

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA  
Facultad de Ciencias y Humanidades



Validación de la metodología analítica utilizada en la determinación de residuos de glifosato en vegetales mediante la técnica de inmunoensayo ELISA en colaboración con el laboratorio INLASA, S.A

Trabajo de graduación en modalidad de tesis presentado por  
Mynor Alejandro Ordoñez Godoy  
para optar al grado académico de Licenciado en Bioquímica y Microbiología

Guatemala

2019



Validación de la metodología analítica utilizada en la determinación de residuos de glifosato en vegetales mediante la técnica de inmunoensayo ELISA en colaboración con el laboratorio INLASA, S.A

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA  
Facultad de Ciencias y Humanidades

Validación de la metodología analítica utilizada en la determinación de residuos de glifosato en vegetales mediante la técnica de inmunoensayo ELISA en colaboración con el laboratorio INLASA, S.A

Trabajo de graduación en modalidad de tesis presentado por  
Mynor Alejandro Ordoñez Godoy  
para optar al grado académico de Licenciado en Bioquímica y Microbiología

Guatemala

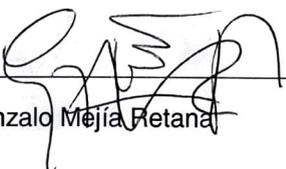
2019

Vo. Bo. :

(f.)   
Krisztina Ríos-Gonzalez, PhD.

Tribunal examinador:

(f.)   
Krisztina Ríos-Gonzalez, PhD.

(f.)   
Lic. Gonzalo Mejía Retana

(f.)   
Licda. Virginia Núñez Aguirre

Fecha de aprobación: Guatemala, 3 de diciembre del 2019

## **PREFACIO**

Este trabajo de investigación surgió de la necesidad del laboratorio INLASA, S.A. de montar un método para detectar residuos de glifosato en vegetales. Durante la etapa de selección de temas de investigación de trabajo de graduación, surgió un interés propio por aplicar conocimientos de inmunoquímica para el control de calidad de alimentos en Guatemala. Por lo tanto, decidí colaborar en este proyecto de validación con el laboratorio INLASA, S.A. Para la validación, se contó únicamente con un kit de ELISA y se delimitó para una sola matriz (i. e. vegetales).

Agradezco a Dios, ante todo, por darme la oportunidad de estudiar en esta casa de estudios y apoyarme en esta nueva etapa universitaria.

Agradezco a mi madre y hermana, por brindarme su amor, apoyo incondicional y motivación en esta etapa final y a lo largo de toda mi carrera universitaria.

Agradezco a Lic. Raúl Paniagua por la confianza que me otorgó en participar en este proyecto de validación y apoyarme en la logística de insumos para empezar dicho proyecto.

Agradezco a la Ing. Anelisse Ponce por su apoyo y paciencia en el diseño y desarrollo de la etapa experimental para la validación del método. Asimismo, su entusiasmo y motivación influyó positivamente en el desarrollo del proceso.

Agradezco a la técnica de laboratorio Claudia Ailón por su apoyo en el desarrollo de pruebas de reproducibilidad del método y consejos para el desarrollo de la técnica ELISA.

Agradezco a la Dra. Krisztina Ríos por su apoyo y seguimiento en el desarrollo de este trabajo de graduación.

## ÍNDICE

	Página
Lista de cuadros.....	iv
Lista de figuras.....	v
I. Introducción .....	1
II. Objetivos.....	2
III. Justificación.....	3
IV. Marco teórico.....	5
V. Antecedentes.....	22
VI. Metodología.....	23
VII. Resultados .....	28
VIII. Discusión .....	31
IX. Conclusiones .....	33
X. Recomendaciones .....	34
XI. Bibliografía.....	35
XII. Anexos.....	38

## LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Sistemas de enzima y sustrato utilizados en inmunoensayos enzimáticos ELISA....	10
Cuadro 2. Definición y operacionalización de las variables de estudio.....	23
Cuadro 3. Determinación de la selectividad del método ELISA para determinación de glifosato.....	28
Cuadro 4. Límite de detección y cuantificación para la determinación de glifosato.....	28
Cuadro 5. Recuperación del glifosato a distintos niveles de la curva.....	29
Cuadro 6. Evaluación de precisión del método mediante repetibilidad y reproducibilidad.....	30

## LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Estructura química de glifosato.....	6
Figura 2. Ruta metabólica del ácido shikímico.....	7
Figura 3. Protocolo de ELISA directo.....	11
Figura 4. Protocolo de ELISA indirecto.....	12
Figura 5. Protocolo de ELISA "sándwich".....	12
Figura 6. Protocolo de ELISA competitivo.....	13
Figura 7. Curva de calibración obtenida a partir de un método instrumental.....	17
Figura 8. Curva de calibración de inmunoensayo ELISA para determinación de glifosato en vegetales.....	29
Figura 9. Evaluación de robustez del método ELISA para determinación de glifosato.....	30

## RESUMEN

El objetivo de este trabajo de investigación fue validar un inmunoensayo ELISA para la determinación de glifosato en vegetales. En resumen, se realizaron curvas de calibración con controles y muestras según indicaciones del kit. Se varió el analista para evaluación de reproducibilidad y el tiempo de derivatización para evaluación de robustez. Al terminar la fase experimental, se encontró que el método ELISA es selectivo para glifosato al compararlo con el aminoácido glicina, cuya estructura es similar al glifosato. Adicionalmente, se obtuvo un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de 0.9969 dentro del intervalo de trabajo de 0.075 a 4 ppb. El glifosato, en vegetales, es detectable a concentraciones arriba de 0.41 ppb y cuantificable a concentraciones superiores a 1.38 ppb. Las recuperaciones del glifosato a 0.245, 0.981 y 3.924 ppb fueron 299%, 185% y 112.10% con un coeficiente de variación de 20.20, 90.40 y 11.48% respectivamente. El método es robusto al variar el tiempo de derivatización (valor p de 0.7862). En conclusión, el método analítico para la determinación de residuos de glifosato es válido bajo los parámetros de la norma COGUANOR ISO/IEC 17025:2017. Se recomienda realizar recuperaciones a niveles mayores del LOD inter e intra-ensayo para fortalecer la validez del método.

## I. INTRODUCCIÓN

El glifosato es un herbicida de amplio espectro, no selectivo y post-emergente que tiene la finalidad de suprimir o inhibir el crecimiento de todo tipo de plantas. Según estudios realizados, este herbicida está relacionado a efectos teratogénicos en animales acuáticos y enfermedades humanas como: nefropatía mesoamericana, desbalance ácido-base, esclerosis múltiple, entre otros. Debido a su alta utilización en el área agrícola y la implementación de organismos genéticamente modificados con resistencia a herbicidas, el glifosato se ha encontrado en alimentos y fuentes de agua. Por lo tanto, diferentes organizaciones han establecido concentraciones residuales máximas para monitorear la exposición de glifosato. La técnica de inmunoabsorción enzimática ELISA, por sus siglas en inglés, es una de las herramientas económicas y confiables utilizadas para la detección de este herbicida a las concentraciones residuales exigidas por las organizaciones regulatorias.

En Guatemala, la norma COGUANOR ISO 17025: 2017 exige, entre sus requisitos técnicos, el proceso de validación de métodos analíticos para garantizar confiabilidad y veracidad en los resultados que se obtengan de los análisis. Por lo tanto, la finalidad de este trabajo de investigación es validar una metodología analítica para la determinación de residuos de glifosato mediante la técnica de inmunoabsorción enzimática ELISA. En este trabajo de validación se evaluarán los siguientes parámetros: selectividad, linealidad, límites de detección y cuantificación, precisión, veracidad y robustez. Los ensayos, a grandes rasgos, consisten en series repetitivas de derivatización y preparación de la curva de calibración de estándares por analistas diferentes y tratamiento de muestras con concentraciones de glifosato dentro de la curva para evaluar la veracidad del método. En conclusión, el método analítico para la determinación de residuos de glifosato por la técnica ELISA es exacto, preciso, lineal y cumple con los parámetros de validación designados por la norma COGUANOR NTG ISO/IEC 17025: 2017.

## II. OBJETIVOS

### A. *General*

Validar un método analítico por ensayo ELISA para determinar residuos de glifosato en vegetales.

### B. *Específicos*

1. Determinar la validez del método analítico propuesto por medio de los siguientes parámetros: selectividad, linealidad, veracidad, precisión, límite de detección (LOD), límite de cuantificación (LOQ), y robustez.
2. Determinar la concentración de glifosato en vegetal de elección para determinar la exactitud del método analítico.

### III. JUSTIFICACIÓN

El glifosato es el herbicida de amplio espectro más utilizado a nivel mundial y su utilización en la agricultura se ha incrementado desde su introducción al mercado en 1970. Debido al desarrollo de una variedad de cultivos genéticamente modificados resistentes a este herbicida, la aplicación de este es cada vez más común (Rendón-Von Osten & Dzul-Caamal, 2017). Esto ha causado una acumulación de residuos en fuentes de agua y alimentos, por lo que la USFDA (United States Food and Drug Administration) ha establecido una concentración residual máxima de 1 µg/ml (Selvi *et. al.*, 2011). En Guatemala, el glifosato se utiliza para el control de malezas en diferentes cultivos, entre ellos: el banano, el café y la caña de azúcar y se aplica posterior al tiempo de limpieza del cultivo. Para la caña de azúcar, en particular, el glifosato se utiliza como madurante para maximizar la producción de azúcar (Spaunhorstid *et. al.*, 2019).

Este herbicida ha sido objeto de evaluaciones periódicas por Agencias nacionales e internacionales. La mayoría de organizaciones han establecido que el glifosato tiene una toxicidad relativamente baja para mamíferos (Tarazona *et al.*, 2017). Sin embargo, en el 2015, un Reporte del Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (IARC, siglas en inglés) indicó que el glifosato y sus productos de formulación son probablemente cancerígenos para el ser humano (Guyton *et al.*, 2015). La Resolución de dicho Reporte se basa en diferentes estudios publicados donde se ha detectado glifosato en orina y sangre de agricultores. Adicionalmente, otros estudios citados en la Resolución indican un alto daño a nivel de ADN y estrés oxidativo (IARC, 2015). Debido a estos hallazgos se han establecido límites de dicho analito en diferentes cultivos para su importación en diversos países debido al daño que puede ocasionar en los sectores agrícola y comercial.

Para Guatemala, como país altamente exportador de productos agrícolas, contar con laboratorios de análisis acreditados bajo la norma ISO 17025 es imprescindible. Estos tienen que contar con métodos normalizados, es decir validados y verificados, para garantizar la calidad de los resultados a los clientes (Oficina Guatemalteca de Acreditación, 2010). Actualmente en el país se cuenta con 23 laboratorios de análisis y 4 laboratorios de calibración acreditados bajo la norma ISO 17025 por la Oficina Guatemalteca de Acreditación (OGA). Entre los laboratorios de análisis acreditados bajo esta norma se encuentra el laboratorio INLASA, el cual está desarrollando el método de determinación de glifosato mediante la técnica de inmunoensayo ELISA. Esta técnica ofrece la detección de este herbicida a nivel de partes por billón tal y como exige la norma internacional, además de reducir el error del proceso de derivatización y tratamientos adicionales a la muestra.

La validación de la metodología analítica por medio del inmunoensayo ELISA para la determinación de residuos de glifosato en vegetales, permitirá detectarlo a los niveles de concentración residual máxima exigidos por la USFDA y otras agencias reguladoras para la importación de estos cultivos. Adicionalmente, el laboratorio INLASA podrá contar con un método confiable y válido para sumar a su compendio de métodos validados bajo la norma ISO 17025. La detección de este analito de interés es un indicador de su uso en los diferentes cultivos y propone una revisión minuciosa al impacto ambiental que puede presentar el glifosato a nivel de suelos y agua. Los cultivos en los que se aplica el herbicida son de alto impacto para el producto interno bruto del país y es primordial que estos cumplan con las normas internacionales y evitar ser rechazados al momento de su importación.

## IV. MARCO TEÓRICO

### A. GLIFOSATO

#### 1. Organismos genéticamente modificados

##### a. Definición

La Organización Mundial de la Salud (2017) define organismos genéticamente modificados (GMOs por sus siglas en inglés) como: “organismo (i.e plantas, animales o microorganismos) en el cual el material genético ha sido alterado de tal manera que no ocurre por apareamiento o recombinación natural”. En cuanto a los cultivos genéticamente modificados, existen dos tipos de alteraciones genéticas: resistencia a herbicidas no selectivos y producción de una toxina de la bacteria *Bacillus thuringiensis* (Zhang *et al.*, 2016). Adicionalmente, se han desarrollado cultivos transgénicos utilizando ARN de interferencia para mejorar su calidad y valor nutricional (Ali *et al.*, 2010)

##### b. Puntos de debate

La introducción de cultivos genéticamente modificados ha sido fuente de debate a nivel mundial y cabe destacar las ventajas y desventajas de su utilización. Una principal ventaja es el rápido crecimiento de esta en comparación con los cultivos tradicionales, brindando una mejor productividad para abastecer una población determinada. Adicionalmente, estos pueden crecer en condiciones climáticas desfavorables (Bawa & Anilakumar, 2013). El costo de producción es bajo y esto se debe probablemente a que su crecimiento se da en granjas industriales (Lisowska, 2011).

Una de las desventajas principales es la ausencia de información sobre los efectos, a largo plazo, que puede tener el consumo de cultivos transgénicos en seres humanos. Debido a esto, mucha gente prefiere no consumirlos y, parte de este pensamiento, muchas empresas manufactureras no incluyen un etiquetado adecuado (Bawa & Anilakumar, 2013). Adicionalmente, la utilización de estos puede ocasionar una presión selectiva en las malezas, para que estas puedan conferir resistencia a un herbicida en particular (Owen & Zelaya, 2005). Por último, la inserción de genes en dichos cultivos puede conferirle propiedades alergénicas en algunas personas o dependiendo del proceso empleado (Bawa & Anilakumar, 2013).

## 2. Propiedades químicas

El glifosato ácido tiene una fórmula molecular de  $C_3H_8NO_5P$  con un peso molecular de 169.07 g/mol. El glifosato ácido es un sólido cristalino, incoloro e inodoro. Su formulación consiste en la sal desprotonada del glifosato ácido y un catión (isopropilamina, amonio o sodio), con más de una sal en algunas de sus formulaciones por diferentes fabricantes. Su estructura orgánica (Figura 1) se muestra a continuación:

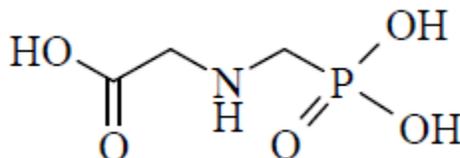


Figura 1. Estructura química del glifosato.

(Szekacs & Darvas, 2012)

Este compuesto es de solubilidad alta en agua (11.6g/L) a 25°C e insoluble en solventes orgánicos comunes como: acetona, etanol y xileno (IARC, 2015). Las sales utilizadas en su formulaciones se utilizan con el fin de aumentar su solubilidad en agua (Szekacs & Darvas, 2012).

El glifosato es estable a la hidrólisis en un rango de pH de 3-9 y relativamente estable a foto degradación. Este se descompone a altas temperaturas, liberando humos tóxicos que incluyen óxidos de nitrógeno y fósforo (IARC, 2015). Debido a los grupos donantes de hidrógeno y aceptores de hidrógeno, este presenta 4 constantes de disociación, siendo estos:  $pK_a(1)=0.8$ ,  $pK_a(2)=2.3$ ,  $pK_a(3)=6$  y  $pK_a(4)=11$ . Estos corresponden a la disociación del protón del primer fosfónico, el carboxilato, segundo fosfónico y la amina, respectivamente (Macbean, 2012).

## 3. Usos

El glifosato es un herbicida de amplio espectro, no selectivo, sistémico y post-emergente con la finalidad de inhibir o suprimir el crecimiento de todo tipo de plantas, incluyendo gramas, perennes, viñas, arbustos y árboles (IARC, 2015). Este tiene uso agrícola y no-agrícola alrededor del mundo (Selvi *et al.*, 2011). En el área agrícola se utiliza principalmente para el control de malezas, en el cual se aplica aproximadamente 4.3 kilogramos por hectárea de manera directa en las malezas (Tomlin, 2000) y como madurante en cultivos de caña de azúcar (Spaunhorstid *et al.*, 2019). Entre sus usos no-agrícolas son particularmente para control de malezas en líneas férreas, parques y huertos familiares (Silva *et al.*, 2018). En Guatemala, este se utiliza para el control de malezas en los cultivos de café, caña de azúcar y banano (Juarez, 2014). Desde la adopción de métodos de siembra directa en la agricultura y el uso de cultivos genéticamente modificados, el

glifosato se ha utilizado como un herbicida post-emergente y selectivo en cultivos anuales (Powles, 2010).

#### 4. Mecanismo de acción

El principal mecanismo de acción del glifosato en las malezas es mediante la inhibición de la biosíntesis de aminoácidos aromáticos en plantas, específicamente en la inhibición de la ruta del ácido shikímico (Motta *et al.*, 2018). La ruta del ácido shikímico se puede observar con mayor claridad en la Figura 2:

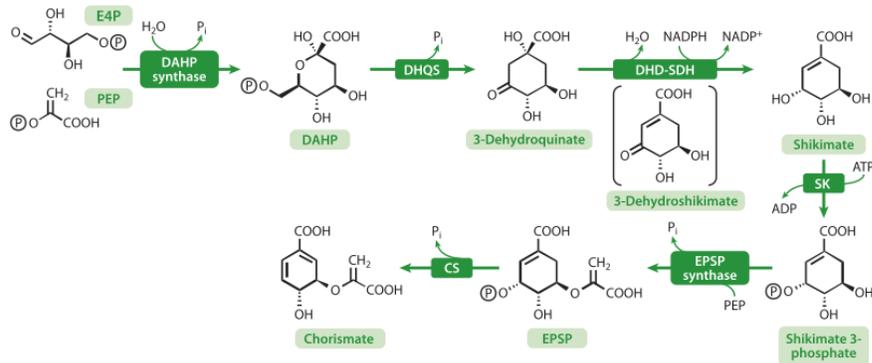


Figura 2. Ruta metabólica del ácido shikímico.

(Maeda & Dudareva, 2012)

E4P: D-erythrose 4-phosphate, PEP: phosphoenolpyruvate, DAHP: 3-Deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate, DHQS: 3-dehydroquinate synthase, DHD: 3-dehydroquinate dehidratase, SDH: shikimate dehidrogenase, SK: Shikimate kinase, EPSP: 5-Enolpiruvilshikimate 3-Fosfato, CS: Chorismate synthase

El glifosato actúa como un inhibidor competitivo en el sitio activo de la enzima 5-enolpiruvil shikimato 3-fosfato sintasa (ESPS), la cual cataliza la reacción entre fosfoenolpiruvato y shikimato 3-fosfato para formar 5-enolpiruvil shikimato 3-fosfato (Herrmann, 1995). Otros efectos indirectos complejos del glifosato se han visto en la Bioquímica de plantas. Entre los efectos se encuentran: (a) Reducción de los niveles de metionina, (b) inhibición de las reacciones de transaminación, (c) Biosíntesis de clorofila y (d) transporte de membrana (Gomes *et al.*, 2014).

#### 5. Toxicidad

El glifosato, desde su introducción en 1974, se ha mantenido como un pesticida de amplio espectro que tiene bajo potencial de riesgo para los mamíferos. Sin embargo, la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC, siglas en inglés), concluyó que el glifosato y sus productos de formulación son probablemente cancerígenos para los humanos (Guyton *et al.*,

2015). El objetivo de dichas evaluaciones es la identificación de peligros de carcinogenicidad y no incluyen recomendaciones regulatorias o legislativas, ya que son evaluaciones científicas del analito en particular (Tarazona *et al.*, 2017). Otras agencias regulatorias han presentado diferentes opiniones sobre la posible carcinogenicidad del glifosato, aumentando el debate social y científico de este herbicida.

Se han realizado varios estudios que indican los efectos adversos del glifosato sobre el ambiente y los animales. Debido al mecanismo de acción primario que tiene el analito, se ha visto que tiene una repercusión en el tamaño y composición de la microbiota de las abejas, importante polinizador de cultivos agrícolas (Motta *et al.*, 2018). También se ha observado sus efectos teratogénicos en microalgas, renacuajos, embriones de erizos de mar, salamandras, entre otros (Szekacs & Darvas, 2012). En peces, se ha visto que el glifosato induce estrés oxidativo mediante la reducción de enzimas moduladoras de especies reactivas de oxígeno y transaminasas (Alves-Balvedi *et al.*, 2018).

En humanos, se ha visto que la exposición a altas concentraciones de glifosato es un factor principal en nefropatía mesoamericana, que afecta principalmente a agricultores en América Central (Seneff & Orlando, 2018). Adicionalmente, se ha visto que, para la nefropatía mesoamericana está asociada con una síntesis proteica deficiente, donde el glifosato sustituye a la glicina en varias acuaporinas, canales de cloro, citocromo c oxidasa y colágeno (Seneff & Orlando, 2018). Su ingestión en bajas dosis puede ocasionar desbalance ácido-base y, subsecuentemente, acidosis metabólica, al igual que disfunción mitocondrial (Swanson *et al.*, 2016). Otras enfermedades asociadas son: esclerosis múltiple, linfoma non-Hodgkin, defectos en el nacimiento, disfunción cardíaca, entre otras (Alves-Balvedi *et al.*, 2018).

## **6. Regulaciones internacionales**

El marco regulatorio del glifosato ha sido deficiente e inefectivo ya que el glifosato no se puede detectar en métodos multiplex para diferentes pesticidas. Por lo tanto, se desconoce el impacto de esta brecha de conocimiento en la economía pública y sistemas de salud. Desde el 2010, la Unión Europea ha realizado monitoreo regular de glifosato en cereales, pero el reto sigue siendo la detección de glifosato en semilla de soya genéticamente modificadas (Alves-Balvedi *et al.*, 2018). Adicionalmente, otros factores importantes es el número de laboratorios que cuentan con un método válido para detectar este herbicida y las estrategias gubernamentales para prevenir efectos adversos del glifosato.

Debido al uso que presenta este herbicida y los peligros que puede ocasionar en el ser humano y animales, una estrategia de regulación empleada es el límite residual máximo (MRL,

por sus siglas en inglés). Estos límites especifican la concentración máxima de un herbicida que puede existir en productos agrícolas y difieren entre las diferentes agencias regulatorias (Li & Jennings, 2017). Por ejemplo, la USFDA (United States Food and Drug Administration) y la Canadian Food and Drug Act establecieron un límite residual máximo de 1.0 µg/ml (Selvi *et al.*, 2011). Otras agencias, como la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA, en inglés) establecen un límite de 20mg kg<sup>-1</sup> de glifosato en habas de soya (Alves-Balvedi *et al.*, 2018).

## **7. Métodos de análisis**

La controversia de este herbicida no selectivo ha puesto en marcha el desarrollo de varios métodos para cuantificar glifosato y su metabolito mayoritario, ácido aminometilfosfónico en varias matrices, tales como: agua, aire, orina y suero (IARC, 2015). La alta polaridad del glifosato dificulta su extracción de matrices agrícolas y biológicas (Selvi *et al.*, 2011) al igual que su análisis directo por técnicas de cromatografía de gases o líquida con detectores tradicionales, incluyendo UV-Vis y Fluorescencia (Oulkar *et al.*, 2017). Sin embargo, se han desarrollado procesos de derivatización para cambiar las propiedades químicas del glifosato. El método más recomendado es derivatización en pre-columna con cloroformiato de 9-fluorenilmetilo (FMOC-Cl) para obtener un derivado fluorescente que pueda ser medido por cromatografía líquida con detector de fluorescencia (Nucci *et al.*, 2018). Sin embargo, los procesos de derivatización para la detección del analito acarrear un error adicional en la detección del analito. También se han desarrollado métodos de alta sensibilidad por cromatografía iónica y cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem para detectar este analito (Alves-Balvedi *et al.*, 2018).

La detección del glifosato con los métodos antes reportados generalmente tienen límites de detección más altos que aquellas reportadas por métodos de inmunoensayo ELISA para la mayoría de herbicidas (Selvi *et al.*, 2011). Por lo tanto, este tipo de inmunoensayo ha sido una herramienta valiosa en la determinación de residuos de herbicidas y complementa los métodos analíticos convencionales.

## **B. ELISA**

### **1. Fundamento de la técnica**

La técnica de ensayo ELISA se basa en el reconocimiento de un antígeno o hapteno a un anticuerpo. (Aydin, 2015). La enzima puede estar acoplada al primer anticuerpo que produce el complejo antígeno-anticuerpo o puede estar en un segundo anticuerpo, más conocido como anticuerpo de detección secundaria. Este complejo se hace visible mediante una reacción enzimática, en el cual la adición de un sustrato enzimático produce un cambio de color. La reacción enzimática se detiene utilizando solución de hidróxido de sodio, ácido clorhídrico o sulfúrico. El

producto que se obtiene puede ser medido en un espectrofotómetro en el rango de 400-600nm. La medida de la densidad óptica de la reacción es proporcional a la cantidad de antígeno en la muestra (Shah & Maghsoudlou, 2016). Debido al cambio de color que debe producir la reacción, se emplean diversos sistemas de enzima/sustrato, los cuales se muestran a continuación en el Cuadro 1:

Cuadro 1. Sistemas de enzima y sustrato utilizados para inmunoensayos enzimáticos ELISA.

Enzyme	Source	Molecular weight	pH optimum	Colorimetric substrates	Fluorometric substrates	Luminometric substrates
Alkaline phosphatase	Calf intestine	100 000	9–10	<i>p</i> -Nitrophenyl-phosphate	4-Methylumbelliferyl-phosphate	Adamantyl-1,2-dioxyethane Phenylphosphate-substituted dioxyethane
$\beta$ -Galactosidase	<i>Escherichia coli</i>	540 000	6–8	<i>o</i> -Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside Chlorophenolic red- $\beta$ -D-galactopyranoside	4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-galactopyranoside	–
Peroxidase	Horseradish	40 000	5–7	2,2'-Azino-di(3-ethylbenzthiazoline sulfonic acid-6) (ABTS)/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3,3'-5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB)/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> <i>o</i> -Phenyldiamine (OPD)/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	<i>p</i> -Hydroxyphenyl-acetic acid <i>p</i> -Hydroxyphenyl-propionic acid	Luminol

(Dankwardt, 2006)

Esta técnica permite la detección de bajas concentraciones de moléculas como péptidos/proteínas, hormonas, vitaminas, drogas y pesticidas en un alto nivel de especificidad con el anticuerpo diseñado para estos (Lequin, 2005). Este tipo de inmunoensayo presenta varias ventajas, entre las cuales destacan: rapidez, sensibilidad alta, y bajos volúmenes de trabajo. Su desventaja principal es la baja confiabilidad, en comparación con los inmunoensayos radioactivos (Dankwardt, n.d.).

## 2. Tipos de ELISA

Los inmunoensayos ELISA se dividen en diferentes categorías dependiendo de cómo el antígeno es inmovilizado y detectado (Shah & Maghsoudlou, 2016). De manera general, se pueden clasificar en métodos homogéneos y heterogéneos. En el primero, la reacción antígeno-anticuerpo y su medida se realiza en solución sin la separación previa de antígeno libre o complejo anticuerpo-anticuerpo (Jenkins, 1992).

Los métodos heterogéneos son los más utilizados y permite una mayor sensibilidad que los descritos anteriormente. Estos métodos consisten en formar el complejo antígeno-anticuerpo sobre una fase sólida y remover, mediante lavados, el antígeno libre en la reacción (Aydin, 2015). Los tipos de métodos heterogéneos se describen con mayor profundidad a continuación:

### a. Directo

Esta modalidad de ELISA es la más simple para detectar antígenos. Este es adecuado para la detección de antígenos de alto peso molecular. La técnica consiste en recubrir la placa con antígeno. El exceso de antígeno se lava y se añade una solución de bloqueo, usualmente albúmina de suero bovino o detergentes, para minimizar unión no específica (Shah & Maghsoudlou, 2016). Esta se incuba con un anticuerpo acoplado a una enzima para su medición. La incubación es seguida por lavado para eliminar antígenos o anticuerpos libres del medio (Aydin, 2015). Después se añade un sustrato que produce un cambio de color que puede ser medido en el espectrofotómetro. La siguiente figura (Figura 3) muestra el proceso de un ELISA directo:

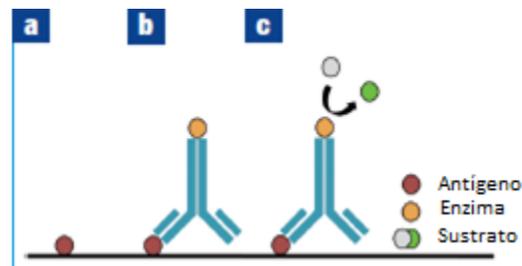


Figura 3. Protocolo de ELISA directo.

(Shah & Maghsoudlou, 2016)

### b. Indirecto

Este tipo de inmunoensayo presenta el mismo principio que el anterior descrito. La diferencia está en la cantidad de anticuerpos utilizados para la detección del antígeno en la placa (Gan & Patel, 2013). Seguido de la inmovilización del antígeno, adición de solución de bloqueo y lavado, se añade un anticuerpo primario que se une al antígeno en la placa. Posterior a esto, se añade un anticuerpo secundario conjugado con una enzima. De manera similar al ELISA directo, se incuba la placa y se añade un sustrato enzimático que produce el cambio de color para ser medido en el espectrofotómetro (Shah & Maghsoudlou, 2016). Este proceso se muestra de mejor manera en la Figura 4 (siguiente página):

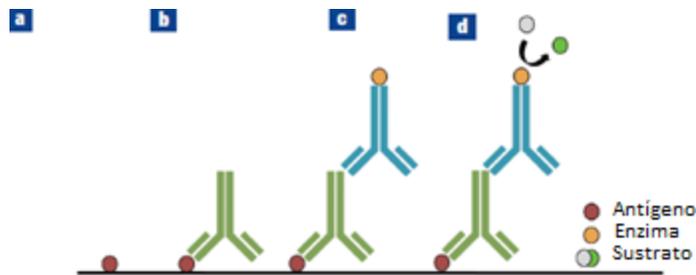


Figura 4. Protocolo de ELISA indirecto.

(Shah & Maghsoudlou, 2016)

### c. Sándwich

Su nombre deriva de la capacidad del ensayo de capturar el antígeno entre dos anticuerpos, formando un “sándwich” (Shah & Maghsoudlou, 2016). La placa se recubre con un anticuerpo específico para el antígeno en la muestra. Después de recubrir los sitios de unión no específicos con albúmina de suero bovino, se añade el antígeno contenido en la muestra. Un anticuerpo primario se adiciona para que atrape el antígeno junto con el anticuerpo en la placa. Un anticuerpo secundario conjugado a una enzima se une específicamente al anticuerpo primario. El exceso se lava para posteriormente añadir el sustrato que enzimáticamente se convierte en un producto coloreado que puede ser medido en un espectrofotómetro (Gan & Patel, 2013). Su proceso se muestra en la siguiente figura (Figura 5):

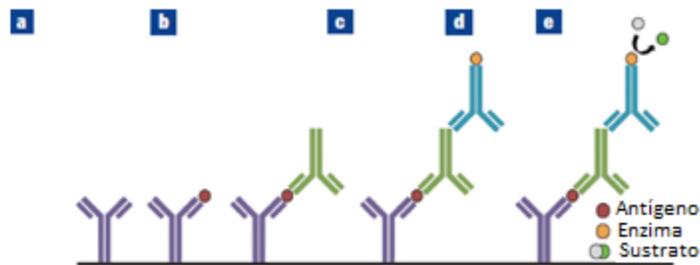


Figura 5. Protocolo de ELISA “sándwich”.

(Shah & Maghsoudlou, 2016)

### d. Competitivo

El proceso clave de este tipo de inmunoensayo es la reacción competitiva entre el antígeno de la muestra y el antígeno adherido a los pozos de la placa con el anticuerpo primario. El anticuerpo primario se incuba con la muestra y este se une, manera específica, al antígeno presente en esta. Los complejos antígeno-anticuerpo se agregan a la placa con el antígeno recubierto. Después de su incubación, se lavan los anticuerpos libres. Entre mayor antígeno exista

en la muestra, mayor cantidad de anticuerpos primarios se unirán a dicho antígeno. Por lo tanto, habrá una baja cantidad de anticuerpos libres para unirse al antígeno en el pocillo de la placa (Gan & Patel, 2013). Un anticuerpo secundario conjugado a una enzima se añade, seguido de un sustrato que produce la señal cromogénica. El ELISA competitivo genera una curva inversa, en la cual una alta cantidad de antígeno en la muestra produce una señal baja (Shah & Maghsoudlou, 2016).

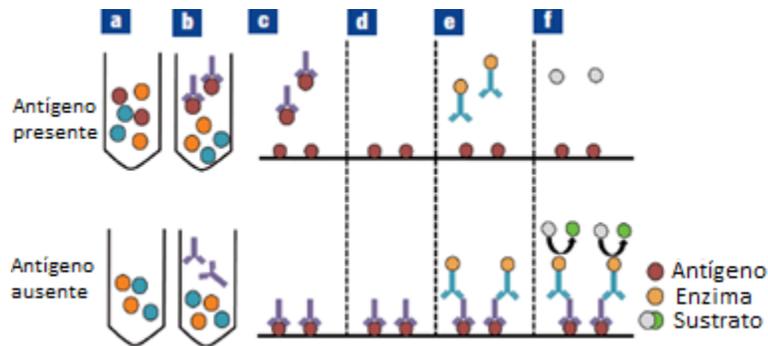


Figura 6. Protocolo de ELISA competitivo.

(Shah & Maghsoudlou, 2016)

### 3. Inmunógenos

Debido a la interacción antígeno-anticuerpo en el inmunoensayo ELISA, el antígeno debe ser suficientemente grande para poder formar dicho complejo. La mayoría de pesticidas tienen un bajo peso molecular y no son ordinariamente antigénicos. Estos deben ser acoplados a una molécula portadora, usualmente una proteína, para inducir una respuesta de anticuerpos. Las moléculas que más se utilizan son fracciones de globulinas, albúminas séricas de diferentes especies, ovoalbúmina, fibrinógeno, entre otras (Dankwardt, 2006).

La derivatización de los analitos permiten incrementar la sensibilidad del inmunoensayo. En este caso, se ha visto que la adición de anhídrido acético puede incrementar la sensibilidad del inmunoensayo 100 veces más (Rubio *et al.*, 2003).

### C. DESARROLLO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

La química analítica es el estudio de la separación, cuantificación e identificación de componentes químicos en muestras naturales o artificiales que se constituyen de uno o varios elementos (Ravisankar *et al.*, 2015). En esta disciplina se pueden obtener resultados cualitativos o cuantitativos, ya sea para detectar presencia o ausencia de un analito o cuantificarlo en una muestra en particular. Los instrumentos analíticos tienen un rol fundamental en la generación de

resultados confiables y de alta calidad. El desarrollo de métodos analíticos es el proceso de seleccionar un procedimiento de ensayo para determinar la composición de una muestra. Estos métodos, posterior a su desarrollo, deben ser validados para garantizar que cumplen con su cometido y que generen resultados confiables y precisos (Chauhan *et al.*, 2015).

La Oficina Guatemalteca de Acreditación (OGA) es el principal encargado de aplicar y administrar la Acreditación en todo el territorio nacional, con el fin de reconocer la competencia técnica de los organismos de evaluación de conformidad, en base a normas nacionales e internacionales vigentes. Entre los organismos sujetos a evaluación por la OGA se encuentran los laboratorios de ensayo y calibración, los cuales trabajan bajo la norma COGUANOR ISO/IEC 17025. Actualmente, Guatemala cuenta con 23 laboratorios de análisis y 4 laboratorios de calibración acreditados bajo dicha norma.

## **1. Tipos de métodos**

### **a. Métodos normalizados**

Se consideran métodos normalizados a todos aquellos emitidos por organismos de normalización internacionales, regionales o nacionales (Organismo Argentino de Acreditación, 2013). Las normas de calidad y regulaciones requieren el uso de este tipo de métodos y se emplean en situaciones en las que el método es ampliamente utilizado. Adicionalmente, estos deben usarse tal y como están descritos (Organismo Guatemalteco de Acreditación, 2018).

### **b. Métodos no normalizados**

Este tipo de métodos deben estar apropiadamente validados para poder ser utilizados, ya sea desarrollado por un tercero o resultado de una modificación de un método normalizado. La validación de este tipo de métodos se hace para demostrar que las modificaciones no tienen repercusión en la calidad de los resultados. La norma COGUANOR NTG ISO/IEC 17025, adoptada por el Organismo Guatemalteco de Acreditación como criterio de acreditación para laboratorios de ensayo y calibración, establece que el laboratorio debe desarrollar un procedimiento de ensayo que incluya al menos: (i) identificación apropiada, (ii) alcance, (iii) Descripción del tipo de objeto a ensayar, (iv) aparatos y equipos, (v) patrones de referencia y materiales de referencia, (vi) condiciones ambientales, (vii) descripción del procedimiento, (viii) criterios de aceptación o rechazo, (ix) registro de datos e incertidumbre (Organismo Guatemalteco de Acreditación, 2018).

### **c. Métodos desarrollados por el laboratorio**

El laboratorio debe demostrar un plan que incluye la evaluación de persona, equipo y recursos que le permita desarrollar métodos propios. Estos deben ser adecuadamente validados, documentados y autorizados antes de ser utilizados en dicho establecimiento. Se debe emplear un material de referencia equivalente al de la muestra (Organismo Guatemalteco de Acreditación, 2018).

## **2. Validación de métodos analíticos**

### **a. Definición**

Según la norma ISO/IEC 17025, el término validación significa: “confirmación, a través del examen y aportación de evidencias objetivas, de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico”(Bravo *et al.*, 2010). Existe una dependencia entre el desarrollo y validación de métodos ya que muchos de los parámetros que se observan en su desarrollo son evaluados en el proceso de validación.

### **b. Importancia de la validación de métodos**

La importancia de la validación de métodos surge de la competencia internacional, manteniendo el estándar de los productos en un alto valor comercial y por razones éticas (Chauhan *et al.*, 2015). Adicional, la validación de los métodos analíticos es parte de los componentes de un resultado de calidad. Con un resultado de calidad, el químico analítico puede tomar una decisión con confianza (Bravo *et al.*, 2010).

### **c. Herramientas de validación**

Para el proceso de validación de métodos analíticos, se emplean diferentes herramientas, entre las cuales se encuentran: blancos, muestras de rutina, soluciones fortificadas, materiales pre-adicionados y patrones de medida.

El uso de diferentes blancos permite evaluar la señal obtenida por el equipo y determinar cuánta parte de esta se atribuye al analito y cuanta parte se atribuye a otras causas. Entre los blancos utilizados se encuentran: de reactivos y de muestra. Los blancos de reactivo son aquellos utilizados durante el proceso analítico. Los blancos de muestra, por otra parte, son aquellas que no contienen el analito de interés. Estas brindan una estimación real de las interferencias que pueden aparecer (Bravo *et al.*, 2010).

La segunda herramienta son las muestras de rutina. Estas proporcionan información sobre la precisión e interferencias que pueden aparecer en un análisis de rutina. Estas son muestras que

contienen el analito de interés. Estas se contrastan con las soluciones fortificadas, donde el analista intencionalmente adiciona el analito de interés a una concentración conocida. Se debe poner cuidado especial de que la concentración no supere el intervalo de trabajo del método (Bravo *et al.*, 2010).

Otra herramienta utilizada son los materiales pre-adicionados. Estas son materiales en los que el analito de interés se agregó en algún momento previo al muestreo para análisis. Los patrones de medida son sustancias en la cual se ha caracterizado una propiedad particular y puede emplearse como referencia metrológica. Entre estas encontramos los materiales de referencia certificado (MRC), en la cual el valor del parámetro de interés se certifica con un documento que demuestra su trazabilidad y su incertidumbre (Ministerio de trabajo y asuntos sociales de España, 2009).

#### **d. Parámetros de desempeño del método**

La norma COGUANOR ISO/IEC 17025 exige la evaluación de ciertas características de un método en particular durante su proceso de validación. Entre estos parámetros se encuentran: selectividad, límite de detección (LOD), límite de cuantificación (LOQ), intervalo de trabajo, linealidad, veracidad, precisión, robustez e incertidumbre de la medida. Cada uno de estos se explica en mejor detalle a continuación.

##### **1) Selectividad**

Se define como la capacidad del método para determinar simultánea o separadamente analitos diferentes presentes en una misma muestra (Oficina Guatemalteca de Acreditación, 2018). En la etapa de medición para un método analítico en particular, no se mide directamente la concentración del analito sino una propiedad específica. En este caso, es fundamental establecer que la propiedad medida sea del analito y no de compuestos con estructura o química similar (Bravo *et al.*, 2010).

Para evaluar la selectividad de un método, se estudia su capacidad de medir el analito de interés en muestras que contienen interferencias específicas. De no conocer si las interferencias se encuentran en la muestra, se estudia la capacidad del método para medir el analito comparando con otros métodos independientes (Bravo *et al.*, 2010).

##### **2) Límite de detección y cuantificación**

El límite de detección (LOD) se puede definir como la concentración mínima de analito en la matriz de una muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo

condiciones específicas (Oficina Guatemalteca de Acreditación, 2018). En esta parte es necesario distinguir el límite de detección del instrumento y el límite de detección del método. El primero puede basarse en la medición de una muestra blanco de reactivo sometido directamente al instrumento. El límite de detección del método es el más útil para validación y se basa en análisis de muestras que son sometidas a todo el proceso de medición (Bravo *et al.*, 2010).

El límite de cuantificación (LOQ) se define como la concentración mínima de analito en la matriz de una muestra que puede ser cuantificada con una exactitud y precisión aceptable bajo condiciones específicas (Oficina Guatemalteca de Acreditación, 2018).

Tanto el LOQ como el LOD requieren un replicado representativo para obtener una desviación estándar adecuada para calcular dichos límites. Normalmente, se realizan entre 6-15 réplicas para dicho parámetro y se recomiendan 10 réplicas para protocolos de validación (Bravo *et al.*, 2010). Estos dos conceptos se reflejan en una curva de calibración de la siguiente forma (Figura 7):

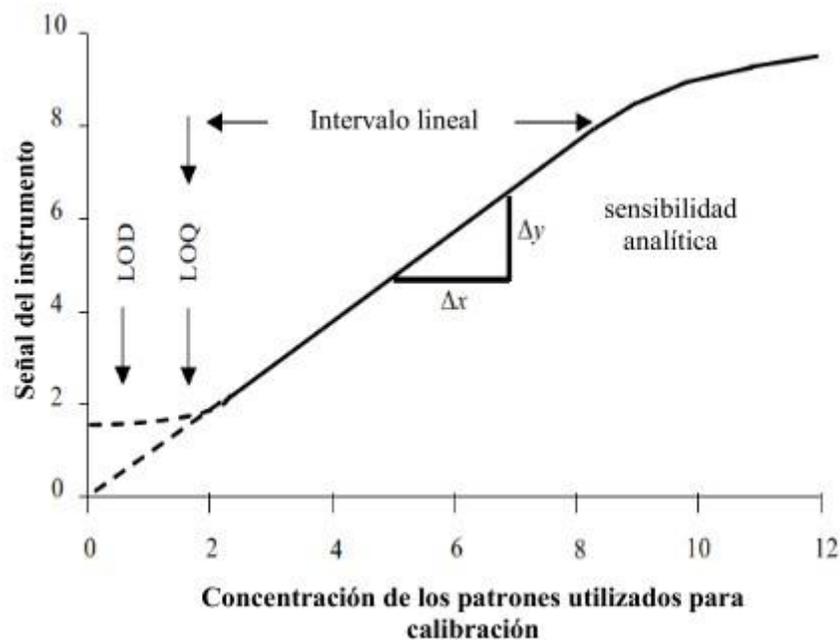


Figura 7. Curva de calibración obtenida a partir de un método instrumental. (Bravo *et al.*, 2010)

### **3) Intervalo de trabajo**

Se define como el intervalo en el cual el método proporciona resultados con una incertidumbre aceptable. El límite inferior del intervalo de trabajo está determinado por el límite de cuantificación (LOQ). El extremo superior está determinado por concentraciones en las cuales se observan desviaciones significativas en la sensibilidad analítica. En este parámetro de desempeño, se evalúa el intervalo de trabajo del método y del instrumento. El primero considera los procesos de extracción y separación del analito mientras que el segundo considera la muestra ya procesada (Bravo *et al.*, 2010).

### **4) Linealidad**

Capacidad del método analítico para generar resultados directamente proporcionales a la concentración del analito en un rango específico (Oficina Guatemalteca de Acreditación, 2018). Dependiendo del contenido del analito en la muestra, se selecciona un rango de linealidad apropiado. Para la evaluación de la linealidad, se emplea el coeficiente de determinación ( $R^2$ ), el cual determina el grado de ajuste lineal, y el análisis de residuos para la curva de calibración (Delgado, 2009).

### **5) Exactitud**

La exactitud se define como el grado de concordancia entre el valor aceptado (i. e. valor de referencia) y el valor encontrado (Oficina Guatemalteca de Acreditación, 2018). En la etapa de validación de métodos se busca analizar la exactitud de los resultados obtenidos mediante la evaluación de los efectos sistemáticos y aleatorios sobre estos. Por lo tanto, el estudio de la exactitud se basa en dos componentes: veracidad y precisión.

Veracidad es la expresión de la proximidad de la medida de un número infinito de resultados a un valor de referencia. Puesto que no se puede realizar dicho número de mediciones, se realiza una evaluación práctica denominada sesgo. Este se basa en la comparación de la media de los resultados con un valor de referencia. Para trabajar dicho parámetro, se realizan experimentos de recuperación por método de adición de estándar (Bravo *et al.*, 2010). El objetivo de estos experimentos es ver efectos de la matriz en la medición del analito de interés.

### **6) Precisión**

Como se mencionó anteriormente, el componente secundario de la exactitud es la precisión. La precisión es el grado de concordancia entre los valores de una serie repetida de ensayos, utilizando una muestra homogénea, bajo condiciones establecidas (Oficina Guatemalteca de Acreditación, 2018). Tanto para la precisión como el sesgo es importante la

medición repetitiva de ensayos para incluir las variaciones en las condiciones operativas que se pueden esperar cuando se utilice el método rutinariamente. Dentro de este parámetro, se consideran tres medidas: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad (Bravo *et al.*, 2010).

La repetibilidad es el grado de concordancia entre los resultados de mediciones sucesivas del mesurando, realizadas en la misma condición de medición (Oficina Guatemalteca de Acreditación, 2018). Esta supone dar la pequeña variación de los resultados (Bravo *et al.*, 2010) y se evalúa realizando 10 réplicas de materiales de referencia en el rango lineal por el mismo analista, mismo instrumento y mismas condiciones ambientales (Delgado, 2009).

La reproducibilidad supone dar la mayor variación en los resultados y es una medida de variabilidad en los resultados entre laboratorios (Bravo *et al.*, 2010). La OGA (2018) indica que algunos cambios válidos para reproducibilidad pueden ser: principio de medición, método, analista/observador, instrumento, material y patrones de referencia.

El punto medio entre estos dos extremos es la precisión intermedia, la cual ofrece una estimación de la variación de los resultados cuando las mediciones se realizan en un solo laboratorio, pero en condiciones que son más variables para la repetibilidad (Bravo *et al.*, 2010). Los parámetros de variación son: día, analista, equipo y lote de reactivos (Oficina Guatemalteca de Acreditación, 2018). Para evaluar estas tres mediciones se emplean parámetros de dispersión tales como: desviación estándar, varianza o coeficiente de variación (Delgado, 2009).

## **7) Robustez**

Se define como la capacidad del método analítico de no ser afectado por pequeñas pero deliberadas variaciones en los parámetros del método (Oficina Guatemalteca de Acreditación, 2018). En otras palabras, en condiciones experimentales establecidas, los pequeños cambios no deben causar variaciones significativas en los resultados obtenidos (Delgado, 2009). Este parámetro de desempeño proporciona una indicación de la fiabilidad del método durante su uso normal (Bravo *et al.*, 2010).

## **8) Incertidumbre de la medida**

La incertidumbre es un intervalo asociado con un resultado de medida que expresa el rango de valores que razonablemente pueden atribuirse a la cantidad que se está midiendo. Algunas consideraciones para el cálculo de incertidumbre de la medida son: incertidumbre en el valor de referencia, calibración de equipos e incertidumbres asociadas a la cristalería y sesgo con su incertidumbre (Bravo *et al.*, 2010). Este se incluye dentro de los parámetros de validación porque forma parte del desempeño de un método (Delgado, 2009).

### **3. Verificación de métodos analíticos**

#### **a. Definición**

Se define como aportación de evidencias objetivas de que un elemento satisface los parámetros especificados (Prichard *et al.*, 2011). Cuando un laboratorio adopta un método normalizado, sin modificación, este debe verificarse antes de ser utilizado para los análisis de las muestras de los clientes (Delgado, 2009). Este proceso, según la OGA (2018), debe emplearse de manera rutinaria como parte del proceso de aseguramiento de calidad.

#### **b. Diferencia entre verificación y validación**

La validación y verificación presentan significados similares, sin embargo, presentan procesos de evaluación diferentes. Según Delgado (2009), el proceso de verificación no necesita una evaluación rigurosa de los parámetros de desempeño del método como lo es para una validación de método. Adicionalmente, la validación de métodos involucra varios días y replicas para corroborar que cumpla con los parámetros mientras que una verificación de método puede requerir un solo día y dos réplicas para cada parámetro.

## V. ANTECEDENTES

La utilización de un inmunoensayo ELISA para la determinación de glifosato se ha empleado en varias matrices. Un estudio realizado por Bettazzi *et. al* (2018) utilizó un inmunoensayo magnético acoplado a sensores electroquímicos para la determinación de glifosato en cervezas. Se evaluaron parámetros como efectos de matriz, límite de detección y cuantificación, y ajuste logarítmico para el inmunoensayo. También se han utilizado muestras de aguas subterráneas, potable y orina en localidades agrícolas para monitoreo de niveles residuales de glifosato (Rendón-Von Osten & Dzul-Caamal, 2017). Otros estudios se han enfocado en el desarrollo y validación de inmunoensayos. Selvi *et. al* (2011) desarrollaron un ELISA, a base de anticuerpos aviares, para la detección de glifosato en muestras alimentarias y complementaron el análisis con cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detector de fluorescencia. Los parámetros que evaluaron en dicho ensayo fueron: reactividad cruzada, veracidad, sensibilidad y linealidad. Esta comparación entre técnicas se ha visto también en una investigación realizada por Fernando Rubio y colaboradores (2003), donde han llegado a concluir que la técnica de inmunoabsorción enzimática ELISA es económica y confiable para el análisis de este herbicida.

## **VI. METODOLOGÍA**

### **A. Sitio de estudio**

La validación de la metodología analítica para determinación de residuos de glifosato se llevó a cabo dentro de las instalaciones del laboratorio INLASA, S.A ubicado en la Ciudad de Guatemala.

### **B. Sujetos de estudio**

Para la validación de la metodología analítica de residuos de glifosato en vegetales, mediante la técnica de inmunoensayo ELISA, se evaluaron los siguientes parámetros de desempeño: selectividad, linealidad, límite de detección y cuantificación, veracidad, precisión y robustez.

### **C. Diseño, enfoque y tipo de investigación**

Enfoque: Cuantitativo.

El diseño de esta investigación es experimental. Este tiene un componente transversal de tipo correlacional ya que, dentro de los parámetros, la linealidad juega un papel importante en evaluar la correlación entre la concentración de glifosato y la absorbancia detectada por el espectrofotómetro. Adicionalmente, este presenta un componente descriptivo debido a la recolección de datos sobre cada parámetro de desempeño del método.

### **D. Tipo y tamaño de muestra**

Los tipos de muestras con los que se trabajará la validación de método por inmunoensayo ELISA son vegetales. Se realizaron soluciones de concentración conocida de glifosato para evaluar los parámetros del método analítico. Para el parámetro de selectividad, se utilizó un estándar de glicina y se trabajó con concentraciones dentro de la curva de calibración establecida por el kit comercial *Abraxis Glyphosate ELISA*.

### **E. Criterios de inclusión y exclusión**

Los vegetales (hortalizas) se clasifican según su parte comestible y las categorías son: frutos, bulbos, flor, hojas y tallos verdes, legumbres y raíces. El método por validar es apto para cuantificar glifosato en vegetales frescos y empacados correctamente con su respectivo código de muestra por parte del laboratorio. Debido a que las frutas no están en la categoría de hortalizas, se excluye cualquier tipo de fruta en este análisis.

## F. Variables

Cuadro 2. Definición y operacionalización de las variables de estudio.

Variable	Definición	Tipo	Unidad de medición
Absorbancia	Cantidad de luz que absorbe el analito.	Cuantitativa Razón	Unidades de Absorbancia
Concentración	Cantidad de analito en la muestra.	Cuantitativa Razón	Partes por billón (ppb)
Selectividad	Capacidad del método determinar simultánea o separadamente analitos diferentes presentes en una misma muestra.	Cuantitativa Razón	Partes por billón de glicina
Límite de detección	Concentración mínima de analito que puede ser detectada, mas no cuantificada, bajo condiciones establecidas.	Cuantitativa Razón	Partes por billón de glifosato
Límite de cuantificación	Concentración mínima de analito que puede ser cuantificada con una exactitud y precisión aceptable bajo condiciones establecidas.	Cuantitativa Razón	Partes por billón de glifosato

Variable	Definición	Tipo	Unidad de medición
Linealidad	Capacidad del método para generar resultados directamente proporcionales a la concentración de analito en un rango específico.	Cuantitativa Intervalo	Coefficiente de determinación ( $R^2$ )
Veracidad	Proximidad de la medida	Cuantitativa Razón	Porcentaje de recuperación
Precisión	Grado de concordancia entre los valores de una serie repetida de ensayos.	Cuantitativa Razón	Coefficiente de variación porcentual
Robustez	Capacidad del método de no ser afectado por pequeñas pero deliberadas variaciones en los parámetros del método.	Cuantitativa Razón	Tiempo de incubación para derivatización (minutos)

## G. Hipótesis

Hipótesis nula: La validación de la metodología analítica para la determinación de residuos de glifosato en vegetales mediante la técnica de inmunoensayo ELISA cumple con los parámetros de selectividad, límite de detección y cuantificación, precisión y robustez designados por la norma COGUANOR NTG ISO/IEC 17025.

Hipótesis alternativa: La validación de la metodología analítica para la determinación de residuos de glifosato en vegetales mediante la técnica de inmunoensayo ELISA es exacta, precisa, lineal y cumple con los parámetros de validación designados por la norma COGUANOR NTG ISO/IEC 17025.

## H. Instrumentos de medición

Fotómetro de microplacas ELISA.

## I. Metodología

### *Preparación solución madre de glifosato y glicina a 500ppm*

Se utilizó un estándar analítico de glifosato (Sigma Aldrich, 98% pureza) para la preparación de la solución madre. La glicina utilizada fue grado reactivo con una pureza de 99.8%.

### *Evaluación de parámetros de validación del método*

Para trabajar las muestras, estándares y controles, se siguió las indicaciones para derivatización y preparación de ELISA del kit comercial *Abraxis Glyphosate ELISA*, que se encuentra en la sección de Anexos.

#### 1. *Selectividad*

Se realizó solución de trabajo de glicina (Merck, grado reactivo) a 500 ppb. A partir de esta solución, se realizaron diluciones a dos concentraciones diferentes (1, 4 ppb) dentro de la curva de calibración.

#### 2. *Límite de detección y cuantificación*

Se realizaron 6 corridas de una solución blanco.

#### 3. *Linealidad*

Se realizó el procedimiento de derivatización y preparación de ELISA para el blanco y la curva de estándares de glifosato en triplicado.

#### 4. *Veracidad*

Se realizó el método de adición de estándar a tres niveles de la curva de calibración (0.25, 1 y 4 ppb) para evaluar recuperación del analito sobre la muestra preparada según el protocolo que se describirá a continuación.

#### 5. *Precisión*

Se realizaron 6 corridas del procedimiento según el inserto del kit comercial. Dichas corridas se efectuaron en dos diferentes días por dos analistas diferentes cada día para evaluación de repetibilidad y reproducibilidad.

#### 6. *Robustez*

Se incubó por 9 minutos para derivatización de muestras, controles y curva de calibración y preparar ELISA.

### *Preparación de muestra*

Se siguió el protocolo de preparación de muestra establecido por Selvi *et al.* (2011) que se encuentra en la sección de Anexos. De manera condensada, se pesó 1 gramo de muestra en un tubo polipropileno de 50ml. Se agregó una alícuota de concentración conocida de estándar de glifosato de manera que la concentración final se encuentre dentro de la curva de calibración. Se realizó una extracción con diclorometano y agua. Se sonicó la muestra y, posteriormente, se centrifugó por 10min a 8000g. Se transfirió la fase acuosa a otro tubo polipropileno y se evaporó hasta secado con nitrógeno a 55°C en baño. Finalmente, se disolvió en 1ml de buffer de ensayo. Modificaciones: Únicamente se transfirió la fase acuosa y se pasó por un filtro PVDF de 0.22µm para su respectivo análisis por ELISA.

## **J. Plan de análisis de datos y presentación de resultados**

Los parámetros de desempeño del método analítico se evaluaron utilizando estadística descriptiva y se evaluó cada parámetro de la siguiente manera:

### *1. Selectividad*

Se obtuvo la absorbancia (B) de la cada concentración de glicina y se dividió entre la absorbancia promedio del blanco (Bo) para obtener un porcentaje de adhesión (% B/Bo). Se obtuvo la concentración de glicina mediante la inserción del %B/Bo en la ecuación logarítmica de 4 parámetros. Se comparó concentraciones y %B/Bo entre glicina y glifosato.

### *2. Límite de detección y cuantificación*

Se calculó el % B/Bo para el diluyente de la forma descrita anteriormente. Utilizando %B/Bo de las 6 corridas del diluyente, se obtuvo la desviación estándar ( $\sigma$ ). Se calculó el límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ) mediante las siguientes ecuaciones:

$$LOD = 3 * \sigma \text{ ppb}$$

Ecuación 1. Determinación de límite de detección

$$LOQ = 10 * \sigma \text{ ppb}$$

Ecuación 2. Determinación de límite de cuantificación

### 3. *Linealidad*

Se obtuvo el %B/B<sub>0</sub> para cada estándar dividiendo la absorbancia promedio de cada estándar (B) por la absorbancia promedio del diluyente (Estándar cero, B<sub>0</sub>). Después, se realizó el gráfico entre el %B/B<sub>0</sub> y la concentración, en logaritmo, de glifosato. Se determinó el coeficiente de correlación de la curva generada utilizando el programa GraphPad Prism 6.

### 4. *Veracidad*

Para cada nivel establecido, se calculó el porcentaje de recuperación mediante la siguiente ecuación:

$$\%R = \frac{C_f - C_i}{C_a} * 100$$

Ecuación 3. Porcentaje de recuperación del glifosato

Donde C<sub>f</sub> es la concentración final, C<sub>i</sub> es la concentración después de la adición de un volumen definido de la solución estándar C<sub>a</sub>.

### 5. *Precisión*

Se calculó el coeficiente de variación porcentual (CV%) sobre las réplicas de la solución control de 75ppb realizadas por el investigador y los analistas de las instalaciones para evaluar la repetibilidad y reproducibilidad.

### 6. *Robustez*

Se comparó, mediante prueba T-Student al 95% de confianza, las medias de la solución control de 75 ppb sometidos a 9 minutos de incubación de derivatización y el tiempo de incubación indicado (10 minutos).

## VII. RESULTADOS

### A. Selectividad

El primer parámetro evaluado fue la selectividad. El Cuadro 3 refleja los porcentajes de adhesión (%B/Bo) obtenidos a dos concentraciones, tanto de glifosato como de glicina, dentro de la curva de calibración trabajada. Se puede observar que el glifosato presenta un porcentaje de adhesión (%B/Bo) menor a la glicina a los dos niveles de concentración mostrados en el cuadro. Adicionalmente, la glicina presenta %B/Bo similares a dos concentraciones diferentes.

Cuadro 3. Determinación de la selectividad del método ELISA para determinación de glifosato.

<b>Analito</b>	<b>Concentración (ppb)</b>	<b>%B/Bo</b>
<b>Glifosato</b>	1.00	0.401
	4.00	0.229
<b>Glicina</b>	1.00	0.737
	4.00	0.724

### B. Límite de detección y cuantificación

El Cuadro 4 muestra que el glifosato en vegetales es detectable a partir de 0.41 ppb. A partir de 1.38 ppb, se puede cuantificar el glifosato en vegetales con precisión y confiabilidad.

Cuadro 4. Límite de detección y cuantificación para la determinación de glifosato.

<b>Límite</b>	<b>Concentración (ppb)</b>
<b>Detección (LOD)</b>	0.41
<b>Cuantificación (LOQ)</b>	1.38

### C. Linealidad

La curva de calibración de ELISA de tipo competitivo se trabaja por regresión logística de 4-parámetros. En la Figura 8, se observa la relación sigmoideal entre el %B/Bo y las concentraciones logarítmicas de glifosato en ppb ( $\mu\text{g/L}$ ). Asimismo, se puede observar los coeficientes de determinación ( $R^2$ ) y determinación ajustado para la regresión logística de 4-parámetros utilizada en esta curva de calibración. Las líneas punteadas en el gráfico reflejan el intervalo de confianza asociado a la curva de calibración.

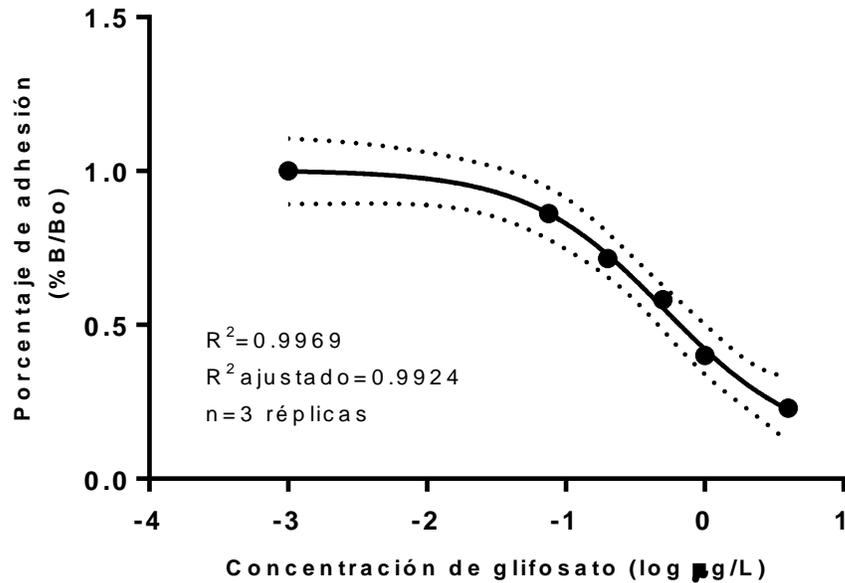


Figura 8. Curva de calibración de inmunoensayo ELISA para determinación de glifosato.

### D. Veracidad

En el Cuadro 5 se observan las concentraciones reales de glifosato, en ppb, agregadas a la muestra de vegetal y las concentraciones obtenidas luego de analizar la muestra. Para cada nivel de concentración, se observa los porcentajes de recuperación obtenidos con su respectivo coeficiente de variación (CV%). Únicamente el nivel de concentración de 3.924 ppb presenta un porcentaje de recuperación y CV% aceptable según la norma SANTE/11813/2017.

Cuadro 5. Recuperación del glifosato a distintos niveles de la curva.

Tipo de muestra	Nivel de concentración (ppb)	Concentración obtenida (ppb)	Recuperación	CV%
Vegetal	0.245	0.735	299.58%	20.20
	0.981	1.817	185.18%	90.40
	3.924	4.400	112.10%	11.48

### E. Precisión

Se observan las concentraciones de la solución control obtenidas mediante interpolación con la regresión de 4-Parámetros y su respectiva desviación estándar bajo condiciones de repetibilidad (1 analista) y reproducibilidad (entre 2 analistas). Asimismo se puede observar el coeficiente de variación (CV%) obtenido para cada condición evaluada. Los coeficientes de variación se encuentran dentro del rango aceptable establecido por la FDA para métodos bioanalíticos.

Cuadro 6. Evaluación de precisión del método mediante repetibilidad y reproducibilidad

Parámetro	Concentración promedio (ppb)	Desviación estándar (ppb)	CV%
Repetibilidad	0.785	0.130	16.52
Reproducibilidad	0.849	0.212	24.92

### F. Robustez

Para la medición de la robustez del método ELISA para la determinación de glifosato en vegetales, se varió el tiempo de incubación para derivatización de muestras, controles y estándares. Se varió a 9 minutos en comparación con 10 minutos, el cual es el tiempo que indica el inserto del kit comercial. A) Se observa la curva de calibración del glifosato a nueve minutos de tiempo de derivatización. Asimismo, se muestra una variación en los intervalos de confianza de la curva de calibración. B) Se muestra el gráfico de barras comparando la concentración de solución control a un tiempo de derivatización de 9 con el tiempo establecido por el kit (10 minutos). El valor p obtenido en la prueba T, a un 95% de confianza, fue de 0.7862.

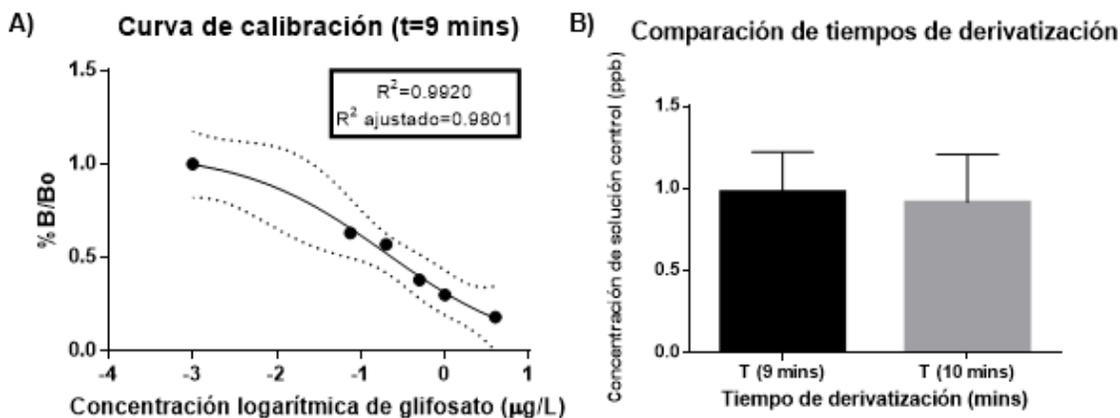


Figura 9. Evaluación de robustez del método ELISA para determinación de glifosato.

## VIII. DISCUSIÓN

El objetivo de este trabajo de investigación consiste en validar un método analítico para la determinación de residuos de glifosato en vegetales mediante la técnica de inmunoensayo ELISA. Para validar dicha metodología, se evaluaron los parámetros de desempeño establecidos por la norma COGUANOR ISO/IEC 17025:2017, los cuales son: selectividad, límite de detección y cuantificación, linealidad, exactitud, precisión y robustez.

La selectividad del método mide la capacidad de detectar el analito de interés (i.e glifosato) en una muestra en particular y no compuestos de estructura similar (Bravo *et al.*, 2010). La glicina es un aminoácido de estructura similar al glifosato (Seneff & F Orlando, 2018), por lo que se usó este compuesto para el ensayo de selectividad. En este caso, se puede observar que las soluciones de glicina preparadas a 1 y 4 partes por billón devuelven porcentajes de adhesión (%B/Bo) cercanos a 1 (Ver Cuadro 3). Al interpolar dichos porcentajes de adhesión (%B/Bo) en la regresión de 4P, se obtendrían concentraciones cercanas al blanco. Esto nos indica que el anticuerpo utilizado en el inmunoensayo es específico para la detección de glifosato, lo cual indica que el método es selectivo.

El siguiente parámetro de evaluación es el límite de detección y cuantificación. En el Cuadro 4, se puede observar que el límite de detección (LOD) para la matriz evaluada es de 0.41 ppb mientras que el límite de cuantificación (LOQ) es de 1.38 ppb. Esto indica que, dentro de este rango, se puede detectar presencia o ausencia de glifosato en las muestras de vegetales analizadas. A concentraciones mayores a 1.38 ppb, se puede cuantificar la cantidad de glifosato en la muestra con un grado de precisión y confiabilidad. Estos límites son aceptables para el laboratorio debido a que se encuentran debajo de los límites residuales máximos de glifosato establecidos por la FDA y Comisión Europea, los cuales son 1000 ppb (Selvi *et al.*, 2011) y 0.1 ppm [100 ppb] (European Comission, 2017), respectivamente.

La linealidad es la capacidad del método para generar resultados directamente proporcionales a la concentración del analito en un rango específico. En este caso, al trabajar con un inmunoensayo competitivo, se emplea una regresión logística de 4 parámetros con la finalidad de obtener un modelo adecuado para el comportamiento de este (Azadeh *et al.*, 2018). La Figura 8 muestra la curva de calibración obtenida al graficar el porcentaje de adhesión (%B/Bo) vs la concentración logarítmica de glifosato. Se puede observar que se obtuvo un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de 0.9969, lo cual indica que el 99.69% de la variabilidad en la variable dependiente son explicadas por el modelo logístico de regresión. Adicionalmente, un valor cercano

a uno indica una mayor fuerza de asociación entre ambas variables bajo el modelo establecido. Según los parámetros de aceptación de la Oficina Guatemalteca de Acreditación (OGA), se requiere un coeficiente de determinación mínimo de 0.98. Al obtener un  $R^2$  mayor al establecido por dicha oficina, se cumple el parámetro de linealidad.

La veracidad del método analítico es la proximidad de la medida a un valor de referencia. En esta validación, se realizaron evaluaciones de recuperación a distintos niveles de la curva del kit comercial. El Cuadro 5 refleja los porcentajes de recuperación obtenidos con su respectivo coeficiente de variación (CV%). Según la norma SANTE/11813/2017, utilizada para la validación de métodos para residuos de pesticidas en alimentos y complementaria con la norma ISO 17025, requiere que los porcentajes de recuperación se encuentren en un rango de 70-120% con un coeficiente de variación menor a 20%. Utilizando esta base, únicamente la concentración de 3.924 ppb cumple con los criterios mencionados. Esto se debe principalmente a que dicha concentración se encuentra por arriba del límite de cuantificación y los niveles de recuperación por debajo de este límite presentan altas variaciones en las réplicas, reflejado en el coeficiente de variación. Por lo tanto, el parámetro de veracidad se cumple al trabajar con recuperaciones por arriba del límite de cuantificación.

La precisión del método se midió por medio de la repetibilidad y reproducibilidad (Bravo *et al.*, 2010), los cuales se evaluaron con 1 y 2 analistas, respectivamente. En este caso, se observa que el coeficiente de variación para la reproducibilidad es mayor a la variación de la repetibilidad ya que depende de factores propios del personal ya sea en habilidades de uso de micropipeta en el ensayo o forma de lavado. Según la guía de validación de métodos bioanalíticos de la FDA (2018), las muestras control para inmunoensayos no deben tener un coeficiente de variación mayor a 25%. En este caso, la reproducibilidad como la repetibilidad sobre las soluciones control del kit tienen coeficientes de variación por debajo del límite mencionado anteriormente, por lo que el método es preciso.

La robustez es un parámetro que indica la capacidad del método de no ser afectado por pequeñas pero deliberadas variaciones en los parámetros del método (Oficina Guatemalteca de Acreditación, 2018). En este caso, se varió el tiempo de incubación para derivatización de las muestras, estándares y control del ensayo. La Figura 9B muestra que no hay diferencia significativa (valor  $p$  0.7862) entre los 9 minutos de incubación y el tiempo de incubación establecido por el inserto del kit comercial (10 minutos). Esto comprueba que el método es robusto, sin embargo, se recomienda seguir las indicaciones del manual para no generar variaciones en los niveles de confianza de los estándares, tal y como se muestran en la Figura 9A.

## **IX. CONCLUSIONES**

1. El método analítico para la determinación de residuos de glifosato en vegetales por medio de la técnica de inmunoensayo ELISA es válido bajo los parámetros de desempeño establecidos por COGUANOR ISO/IEC 17025:2017.
2. El método es exacto a concentraciones por arriba 1.38 partes por billón, reflejado en el porcentaje de recuperación obtenido y su respectivo coeficiente de variación.

## **X. RECOMENDACIONES**

Para profundizar en la etapa de validación de este método, se recomienda realizar ensayos de recuperación a niveles por arriba por del límite de cuantificación (LOQ) del método. Dichos experimentos de recuperación se pueden hacer con dos analistas para evaluar la variación intra e inter-ensayo para poder compararlos con los criterios de aceptación de la norma SANTE/11813/2017. Al trabajar con inmunoensayos, se recomienda también utilizar micropipetas multicanal para reducir el error durante las etapas del análisis. Por último, se recomienda evaluar el método con frutas para ampliar el alcance del método.

## XI. BIBLIOGRAFÍA

- Acreditación, O. A. de. (2013). *OAA Organismo Argentino de Acreditación GUIA PARA VALIDACION DE METODOS DE ENSAYO*. Retrieved from <http://www.oaa.org.ar/docs/GUI-LE-03 v1.pdf>
- Acreditación, O. G. de. (2010). Acerca de la OGA. Retrieved March 19, 2019, from <http://www.oga.org.gt/company-profile/>
- Acreditación, O. G. de. (2018). *OGA-GEC-016 " Política de la Selección y Validación de Métodos de Ensayo ."* Guatemala.
- Ali, N., Datta, S. K., & Datta, K. (2010). RNA interference in designing transgenic crops. *GM Crops*, 1(4), 207–213. <https://doi.org/10.4161/gmcr.1.4.13344>
- Alves-Balvedi, R. P., Valle, A. L., Mello, F. C. C., Goulart, L. R., & Rodrigues, L. P. (2018). Glyphosate detection: methods, needs and challenges. *Environmental Chemistry Letters*, (0123456789). <https://doi.org/10.1007/s10311-018-0789-5>
- Aydin, S. (2015). A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides*, 72, 4–15. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.04.012>
- Azadeh, M., Gorovits, B., Kamerud, J., MacMannis, S., Safavi, A., Sailstad, J., & Sondag, P. (2018). Calibration Curves in Quantitative Ligand Binding Assays: Recommendations and Best Practices for Preparation, Design, and Editing of Calibration Curves. *AAPS Journal*, 20(1). <https://doi.org/10.1208/s12248-017-0159-4>
- Bawa, A. S., & Anilakumar, K. R. (2013). Genetically modified foods: safety, risks and public concerns-a review. *J Food Sci Technology*, 50(6), 1035–1046. <https://doi.org/10.1007/s13197-012-0899-1>
- Bravo, V. P., R Ellison, S. L., & F Gjengedal, E. L. (2010). *Una Guía de Laboratorio para Validación de Métodos y Temas Relacionados*. (U. Örnemark & B. Magnusson, Eds.) (2nd ed.). Suecia. Retrieved from [www.eurachem.org](http://www.eurachem.org)
- Chauhan, A., Mittu, B., & Chauhan, P. (2015). Need of analytical method development and validation. *Analytical & Bioanalytical Techniques*, 6(1). <https://doi.org/10.4172/2155-9872.1000233>
- Dankwardt, A. (n.d.). *Immunochemical Assays in Pesticide Analysis*. Retrieved from <https://pdfs.semanticscholar.org/3261/02b56eae664c71fc6a000f5e5de203f3de58.pdf>
- Dankwardt, A. (2006). Immunochemical Assays in Pesticide Analysis. In *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470027318.a1714>
- Delgado, G. (2009). Validación y verificación de métodos de ensayos . Un dilema en los laboratorios de ensayos y en las auditorías de la acreditación, (March), 14–21.
- European Commission. (2017). EU Pesticides database - European Commission. Retrieved December 1, 2019, from <https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=pesticide.residue.selection&language=EN>
- Gan, S. D., & Patel, K. R. (2013). Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Investigative Dermatology*, 133(9), 1–3. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.287>
- Gomes, M. P., Smedbol, E., Chalifour, A., Hénault-Ethier, L., Labrecque, M., Lepage, L., ... Juneau, P. (2014). Alteration of plant physiology by glyphosate and its by-product aminomethylphosphonic acid: an overview. *Journal of Experimental Botany*, 65(17), 4691–4703. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru269>
- Guyton, K. Z., Loomis, D., Grosse, Y., El Ghissassi, F., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., ... Zeise, L. (2015). Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate. *The Lancet Oncology*, 16(5), 490–491. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)70134-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)70134-8)
- Herrmann, K. M. (1995). *The Shikimate Pathway: Early Steps in the Biosynthesis of Aromatic Compounds*. *The Plant Cell* (Vol. 7). American Society of Plant Physiologists. Retrieved from <http://www.plantcell.org/content/plantcell/7/7/907.full.pdf>

- IARC. (2015). Glyphosate Evaluation. Retrieved March 25, 2019, from [http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol112/mono112-10.pdf%0Ahttps://www.iarc.fr/en/media-centre/iarcnews/2016/glyphosate\\_IARC2016.php](http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol112/mono112-10.pdf%0Ahttps://www.iarc.fr/en/media-centre/iarcnews/2016/glyphosate_IARC2016.php)
- Jenkins, S. H. (1992). Homogeneous enzyme immunoassay. *Journal of Immunological Methods*, 150(1–2), 91–97. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(92\)90067-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(92)90067-4)
- Juarez, S. E. (2014). *EFECTOS SINÉRGICOS DEL SULFATO DE AMONIO Y EL GLIFOSATO N-(FOSFOMETIL) GLICINA SOBRE EL CONTROL DE MALEZAS EN EL CULTIVO DE BANANO; AYUTLA, SAN MARCOS (1997-2012)*. Universidad Rafael Landívar. Retrieved from <http://biblio3.url.edu.gt/Tesario/2014/06/17/Juarez-Selvin.pdf>
- Lequin, R. M. (2005). Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). <https://doi.org/10.1373/clinchem.2005.051532>
- Li, Z., & Jennings, A. (2017). Worldwide Regulations of Standard Values of Pesticides for Human Health Risk Control: A Review. *Environmental Research and Public Health*, 14(826), 41. <https://doi.org/10.3390/ijerph14070826>
- Lisowska, K., Biology, M., Biology, T., Sk, M., Memorial, C., & Branch, G. (2011). XII Conference Environmental Genetically modified crops and food : pros and cons, (11).
- Macbean, C. (2012). *The Pesticide Manual: A World Compendium* (16th ed.). British Crop Protection Council.
- Maeda, H., & Dudareva, N. (2012). The Shikimate Pathway and Aromatic Amino Acid Biosynthesis in Plants. *Annual Review of Plant Biology*, 63(1), 73–105. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105439>
- Ministerio de trabajo y asuntos sociales de España. (2009). *NTP 656- MATERIALES DE REFERENCIA. UTILIZACION EN EL LABORATORIO CLINICO INDUSTRIAL*. España.
- Motta, E. V. S., Raymann, K., & Moran, N. A. (2018). Glyphosate perturbs the gut microbiota of honey bees. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(41), 10305–10310. <https://doi.org/10.1073/pnas.1803880115>
- Nucci, D. G., Srf, J., & Pcp, R. (2018). Brief review analytical methods for the determination of glyphosate. *MOJ Toxicol*, 4(1), 39–42. <https://doi.org/10.15406/mojt.2018.04.00088>
- Oulkar, D. P., Hingmire, S., Goon, A., Jadhav, M., Ugare, B., Thekkumpurath, A. S., & Banerjee, K. (2017). Optimization and validation of a residue analysis method for glyphosate, glufosinate, and their metabolites in plant matrixes by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Journal of AOAC International*, 100(3), 631–639. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.17-0046>
- Owen, M. D. K., & Zelaya, I. A. (2005). Herbicide-resistant crops and weed resistance to herbicides. *Pest Management Science*, 61(3), 301–311. <https://doi.org/10.1002/ps.1015>
- Powles, S. O. D. S. B. (2010). Glyphosate-Resistant Crops and Weeds: Now and in the Future. *AgoBioForum*, 12(3). Retrieved from <http://www.agbioforum.org/v12n34/v12n34a10-duke.htm>
- Prichard, E., Magnusson, B., Patriarca, M., Superiore di Sanità, I., Elizabeth Prichard, I., Andersen, J., ... Hospital, K. (2011). *Terminology in Analytical Measurement-Introduction to VIM 3 First Edition 2011 Editors Vicki Barwick (LGC, UK)*. (V. Barwick & E. Prichard, Eds.) (1st ed.). UK National Measurement System. Retrieved from [www.eurachem.org](http://www.eurachem.org)
- Ravisankar, P., Naga Navya, C., Pravallika, D., & Navya, D. (2015). *A Review on Step-by-Step Analytical Method Validation*. *IOSR Journal Of Pharmacy* (Vol. 5). Retrieved from [www.iosrphr.org](http://www.iosrphr.org)
- Rendón-Von Osten, J., & Dzul-Caamal, R. (2017). Glyphosate residues in groundwater, drinking water and urine of subsistence farmers from intensive agriculture localities: A survey in Hopelchén, Campeche, Mexico. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(6). <https://doi.org/10.3390/ijerph14060595>
- Rubio, F., Veldhuis, L. J., Clegg, B. S., Fleeker, J. R., & Hall, J. C. (2003). Comparison of a Direct ELISA and an HPLC Method for Glyphosate Determinations in Water. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(3), 691–696. <https://doi.org/10.1021/jf020761g>
- Selvi, A. A., Sreenivasa, M. A., & Manonmani, H. K. (2011). Enzyme-linked immunoassay for the detection of glyphosate in food samples using avian antibodies. *Food and Agricultural Immunology*, 22(3), 217–228. <https://doi.org/10.1080/09540105.2011.553799>
- Seneff, S., & F Orlando, L. (2018). Glyphosate Substitution for Glycine During Protein Synthesis

- as a Causal Factor in Mesoamerican Nephropathy. *Journal of Environmental & Analytical Toxicology*, 08(01), 1–9. <https://doi.org/10.4172/2161-0525.1000541>
- Seneff, S., & Orlando, L. (2018). Is Glyphosate a Key Factor in Mesoamerican Nephropathy? *Journal of Environmental & Analytical Toxicology*, 8(1), 10. <https://doi.org/10.4172/2161-0525.1000542>
- Shah, K., & Maghsoudlou, P. (2016). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): the basics. *British Journal of Hospital Medicine*, 77(7), C98–C101. <https://doi.org/10.12968/hmed.2016.77.7.C98>
- Silva, V., Montanarella, L., Jones, A., Fernández-Ugalde, O., Mol, H. G. J., Ritsema, C. J., & Geissen, V. (2018). Distribution of glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) in agricultural topsoils of the European Union. *Science of the Total Environment*, 621, 1352–1359. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.093>
- Spaunhorstid, D. J., Todd, J. R., & Hale, A. L. (2019). Sugarcane cultivar response to glyphosate and trinexapac-ethyl ripeners in Louisiana. *Plos One*, 14(6), 10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218656>
- Swanson, N. L., Hoy, J., & Seneff, S. (2016). Evidence that glyphosate is a causative agent in chronic sub-clinical metabolic acidosis and mitochondrial dysfunction Evidence that glyphosate is a causative agent in chronic sub-clinical metabolic acidosis and mitochondrial dysfunction. *International Journal of Human Nutrition and Functional Medicine*, 4(August), 32.
- Szekacs, A., & Darvas, B. (2012). Forty Years with Glyphosate. In *Herbicides - Properties, Synthesis and Control of Weeds*. InTech. <https://doi.org/10.5772/32491>
- Tarazona, J. V., Court-Marques, D., Tiramani, M., Reich, H., Pfeil, R., Istace, F., & Crivellente, F. (2017). Glyphosate toxicity and carcinogenicity: a review of the scientific basis of the European Union assessment and its differences with IARC. *Archives of Toxicology*, 91(8), 2723–2743. <https://doi.org/10.1007/s00204-017-1962-5>
- Tomlin, C. (2000). *The pesticide manual : a world compendium*. (C.D.S. Tomlin, Ed.) (12th ed.). Farnham: British Crop Protection Council.
- Zhang, C., Wohlhueter, R., & Zhang, H. (2016). ScienceDirect Genetically modified foods: A critical review of their promise and problems. *Food Science and Human Wellness*, 5, 116–123. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2016.04.002>

## **XII. ANEXOS**

### **PROCOLO MODIFICADO DE PREPARACIÓN DE MUESTRA**

1. Pesar 1 gramo de vegetal en un tubo de polipropileno de 50ml.
2. Agregar alícuota de solución de trabajo de glifosato a la muestra de vegetal.
3. Agregar 10ml de agua ultrapura y 5ml de diclorometano.
4. Sonicar tubo por 10mins y mezclar vigorosamente por 1 minuto.
5. Sonicar el tubo con la muestra por 10 minutos adicionales.
6. Centrifugar muestra por 10 minutos a 8000g.
7. Transferir fase acuosa a otro tubo de polipropileno.
8. Pasar fase acuosa obtenida sobre un filtro PVDF de 0.22 $\mu$ m.
9. Trabajar muestra según indicaciones del kit *Abraxis Glyphosate*

### **PROCOLO DE DERIVATIZACIÓN Y PREPARACIÓN DE ELISA**

(Ver documento adjunto).

### **CERTIFICADO DE ANÁLISIS DE GLIFOSATO MARCA SIGMA ALDRICH**

(Ver documento adjunto).

## Importance of Glyphosate Determination

Glyphosate, a broad-spectrum systemic herbicide, was introduced in 1974 by Monsanto under the trade name Roundup®. Glyphosate (N-(phosphonomethyl)glycine or 2-[(hydroxy-oxidophosphoryl)methylamino]acetic acid) is the largest selling agrochemical in the world and is marketed under dozens of trade names by many different manufacturers. Glyphosate is used for vegetation control of perennial and annual plants, broad-leaf weeds, grasses, woody plants, and aquatic weeds, as well as grain desiccation to increase harvest yield. The introduction of genetically modified crops resistant to Glyphosate (i.e. Roundup Ready®) has caused an increased use of Glyphosate, allowing farmers to control weeds without harming their crops. The emergence of Glyphosate-resistant weeds has also caused increases in frequency and volume of applications of Glyphosate in combination with other herbicides. Due to its widespread use, Glyphosate has become ubiquitous in the environment and food supply.

Glyphosate can adsorb to soil and is highly water soluble, which can cause surface and ground water contamination from runoff, soil erosion, and leaching especially after heavy rainfall. The long-term impact on the environment and human health are growing concerns. In March 2015, the World Health Organization's International Agency for Research on Cancer classified Glyphosate as "probably carcinogenic in humans" (category 2A). Some studies show a correlation between exposure to Glyphosate-based herbicides and non-Hodgkin's Lymphoma in humans and others show evidence of Glyphosate causing cancers in laboratory animals.

In the European Union, the combined maximum residue level (MRL) for Glyphosate and its relevant metabolites in drinking water is 0.1 ng/mL. In February 2016, the U.S. Food and Drug Administration announced it will be testing the US food supply for Glyphosate.

The Abraxis Glyphosate ELISA Assay can be performed in about 2 hours and requires only a few milliliters of sample.

## Performance Data

The Glyphosate ELISA has an estimated detection limit (90% B/B<sub>0</sub>) of 0.05 ppb (µg/L). The middle of the test (50% B/B<sub>0</sub>) is approximately 0.5 ppb. Determinations closer to the middle of the calibration curve give the most accurate results.

Test reproducibility: Intra and inter assay: < 17%

Recoveries:

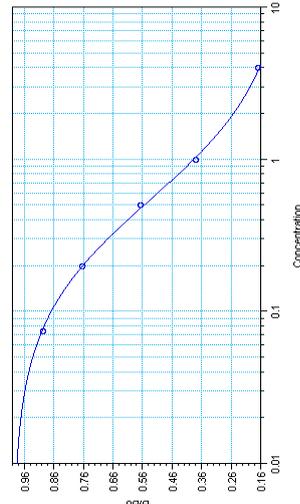
Level (ppb)	% Recovery
0.25	102
0.50	105
1.00	103
2.00	106

Specificity:

The cross-reactivity of the Glyphosate ELISA for various related analogues expressed as the least detectable dose (LDD) or 90% B/B<sub>0</sub> and as the dose required for 50% inhibition (50% B/B<sub>0</sub>) are as follows:

Compound	LDD (ppb)	50% (ppb)
Glyphosate	0.05	0.5
Glyphosine	50	3000
Glufoosinate	2000	70,000
AMPA	35,000	> 1,000,000
Glycine	> 10,000	> 1,000,000

Standard Curve:



For demonstration purposes only. Not for use in sample interpretation.

Roundup® and Roundup Ready® are registered trademarks of the Monsanto Company.

General Limited Warranty: Abraxis Inc. warrants the products manufactured by the Company, against defects and workmanship when used in accordance with the applicable instructions for a period not to extend beyond the product's printed expiration date. **Abraxis makes no other warranty, expressed or implied. There is no warranty of merchantability or fitness for a particular purpose.**

For ordering or technical assistance contact:

Abraxis, Inc.  
124 Railroad Drive  
Warminster, PA 18974  
Tel.: (215) 357-3911  
Fax: (215) 357-5232  
Email: [info@abraxiskits.com](mailto:info@abraxiskits.com)  
WEB: [www.abraxiskits.com](http://www.abraxiskits.com)

RI21117

## Glyphosate ELISA, Microtiter Plate

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Determination of Glyphosate in Water Samples

Product No. 500086



### 1. General Description

The Abraxis Glyphosate ELISA Plate Kit is an immunoassay for the quantitative and sensitive screening of Glyphosate in water samples. This test is suitable for the quantitative and/or qualitative screening of Glyphosate in groundwater, surface water, well, and tap water samples (refer to section C, Sample Collection and Handling). For soil, crop, and food sample applications, contact Abraxis for the appropriate technical bulletin and/or matrix validation guidelines. Samples requiring regulatory action should be confirmed by HPLC, GC/MS, or other conventional methods.

### 2. Safety Instructions

The standard and control solutions in the test kit contain small amounts of Glyphosate. The Derivatization Reagent Diluent is Dimethyl Sulfoxide (DMSO). In addition, the substrate solution contains tetramethylbenzidine and the stop solution contains diluted sulfuric acid. Avoid contact of these solutions with skin and mucous membranes. If these reagents come in contact with skin, wash thoroughly with water.

### 3. Storage and Stability

The Glyphosate ELISA Kit should be stored in the refrigerator (4-8°C). The solutions must be allowed to reach room temperature (20-25°C) before use. Reagents may be used until the expiration date on the box. Consult state, local, and federal regulations for the proper disposal of all reagents.

### 4. Test Principle

The test is a direct competitive ELISA based on the recognition of Glyphosate by polyclonal antibodies. The sample to be tested is derivatized (please refer to Section D, Test Preparation) and then added to microtiter wells coated with goat anti-rabbit antibodies. A rabbit anti-Glyphosate antibody solution is added to the wells with the derivatized samples and allowed to incubate for 30 minutes. The Glyphosate enzyme conjugate is then added and a competitive reaction occurs between the Glyphosate, which may be present in the sample, and the enzyme labeled Glyphosate for the binding sites of the rabbit anti-Glyphosate antibodies bound by the goat anti-rabbit antibodies immobilized on the microtiter plate. The reaction is allowed to continue for 60 minutes. After a washing step and addition of the substrate solution, a color signal is generated. The intensity of the blue color is inversely proportional to the concentration of Glyphosate present in the sample. The color reaction is stopped after a specified time and the color is evaluated using an ELISA reader. The concentrations of the samples are determined by interpolation using the standard curve constructed with each run.

### 5. Limitations of the Glyphosate ELISA, Possible Test Interference

Numerous organic and inorganic compounds commonly found in samples have been tested and found not to interfere with this test. However, due to the high variability of compounds that might be found in samples, test interferences caused by matrix effects cannot be completely excluded. The presence of the following substances up to 10,000 ppm were found to have no significant effect on the Glyphosate ELISA results: nitrate, phosphate, sulfate, sodium fluoride, calcium, magnesium, copper, zinc, iron, and sodium thiosulfate. Manganese up to 100 ppm, humic acid up to 10 ppm, and sodium chloride up to 1M also had no significant effect on the Glyphosate ELISA results.

Solvents commonly used to extract pesticides from soil or plant matrices, such as methanol and acetone, were found to be acceptable for use at concentrations up to 100% with the Glyphosate ELISA.

Samples containing gross particulate matter should be filtered (refer to Section C, Sample Collection and Handling). Samples, which have been preserved with monochloroacetic acid or other acids, should be neutralized (pH ~ 7) prior to testing.

Standards, control, and samples must be derivatized prior to each analysis with the Glyphosate ELISA kit (See Section D, Test Preparation).

Mistakes in handling the test can also cause errors. Possible sources for such errors include: inadequate storage conditions of the test kit, incorrect pipetting sequence or inaccurate volumes of the reagents, too long or too short incubation times during the immune and/or substrate reaction, exposure to direct or indirect sunlight during the substrate reaction, or extreme temperatures (lower than 10°C or higher than 30°C) during the test performance.

As with any analytical technique (GC, HPLC, etc.), positive results requiring regulatory action should be confirmed by an alternative method.

- A. Reagents and Materials Provided** (\*Additional quantities available for purchase, contact Abraxis)
1. Microtiter plate coated with a secondary antibody (anti-rabbit), in a re-sealable aluminum pouch with desiccant.
  2. Glyphosate Antibody Solution, 6 mL
  3. Glyphosate Conjugate Solution, 6 mL
  4. Glyphosate Standards (6): 0, 0.075, 0.20, 0.5, 1.0, 4.0 ppb, 2 mL each
  5. Control at 0.75 ± 0.2 ppb, 2 mL
  6. Diluent/Zero Standard (Sample Diluent)\*, 30 mL
  7. Wash Buffer (5X) Concentrate, 100 mL, must be diluted before use, see Test Preparation (Section D)
  8. Substrate (Color) Solution (TMB), 16 mL
  9. Stop Solution, 12 mL (handle with care)
  10. Assay Buffer\*, 125 mL
  11. Derivatization Reagent\*, 3 vials, 100 µL each
  12. Derivatization Reagent Diluent\*, 3 vials, 4 mL each

- B. Additional Materials** (not delivered with the test kit)
1. Micro-pipettes with disposable plastic tips (10-200 and 200-1000 µL)
  2. Multi-channel pipette (10-300 µL), stepper pipette (10-300 µL), or electronic repeating pipette with disposable plastic tips (capable of delivering 50-1000 µL)
  3. Disposable glass test tubes
  4. Parafilm or microtiter plate cover slip
  5. Microtiter plate washer (optional)
  6. Microtiter plate reader (wave length 450 nm)
  7. Deionized or distilled water
  8. Container with 500 mL capacity (for diluted 1X Wash Buffer, see Test Preparation, Section D)
  9. Paper towels or equivalent absorbent material
  10. Timer

- C. Sample Collection and Handling**
- Collect water samples in glass or plastic sample containers. Drinking water samples should be treated with ascorbic acid (0.1 mg/mL) immediately after collection to remove residual chlorine. Samples, which have been preserved with monochloroacetic acid or other acids, should be neutralized (pH ~ 7) prior to testing.
- Samples containing gross particulate matter should be filtered prior to analysis using any of the following syringe filters: Environmental Express 0.2 mm PES (PN SF020E), Pall Acrodisc® 0.2 mm PVDF (PN 4450), Whatman™ 0.2 mm Anotop™ 25 Plus (Cat. No. 6809-4022), or Environmental Express 1.2 mm Glass Fiber (PN SF012G).
- Store samples refrigerated for up to 2 weeks. For storage periods greater than 2 weeks, samples should be stored frozen.

- D. Test Preparation**
- Micro-pipetting equipment and pipette tips for pipetting the standards and the samples are necessary. A multi-channel, stepping, or electronic repeating pipette is recommended for adding the enzyme conjugate, antibody, substrate (color), and stop solutions in order to equalize the incubation periods across the entire microtiter plate. Please only use the reagents and standards from one package lot in one test, as they have been adjusted in combination.
1. Allow the microtiter plate, reagents, and samples to reach room temperature before use.
  2. The standard solutions, control, antibody, conjugate, substrate (color), and stop solutions are ready to use and do not require any further dilutions.
  3. Dilute the Wash Buffer (5X) Concentrate at a ratio of 1:5. If using the entire bottle (100 mL) add to 400 mL of deionized or distilled water.
  4. The stop solution must be handled with care as it contains diluted H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.
  5. Remove the number of microtiter plate strips required from the foil bag. The remaining strips are stored in the foil bag with desiccant and zip-locked closed.
  6. After analysis, store the remaining kit components in the refrigerator (4-8°C).
  7. Derivatization of Standards, Control, and Samples (must be performed prior to each analysis):
    - a. Dilute the Derivatization Reagent with 3.5 mL of Derivatization Reagent Diluent. Vortex to mix thoroughly. **Note: Diluted Derivatization Reagent must be used within 8 hours of preparation. If additional samples are to be analyzed more than 8 hours after dilution, discard the vial, and a new vial of Derivatization Reagent should be diluted for use.**
    - b. Label single disposable glass test tubes for standards, control, and samples.
    - c. Pipette 250 µL of standard, control, or sample into appropriately labeled glass test tube.
    - d. Add 1 mL of Assay Buffer to each test tube. Vortex to mix.
    - e. Add 100 µL of the diluted derivatization reagent to each test tube. **Vortex each tube immediately after addition of diluted reagent until no swirling lines are present.**
    - f. Incubate at room temperature for 10 minutes.
    - g. Derivatized standards, control, and samples are ready to be analyzed. Proceed to Assay Procedure, Section F, Step 1. **Note: Discard derivatized standards, control, and samples after use. Do not use for re-analysis.**

- E. Working Scheme**
- The microtiter plate consists of 12 strips of 8 wells, which can be used individually for the test. The standards must be run with each test. **Never use the values of standards which have been determined in a test performed previously.**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Std 0	Std 4	Sample?									
B	Std 0	Std 4	Sample?									
C	Std 1	Std 5	etc.									
D	Std 1	Std 5	etc.									
E	Std 2	Cont.										
F	Std 2	Cont.										
G	Std 3	Sample?										
H	Std 3	Sample?										

Std 0-Std5: Derivatized Standards  
 Contr.: Derivatized Control  
 Samp1, Samp2, etc: Derivatized Samples

- F. Assay Procedure**
1. Add 50 µL of the derivatized standards, control, or samples (see Section D, Test Preparation) into the wells of the test strips according to the working scheme given. Analysis in duplicate or triplicate is recommended
  2. Add 50 µL of the antibody solution to the individual wells successively using a multi-channel pipette, stepping, or electronic repeating pipette. Cover the wells with parafilm or tape and mix the contents by moving the strip holder in a circular motion on the benchtop for 60 seconds. Be careful not to spill the contents. Incubate the strips for 30 minutes at room temperature.
  3. Remove the covering and add 50 µL of the enzyme conjugate solution to the individual wells successively using a multi-channel pipette, stepping, or electronic repeating pipette. Cover the wells with parafilm or tape and mix the contents by moving the strip holder in a circular motion on the benchtop for 60 seconds. Be careful not to spill the contents. Incubate the strips for 60 minutes at room temperature.
  4. Remove the covering, decant the contents of the wells into a sink, and blot the inverted plate on a stack of paper towels. Wash the strips three times using the diluted wash buffer. Please use at least a volume of 250 µL of 1X wash buffer for each well and each washing step. Blot the inverted plate after each wash step on a stack of paper towels. After the last wash/blot, check the wells for any remaining buffer in the wells, and if necessary, remove by additional blotting.
  5. Add 150 µL of substrate (color) solution to the individual wells successively using a multi-channel pipette, stepping, or electronic repeating pipette. Cover the wells with parafilm or tape and mix the contents by moving the strip holder in a circular motion on the benchtop for 30 seconds. Be careful not to spill the contents. Incubate the strips for 20-30 minutes at room temperature. Protect the strips from sunlight.
  6. Add 100 µL of stop solution to the wells in the same sequence as for the substrate (color) solution using a multi-channel pipette, stepping, or electronic repeating pipette.
  7. Read the absorbance at 450 nm using a microtiter plate ELISA photometer within 15 minutes after the addition of the stopping solution.
- G. Evaluation**
- The evaluation of the ELISA can be performed using commercial ELISA evaluation programs (4-Parameter (preferred) or Logit/Log). For a manual evaluation, calculate the mean absorbance value for each of the standards. Calculate the %B/B<sub>0</sub> for each standard by dividing the mean absorbance value for each standard by the Zero Standard (Standard 0) mean absorbance. Construct a standard curve by plotting the %B/B<sub>0</sub> for each standard on the vertical linear (y) axis versus the corresponding Glyphosate concentration on the horizontal logarithmic (x) axis on graph paper. %B/B<sub>0</sub> for the control and samples will then yield levels in ppb of Glyphosate by interpolation using the standard curve. Results can also be determined using a spreadsheet macro available from Abraxis upon request.
- The concentrations of the samples are determined using the standard curve run with each test. Samples showing a lower concentration of Glyphosate than standard 1 (0.075 ppb) should be reported as containing < 0.075 ppb of Glyphosate. Samples showing a higher concentration than standard 5 (4.0 ppb) should be reported as containing > 4.0 ppb of Glyphosate or must be diluted using Diluent/Zero Standard (Sample Diluent) and re-analyzed to obtain accurate results. The concentration of the positive control provided should be 0.75 ± 0.2 ppb.
- Semi-quantitative results can be derived by simple comparison of the sample absorbances to the absorbances of the standards. Samples with lower absorbances than a standard will have concentrations of Glyphosate greater than that standard. Samples with higher absorbances than a standard will have concentrations of Glyphosate less than that standard.
- As with any analytical technique (GC, HPLC, etc.), positive results requiring regulatory action should be confirmed by an alternative method.

## Certificate of Analysis

**Product Name:** GLYPHOSATE  
PESTANAL™, analytical standard  
**Product Number:** 45521  
**Batch Number:** BCBZ6585  
**Brand:** Sigma-Aldrich  
**CAS Number:** 1071-83-6  
**Formula:** (HO)<sub>2</sub>P(O)CH<sub>2</sub>NHCH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H  
**Formula Weight:** 169.07  
**Expiration Date:** NOV 2023  
**Quality Release Date:** 04 DEC 2018

TEST	SPECIFICATION	RESULT
APPEARANCE (COLOR)	WHITE TO LIGHT YELLOW AND FAINT BEIGE TO LIGHT BEIGE	WHITE
APPEARANCE (FORM)	POWDER OR CRYSTALS	POWDER
PURITY (HPLC AREA %)	≥ 98.0 %	98.1 %
WATER	≤ 1.0 %	0.1 %
PROTON NMR SPECTRUM	CONFORMS TO STRUCTURE	CONFORMS



Dr. Claudia Geitner  
Manager Quality Control  
Buchs, Switzerland

Sigma-Aldrich warrants that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

# 45521 Glyphosate

Lot Number: <b>BCBZ6585</b>	Sample Name: <b>T58172_001_LC</b>
<b>Dionex Ultimate 3000</b>	
<b>Pump</b> : LPG-3400SD	<b>Injection Time</b> : 26.11.18 15:05
<b>Autosampler</b> : WPS-3000	<b>Processed By</b> : Markus Urthaler
<b>Detector</b> : VWD-3400	<b>Vial Number</b> : GC2
<b>Column</b> : Supelco Ascentis Express C18, 2.7 um	<b>Column S/N</b> : -
<b>Column Dim.</b> : 100 x 4.6 mm	<b>Sample Type</b> : unknown
<b>Mobile Phase</b> :	<b>Injection Volume</b> : 2.0 µl
%A: Acetonitril	<b>Flow</b> : 1.5 ml/min
%B: TB pH 2.4	<b>Column Temp. (°C)</b> : 25.0
%C: %C	<b>Run Time</b> : 15.00 min
%D: %D	
<b>Gradient</b> : see Figure 1	
<b>Sample Prep.</b> : 1 mg sample in 1 ml borate-buffer pH 9.0 : 5 mg DNBCI-Lsg in 1 ml in acetonitrile 4:6	

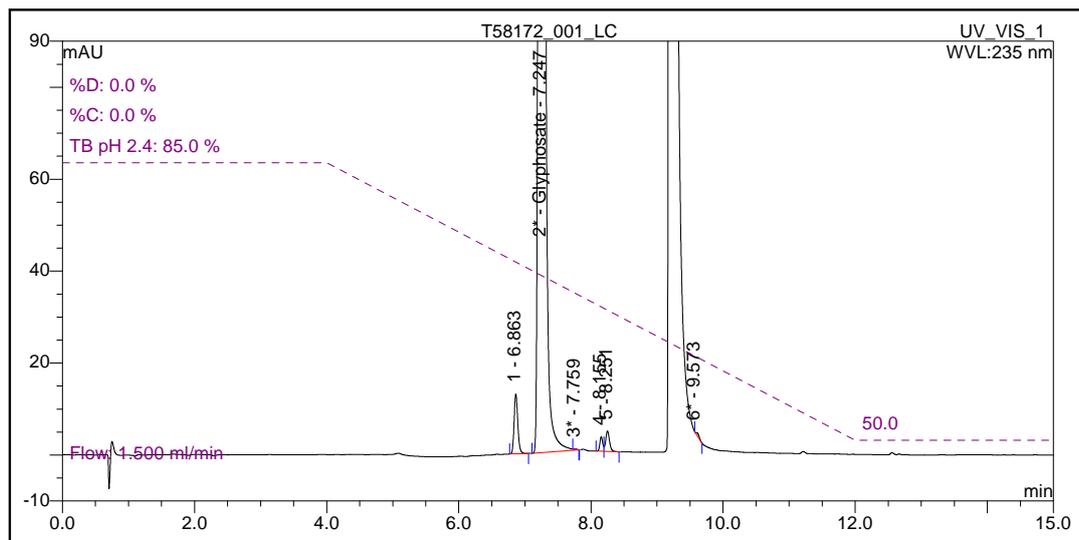


Figure 1: Zoomed Chromatogram

No.	Ret.Time min	Peak Name	Area mAU*min	Height mAU	Amount	Rel.Area %
1	6.863	n.a.	0.84690	13.00937	n.a.	1.23
2	7.247	Glyphosate	67.39271	871.41777	n.a.	98.05
3	7.759	n.a.	0.00402	0.07057	n.a.	0.01
4	8.155	n.a.	0.15638	3.13602	n.a.	0.23
5	8.251	n.a.	0.30127	4.47103	n.a.	0.44
6	9.573	n.a.	0.03398	0.00124	n.a.	0.05
<b>Total:</b>			<b>68.73527</b>	<b>892.10600</b>		<b>100.00</b>

Table 1: Integration