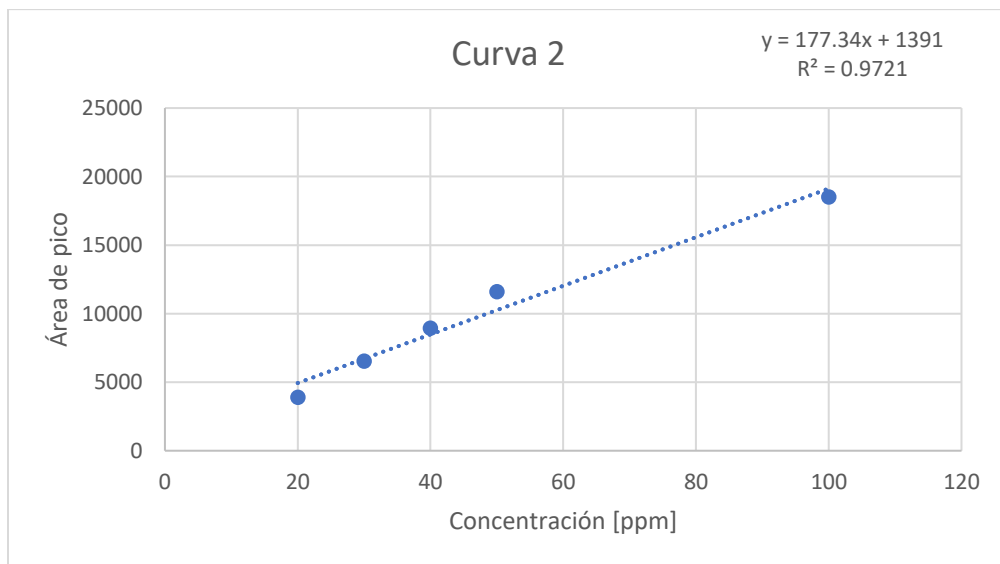
*Cuadro 13: Tiempos de retención del glifosato en cada curva de calibración*

[c] (ppm)	Tr 1 (min)	Tr 2 (min)	Tr 3 (min)	Tr 4 (min)	Tr 5 (min)	Tr 6 (min)	Tr 7 (min)	Tr 8 (min)
20	6.68	6.43	6.5	6.58	6.4	6.34	6.44	6.46
30	6.67	6.5	6.48	6.61	6.44	6.29	6.51	6.45
40	6.68	6.51	6.53	6.41	6.44	6.32	6.48	6.44
50	6.71	6.53	6.59	6.41	6.47	6.29	6.47	6.45
100	6.68	6.53	6.54	6.42	6.4	5.87	6.45	6.45

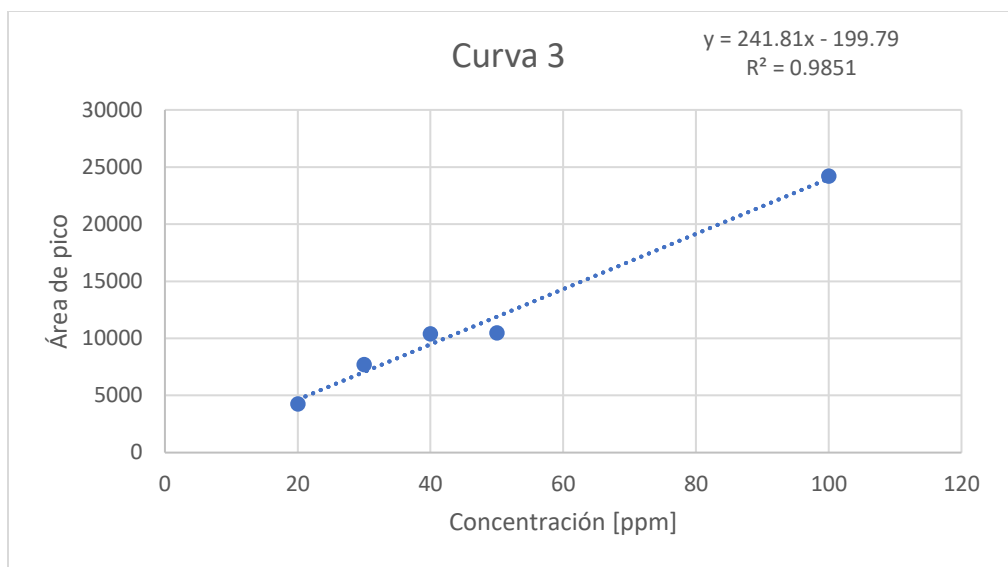
*B. Curvas de calibración para la validación del método de detección y cuantificación de glifosato*



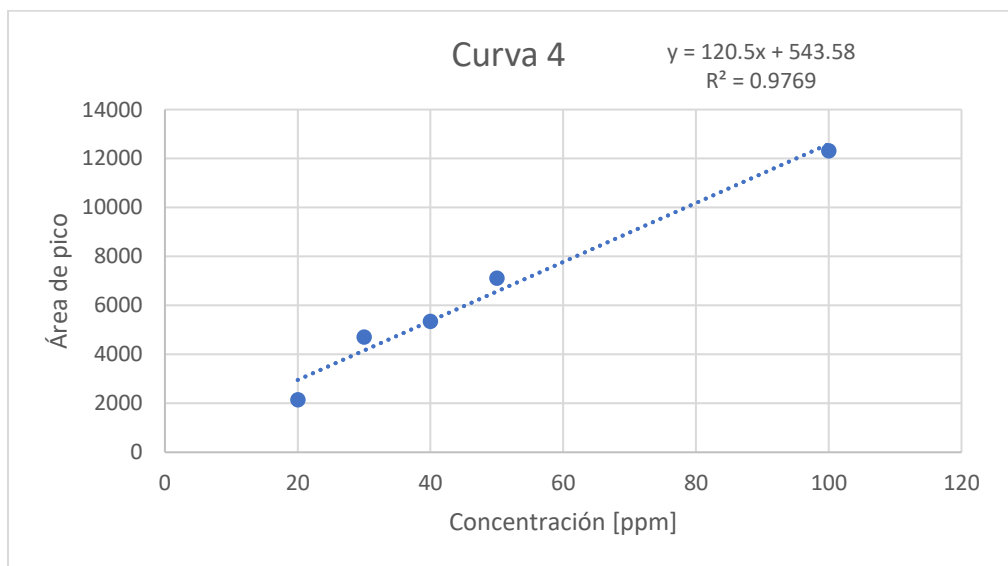
*Figura 4: Curva de calibración 1*



*Figura 5: Curva de calibración 2*



*Figura 6: Curva de calibración 3*



*Figura 7: Curva de calibración 6*

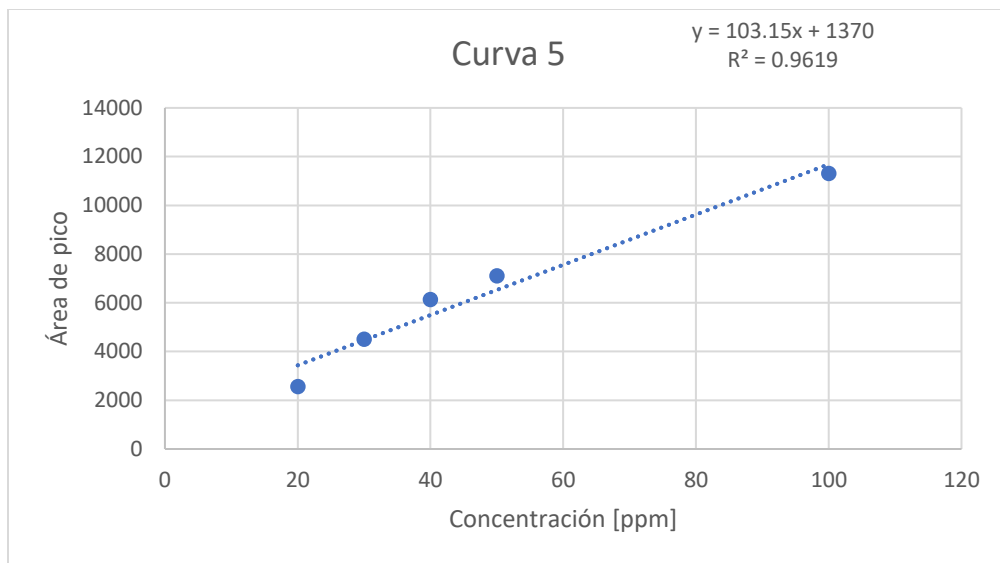


Figura 8: Curva de calibración 5

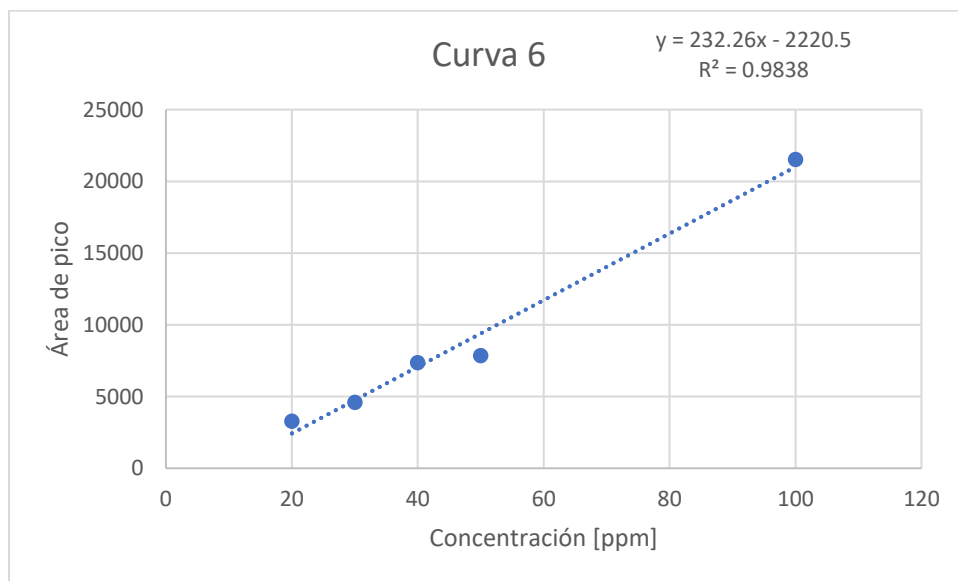
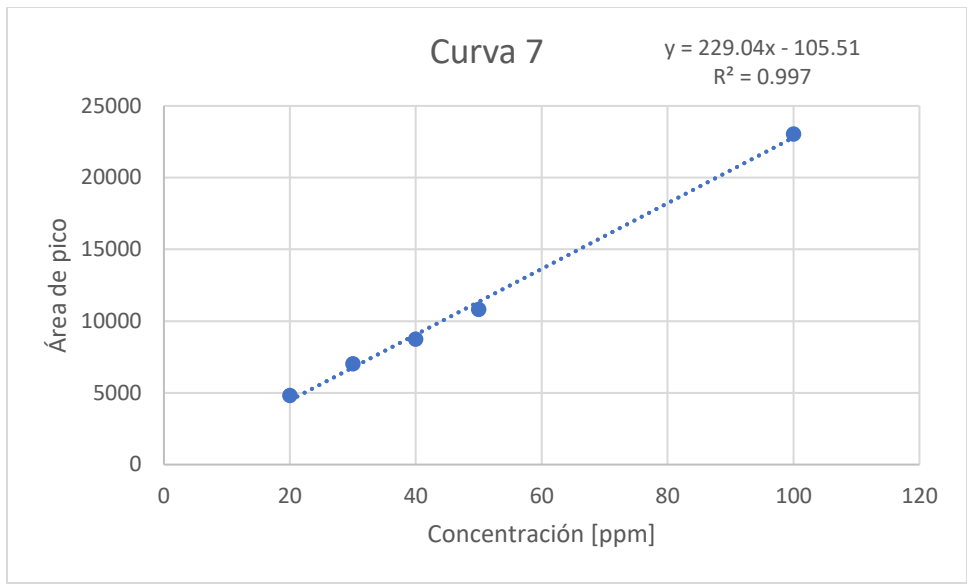
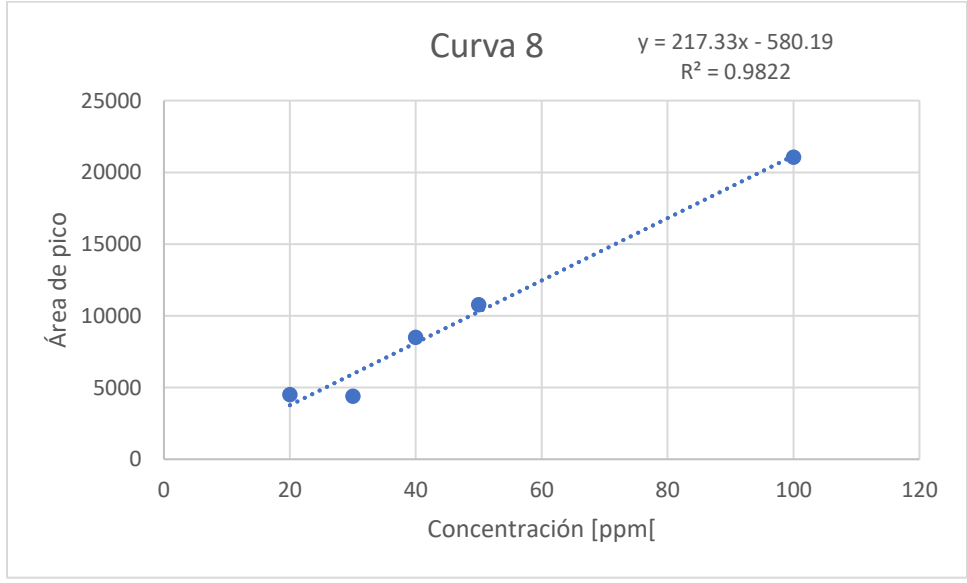


Figura 9: Curva de calibración 6



*Figura 10: Curva de calibración 7*



*Figura 11: Curva de calibración 8*

C. Cromatograma y espectros de masas para la identificación del pico de Glifosato

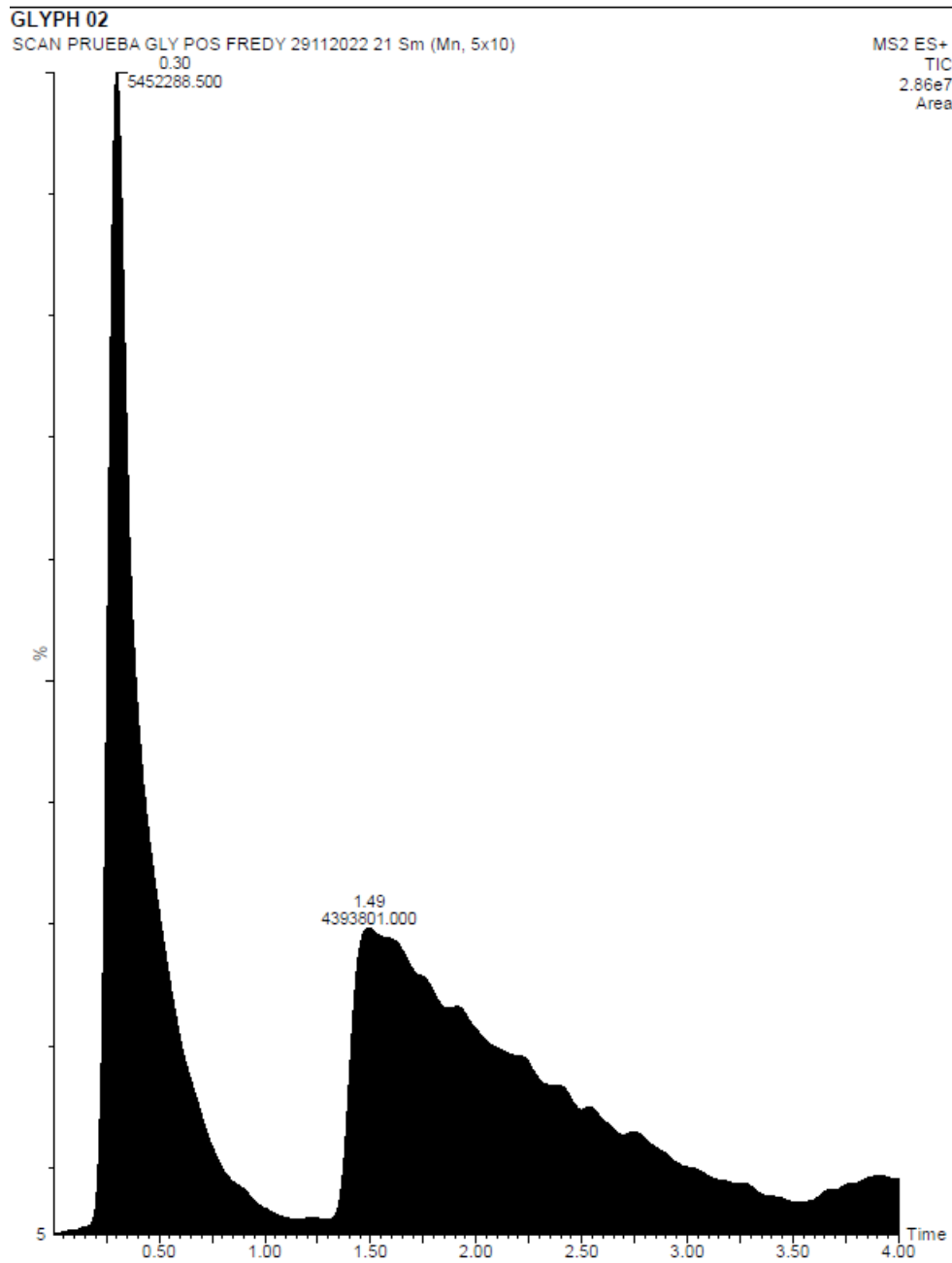


Figura 12: Cromatograma de inyección de estandar de glifosato en cromatografo líquido UPLC.

GLYPH 02

SCAN PRUEBA GLY POS FREDY 29112022 21 757 (1.588)

MS2 ES+  
2.22e6

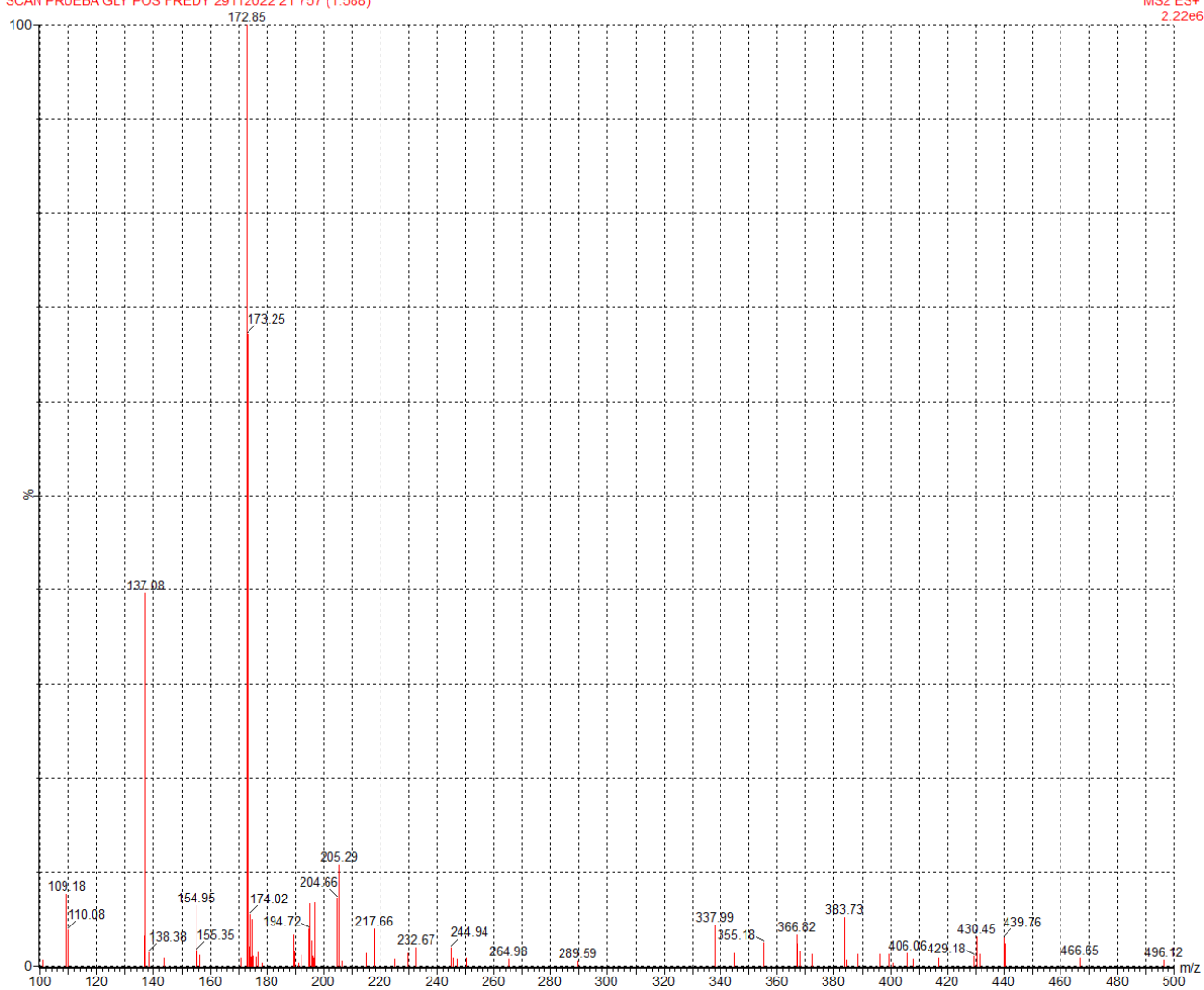


Figura 13: Espectro de masas de solución de glifosato sin derivatizar

GLYPH 02

SCAN PRUEBA GLY POS FREDY 29112022 20 171 (0.359)

MS2 ES+

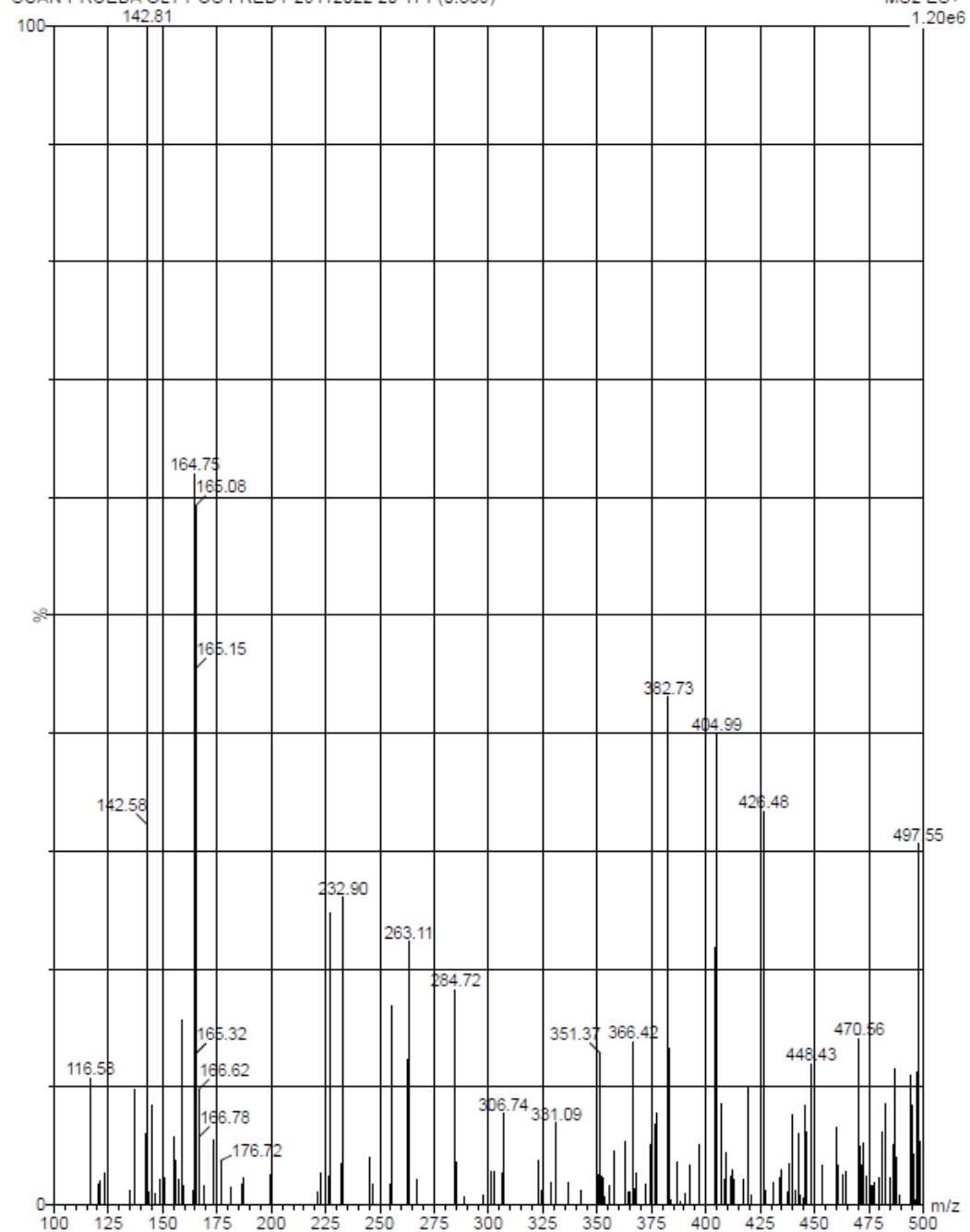


Figura 14: Espectro de masa para primer pico de cromatograma generado por cromatógrafo líquido UPLC.

D. Cromatogramas de las soluciones de Glifosato para LOD y LOQ

La flecha negra corresponde al derivatizante, flecha azul corresponde al Glifosato y la flecha naranja al AMPA.

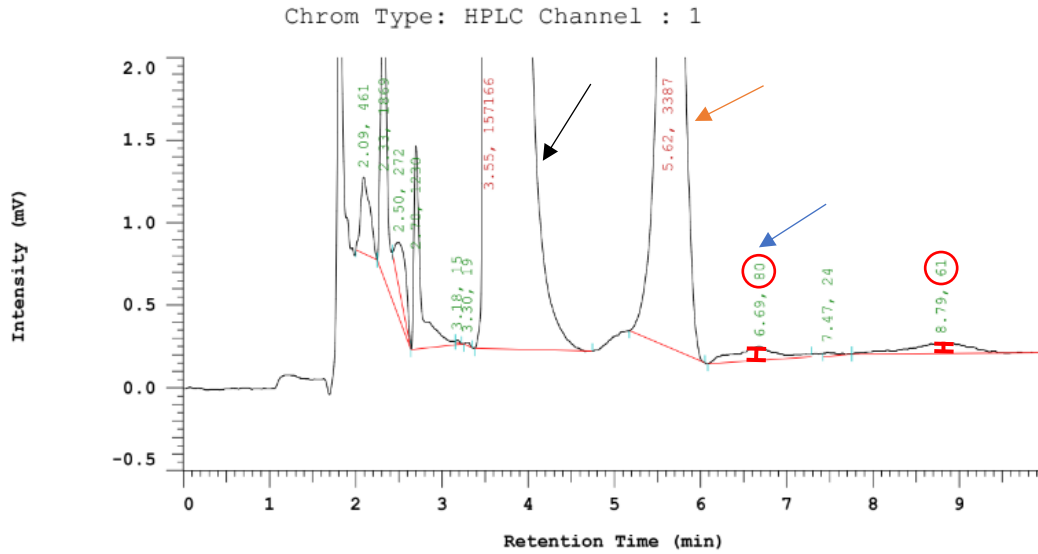


Figura 15: Cromatograma para límite de detección de glifosato, solución a 4ppm, Pico de glifosato en 6.69min.

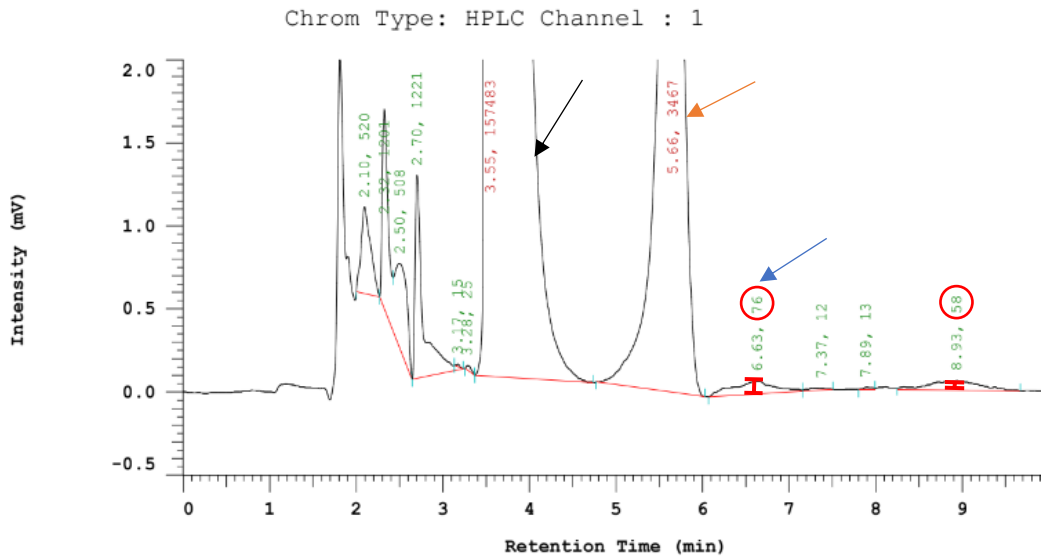


Figura 16: Cromatograma para determinación de límite de detección y cuantificación de glifosato, solución a 4ppm. Pico de glifosato en 6.60min.

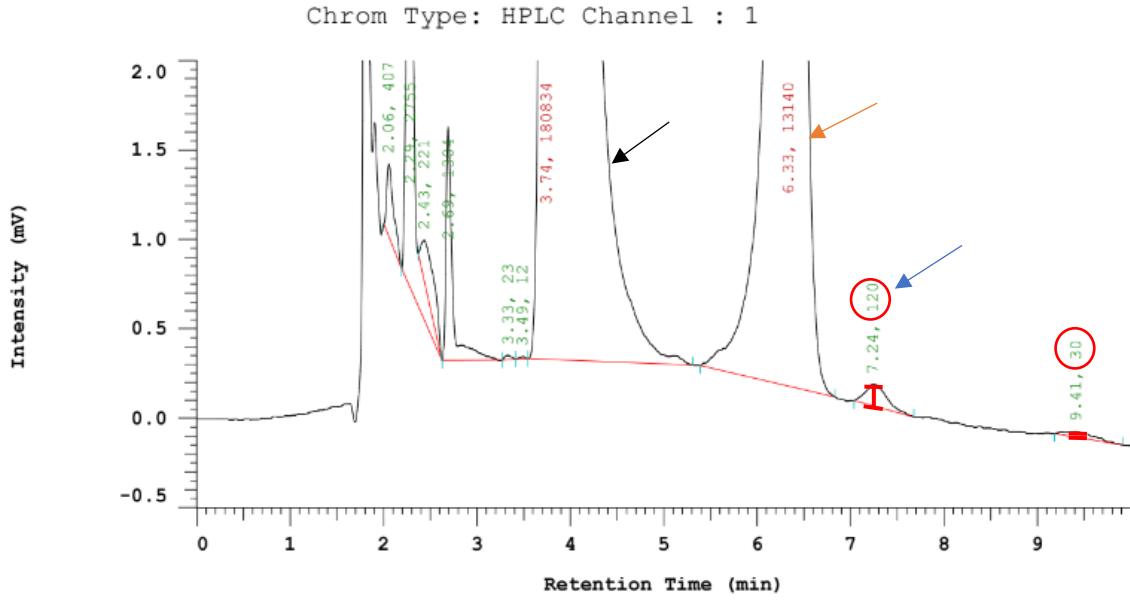


Figura 17: Cromatograma para límite de cuantificación de glifosato, solución a 10ppm, pico de glifosato en 7.24 min.

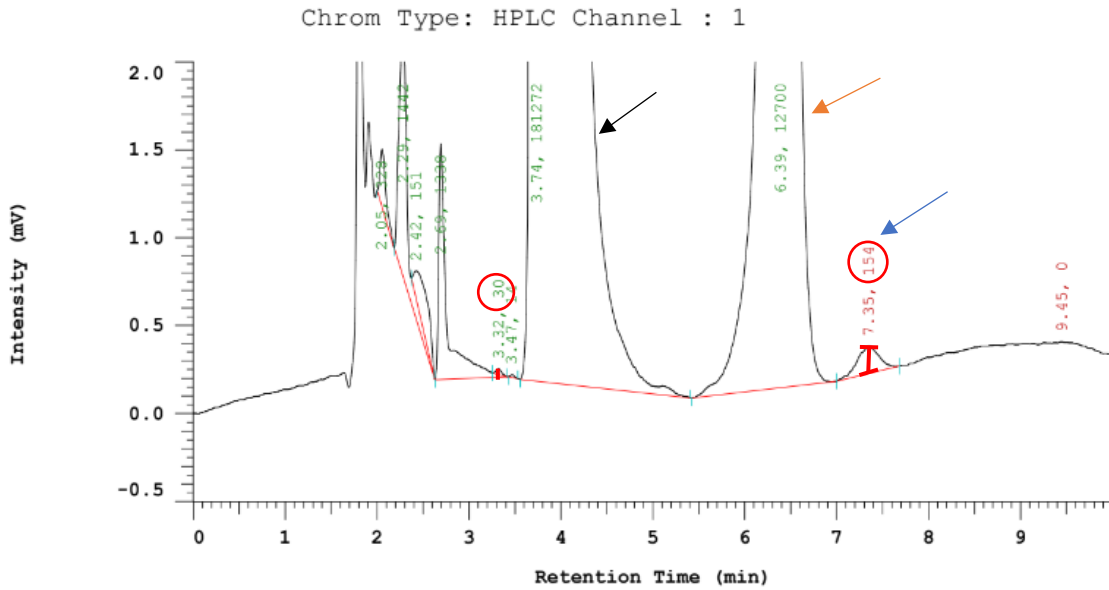
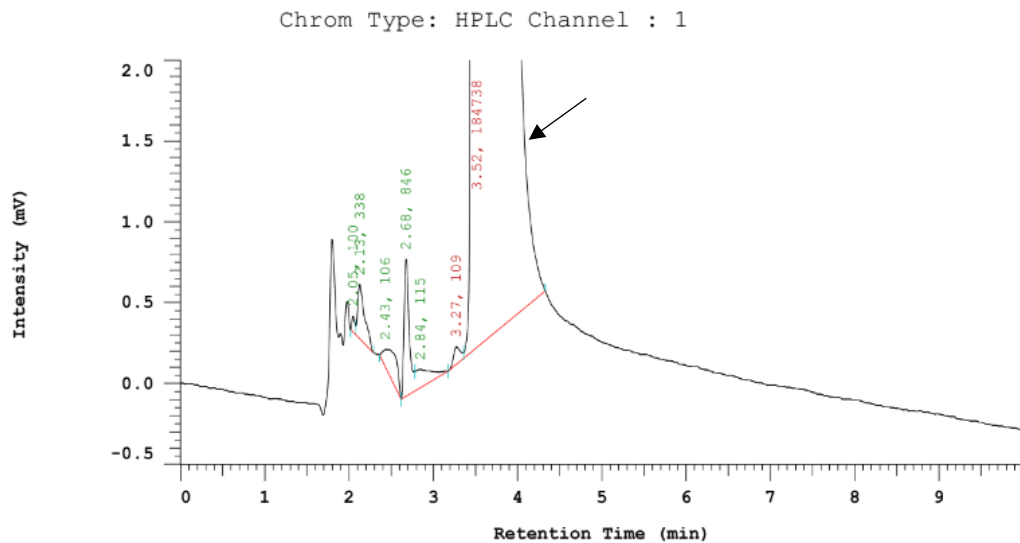


Figura 18: Cromatograma para límite de cuantificación de glifosato, solución a 10ppm, pico de glifosato en 7.35 min.



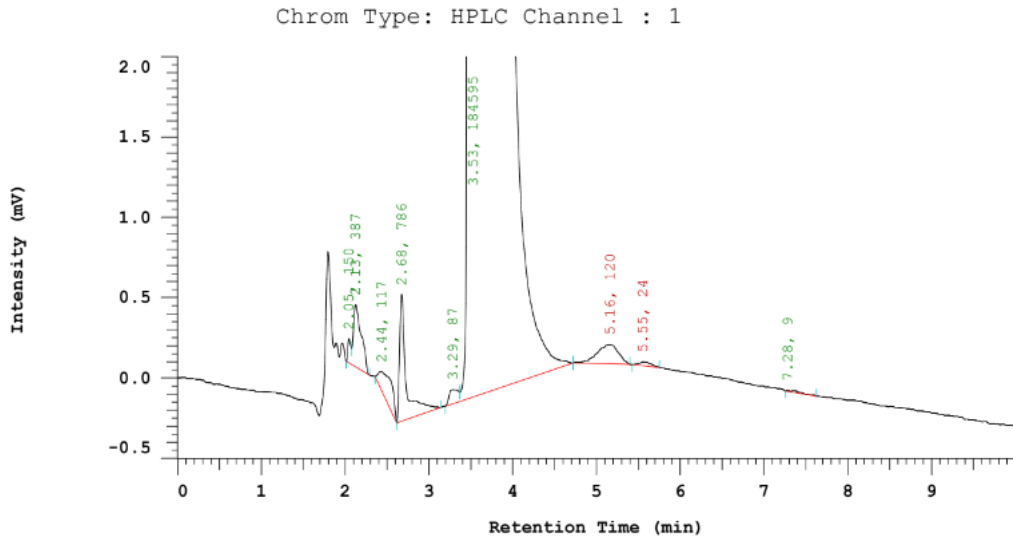


Figura 21: Cromatograma de solución de glifosato derivatizada a 0.04ppm

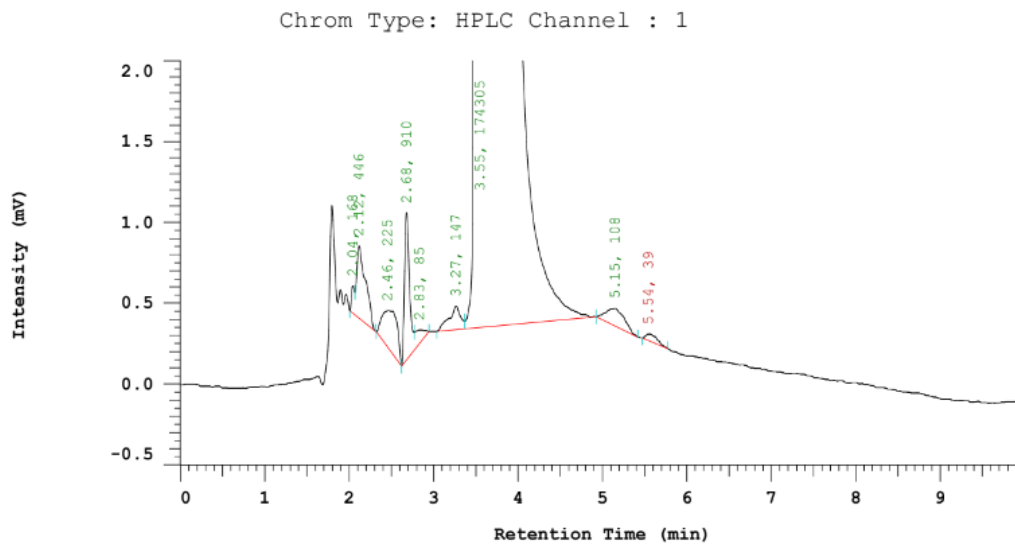


Figura 22: Cromatograma de solución de glifosato derivatizada a 0.06ppm

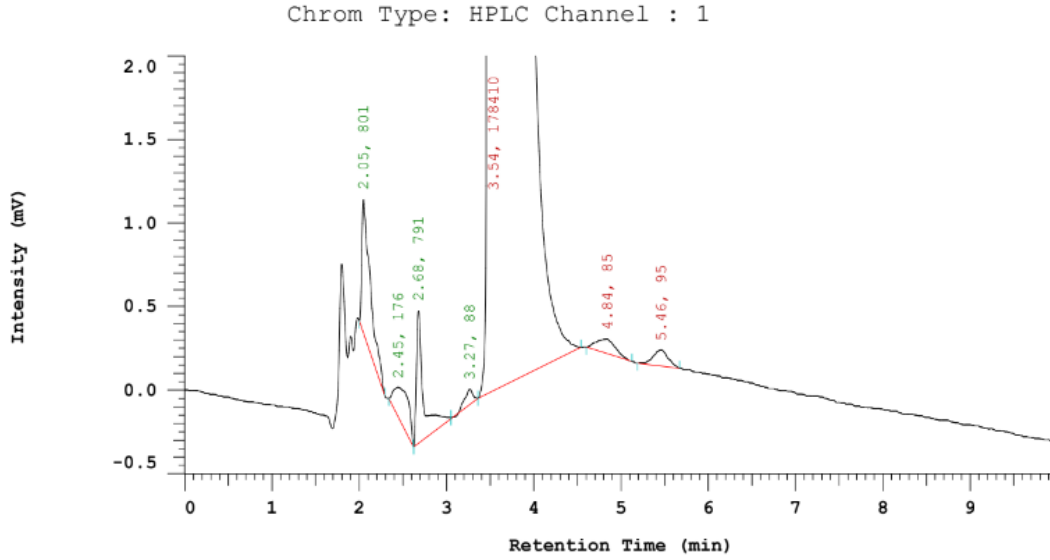


Figura 23: Cromatograma de solución de glifosato derivatizada a 0.08ppm

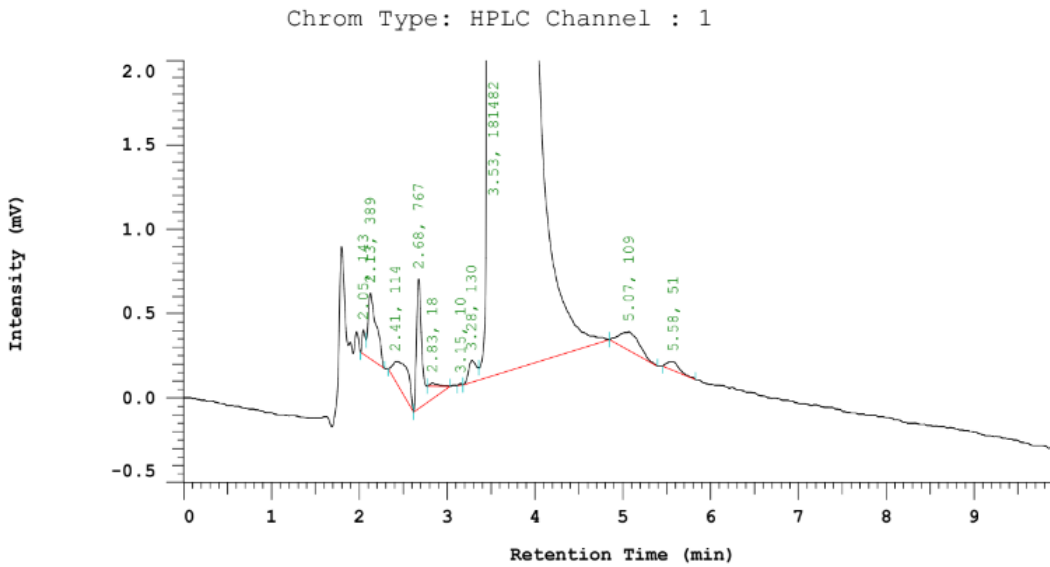


Figura 24: Cromatograma de solución de glifosato derivatizada a 0.1ppm

E. Cromatogramas de las soluciones de Glifosato para curvas de calibración

1. Curva 1

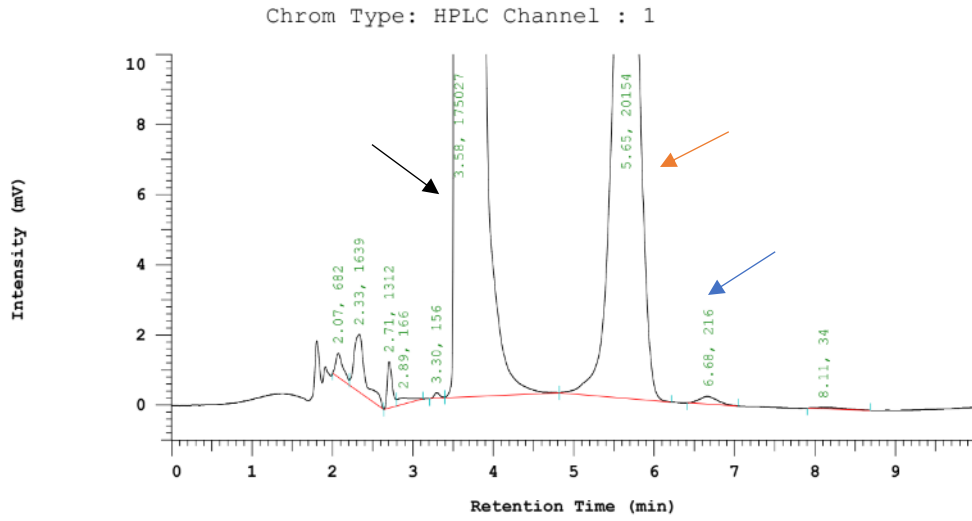


Figura 25: Cromatograma para solución a 20ppm.

Pico de glifosato en 6.68mins. Pico de AMPA en 5.65mins. Pico de derivatizante en 3.58mins.

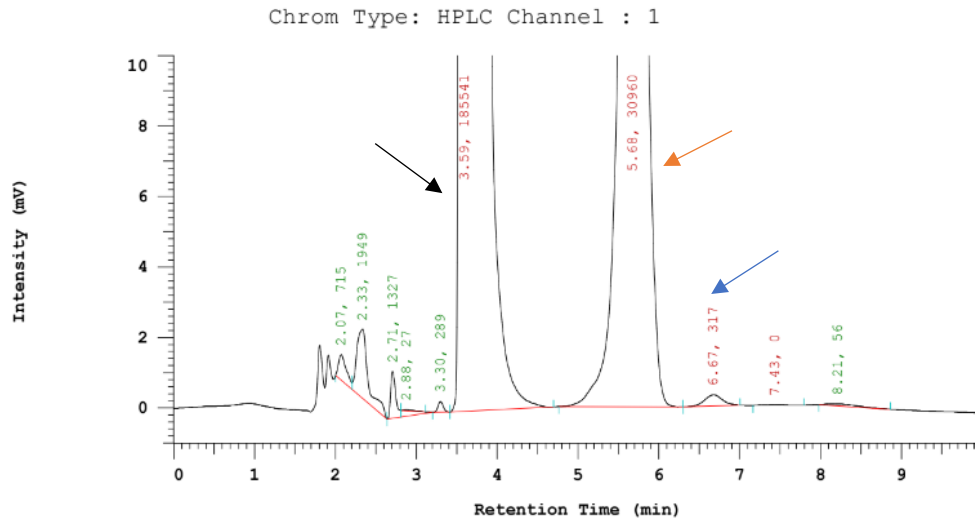


Figura 26: Cromatograma para solución a 30ppm.

Pico de glifosato en 6.67mins. Pico de AMPA en 5.68mins. Pico de derivatizante en 3.59mins.

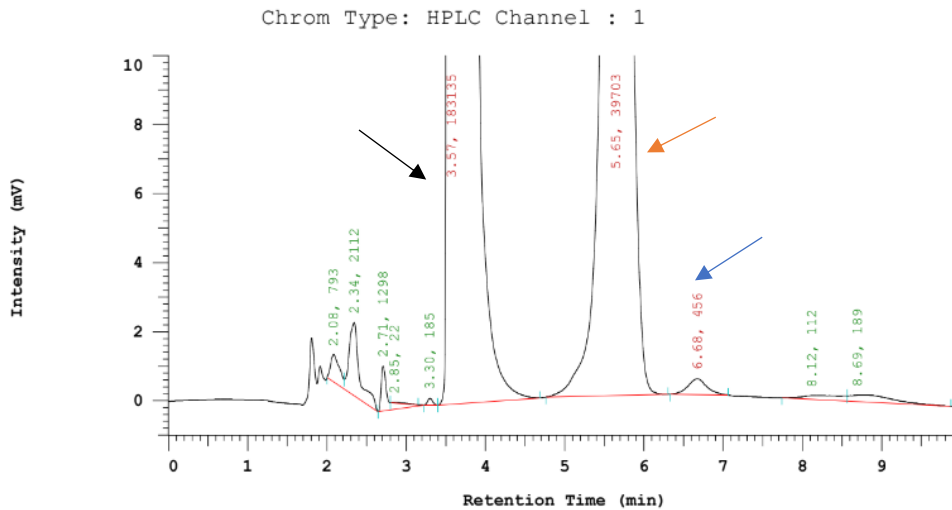


Figura 27: Cromatograma para solución a 40ppm.

Pico de glifosato en 6.68mins. Pico de AMPA en 5.65mins. Pico de derivatizante en 3.57mins.

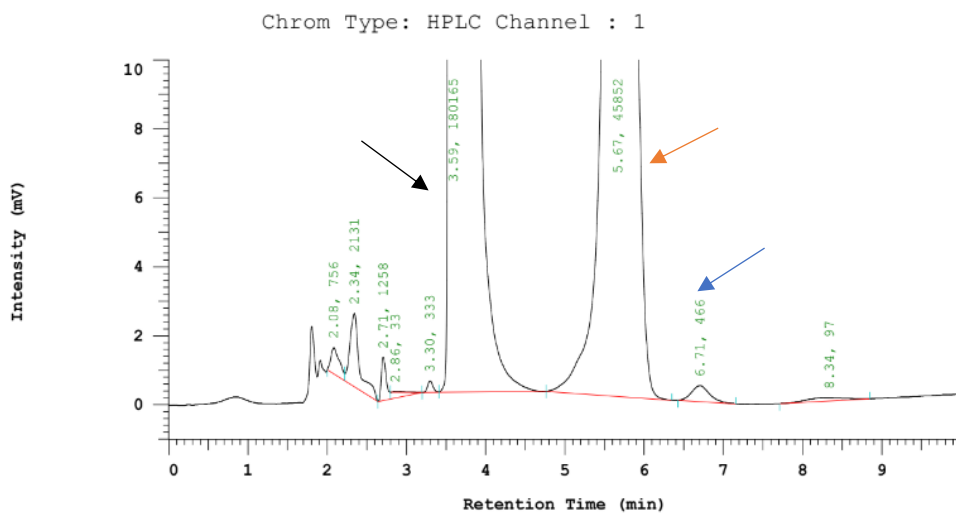


Figura 28: Cromatograma para solución a 50ppm.

Pico de glifosato en 6.71mins. Pico de AMPA en 5.67mins. Pico de derivatizante en 3.59mins.

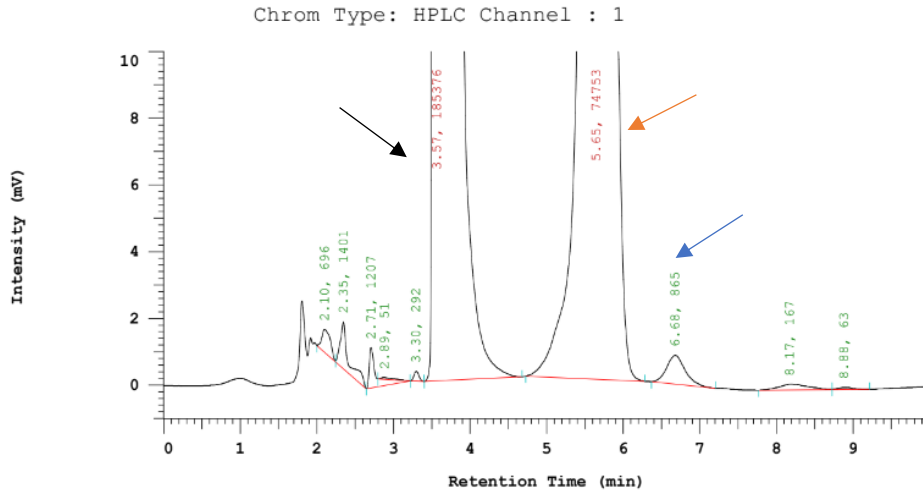


Figura 29: Cromatograma para solución a 100ppm.

Pico de glifosato en 6.68mins. Pico de AMPA en 5.65mins. Pico de derivatizante en 3.57mins.

## 2. Curva 2

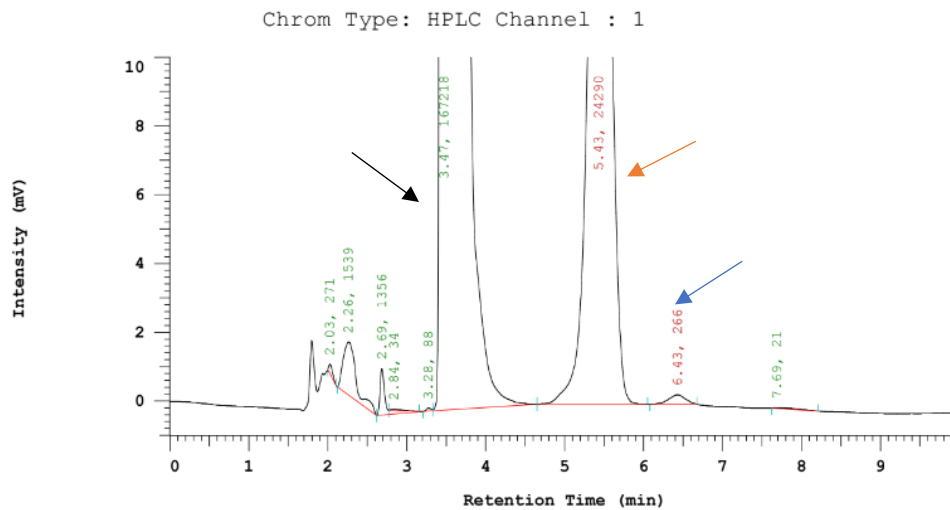


Figura 30: Cromatograma para solución a 20ppm.

Pico de glifosato en 6.43mins. Pico de AMPA en 5.43mins. Pico de derivatizante en 3.47mins.

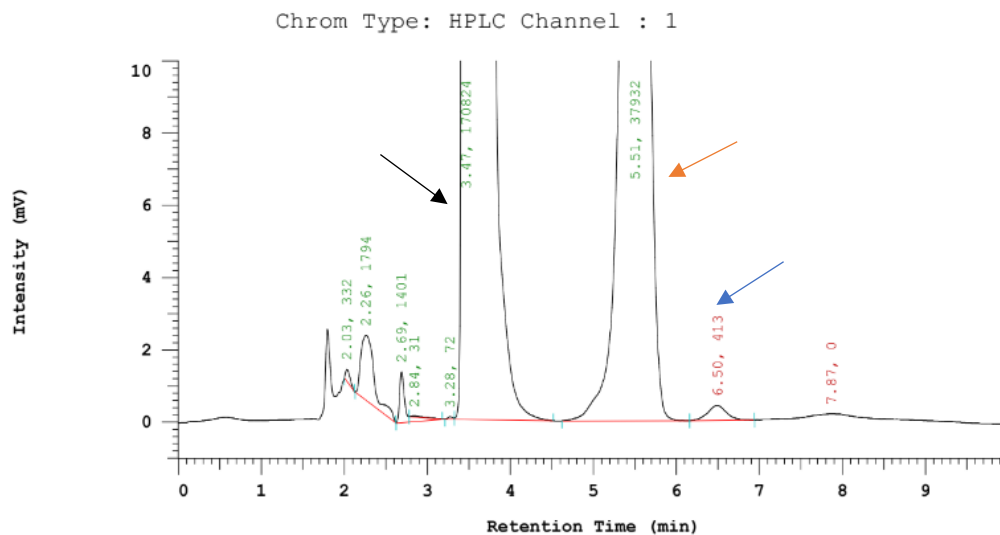


Figura 31: Cromatograma para solución a 30ppm.

Pico de glifosato en 6.50mins. Pico de AMPA en 5.51mins. Pico de derivatizante en 3.47mins.

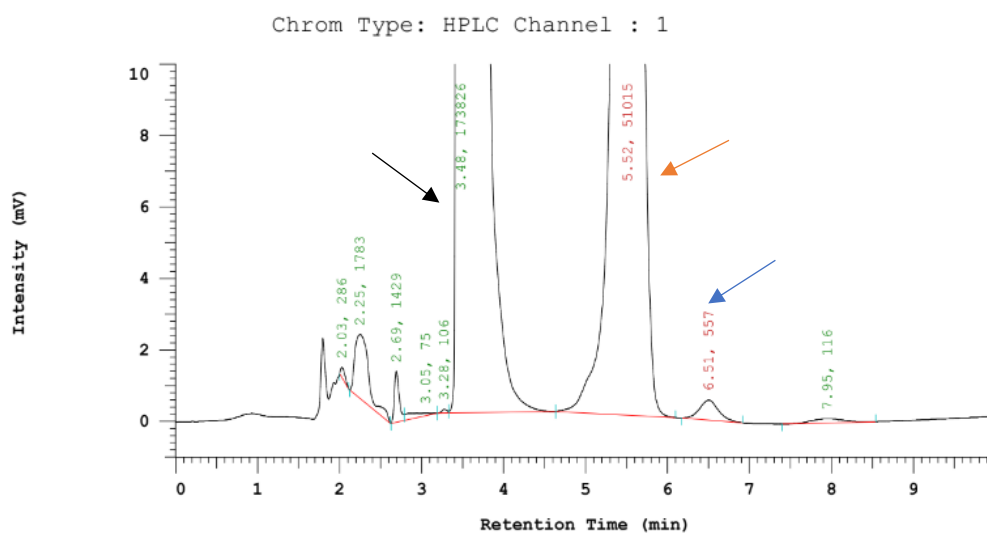


Figura 32: Cromatograma para solución a 40ppm.

Pico de glifosato en 6.51mins. Pico de AMPA en 5.52mins. Pico de derivatizante en 3.48mins.

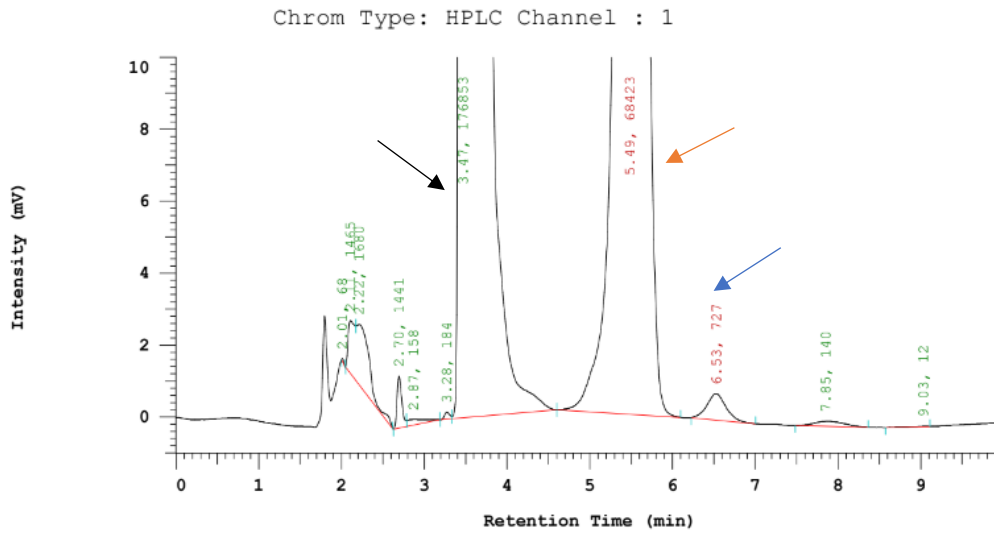


Figura 33: Cromatograma para solución a 50ppm.

Pico de glifosato en 6.53mins. Pico de AMPA en 5.49mins. Pico de derivatizante en 3.47mins.

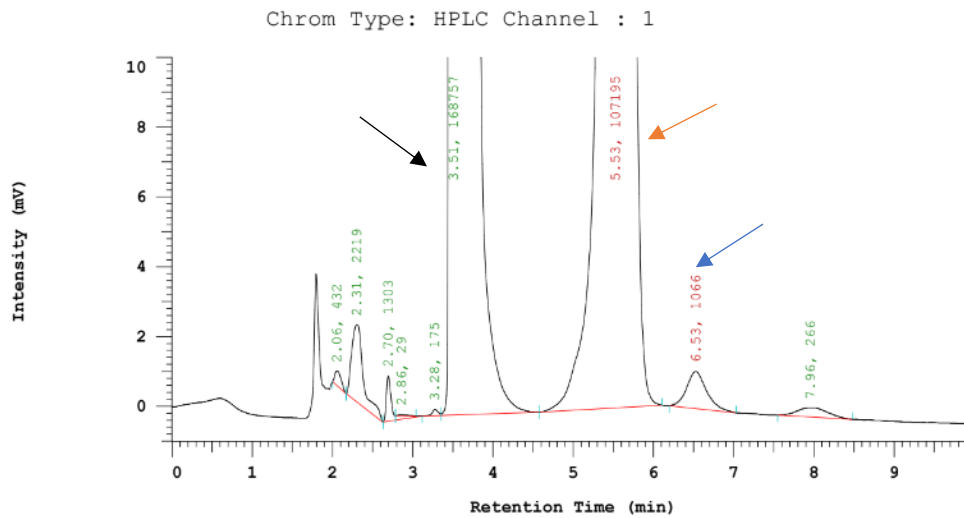


Figura 34: Cromatograma para solución a 100ppm.

Pico de glifosato en 6.53mins. Pico de AMPA en 5.53mins. Pico de derivatizante en 3.51mins.

### 3. Curva 3

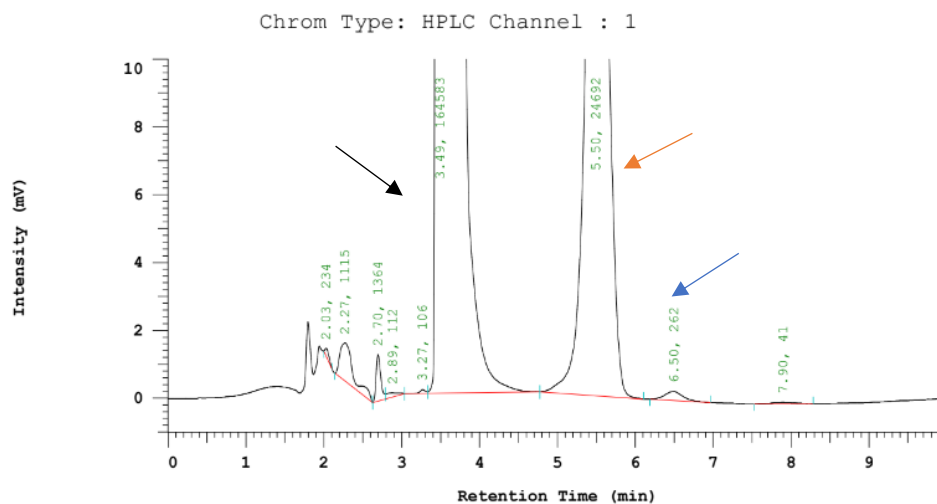


Figura 35: Cromatograma para solución a 20ppm.

Pico de glifosato en 6.50mins. Pico de AMPA en 5.50mins. Pico de derivatizante en 3.49mins.

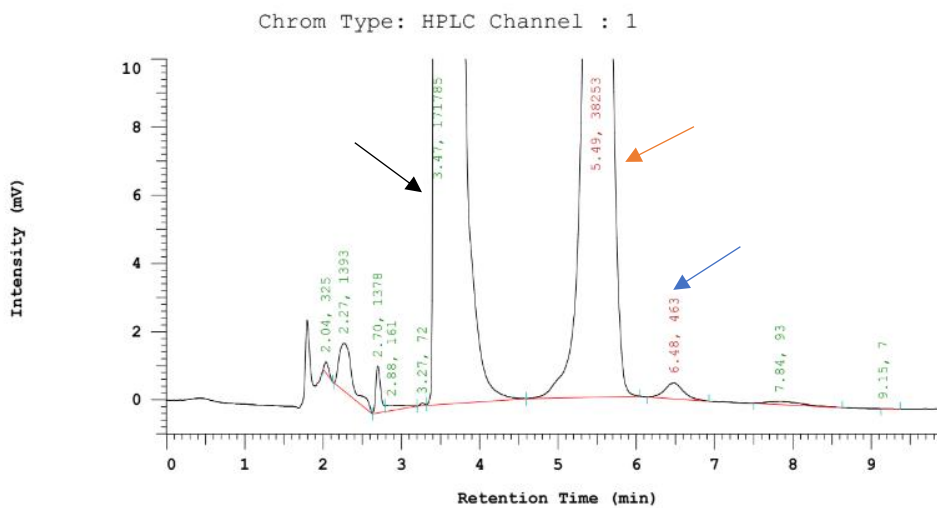


Figura 36: Cromatograma para solución a 30ppm

Pico de glifosato en 6.48mins. Pico de AMPA en 5.49mins. Pico de derivatizante en 3.47mins.

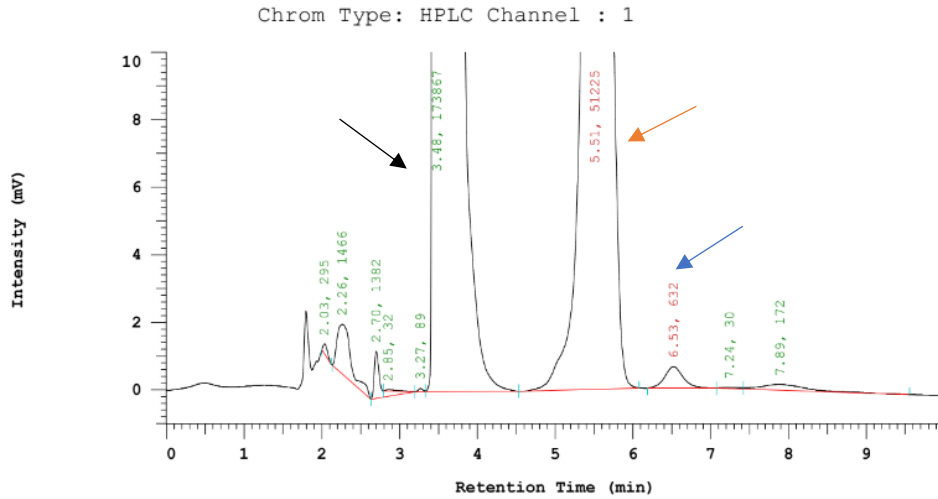


Figura 37: Cromatograma para solución a 40ppm.

Pico de glifosato en 6.53mins. Pico de AMPA en 5.51mins. Pico de derivatizante en 3.48mins.

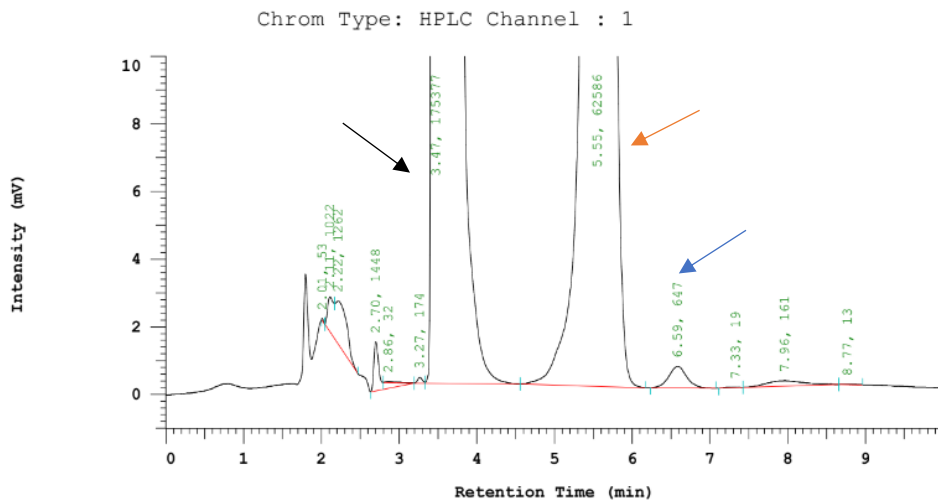


Figura 38: Cromatograma para solución a 50ppm.

Pico de glifosato en 6.59mins. Pico de AMPA en 5.55mins. Pico de derivatizante en 3.47mins.

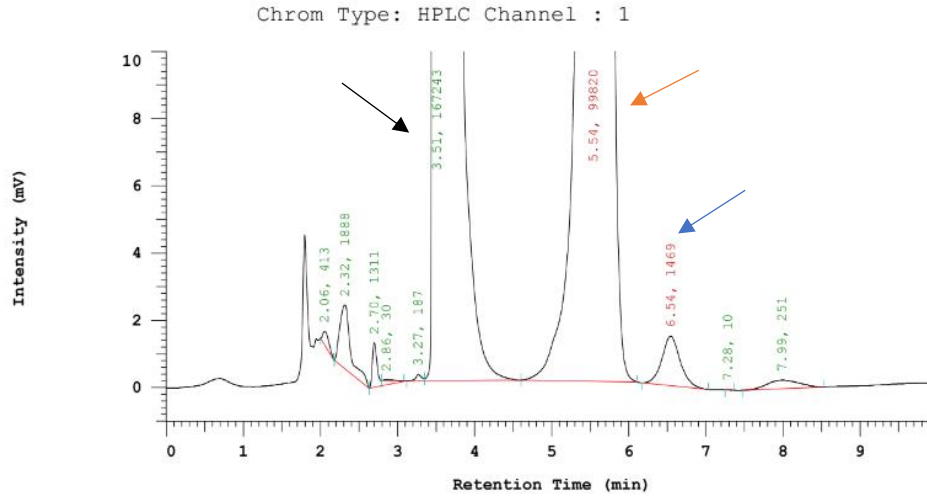


Figura 39: Cromatograma para solución a 100ppm.

Pico de glifosato en 6.54mins. Pico de AMPA en 5.54mins. Pico de derivatizante en 3.51mins.

#### 4. Curva 4

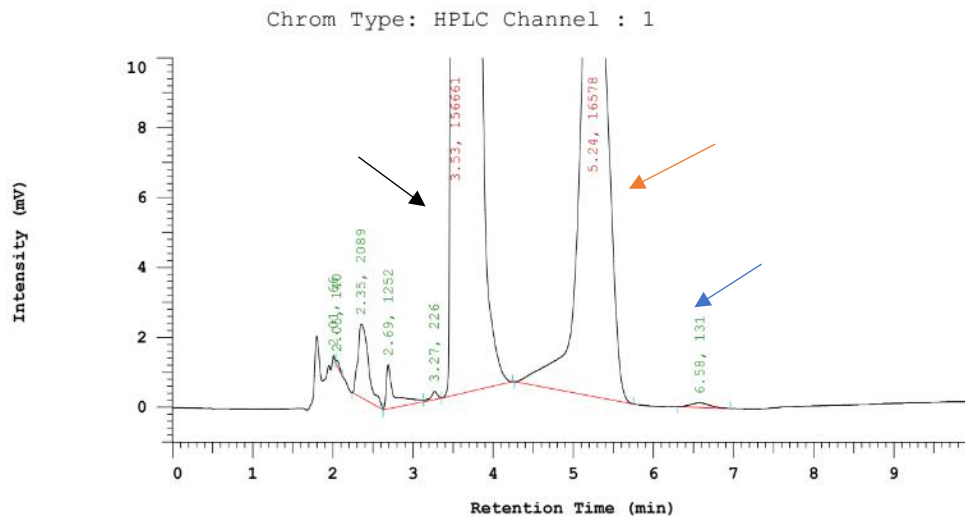


Figura 40: Cromatograma para solución a 20ppm.

Pico de glifosato en 6.58mins. Pico de AMPA en 5.24mins. Pico de derivatizante en 3.53mins.

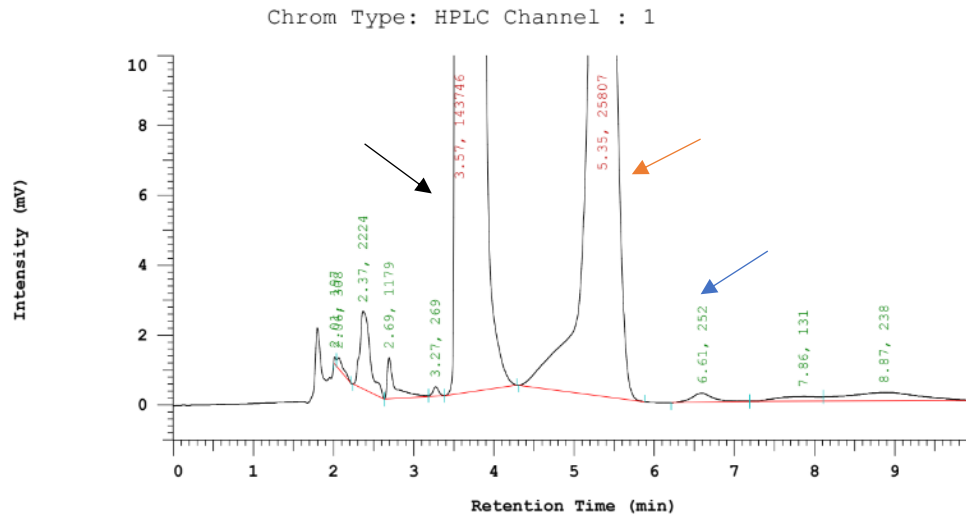


Figura 41: Cromatograma para solución a 30ppm.

Pico de glifosato en 6.61mins. Pico de AMPA en 5.35mins. Pico de derivatizante en 3.57mins.

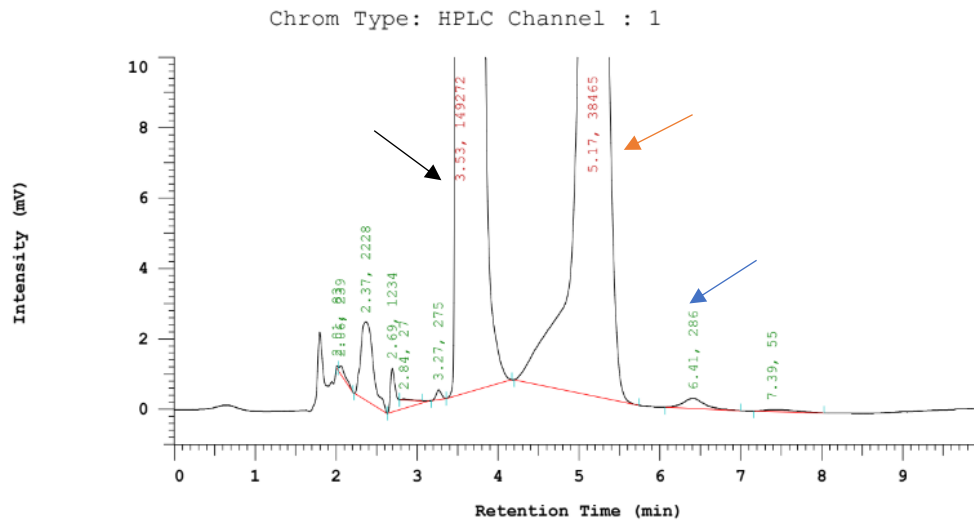


Figura 42: Cromatograma para solución a 40ppm.

Pico de glifosato en 6.41mins. Pico de AMPA en 5.17mins. Pico de derivatizante en 3.53mins.

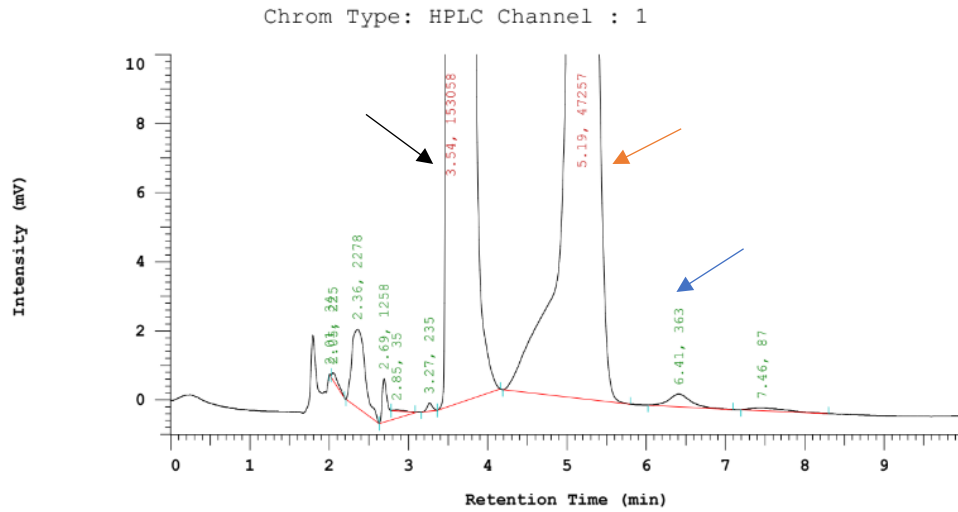


Figura 43: Cromatograma para solución a 50ppm.

Pico de glifosato en 6.41mins. Pico de AMPA en 5.19mins. Pico de derivatizante en 3.54mins.

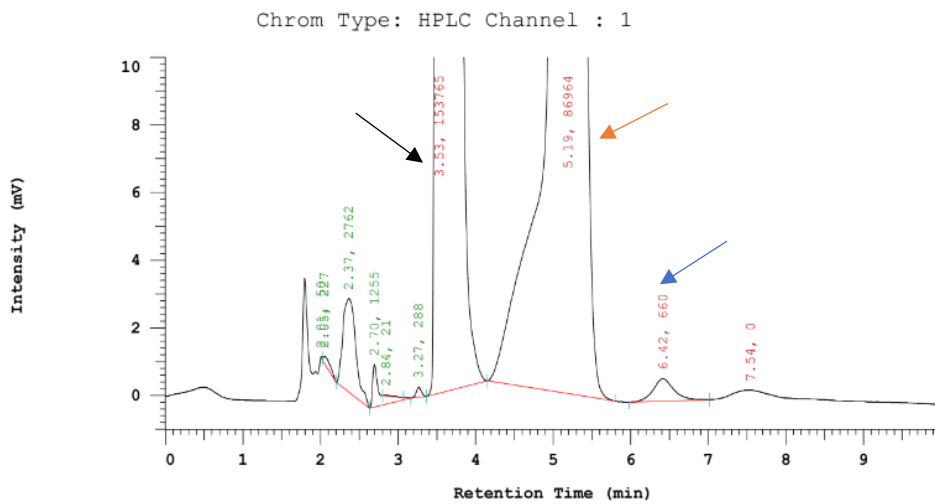


Figura 44: Cromatograma para solución a 100ppm.

Pico de glifosato en 6.42mins. Pico de AMPA en 5.19mins. Pico de derivatizante en 3.53mins.

5. Curva 5

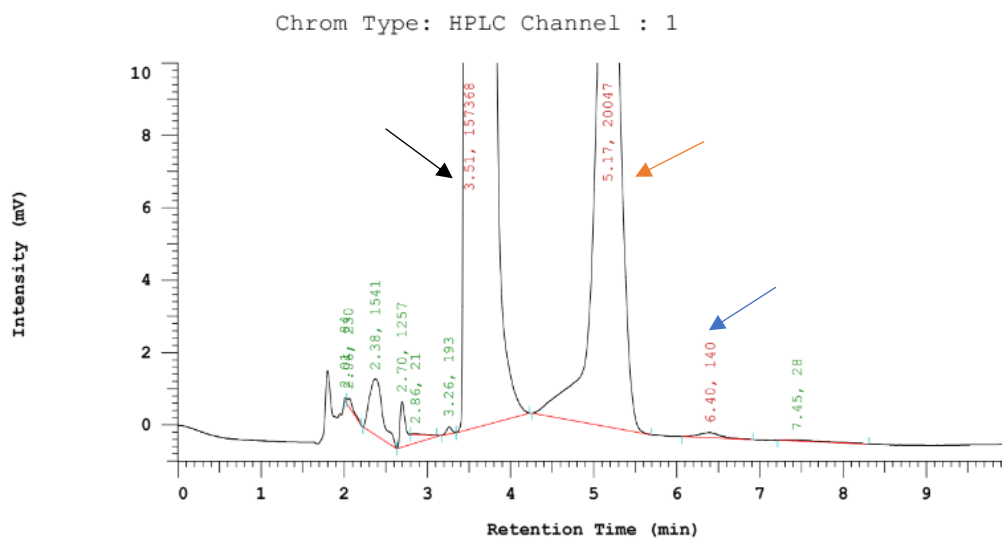


Figura 45: Cromatograma para solución a 20ppm.

Pico de glifosato en 6.40mins. Pico de AMPA en 5.17mins. Pico de derivatizante en 3.51mins.

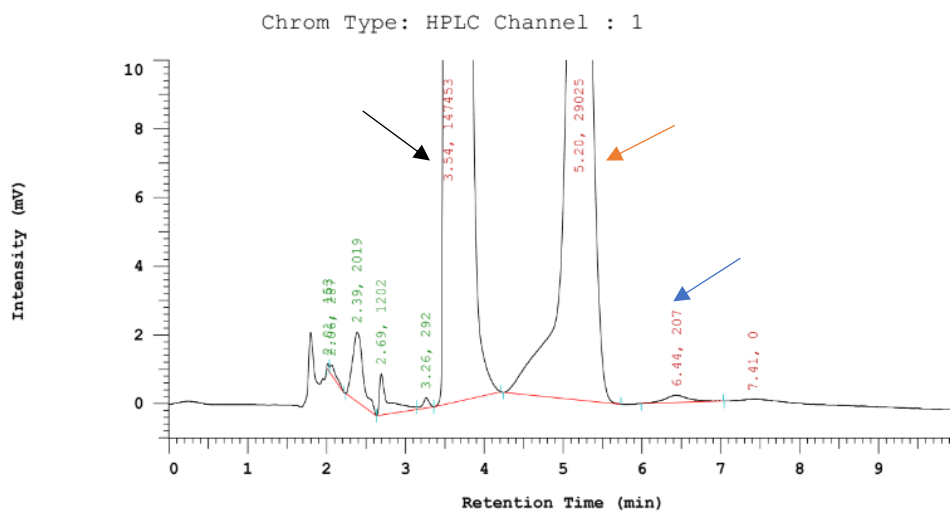


Figura 46: Cromatograma para solución a 30ppm.

Pico de glifosato en 6.44mins. Pico de AMPA en 5.20mins. Pico de derivatizante en 3.54mins.

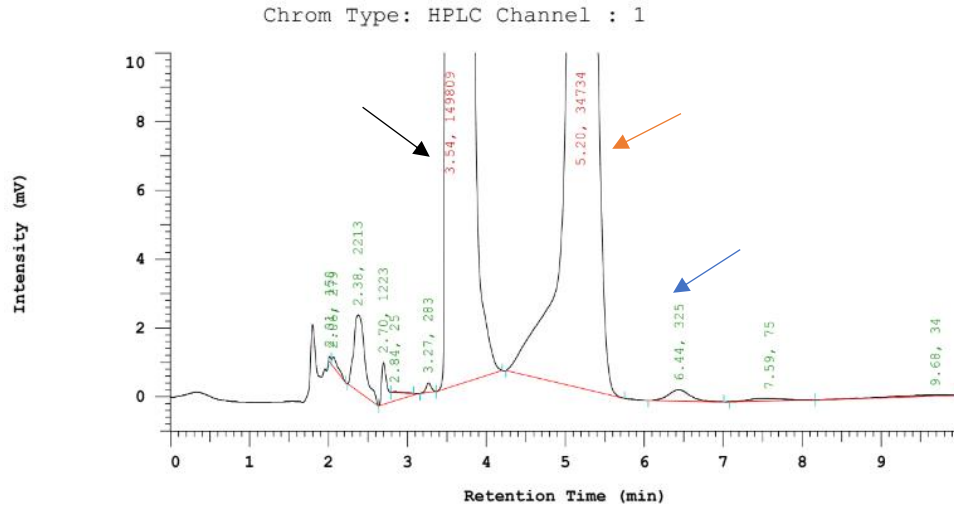


Figura 47: Cromatograma para solución a 40ppm.

Pico de glifosato en 6.44mins. Pico de AMPA en 5.20mins. Pico de derivatizante en 3.54mins.

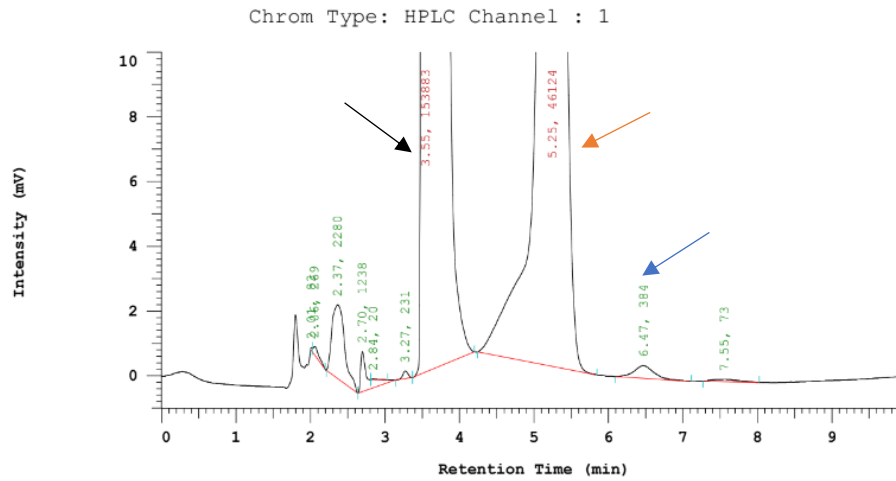


Figura 48: Cromatograma para solución a 50ppm.

Pico de glifosato en 6.47mins. Pico de AMPA en 5.25mins. Pico de derivatizante en 3.55mins.

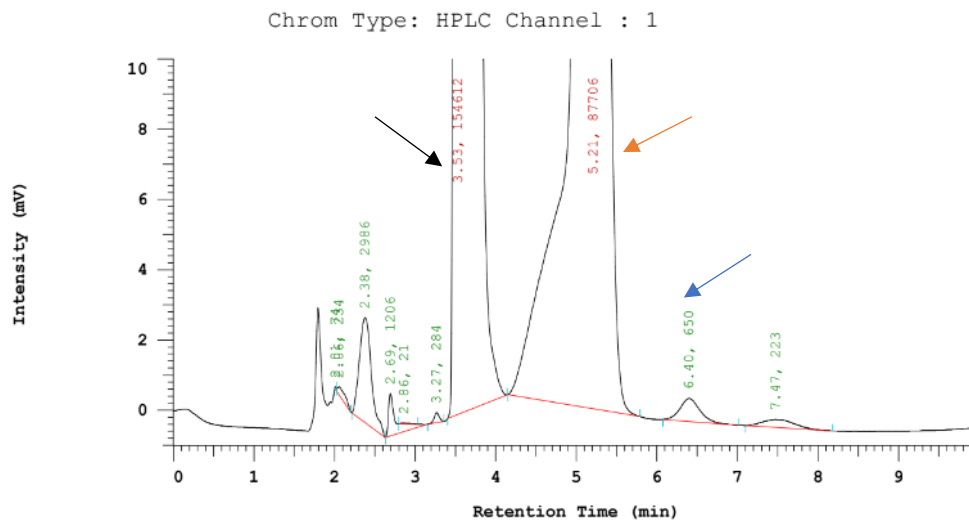


Figura 49: Cromatograma para solución a 100ppm.

Pico de glifosato en 6.40mins. Pico de AMPA en 5.21mins. Pico de derivatizante en 3.53mins.

## 6. Curva 6

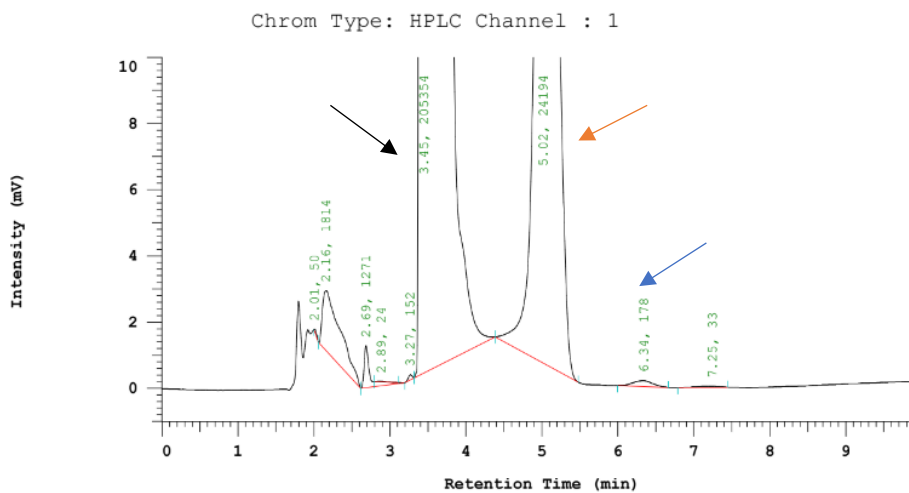


Figura 50: Cromatograma para solución a 20ppm.

Pico de glifosato en 6.34mins. Pico de AMPA en 5.02mins. Pico de derivatizante en 3.45mins.

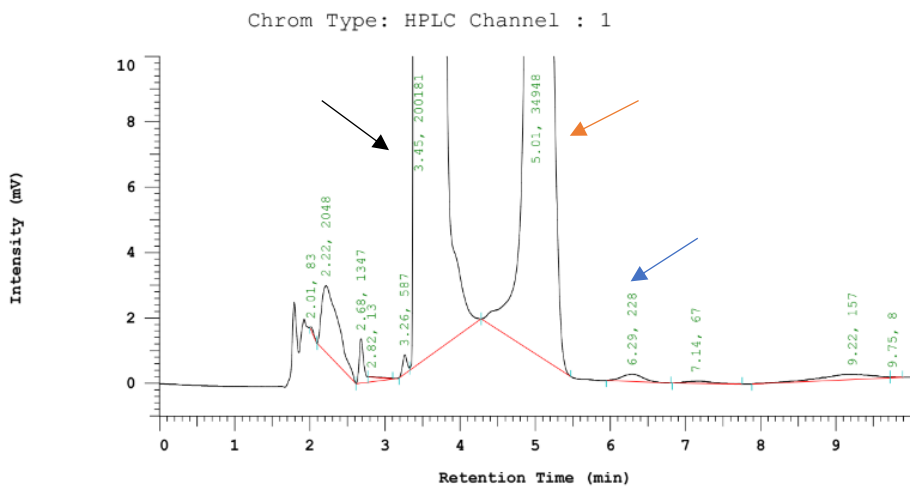


Figura 51: Cromatograma para solución a 30ppm.

Pico de glifosato en 6.29mins. Pico de AMPA en 5.01mins. Pico de derivatizante en 3.45mins.

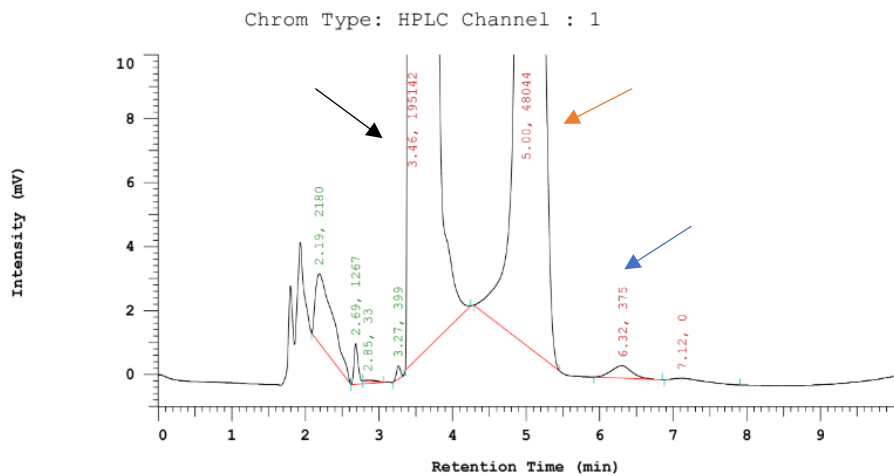


Figura 52: Cromatograma para solución a 40ppm.

Pico de glifosato en 6.32mins. Pico de AMPA en 5.00mins. Pico de derivatizante en 3.46mins.

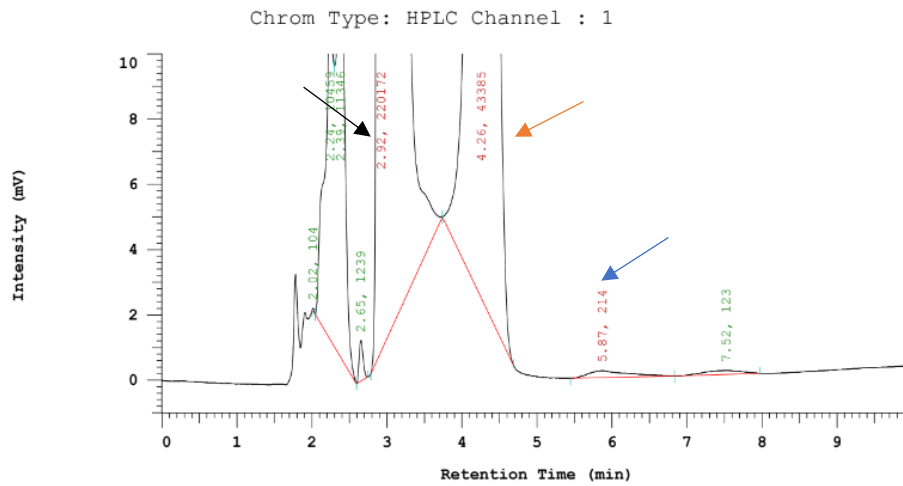


Figura 53: Cromatograma para solución a 50ppm.

Pico de glifosato en 5.87mins. Pico de AMPA en 4.26mins. Pico de derivatizante en 2.92mins.

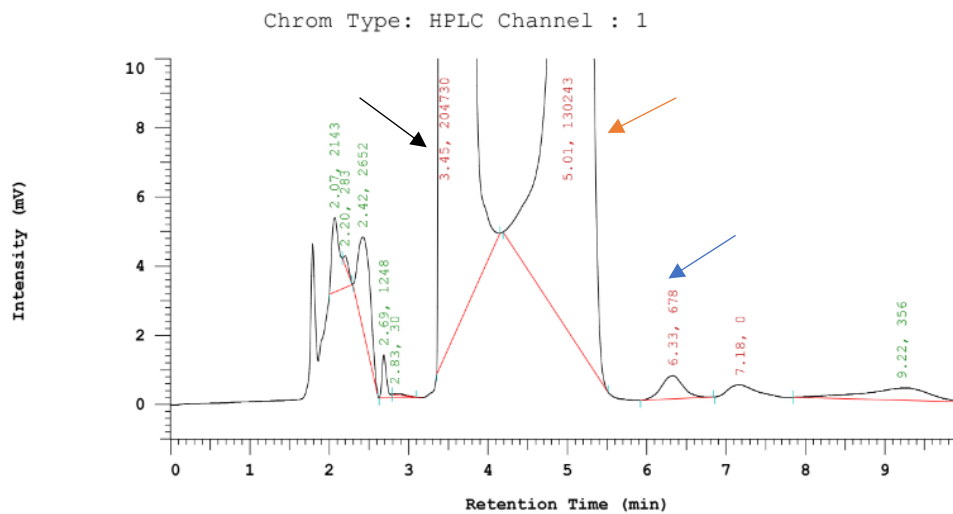


Figura 54: Cromatograma para solución a 100ppm.

Pico de glifosato en 6.33mins. Pico de AMPA en 5.01mins. Pico de derivatizante en 3.45mins.

7. Curva 7

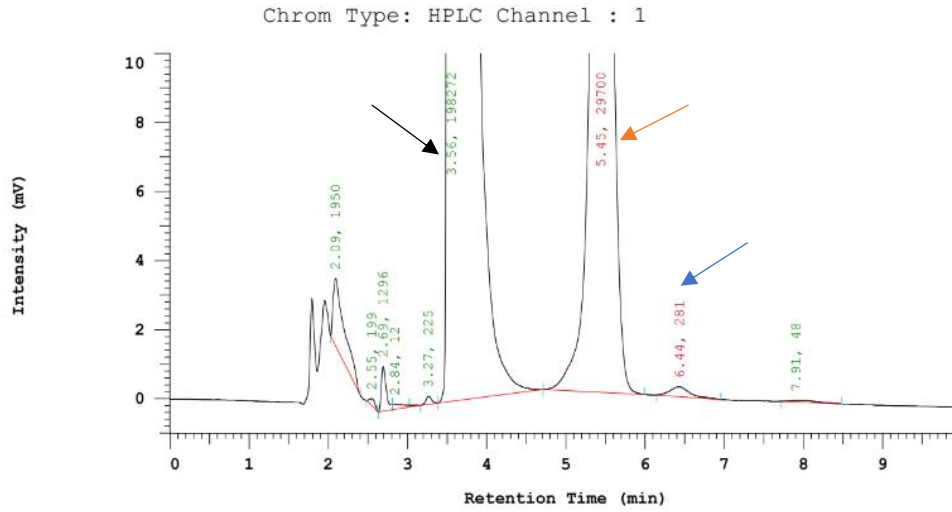


Figura 55: Cromatograma para solución a 20ppm.

Pico de glifosato en 6.44mins. Pico de AMPA en 5.45mins. Pico de derivatizante en 3.56mins.

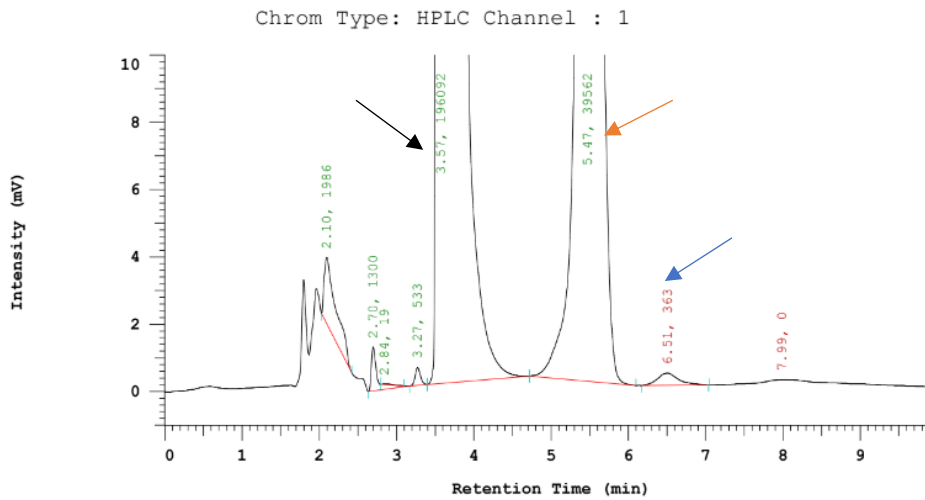


Figura 56: Cromatograma para solución a 30ppm.

Pico de glifosato en 6.51mins. Pico de AMPA en 5.47mins. Pico de derivatizante en 3.57mins.

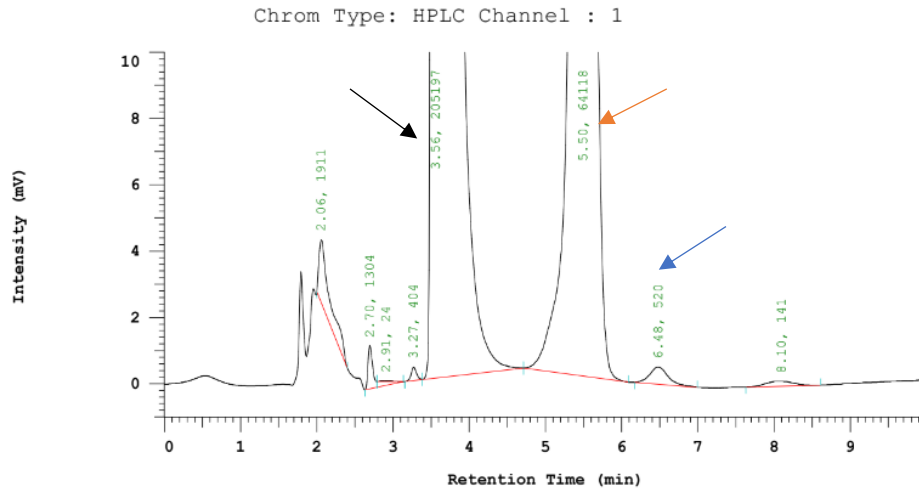


Figura 57: Cromatograma para solución a 40ppm.

Pico de glifosato en 6.48mins. Pico de AMPA en 5.50mins. Pico de derivatizante en 3.56mins.

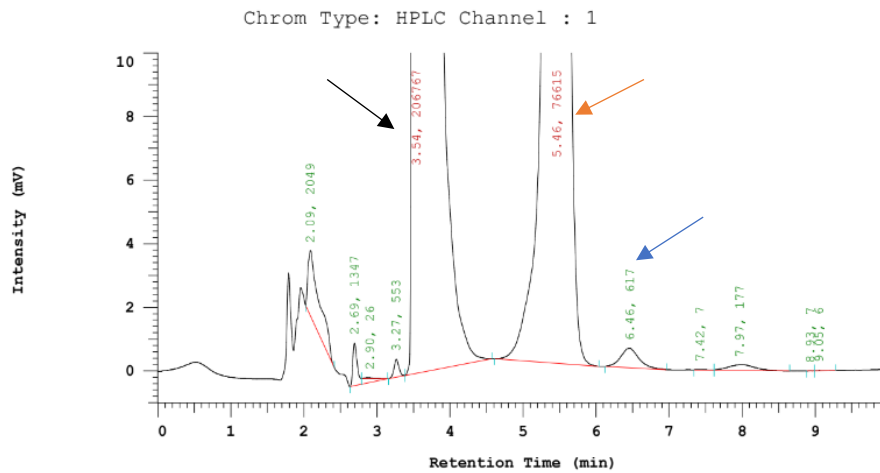


Figura 58: Cromatograma para solución a 50ppm.

Pico de glifosato en 6.46mins. Pico de AMPA en 5.46mins. Pico de derivatizante en 3.54mins.

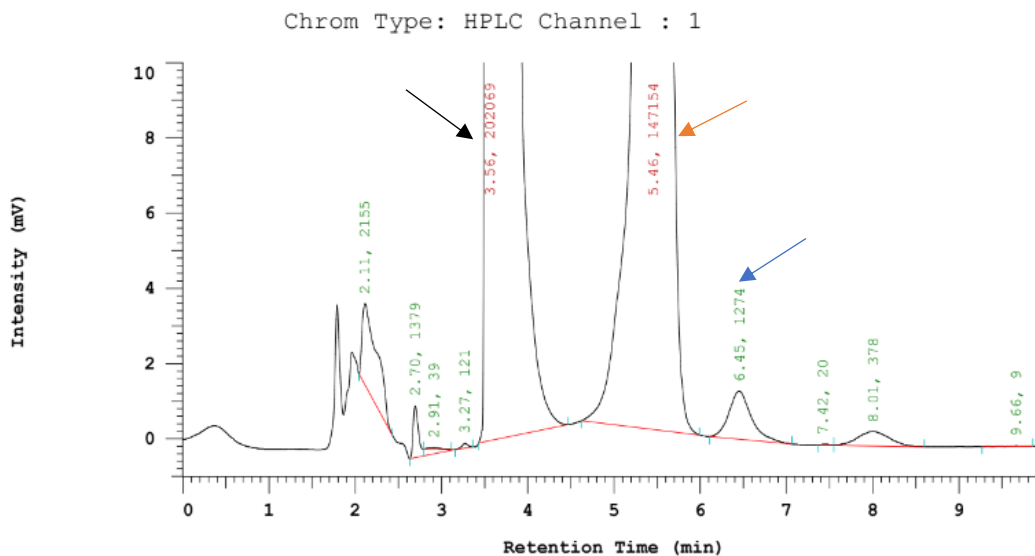


Figura 59: Cromatograma para solución a 100ppm.

Pico de glifosato en 6.45mins. Pico de AMPA en 5.46mins. Pico de derivatizante en 3.56mins.

8. Curva 8

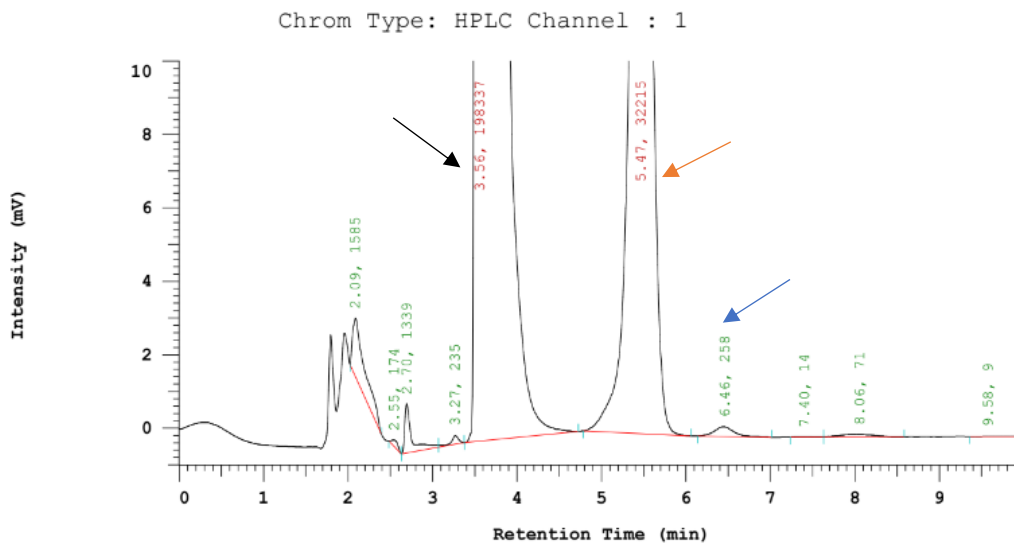


Figura 60: Cromatograma para solución a 20ppm.

Pico de glifosato en 6.46mins. Pico de AMPA en 5.47mins. Pico de derivatizante en 3.56mins.

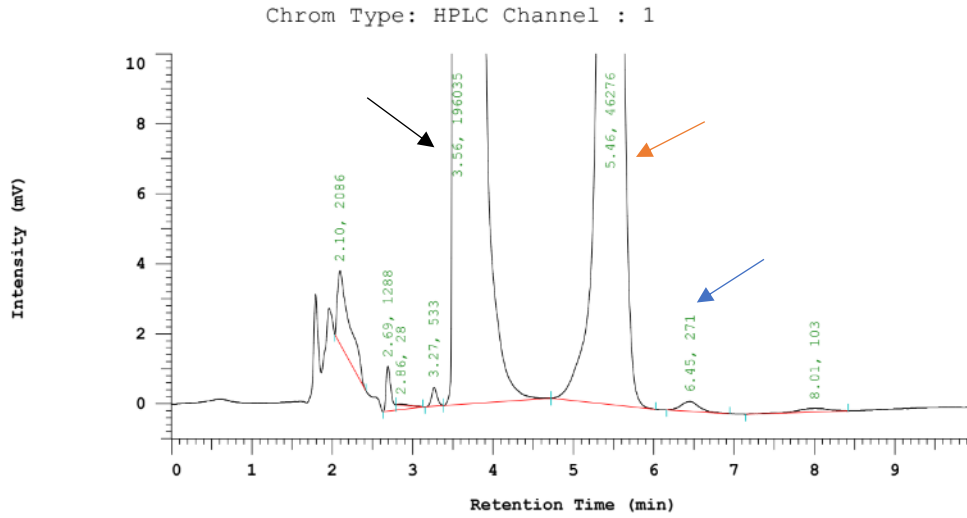


Figura 61: Cromatograma para solución a 30ppm.

Pico de glifosato en 6.45mins. Pico de AMPA en 5.46mins. Pico de derivatizante en 3.56mins.

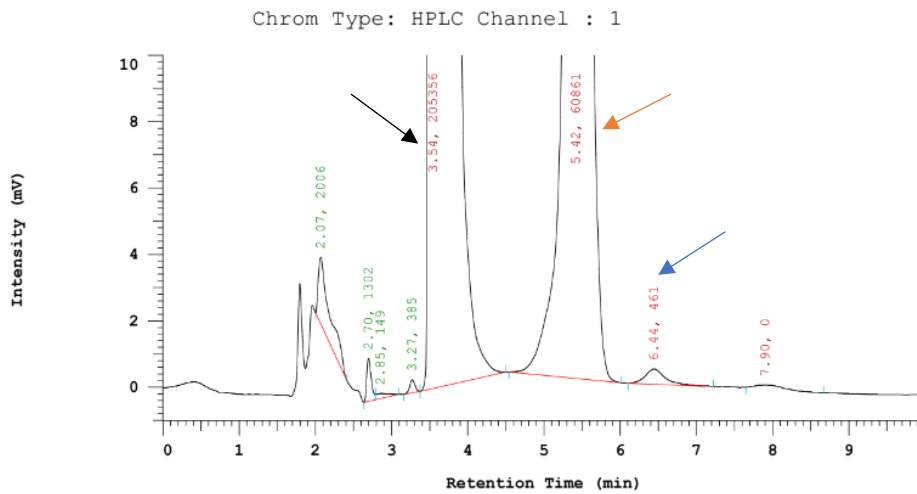


Figura 62: Cromatograma para solución a 40ppm.

Pico de glifosato en 6.44mins. Pico de AMPA en 5.42mins. Pico de derivatizante en 3.54mins.

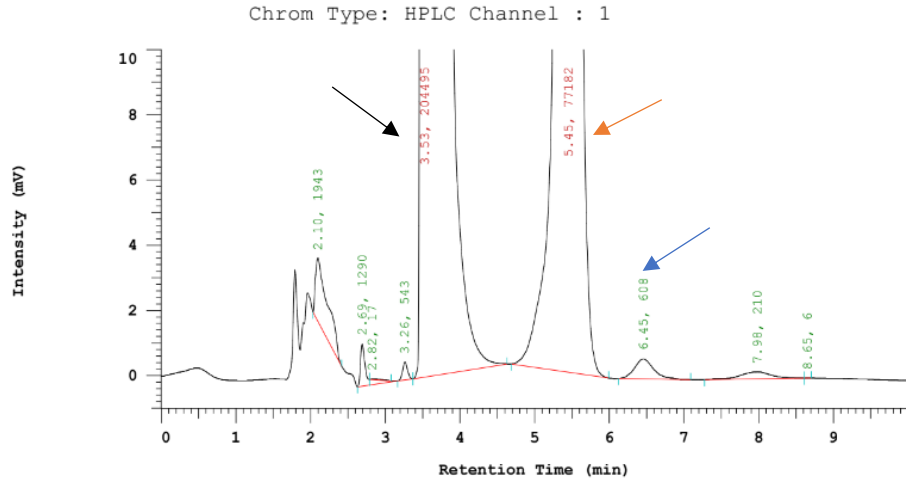


Figura 63: Cromatograma para solución a 50ppm.

Pico de glifosato en 6.45mins. Pico de AMPA en 5.45mins. Pico de derivatizante en 3.53mins.

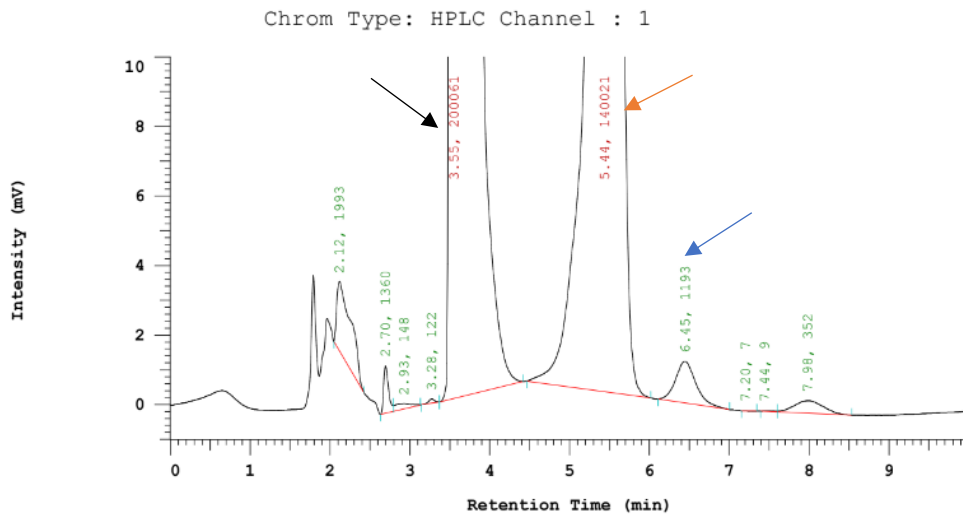


Figura 64: Cromatograma para solución a 100ppm.

Pico de glifosato en 6.45mins. Pico de AMPA en 5.44mins. Pico de derivatizante en 3.55mins.

F. Reacciones y mecanismos

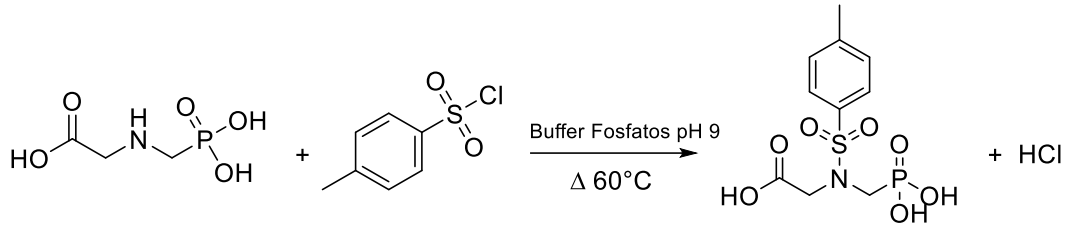


Figura 65: Reacción de derivatización de glifosato con cloruro de p-toluensulfonilo

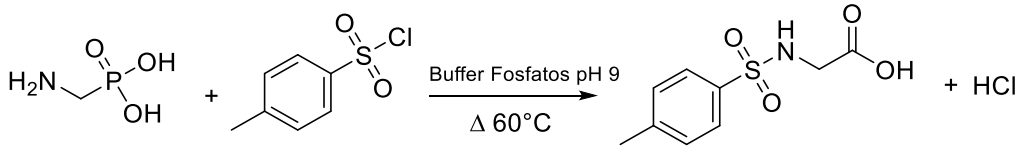


Figura 66: Reacción entre AMPA y cloruro de p-toluensulfonilo

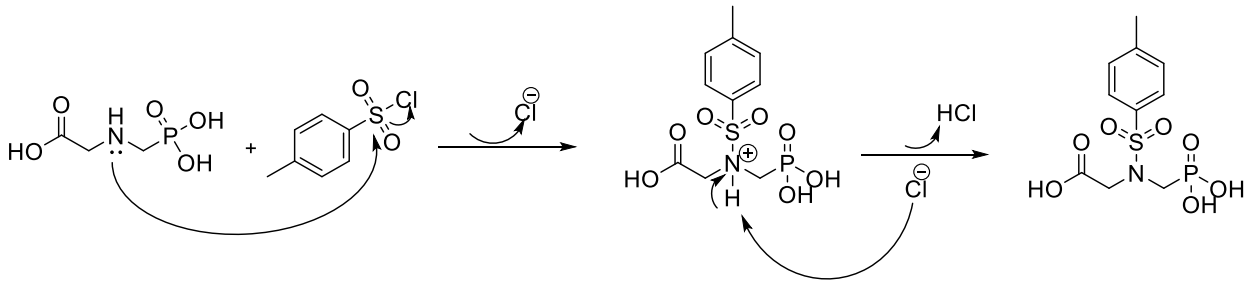


Figura 67: Propuesta de mecanismo de reacción para la reacción de derivatización.

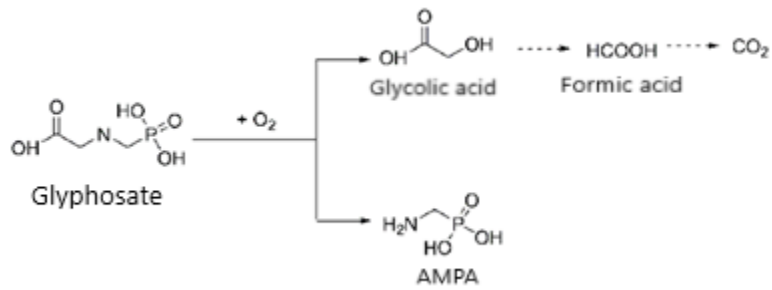


Figura 68: Posible ruta para la degradación del glifosato por oxidación húmeda (wet-air oxidation)

(Feng, Malleret, Soric, & Boutin, 2020)

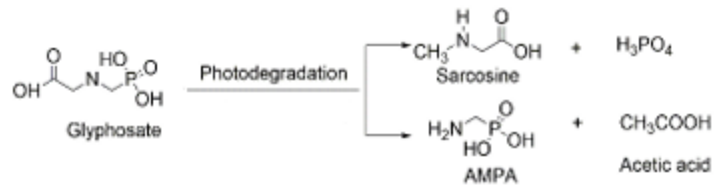


Figura 69: Posible ruta para la degradación del glifosato por fotodegradación

(Feng, Soric, & Boutin, Treatment technologies and degradation pathways of glyphosate: A critical review, 2020)

G. Cromatogramas de referencia

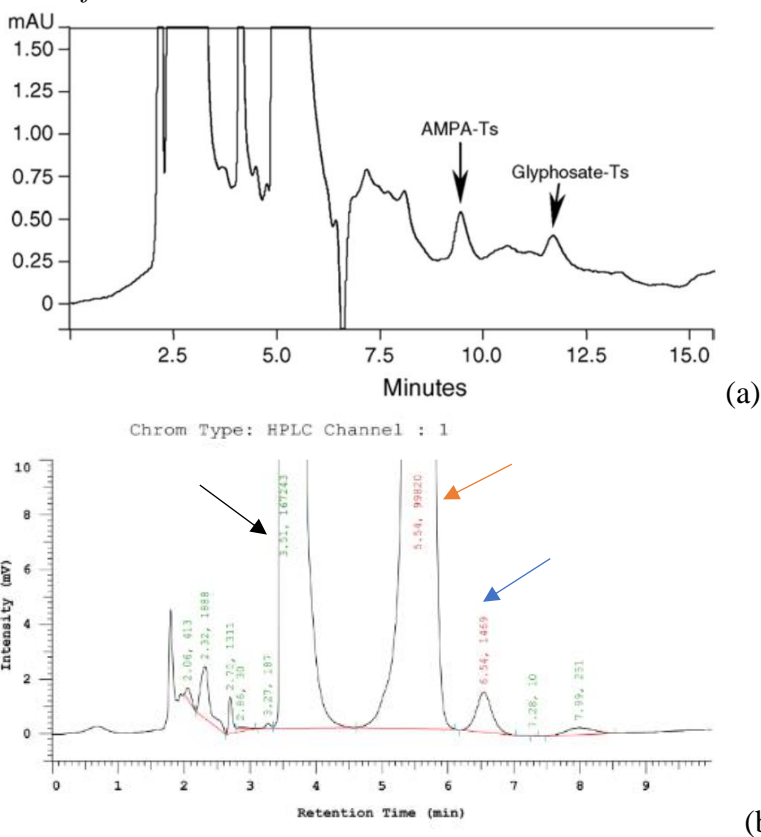
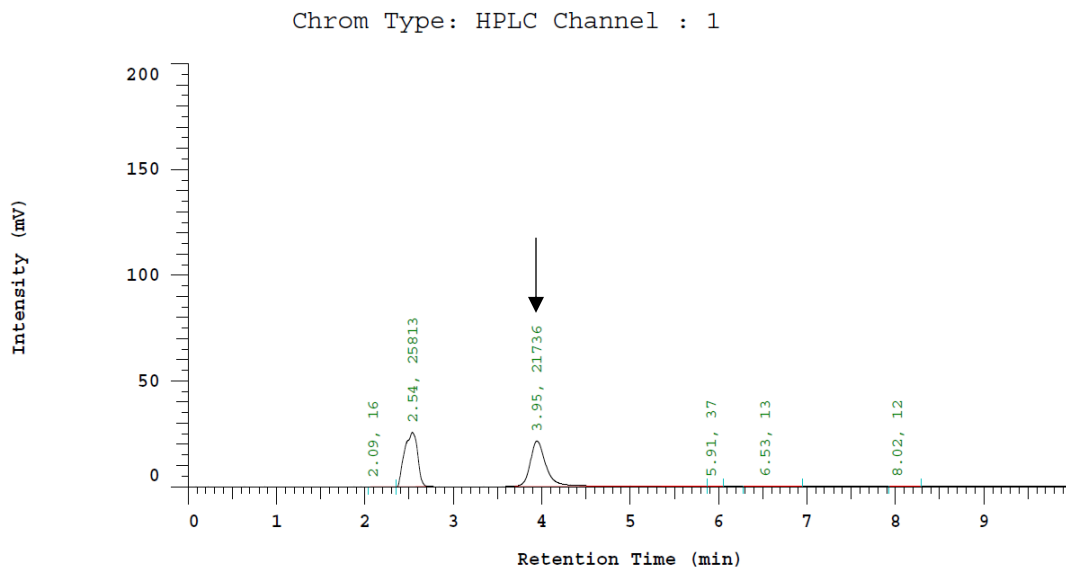


Figura 70: Comparación entre cromatograma de glifosato derivatizado (b) con cromatograma brindado por el análisis realizado por Khrolenko y Wieczorek (a)

Cuadro 14: Condiciones de método cromatográfico utilizado por Khrolenko y Wieczorek.

Parámetro	Valor
Vol. Inyección	10 $\mu$ L
T. Columna	25°C
Fase móvil	Buffer fosfatos 0.06M pH 2.3 : Acetonitrilo (85:15 v/v)
Flujo	1mL/min
Tiempo de corrida	15min
Longitud de onda	240nm
Columna	Microsorb-MV C18, 25cm x 0.46cm.



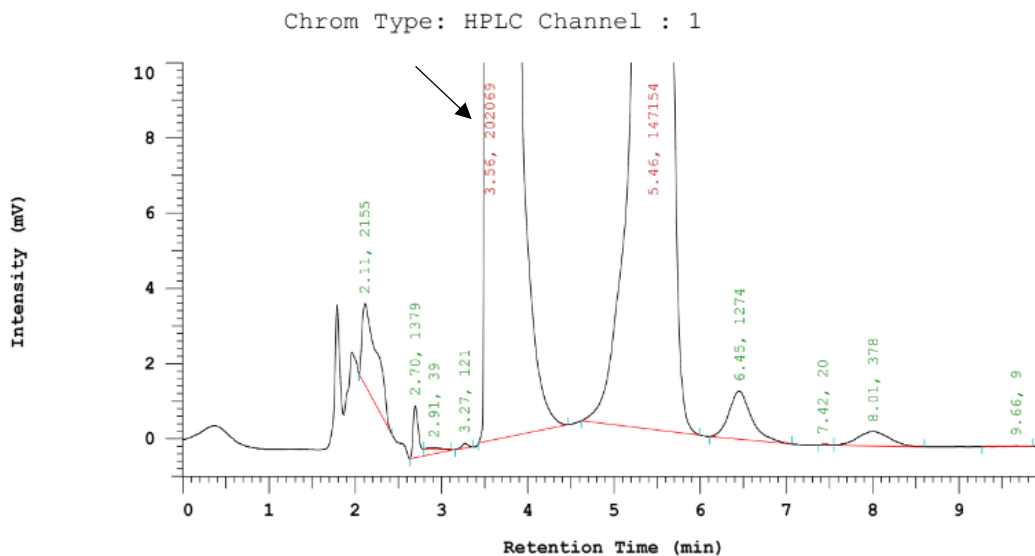
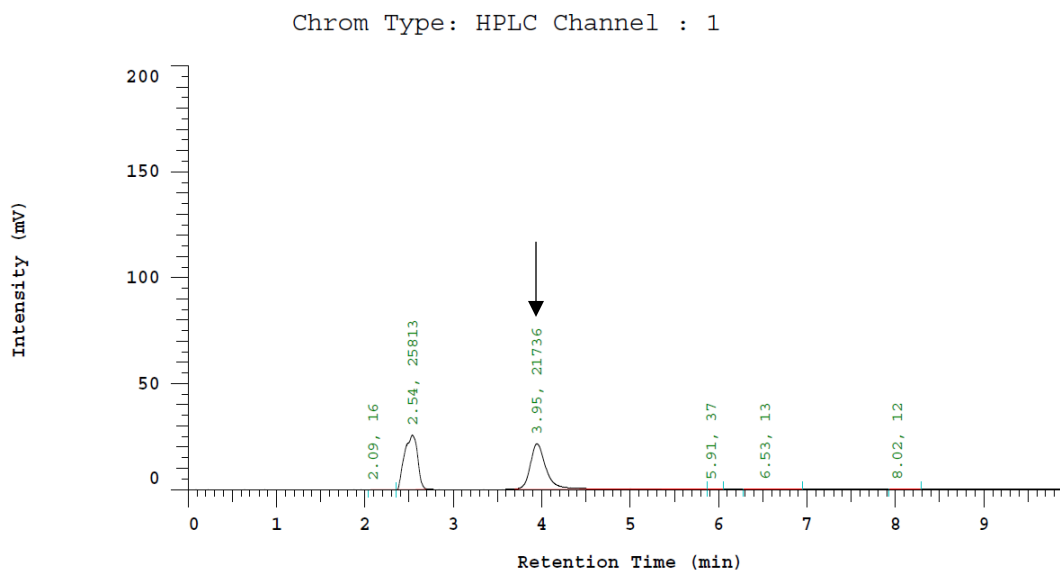


Figura 71: Comparación de cromatograma del cloruro de *p*-toluensulfonilo e inyección de solución madre derivatizada 1. Picos en 3.95mins y 3.56mins, respectivamente.



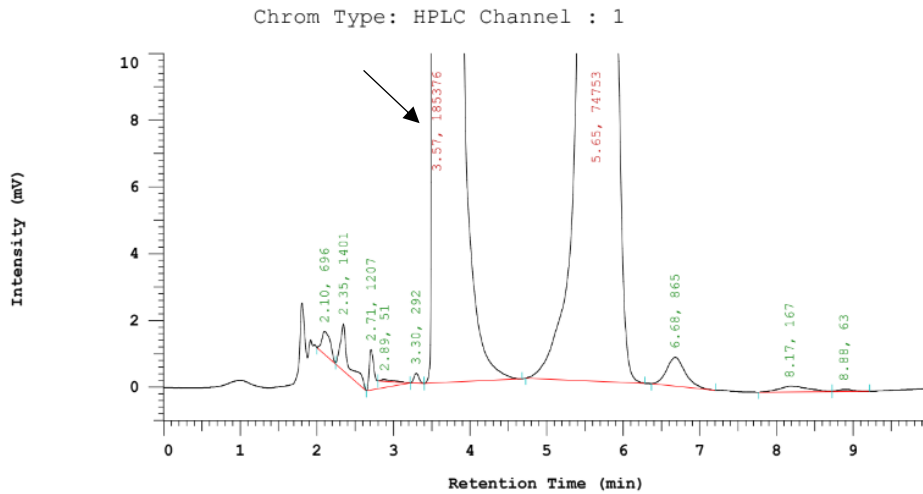
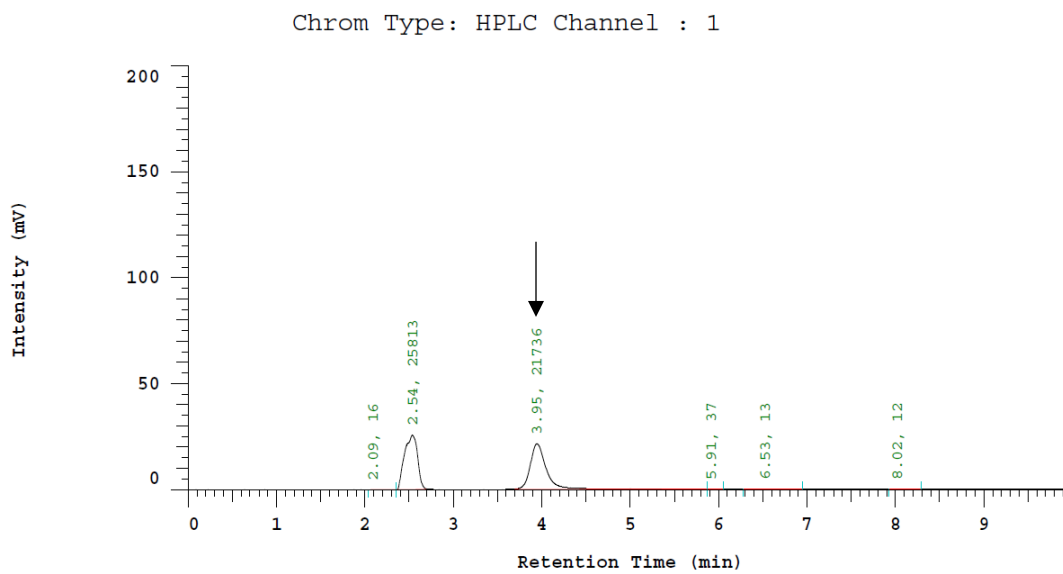


Figura 72: Comparación de cromatograma del cloruro de *p*-toluensulfonilo e inyección de solución madre derivatizada 2. Picos en 3.95mins y 3.57mins, respectivamente.



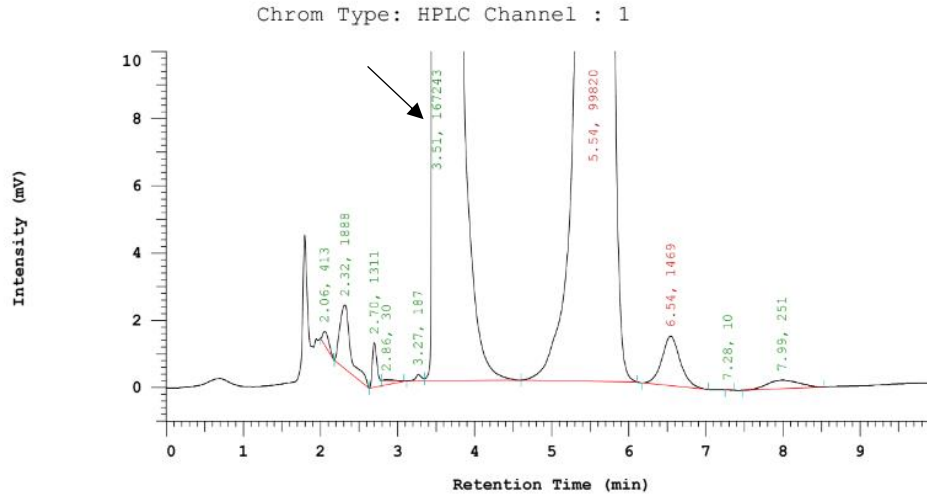


Figura 73: Comparación de cromatograma del cloruro de p-toluensulfonilo e inyección de solución madre derivatizada 3. Picos en 3.95mins y 3.51mins, respectivamente.

Cuadro 15: Comparación de tiempos de retención de agente derivatizante e inyección de solución madre derivatizada

Solución	Tiempo de retención (min)
Cloruro de p-toluensulfonilo	3.96
Solución madre derivatizada 1	3.56
Solución madre derivatizada 2	3.57
Solución madre derivatizada 3	3.51

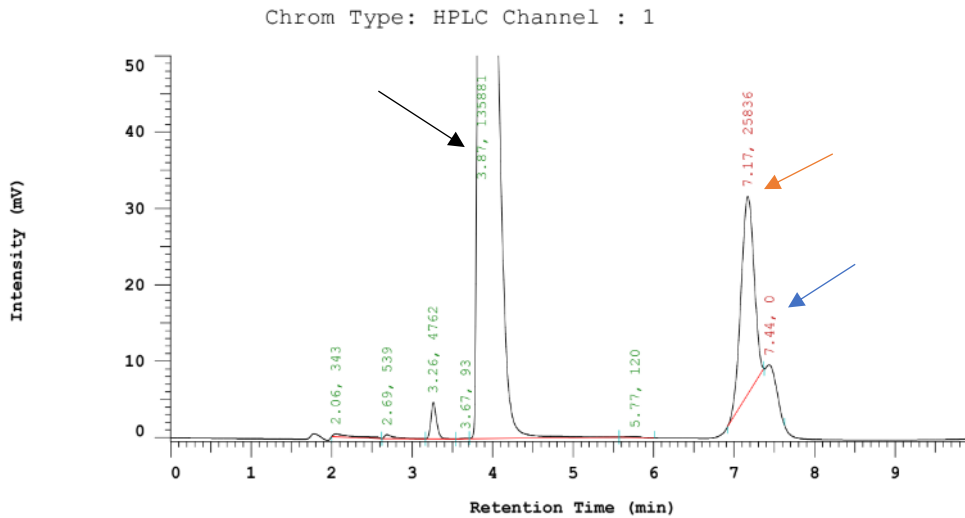


Figura 74: Cromatograma de pruebas iniciales de inyección de solución de glifosato derivatizado para el montaje del método

## H. Cálculos

*Cálculo 3: Muestra de cálculo para límite de detección a 4ppm.*

$$S = \frac{2H}{h}$$
$$S = \frac{2 * 80}{61}$$
$$S = 2.6$$

Este mismo cálculo se realizó para la repetición 2 a esta concentración

*Cálculo 4: Cálculo para límite de cuantificación a 10ppm.*

$$S = \frac{2H}{h}$$
$$S = \frac{2 * 154}{30}$$
$$S = 10.2$$

Este mismo cálculo se realizó para la repetición 2 a esta concentración

*Cálculo 5: Cálculo para CV permitido para la solución de glifosato a 20ppm.*

$$\frac{20mg}{kg} * \frac{1g}{1000mg} * \frac{1kg}{1000g} = 20 * 10^{-6}$$
$$CV = 2^{1-0.5 \log C}$$
$$CV = 2^{1-0.5 \log 20 * 10^{-6}}$$
$$CV = 10.2\%$$

*Cálculo 6: Cálculo para CV permitido para la solución de glifosato a 30ppm.*

$$\frac{30mg}{kg} * \frac{1g}{1000mg} * \frac{1kg}{1000g} = 30 * 10^{-6}$$
$$CV = 2^{1-0.5 \log C}$$

$$CV = 2^{1-0.5 \log 30 \cdot 10^{-6}}$$

$$CV = 9.6\%$$

*Cálculo 7: Cálculo para CV permitido para la solución de glifosato a 40ppm.*

$$\frac{40mg}{kg} * \frac{1g}{1000mg} * \frac{1kg}{1000g} = 40 * 10^{-6}$$

$$CV = 2^{1-0.5 \log C}$$

$$CV = 2^{1-0.5 \log 40 \cdot 10^{-6}}$$

$$CV = 9.2\%$$

*Cálculo 8: Cálculo para CV permitido para la solución de glifosato a 50ppm.*

$$\frac{50mg}{kg} * \frac{1g}{1000mg} * \frac{1kg}{1000g} = 50 * 10^{-6}$$

$$CV = 2^{1-0.5 \log C}$$

$$CV = 2^{1-0.5 \log 50 \cdot 10^{-6}}$$

$$CV = 8.9\%$$

*Cálculo 9: Cálculo para CV permitido para la solución de glifosato a 100ppm.*

$$\frac{100mg}{kg} * \frac{1g}{1000mg} * \frac{1kg}{1000g} = 100 * 10^{-6}$$

$$CV = 2^{1-0.5 \log C}$$

$$CV = 2^{1-0.5 \log 100 \cdot 10^{-6}}$$

$$CV = 8.0\%$$