



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Ingeniería Química

Programa de Investigación y Análisis de Residuos y Contaminantes Químicos (PRINARC)

Tesis presentada como parte de los requisitos de la Universidad Nacional del Litoral para la obtención del Grado Académico de: Doctor en Química

“Estudio de métodos alternativos para la determinación de glifosato y otros plaguicidas de solución analítica compleja en matrices ambientales y alimentarias de interés prioritario regional”

Tesista: Lic. Luisina Delma Demonte

Director: Ing. Horacio Ramón Beldoménico

Co-directora: Lic. María Rosa Repetti

Miembros del jurado:

- Dr. José Manuel Camiña (UNLPam-CONICET)
- Dra. Karina Silvia Beatriz Miglioranza (UNMdP-CONICET)
- Dra. Cristina Susana Zalazar (UNL-CONICET)

2020

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a todo el personal del PRINARC que me acompañó durante la realización de esta tesis, por su compañerismo brindado en todo momento, por generar un hermoso ambiente de trabajo y hacer muy agradable mi estancia en el laboratorio. Principalmente a mis directores: Horacio Beldoménico y María Rosa Repetti por su trabajo, dedicación y conocimientos inculcados, pero por sobre todas las cosas por su acompañamiento.

A mis papás que siempre me apoyaron incondicionalmente y a quienes dedico esta tesis.

A mi hermano, familiares y amigos por el aliento brindado día a día.

También quiero agradecer a las siguientes instituciones por el apoyo económico otorgado: CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas) a través de la Beca Doctoral; a la ANPCYT (Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica) a través de los proyectos PICT N° 2011 Res. 98/11, PME N° 2006-02568, PRAMIN N° 2008-164 Res. 160/08; a la provincia de Santa Fe por el proyecto SECTel 2010-070-14, a la Universidad Nacional del Litoral a través de los proyectos CAI+D UNL 2011, Res. C.S. N° 205/13, PI CAI+D UNL 2011 Código 50120110100173 LI, PACT/CAI+D UNL (2013-2016), CAI+D Orientado 2014 Res. C.S. N° 223/15, CAI+D 2016 PIC Res. C.S. 48/17 y al Programa de Investigación y Análisis de Residuos y Contaminantes Químicos (PRINARC).

Y, por último, quiero agradecer a todas las personas que me acompañaron durante los años del doctorado, por estar presentes de una u otra manera.

A todos, sinceramente MUCHAS GRACIAS.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	1
RESUMEN.....	2
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN.....	5
1.1. PLAGUICIDAS.....	5
1.1.1. Definición, clasificación y propiedades.....	5
1.1.2. Propiedades físicas y químicas de los plaguicidas.....	6
1.1.3. Residuo de plaguicida.....	8
1.1.4. Límite Máximo de Residuo (LMR).....	9
1.1.5. Legislación.....	11
1.2. PLAGUICIDAS OBJETO DE ESTUDIO.....	14
1.2.1. Glifosato.....	14
1.2.2. AMPA.....	17
1.2.3. Glufosinato.....	18
1.3. MATRICES ANALIZADAS.....	20
1.3.1. Agua.....	21
1.3.2. Suero sanguíneo.....	22
1.3.3. Miel.....	23
1.4. INSTRUMENTAL Y METODOLOGÍAS PARA LA DETERMINACIÓN DE GLIFOSATO Y COMPUESTOS RELACIONADOS.....	25
1.4.1. Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa.....	28
1.4.1.1. Cromatografía líquida de ultra alta eficiencia (UHPLC).....	29
1.4.1.2. Espectrometría de masa.....	29
OBJETIVOS.....	37
Objetivo general.....	37
Objetivos específicos.....	37
CAPÍTULO 2. MATERIALES, EQUIPAMIENTO E INSTRUMENTACIÓN.....	38
2.1. MATERIALES.....	38
2.1.1. Analitos y reactivos.....	38
2.1.2. Materiales de laboratorio.....	39
2.2. EQUIPAMIENTO E INSTRUMENTACIÓN.....	39
2.2.1. Equipos de laboratorio.....	39
2.2.2. Instrumentación analítica.....	39
CAPÍTULO 3. DETERMINACIÓN DE GLIFOSATO, AMPA Y GLUFOSINATO EN AGUA.....	41
3.1. OBJETIVOS.....	41
3.2. RESUMEN.....	41
3.3. DESARROLLO DEL MÉTODO.....	42
3.3.1. Optimización del sistema cromatográfico.....	42
3.3.2. Optimización del sistema espectrométrico.....	44
3.3.3. Ensayos comparativos sobre la etapa de preparación de la muestra.....	48
3.3.4. Validación del método D seleccionado.....	56
3.4. APLICACIÓN A MUESTRAS REALES.....	60
3.4.1. Determinación de glifosato, AMPA y glufosinato en agua de tambos.....	60
3.4.2. Determinación de glifosato y AMPA movilizados por escorrentía. Relación fósforo-glifosato.....	63
3.4.3. Determinación de glifosato, AMPA y glufosinato en aguas superficiales provenientes de servicios analíticos brindados a la comunidad.....	68
3.5. CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO 3.....	69

CAPÍTULO 4. DETERMINACIÓN DE GLIFOSATO, AMPA Y GLUFOSINATO EN SUERO SANGUÍNEO.....	71
4.1. OBJETIVOS.....	71
4.2. RESUMEN.....	71
4.3. DESARROLLO DEL MÉTODO.....	72
4.3.1. Sistema instrumental.....	72
4.3.2. Optimización de la etapa de preparación de la muestra.....	72
4.3.3. Validación del método optimizado.....	75
4.4. APLICACIÓN A MUESTRAS REALES.....	78
4.4.1. Determinación de glifosato y AMPA en suero sanguíneo de rata.....	78
4.4.2. Determinación de glifosato y AMPA en suero sanguíneo de oveja.....	82
4.5. CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO 4.....	84
CAPÍTULO 5. DETERMINACIÓN DE GLIFOSATO, AMPA Y GLUFOSINATO EN MIEL.....	86
5.1. OBJETIVOS.....	86
5.2. RESUMEN.....	86
5.3. DESARROLLO DEL MÉTODO.....	87
5.3.1. Sistema cromatográfico.....	87
5.3.2. Optimización del sistema espectrométrico.....	87
5.3.3. Optimización de la etapa de preparación de la muestra.....	92
5.3.4. Validación del método optimizado.....	95
5.4. APLICACIÓN A MUESTRAS REALES.....	99
5.4.1. Determinación de glifosato, AMPA y glufosinato en miel.....	99
5.4.2. Determinación de glifosato y AMPA en néctar.....	100
5.5. CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO 5.....	103
CAPÍTULO 6. CONCLUSIÓN FINAL Y CONTRIBUCIONES.....	104
6.1. CONCLUSIÓN FINAL.....	104
6.2. DIFUSIÓN CIENTÍFICA DE LOS RESULTADOS.....	106
CAPÍTULO 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	109

ABREVIATURAS

%REC	Porcentaje de recuperación
AMPA	Ácido aminometilfosfónico
ACN	Acetonitrilo
AF	Ácido fórmico
APCI	Ionización química a presión atmosférica
API	Ionización a presión atmosférica
APPI	Fotoionización a presión atmosférica
BPA	Buenas prácticas agrícolas
DCM	Diclorometano
EI	Ionización por impacto electrónico
ESI	Electrospray ionization
EPA	Environmental Protection Agency
FM	Fase móvil
FMOC-Cl	9-fluorenilmetilcloroformato
GC	Cromatografía gaseosa
GC-MS	Cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa
GC-MS/MS	Cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa en tándem
IARC	International Agency for Research on Cancer
IDA	Ingesta diaria admisible
JMPR	Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues
LD	Límite de detección
LC	Límite de cuantificación
LC	Cromatografía líquida
LC-DAD	Cromatografía líquida acoplada a detector de arreglo de diodos
L-L	Líquido-líquido
LMR	Límite máximo de residuo
LC-MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa
LC-MS/MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa en tándem
MRM	Multiple Reaction Monitoring (modo de espectrometría de masa)
MS	Espectrometría de masa
MS/MS	Espectrometría de masa en tándem
m/z	Relación masa/carga
NOAEL	Non Observed Adverse Effects Level
OPA	O-ftalaldehído
q	Transición de confirmación
Q	Transición de cuantificación
Q	Cuadrupolo
QqQ	Triple cuadrupolo
QuEChERS	Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe
S/N	Relación señal/ruido
SPE	Extracción en fase sólida
SRM	Selected Reaction Monitoring
TOF	Tiempo de vuelo (analizador MS)
UE	Unión Europea
UV	Ultravioleta
UHPLC	Cromatografía líquida de ultra alta resolución

RESUMEN

Argentina ha transformado su agricultura basada en importantes innovaciones tecnológicas, lo que incluyó la adopción de cultivos genéticamente modificados diseñados para ser resistentes a herbicidas específicos, principalmente glifosato y glufosinato.

Según datos del Ministerio de Agroindustria de nuestro país, se han aplicado aproximadamente 200 millones de toneladas de glifosato anualmente en una superficie que creció de 25 a más de 40 millones de hectáreas desde 1996 a 2016, produciendo un total de más de 110 millones de toneladas de cultivos (soja, entre otros).

En este contexto, el glifosato es el herbicida más usado. Se lo utiliza como agente de secado antes de la siembra directa en una amplia gama de cultivos.

El glifosato es un herbicida no selectivo, de amplio espectro, post emergente, ampliamente utilizado para el control de malezas, introducido por la empresa Monsanto (USA) en la década de los 70 como principio activo del formulado Roundup® y actualmente comercializado por un gran número de empresas en Argentina.

Este herbicida, de amplia y dominante utilización en la agricultura de nuestro país, aplicado en diversos cultivos, está en la mira de la sociedad generando gran preocupación por sus negativos efectos en la salud humana y el ambiente, por ello, si bien es potencialmente menos tóxico y perjudicial comparado con otros plaguicidas, es necesaria su evaluación. Sus posibles efectos, comportamiento y destino final ambiental resultan controversiales, haciéndose necesario realizar estudios específicos y controles periódicos. Uno de los principales problemas debido a su carácter anfotérico, alta polaridad y bajo peso molecular, es el análisis a niveles de trazas, ineludible para su determinación en muestras ambientales (suelos y aguas) y alimentarias.

Durante esta tesis se desarrollaron métodos analíticos para la determinación de glifosato, su principal metabolito, ácido aminometilfosfónico (AMPA) y glufosinato, otro herbicida de características similares al glifosato autorizado en nuestro país, en diferentes matrices: ambientales, biológicas y alimentarias utilizando alternativas de derivatización con 9-fluorenilmetilcloroformato (FMOC-Cl) y posterior análisis empleando cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa en tándem (UHPLC-MS/MS).

Todas las metodologías analíticas propuestas fueron optimizadas, introduciendo innovación y mejoras, y posteriormente validadas, para confirmar que el método propuesto es confiable y reproducible. En el proceso se optimizaron las etapas de extracción, los reactivos utilizados, el tiempo de reacción, valores de pH óptimos y etapas de limpieza de los extractos. Siendo la etapa de limpieza un paso clave para poder obtener extractos lo más limpios posibles para lograr

detectar los analitos estudiados en las menores concentraciones para ser compatibles con las normativas más estrictas en cuanto a los límites máximos de residuos permitidos.

Teniendo en cuenta esto, la estructura de la tesis quedó compuesta por una introducción general acerca del estado actual del análisis de plaguicidas, haciendo hincapié en los analitos estudiados, un capítulo donde se presentan los materiales (reactivos y materiales de laboratorio) así como el equipamiento y la instrumentación utilizada durante los trabajos experimentales desarrollados, tres capítulos dedicados a cada una de las matrices analizadas (agua, suero y miel) y una conclusión final del trabajo.

El capítulo 3 describe la optimización y validación de una metodología analítica basada en la derivatización previa con FMOC-Cl y análisis mediante UHPLC-MS/MS para determinar los tres analitos en agua y su aplicación para el análisis de muestras de agua reales y de ensayos a campo correspondientes a estudios de casos seleccionados de interés regional. Se analizaron 158 muestras de agua provenientes de 40 tambos de la zona central de la provincia de Santa Fe, encontrándose residuos de glifosato (68%), AMPA (96%) y glufosinato (11%) con concentraciones máximas de 21,2; 6,5 y 0,1 $\mu\text{g/L}$, respectivamente. También se pudieron analizar 146 muestras de agua superficial (arroyos, ríos, lagunas) provenientes de las provincias de Santa Fe y Entre Ríos, como parte de los servicios que brinda el PRINARC a la comunidad, observando la presencia de glifosato en el 55% de los casos, AMPA en el 58% y glufosinato sólo en el 1% de las muestras.

Con los ensayos a campo, se estudió la interacción que existe entre glifosato y fósforo (fertilizantes), pudiéndose verificar una interacción significativa entre ellos.

En el capítulo 4 se detalla la metodología desarrollada y la validación de la misma, siguiendo los pasos de una derivatización con FMOC-Cl y análisis por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa en muestras de suero sanguíneo, y su aplicación para la medición de la concentración de glifosato y AMPA en muestras reales de suero, provenientes de estudios experimentales realizados con animales (ratas y ovejas) que permitieron evaluar los efectos adversos que tiene este herbicida cuando ingresa al organismo a través de distintas vías.

El capítulo 5 describe la optimización y validación de un método analítico para analizar miel y matrices similares como el néctar, a través de una reacción de derivatización con FMOC-Cl y el posterior análisis mediante UHPLC-MS/MS para la determinación de los tres analitos y su aplicación en muestras reales. Se analizaron un total de 48 muestras de miel provenientes de la provincia de Santa Fe hallándose glifosato en el 91% de ellas, AMPA en un 8% y no se ha detectado glufosinato.

Considerando el experimento desarrollado a campo los valores obtenidos de glifosato y AMPA en el néctar recolectado de las colmenas del ensayo han mostrado evidencia de la

contaminación que se produce cuando las colmenas se encuentran próximas a un cultivo que demanda este herbicida.

Para finalizar, en el capítulo 6, se presenta una conclusión de todos los resultados obtenidos durante el trabajo, los cuales representan un aporte importante respecto al conocimiento sobre los residuos de glifosato, su metabolito y glufosinato presentes en el ambiente, lo que sugiere la urgente mejora en la realización de programas de monitoreo y controles periódicos que conduzcan a más acciones efectivas, correctivas y preventivas.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

El uso intensivo de plaguicidas, principalmente el herbicida glifosato, representa un riesgo para el medio ambiente. Los productos fitosanitarios utilizados en los cultivos pueden tener un impacto directo en las personas debido a que quedan expuestas a sustancias químicas residuales que permanecen tras su aplicación sobre el propio cultivo contaminando los alimentos, como así también el ambiente (agua, suelo, sedimento, aire).

Debido a esta problemática actual, el uso de planes de monitoreo de contaminantes ambientales son cada vez más necesarios.

1.1. PLAGUICIDAS

1.1.1. Definición, clasificación y propiedades

Los daños que causan las plagas tienen gran importancia económica debido a que inciden en la disminución de los rendimientos, el aumento de los costos y como consecuencia menor calidad de la producción. Los plaguicidas se utilizan para proteger a los cultivos de insectos, malezas, hongos y otras plagas.

El término “plaguicida” según la definición de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, FAO, es cualquier sustancia destinada a impedir, destruir, atraer, repeler o combatir cualquier plaga, incluidas las especies indeseadas de plantas o animales, durante la producción, almacenamiento, transporte, distribución y elaboración de alimentos, productos agrícolas o piensos, o que pueda administrarse a los animales para combatir ectoparásitos. El término incluye las sustancias destinadas a utilizarse como reguladores del crecimiento de las plantas, defoliantes, desecantes, agentes para reducir la densidad de fruta o inhibidores de la germinación, y las sustancias aplicadas a los cultivos antes o después de la cosecha para proteger el producto contra el deterioro durante el almacenamiento y transporte; y excluye normalmente los fertilizantes, nutrientes de origen vegetal o animal, aditivos alimentarios y medicamentos veterinarios (Codex Alimentarius, 2019).

A los plaguicidas, como a muchas sustancias, se los puede clasificar en naturales y sintéticos. Así como también, según la plaga a la que deben combatir o atacar, de esta manera, a las sustancias que impiden o retrasan el desarrollo de hongos se las denomina fungicidas; aquellas que controlan o eliminan insectos, insecticidas; aquel producto destinado para eliminar las plantas indeseadas o malezas, herbicida, entre otros.

Además, se pueden clasificar según el grupo químico al cual pertenecen, clasificación que resulta compleja debido a que permanentemente se están incorporando nuevos agroquímicos al mercado, cabe destacar que resulta importante conocer el grupo químico desde el punto de vista toxicológico, ya que productos de un mismo grupo producen intoxicaciones análogas y con similares tratamientos.

A su vez, según su comportamiento en la planta pueden ser sistémicos (absorbidos por el vegetal, hojas y/o raíces, y traslocados en la planta) o de contacto (efectivo contra la plaga cuando entra en contacto directo con ella). Y considerando la especificidad contra la plaga, pueden ser selectivos y no selectivos.

Finalmente, de acuerdo a la toxicidad aguda de los plaguicidas, queda establecida la siguiente clasificación según la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2009) según criterios revisados e introducidos en la actualización realizada en 2009, donde este organismo utiliza las categorías de peligro de toxicidad aguda del Sistema Globalmente Armonizado de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos (GHS, por sus siglas en inglés) como punto de partida para la clasificación (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de plaguicidas considerando el riesgo toxicológico según OMS, 2009.

Clasificación OMS	DL ₅₀ para rata (mg/kg de peso corporal)	
	Oral	Dermal
Ia Extremadamente peligroso (Extremely hazardous)	< 5	< 50
Ib Altamente peligroso (Highly hazardous)	5-50	50-200
II Moderadamente peligroso (Moderately hazardous)	50-2000	200-2000
III Ligeramente peligroso (Slightly hazardous)	Más de 2000	Más de 2000
U Poco probable que presente peligro agudo (Unlikely to present acute hazard)	5000 o más	5000 o más

La estimación de la toxicidad aguda se correlaciona con el valor de la dosis letal media (DL₅₀) determinado experimentalmente en ratas frente a la exposición oral y dermal del plaguicida estudiado.

1.1.2. Propiedades físicas y químicas de los plaguicidas

Para entender cómo se comporta un plaguicida en el ambiente se necesita conocer sobre las propiedades físico-químicas de la molécula y su mecanismo de transporte, así como las características ambientales y la geografía del lugar en el que se encuentra.

Con la gran cantidad de datos de cierta complejidad, los científicos no siempre pueden predecir exactamente lo que ocurrirá con una molécula de plaguicida cuando ésta ingresa en el ambiente. A este problema, se suma el hecho de que los datos de las investigaciones realizadas son obtenidos bajo condiciones controladas de laboratorio y con cantidades conocidas de plaguicida, lo cual no ocurre en la naturaleza.

A pesar de lo complejo del problema, los científicos han logrado determinar ciertas características físico-químicas cuantificables para los plaguicidas, como es la solubilidad, presión de vapor, constante de la Ley de Henry, el coeficiente de adsorción de carbono orgánico (Koc), el coeficiente de partición octanol-agua (Kow) y la constante de acidez, entre las más importantes. Esta información sirve para predecir el lugar donde pudiera encontrarse un plaguicida en altas concentraciones. Por otra parte, la molécula del plaguicida no permanece intacta por tiempo indefinido en el medio ambiente, ya que sufre degradación influenciada por microorganismos, actividad química, pH, clima y contenido de materia orgánica del suelo, entre otros (Beldoménico y col., 2012).

Solubilidad: es una medida que determina la máxima cantidad de un plaguicida disuelto en agua o solventes orgánicos. Se sabe que un valor de solubilidad en agua >500 mg/L representa un peligro de movilización en suelos, contaminación de acuíferos y acumulación en ecosistemas acuáticos.

Es importante mencionar que la mayoría de los valores reportados son determinados mediante experimentos de laboratorio a temperaturas de 20 a 25°C. Los plaguicidas muy solubles en agua se adsorben con baja afinidad a los suelos y por lo tanto, son fácilmente transportados del lugar de la aplicación por una fuerte lluvia, riego o escurrimiento hasta los cuerpos de agua superficial y/o subterránea (lixiviación).

Presión de vapor: es una medida de la volatilidad de una sustancia química en estado puro y es un determinante importante de la velocidad de volatilización, donde llega al aire desde la vegetación o los suelos contaminados. Esta propiedad varía con la temperatura (si aumenta la temperatura, aumenta la presión y viceversa). Valores de $P_{\text{vap}} < 1 \cdot 10^{-8}$ mmHg indican bajo potencial para volatilizarse y valores $P_{\text{vap}} > 1 \cdot 10^{-3}$ mmHg indican que el plaguicida se puede considerar volátil.

Constante de la Ley de Henry: describe la tendencia de un plaguicida a volatilizarse del agua o suelo húmedo. El valor se calcula usando la presión de vapor, solubilidad en agua y peso molecular del plaguicida. Se considera que un plaguicida con un valor de constante de Ley de

Henry $>10^{-5}$ Pa·m³/mol es un compuesto con una volatilidad significativa, si presenta un valor $>10^{-3}$ Pa·m³/mol es muy volátil y existe riesgo de contaminación del aire y pérdidas en el procesamiento analítico, mientras que si presenta un valor $<10^{-7}$ Pa·m³/mol no hay riesgo de volatilización.

Coefficiente de adsorción de carbono orgánico (Koc): es el coeficiente de partición de suelo y agua estandarizado en función del contenido de carbono orgánico. Representa una medida de la tendencia de las sustancias a ser adsorbidas por el suelo. El Koc es específico de la sustancia química e independiente de las propiedades del suelo. Un valor de Log Koc <2 representa una movilidad alta en el suelo y contaminación de acuíferos.

Coefficiente de partición Octanol-Agua (Kow): es una medida de cómo se distribuye un soluto en el equilibrio de las fases octanol y agua. Este coeficiente sirve para tener una referencia de la afinidad de las sustancias para penetrar las barreras lipídicas celulares. Un valor de Kow >1000 representa un peligro de absorción a través de membranas celulares y acumulación en tejidos adiposos con potencial bioacumulación.

Constante de acidez (K_a , pKa): es la constante de equilibrio de la disociación de una reacción ácido-base. Es importante para definir el estado de ionización de una molécula en función del pH del medio en que se encuentra, por lo que tiene mucha implicancia en los procesos de extracción analítica.

1.1.3. Residuo de plaguicida

Queda establecido en el CODEX (Codex Alimentarius, 2019) que un "residuo de plaguicida" es cualquier sustancia específica presente en alimentos, productos agrícolas o alimentos para animales como consecuencia del uso de un plaguicida. Este término incluye cualquier derivado de un plaguicida, como productos de conversión, metabolitos, productos de reacción o impurezas consideradas de importancia toxicológica. Además, un "residuo de plaguicida" comprende los residuos de fuentes desconocidas o inevitables (por ejemplo, de origen ambiental), así como los usos conocidos del producto químico.

Se requiere una "definición de residuo" para establecer con claridad el o los compuestos de interés en la estimación de los riesgos de la ingesta alimentaria asociada a la presencia de residuos en alimentos o piensos y proporcionar la base para el control del cumplimiento del Límite Máximo de Residuo (LMR) (OCDE, 2009; FAO, 2017).

A pesar de que los metabolitos, productos de degradación y las impurezas se incluyen en la definición general de residuo de plaguicida, no necesariamente siempre deben ser incluidos en la definición para hacer cumplir los LMR o estimar la ingesta alimentaria. Esto va a depender del propósito para el cual se debe definir el residuo. Siempre que se pueda, la misma definición de residuo debe aplicarse a todos los productos, aunque hay excepciones, como productos de origen animal y vegetal y productos específicos como los cultivos transgénicos. Un ejemplo de esto es respecto a la definición de residuo de glifosato debido a las diferentes proporciones de residuos en vegetales tolerantes genéticamente modificados. Para el cumplimiento del LMR (productos vegetales) de grano de soja, maíz y colza se considera residuo a la suma de glifosato y N-acetil-glifosato, expresado como glifosato, mientras que para otros cultivos sólo glifosato. Y para estimar la ingesta alimentaria (productos vegetales y animales) el residuo se define sumando glifosato, N-acetil-glifosato, AMPA y N-acetil AMPA, expresado como glifosato.

La inclusión de productos de transformación en la definición de residuo depende de varios factores, las consideraciones sobre si deben ser incluidos es muy compleja y las decisiones deben tomarse atendiendo las particularidades de cada caso (FAO, 2017), a su vez siempre se debe considerar la posibilidad de nuevos metabolitos de un plaguicida que puedan afectar a la definición del LMR y/o evaluaciones de riesgos (OCDE, 2009).

Los plaguicidas son muy importantes para producir alimentos, ya que mantienen o aumentan el rendimiento de las cosechas y el número de ellas que se recogen por año en el mismo suelo. Pero, para proteger a los consumidores de los efectos perjudiciales de los plaguicidas, la OMS y los organismos regulatorios de los países, examinan los datos científicos disponibles y establecen LMR que son aceptados a nivel nacional e internacional (SENASA, 2010; OMS, 2019).

1.1.4. Límite Máximo de Residuo (LMR)

Según la Comisión del Codex Alimentarius, el límite máximo de residuo es la concentración máxima de residuos de un plaguicida (expresada en mg/kg), permitida legalmente en la superficie o la parte interna de productos de alimentación para consumo humano y de piensos. Este valor se refiere a las trazas que dejan los plaguicidas en los productos tratados cuando éstos se aplican correctamente, conforme a las Buenas Prácticas Agrícolas (BPA). Este término se utiliza para referirse a elementos muy variados, desde el monitoreo del uso de plaguicidas, hasta aspectos más abarcadores de la producción primaria y los sistemas de postproducción, como la evaluación del impacto ambiental o las condiciones laborales (Poisot y col., 2004). Según el Codex se entiende por BPA los usos inocuos de plaguicidas autorizados en un país en las condiciones necesarias para realizar el control eficaz y fiable de las plagas. Comprende una gama de niveles de aplicación de plaguicidas hasta la concentración de uso autorizada más elevada,

aplicada de forma que quede la concentración mínima posible del residuo (Codex Alimentarius, 2019). Un LMR se basa en el uso de BPA y su objetivo es lograr que los alimentos derivados de productos básicos que se ajustan a los respectivos límites sean toxicológicamente aceptables. Los LMR del Codex, que se destinan principalmente para ser aplicados a productos que circulan en el comercio internacional, se obtienen basándose en estimaciones hechas por la JMPR (Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues), siguiendo criterios por un lado toxicológicos y por el otro agronómicos, después de:

- a) Evaluar toxicológicamente el plaguicida y su residuo para que no provoque efectos adversos a la salud de los consumidores. Para ello se determina el nivel sin efecto adverso observable (NOAEL, Non Observed Adverse Effects Level) en dos o más especies distintas de animales de experimentación, y luego este dato se extrapola a la especie humana aplicando coeficientes de seguridad con el fin de obtener la Ingesta Diaria Admisible (IDA). Según FAO/OMS, este parámetro representa la cantidad de residuo de cada plaguicida que ingerida diariamente durante una vida entera no muestra riesgos apreciables, basándose en los conocimientos que actualmente se poseen.
- b) Examinar los datos de residuos obtenidos en ensayos a campo, cuando su uso se ajusta a las prácticas agrícolas nacionales. En el examen se incluyen datos de ensayos supervisados realizados a la concentración de uso más elevada recomendada, autorizada o registrada en el país. Para tener en cuenta las variaciones introducidas en los requisitos nacionales de control de plagas, en los LMR del Codex se consideran los niveles más elevados observados en tales ensayos supervisados, que se estima representan las prácticas efectivas de control de plagas.

La presencia de residuos en los alimentos depende de una gran cantidad de factores relacionados principalmente con las propiedades físicas y químicas de las moléculas, de las características ambientales donde se aplican y la modalidad de uso. Muchos de estos aspectos se tienen en cuenta al momento de minimizar su aparición en los alimentos mediante la aplicación de las BPA.

Como los criterios sobre las BPA son muy variables de un país a otro debido a diferencias en los tipos y gravedad de plagas, formas de cultivo, condiciones climáticas, entre otras, los entes de regulación de cada país encargados de fijar los LMR contemplan las respectivas realidades, por lo que los mismos pueden ser muy diferentes entre países. El Codex Alimentarius, ha constituido en sus reglamentaciones una referencia muy utilizada por los entes reguladores de todo el mundo, donde se apoya en criterios agronómicos y toxicológicos de amplio consenso internacional, orientados a favorecer la producción alimentaria con suficientes márgenes de seguridad para la salud humana. Mantiene permanentes mecanismos de revisión de sus criterios

y regulaciones, ante los continuos hallazgos de la ciencia que pueden demostrar la insuficiencia en los recaudos y márgenes de seguridad adoptados para proteger la salud humana.

1.1.5. Legislación

Siguiendo las recomendaciones de los organismos internacionales mencionados, para proteger la salud de los consumidores, la mayoría de los países han establecido por ley límites máximos de presencia de residuos de plaguicidas tanto en alimentos como en agua de consumo y cereales, forrajes, entre otros. Cuando estos límites difieren entre los distintos países pueden plantearse dificultades comerciales. A la hora de imponer sanciones legales o administrativas debido a infracciones cometidas sobre los LMR, se debe tener en cuenta la incertidumbre de la medición analítica, la cual resulta ser $\pm 50\%$ de la concentración de residuos medida (EFSA, 2014).

Para comprender el rol del Estado en todos los temas relacionados con los plaguicidas es necesario tener en cuenta el marco legal existente en Argentina.

En el caso particular de los plaguicidas agropecuarios (fitosanitarios y de sanidad animal), el organismo responsable de la aplicación de la normativa referente es el SENASA (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria) dependiente del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación. En el caso de los productos domiciliarios o domisanitarios el organismo de aplicación es el ANMAT/INAL (Administración Nacional de Alimentos, Medicamentos y Tecnología Médica/Instituto Nacional de Alimentos) dependiente del Ministerio de Salud de la Nación (Pórfido, 2014).

Los productos fitosanitarios que se usen y comercialicen en todo el territorio nacional deben estar inscriptos en el Registro Nacional de Terapéutica Vegetal de acuerdo a lo establecido por los Decretos N° 3489/58 y 5769/59, cumpliendo con los términos establecidos en el Manual de Procedimientos, Criterios y Alcances para el Registro de Productos Fitosanitarios en la República Argentina aprobado por la Resolución SAGPyA N° 350/99 (SAGPyA, 1999).

El SENASA, es una institución que es responsable de la evaluación y registro de todos los plaguicidas de uso veterinario y/o agrícola que se producen o importan en Argentina, así como de establecer los LMR para cada combinación plaguicida-alimento. Las normativas más recientes sobre las especificaciones respecto a LMR son las Resoluciones SENASA N° 934, 559 y 608 emitidas en el año 2010, 2011 y 2012, respectivamente (SENASA, 2010; SENASA, 2011; SENASA, 2012). Además, SENASA ha intensificado su accionar implementando, entre otros, los siguientes Programas relacionados con plaguicidas de alcance Nacional: Programa de Control de Calidad de Productos Fitosanitarios, Proyecto “Desafíos para la Exportación a la Unión Europea”, Programa Nacional de Supresión de Carpcapsa, Programa Nacional de Sanidad Forestal,

Programa Nacional de Control y Erradicación de Mosca de los Frutos, Programa de Buenas Prácticas Agrícolas, Sistema de Control de Productos Frutihortícolas Frescos (SICOFHOR), Sistema Federal de Fiscalización de Agroquímicos y Biológicos (SIFAB) y Plan Nacional de Control de Residuos e Higiene en Alimentos (CREHA).

Argentina cuenta con legislaciones de otros organismos que establecen límites para ciertos plaguicidas en alimentos y aguas. El Ministerio de Salud de la Nación ha fijado LMR para leche y agua en los capítulos 8 y 12 del Código Alimentario Argentino (CAA), respectivamente (CAA, 2019).

Para el agua, la Provincia de Santa Fe cuenta con la Ley N° 11220 la cual establece valores máximos para un grupo de plaguicidas en agua de consumo (Santa Fe, 1994).

Respecto al ámbito internacional, la Unión Europea regula el uso de los plaguicidas así como los niveles máximos permitidos de sus residuos en los alimentos mediante una amplia normativa. El Reglamento (CE) N° 1107/2009 Del Parlamento Europeo y del Consejo de la Unión del 21 de octubre de 2009 hace referencia a la comercialización de productos fitosanitarios (CE, 2009) y el Reglamento (UE) N° 293/2013 de la Comisión Europea del 20 de marzo de 2013 que modifica los anexos II y III del Reglamento (CE) N° 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo se refiere a los límites máximos de residuos de plaguicidas (UE, 2013). Si un plaguicida no se menciona específicamente, se aplica un LMR general por defecto de 0,01 mg/kg. Este Reglamento también hace referencia a la seguridad de todos los grupos de consumidores, incluyendo, bebés, niños y vegetarianos.

Las Agencias de Protección Ambiental (EPA, Environmental Protection Agency) tanto de Estados Unidos como Canadá se encargan de proteger la salud humana y el medio ambiente: aire, agua y suelo (EPA, 2019; CEPA, 2019).

El Codex Alimentarius (Codex Alimentarius, 2019b) es un organismo que cubre una amplia cantidad de alimentos ya sean procesados o crudos y establece LMR de plaguicidas, que son tomados como punto de referencia internacional para la resolución de cuestiones relacionadas con la inocuidad de los alimentos y la protección de los consumidores.

Respecto a la calidad del agua y considerando al herbicida glifosato, la Unión Europea establece para el agua de bebida un valor paramétrico de plaguicidas, incluidos herbicidas orgánicos, de 0,1 µg/L (CE, 1998). La EPA de Estados Unidos fija un nivel máximo de glifosato en agua potable de 0,7 mg/L por debajo del cual no existe riesgo conocido para la salud, si se supera dicho valor los efectos posibles sobre la salud humana refieren a problemas renales y dificultades reproductivas, y considera como fuente de contaminación la escorrentía producto del uso del herbicida. Mientras que la EPA de Canadá fija un valor de 0,28 mg/L considerando como fuente de contaminación lixiviación y/o escorrentía por el uso.

Según la Guía de calidad del agua para consumo humano de la OMS, tanto glifosato como AMPA (metabolito) presentan un perfil toxicológico similar y se considera bajo, para lo cual se fija un valor en base a la salud de 0,9 mg/L derivado de considerar la IDA de AMPA solo o en combinación con glifosato de 0,3 mg/kg de peso corporal, basada en un NOAEL de 32 mg/kg de peso corporal por día.

En Argentina, el nivel guía para fuentes de provisión de agua de consumo humano es de 0,3 mg/L, expresado como sal de glifosato isopropilamina (Subsecretaría de Recursos Hídricos de la Nación, 2003).

Como se expresó anteriormente, las agencias de protección ambiental de Estados Unidos y Canadá no sólo fijan valores máximos para agua de consumo sino también considerando la protección ambiental, en tal sentido la EPA estadounidense fija valores de referencia de la vida acuática para especies de agua dulce y criterios de calidad del agua dulce ambiental para plaguicidas registrados (Tabla 2).

Tabla 2. Valores de referencia de vida acuática en agua dulce (mg/L) establecidos por la EPA (EPA, 2019b).

Plaguicida	Peces		Invertebrados		Plantas no vasculares	Plantas vasculares
	Agudo ¹	Crónico ²	Agudo ³	Crónico ⁴	Agudo ⁵	Agudo ⁶
Glifosato	21,5	25,7	26,6	49,9	12,1	11,9
Glufosinato	>156	50	325,5	31	0,072	1,470

¹Valor de toxicidad x LOC. En peces el valor de toxicidad es generalmente la LC₅₀ más baja de 96 horas en una prueba estandarizada (generalmente con trucha arcoíris, carpita cabezona o agalla azul), y el LOC es 0,5.

²Valor de toxicidad x LOC. En peces el valor de toxicidad es generalmente la NOAEC más baja de una prueba de ciclo de vida o etapa temprana de vida (generalmente con trucha arcoíris o pez gordo), y el LOC es 1.

³Valor de toxicidad x LOC. Para invertebrados el valor de toxicidad suele ser la CE₅₀ o LC₅₀ más baja de 48 o 96 horas en una prueba estandarizada (generalmente con mosquito), y el LOC es 0,5.

⁴Valor de toxicidad x LOC. Para invertebrados el valor de toxicidad suele ser la NOAEC más baja de una prueba de ciclo de vida con invertebrados (generalmente con mosquito), y el LOC es 1.

⁵Valor de toxicidad x LOC. Para las plantas no vasculares, el valor de toxicidad suele ser una CE₅₀ a corto plazo (menos de 10 días) (generalmente con algas verdes o diatomeas), y el LOC es 1.

⁶Valor de toxicidad x LOC. Para las plantas vasculares agudas, el valor de toxicidad suele ser una CE₅₀ a corto plazo (menos de 10 días) (generalmente con lenteja de agua) y el LOC es 1.

LOC: Nivel de preocupación.

LC₅₀: Concentración letal del 50%.

CE₅₀: Concentración de efecto del 50%.

NOAEC: Concentración de efectos adversos no observados.

Por su parte, la EPA canadiense también hace referencia a la protección ambiental, considerando ecosistemas acuáticos y terrestres (CCME, 2019). Para el herbicida glifosato establece concentraciones de 27 y 0,8 mg/L para garantizar la calidad de agua para la protección de la vida acuática en agua dulce considerando tiempos de exposición cortos y largos al herbicida, respectivamente. Y para agua marina no hay un valor recomendado. A su vez, para

cumplir con la calidad del agua para la protección de la agricultura fija concentraciones de 0,28 mg/L para el agua destinada al ganado, mientras que para el agua de riego no hay datos.

Para el caso de glifosato no hay datos respecto a las pautas de calidad del sedimento para la protección de la vida acuática (agua dulce y marina) y tampoco los hay para garantizar la calidad del suelo para la protección de la salud ambiental y humana.

1.2. PLAGUICIDAS OBJETO DE ESTUDIO

En este trabajo, se propone estudiar herbicidas. Los herbicidas objeto de estudio son glifosato, su principal metabolito ácido aminometilfosfónico (AMPA) y glufosinato, en diferentes matrices consideradas de gran importancia: ambientales, biológicas y alimentarias.

Las características físicas y químicas de los plaguicidas mencionados fueron extraídas de las bases de datos PPDB, 2019 y PAN, 2019.

1.2.1. Glifosato

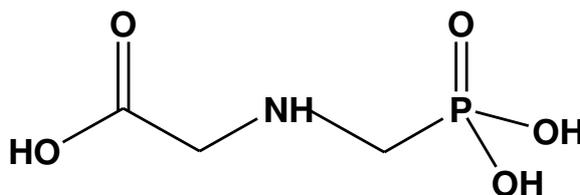


Figura 1. Estructura molecular de glifosato.

Nombre IUPAC: N-(fosfonometil)glicina.

Propiedades físicas y químicas:

- Peso molecular: 169,1 g/mol.
- Solubilidad en agua a 20°C: 10500 mg/L.
- Solubilidad en solventes orgánicos a 20°C: 0,6 mg/L (acetona, xilenos, acetato de etilo), 10 mg/L (metanol).
- Punto de fusión: 189,5°C.
- Punto de ebullición: se descompone antes de hervir.
- Punto de degradación: 200°C.
- Punto de inflamabilidad: no se espera auto-inflamarse. No es altamente inflamable.
- Densidad: 1,71 g/mL.
- Coeficiente de partición octanol-agua a pH 7 y 20°C: $P = 6,31 \cdot 10^{-4}$, $\log P = -3,2$.
- Presión de vapor a 20°C: 0,0131 mPa (baja volatilidad).

- Constante de la Ley de Henry a 25°C: $2,1 \cdot 10^{-7}$ Pa·m³/mol.
- Log Kow: -0,7 a pH 1; -1,15 a pH 3; -1,30 a pH 5; -2,9 a pH 7; -3,05 a pH 7,5; -1,90 a pH 9; -0,80 a pH 11.
- Koc: 884-50660 mL/g (ligeramente móvil).
- Constante de disociación a 25°C: pKa1: 0,8; pKa2: 2,23; pKa3: 5,46; pKa4: 10,14. (Albers y col., 2009). Sus propiedades anfotéricas se deben a la presencia de grupos ácidos y básicos en su molécula. Se encuentra normalmente en forma iónica (generalmente con carga neta negativa en casi toda la escala de pH, aunque puede presentar carga positiva a pH<1), a excepción de un margen estrecho de pH, en medio ácido, en el que se encuentra con carga neta neutra, aunque presentando cargas parciales negativas (pérdida del protón más ácido del grupo fosfónico) y positivas (protonación del grupo amino).
- Tiempo degradación en suelo (aeróbico): DT₅₀ (típico): 15 días, DT₅₀ (laboratorio a 20°C): 15 días, DT₅₀ (campo): 23,79 días, DT₉₀ (laboratorio a 20°C): 215,2 días, DT₉₀ (campo): 169,78 días (no persistente).

Diversos estudios han demostrado que una vez aplicado el glifosato, éste es fuertemente adsorbido por los componentes del suelo, tales como arcillas, óxidos de hierro y ácidos húmicos. Además, sufre una importante degradación, principalmente de tipo biológico, siendo su metabolito mayoritario AMPA pero puede inactivarse rápidamente dependiendo del tipo de suelo. De acuerdo con estos datos, no sería previsible su presencia en altas concentraciones en las aguas subterráneas y/o superficiales (Sprankle y col., 1975, 1975b; Albers y col., 2009; Al-Rajab y Schiavon, 2010; Aparicio y col., 2013; Arroyave y col., 2016). Sin embargo, se han reportado niveles de glifosato y AMPA en aguas superficiales y subterráneas (Kjær y col., 2011; Marek y Koskinen, 2014; Ronco y col., 2016; Rendon-von Osten y Dzul-Caamal, 2017; Demonte y col., 2018).

Características y aplicaciones

El glifosato es un herbicida común y eficaz no selectivo. Es altamente soluble en agua, relativamente volátil y normalmente no se filtra al agua subterránea. No es persistente en suelos, pero puede estar en sistemas acuáticos bajo ciertas condiciones. Es moderadamente tóxico para los humanos y es irritante para la piel y los ojos. Es moderadamente tóxico para las aves, la mayoría de los organismos acuáticos, las lombrices de tierra y las abejas melíferas (PPDB, 2019).

Es un herbicida de amplio espectro utilizado en una vasta gama de cultivos, utilidades y situaciones industriales para el control de malezas y pastos, como lo son malezas anuales y perennes, malezas de hoja ancha y gramíneas. Dentro de las aplicaciones se puede mencionar: agricultura incluyendo cereales, soja, cultivos tolerantes al glifosato, horticultura, silvicultura y jardines domésticos (PPDB, 2019).

Pertenece a la clase química de fosfoglucina.

El modo de acción es sistémico foliar, ingresa a la planta por el follaje y trasloca por xilema y floema, no residual. Actúa inhibiendo la enzima 5-enolpiruvil-shiquimato-3-fosfato sintasa (EPSPS), enzima responsable de la formación de los aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina y triptófano. El shiquimato (anión del ácido shiquímico) es el precursor clave y común en la biosíntesis de todos los aminoácidos aromáticos y el triptófano que resulta de la ciclación de un ácido heptónico. Debido a que la EPSPS no se encuentra en animales, se asume que el glifosato es relativamente inocuo para mamíferos, insectos, peces y aves. Sin embargo, en los últimos años han proliferado investigaciones científicas que evidencian lo contrario (López y col., 2012).

Este herbicida sólo es selectivo de cultivos transgénicos que poseen una EPSP sintasa que no es inhibida por el glifosato. En estos casos se puede emplear en cualquier etapa de crecimiento de estos cultivos.

El uso principal del glifosato es en el barbecho químico (Arregui y col., 2009). Este procedimiento consiste en eliminar las malezas que consumen agua y nutrientes antes de la siembra del cultivo, para que éste pueda emerger e implantarse en mejores condiciones. Esto es especialmente relevante en el centro de Santa Fe ya que en el período de implantación de los cultivos estivales es frecuente el déficit hídrico.

El glifosato queda fuertemente unido a las partículas del suelo (mediante mecanismos de uniones fosfatos), razón por la cual es menos propenso a contaminar corrientes de agua, como consecuencia de la escorrentía o la percolación de residuos provenientes de aplicación del herbicida. El glifosato no es un compuesto que plantea grandes problemas de residualidad, pues es muy lábil ante las condiciones ambientales luz, agua y temperatura. Su efecto es de relativa corta duración en los suelos, siendo degradado por procesos fotoquímicos, químicos y biológicos, siendo más importante la descomposición enzimática por efecto de los microorganismos del suelo, la cual origina metabolitos, tales como AMPA. Además, dióxido de carbono, agua, nitrógeno y ciertos fosfatos son otros productos generales de degradación.

No obstante, varios trabajos recientes han informado características novedosas respecto a la residualidad y persistencia de este compuesto (Okada y col., 2016; Primost y col., 2017).

En cuanto a la toxicidad aguda informada en la base de datos de la red de acción sobre plaguicidas (PAN-Pesticide Action Network), sólo se refiere al ingrediente químico puro y puede no reflejar la toxicidad aguda de los productos de plaguicidas individuales. Según la OMS, se lo clasifica como categoría U, poco probable que presente riesgo y según estudios del Programa Nacional de Toxicología (NTP, National Toxicology Program) de Estados Unidos es considerado no muy tóxico a ligeramente tóxico. Demás entes no lo consideran dentro del listado de productos, como por ejemplo el inventario de sustancias tóxicas (TRI, Toxics Release Inventory) de la EPA de Estados Unidos.

Referido a la carcinogenicidad del glifosato, la IARC (International Agency for Research on Cancer) lo considera como probable carcinogénico (categoría 2A) mientras que la EPA de Estados Unidos, como improbable (categoría E).

En cuanto a los estándares y criterios para la contaminación del agua, según los Estándares Nacionales de Agua Potable se expresa que el Nivel Máximo de Contaminante (MCL, Maximum Contaminant Level) es de 0,7 mg/L (EPA, 2018). Según las normas y criterios de agua potable de Canadá, la Concentración Máxima Aceptable (MAC, Maximum Acceptable Concentration) es de 0,28 mg/L.

Resumiendo la información toxicológica disponible es alta la toxicidad en la categoría carcinogenicidad, es potencial contaminante de aguas subterráneas y no hay evaluación disponible del peso de la evidencia respecto a si es perturbador endócrino (PAN, 2019).

1.2.2. AMPA

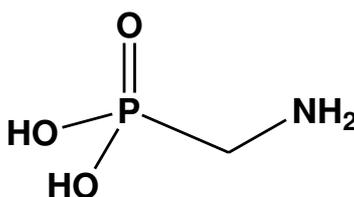


Figura 2. Estructura molecular de AMPA.

Nombre IUPAC: ácido aminometilfosfónico.

Propiedades físicas y químicas:

- Peso molecular: 111 g/mol.
- Solubilidad en agua a 20°C: 1466561 mg/L.
- Coeficiente de partición octanol-agua a pH 7 y 20°C: $P = 2,34 \cdot 10^{-2}$, $\log P = -1,63$.
- Densidad: 1,64 g/mL.
- Koc: 2002 mL/g (ligeramente móvil).

- Tiempo degradación en suelo (aeróbico): DT₅₀ (típico): 121,4 días, DT₅₀ (laboratorio a 20°C): 121,4 días, DT₅₀ (campo): 419 días, DT₉₀ (laboratorio a 20°C): 400 días, DT₉₀ (campo): 1000 días (muy persistente).

Características y aplicaciones

El glifosato cuando se deposita en el suelo es degradado por procesos fotoquímicos, químicos y biológicos, aunque el más importante es la descomposición enzimática por efecto de los microorganismos del suelo, lo cual origina metabolitos, siendo el más importante el ácido aminometilfosfónico (AMPA).

La degradación co-metabólica del glifosato depende de la actividad microbiológica y del tipo de suelo. Los microorganismos pueden romper los enlaces C-P (carbono-fósforo) dando como producto este metabolito. El AMPA también es tóxico, con cierta movilidad en el suelo, pero se descompone, lo cual resulta en la lixiviación de cantidades mínimas en los suelos destinados a la agricultura (CONICET, 2009).

Resumiendo la información toxicológica que brinda la base de datos PAN, no hay evaluación disponible respecto a la carcinogenicidad, tampoco hay evidencia de si es o no potencial contaminante de aguas subterráneas, y si es perturbador endócrino. A su vez, no hay información respecto a la toxicidad aguda (PAN, 2019).

1.2.3. Glufosinato

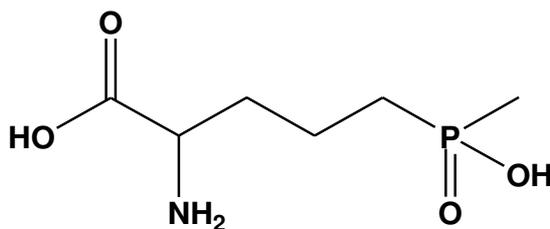


Figura 3. Estructura molecular de glufosinato.

Nombre IUPAC: Ácido butírico de amonio (2RS)-2-amino-4-(metilfosfinato)

Propiedades físicas y químicas

- Peso molecular: 198,2 g/mol.
- Solubilidad en agua a 20°C: 500000 mg/L.
- Solubilidad en solventes orgánicos a 20°C: 250 mg/L (acetona, xilenos, acetato de etilo), 5730000 mg/L (metanol).
- Punto de fusión: 216,5°C.

- Punto de ebullición: se descompone antes de hervir.
- Punto de degradación: 245°C.
- Punto de inflamabilidad: no se espera auto-inflamarse. No es altamente inflamable.
- Densidad: 1,32 g/mL.
- Coeficiente de partición octanol-agua a pH 7 y 20°C: $P = 9,77 \cdot 10^{-5}$, $\log P = -4,01$.
- Presión de vapor a 20°C: 0,031 mPa (baja volatilidad).
- Constante de la Ley de Henry a 25°C: $4,48 \cdot 10^{-9}$ Pa·m³/mol.
- Log Kow: -0,7 a pH 1; -1,15 a pH 3; -1,30 a pH 5; -2,9 a pH 7; -3,05 a pH 7,5; -1,90 a pH 9; -0,80 a pH 11.
- Koc: 10-1500 mL/g (ligeramente móvil).
- Constante de disociación a 25°C: pKa: 9,15.
- Tiempo degradación en suelo (aeróbico): DT₅₀ (típico): 7,4 días, DT₅₀ (laboratorio a 20°C): 7,4 días, DT₅₀ (campo): 7 días, DT₉₀ (laboratorio a 20°C): 25 días (no persistente).
- En el aire está presente únicamente como partículas, las cuales son eliminadas de la atmósfera por precipitación húmeda y seca. En el suelo tiene una movilidad baja a alta y la degradación microbiana es su principal mecanismo de eliminación. En el agua la volatilización, hidrólisis y fotólisis no son destinos ambientales importantes para este plaguicida. El glufosinato de amonio tiene un bajo potencial de bioconcentración en los organismos acuáticos (IUPAC, 2019).

Características y aplicaciones

El glufosinato de amonio es un herbicida altamente soluble en agua, volátil y tiene un bajo riesgo de lixiviación al agua subterránea. No es persistente en los suelos, pero puede ser persistente en los sistemas acuáticos. Es moderadamente tóxico para los mamíferos y se considera una neurotoxina. Muestra una toxicidad moderada a baja para las aves, la mayoría de los organismos acuáticos, lombrices de tierra y abejas melíferas (PPDB, 2019).

Es un herbicida para el control total de la vegetación y para controlar una amplia gama de malezas y pastos, por ejemplo: malezas anuales de hoja ancha que incluyen sombra, velvet leaf, mostaza silvestre, también hierbas anuales que incluyen pasto de corral, cola de zorra erizada, entre otros. Es no selectivo. El modo de acción es por contacto con alguna acción sistémica. Pertenece al grupo de sustancias del ácido fosfínico (PPDB, 2019).

Es un análogo estructural de glutamato y un inhibidor de la glutamina sintetasa, una enzima que cataliza la combinación de ácido glutámico y amoníaco (PPDB, 2019). El resultado es una acumulación de amoníaco y agotamiento de glutamina y otros aminoácidos en la planta. Estos efectos son acompañados por una disminución de la fotosíntesis y son seguidos por clorosis y

deseccación. Los síntomas de daños se inician a los 2-5 días con decoloraciones amarillo pálidas de las partes verdes de la planta. A los 5-10 días, según condiciones climáticas, se produce el desecamiento total de las partes aéreas de la hierba. La duración del efecto contra perennes es de 6-8 semanas, según especies, dosis y condiciones climáticas (Hoerlein, 1994).

La degradación rápida y completa en el suelo y el agua superficial impide el movimiento de los residuos en las aguas subterráneas. Este herbicida se degrada biológicamente en el suelo y es absorbido por los coloides en los estratos superiores, primeros 10 cm (Faber y col., 1997). El principal producto de transformación (ácido 3-(hidroxi(metil)fosfinoil)propiónico)-MPPA presenta mayor movilidad en los suelos que el compuesto original (Gallina y Stephenson, 1992). Además, otros productos de degradación que pueden originarse son ácido fosfórico, metano, amoníaco, dióxido de carbono y agua (Gallina y Stephenson, 1992; Hoerlein, 1994).

Estudios toxicológicos muestran que no es probable que cause carcinogenicidad, es potencial contaminante de aguas subterráneas y no hay evaluación disponible del peso de la evidencia respecto a si es perturbador endócrino (PAN, 2019).

1.3. MATRICES ANALIZADAS

En 2016, el área global utilizada por glifosato y otros agroquímicos con cultivos biotecnológicos altamente exigentes fue de 185,1 millones de hectáreas para un total de 26 países, lo que representa un aumento del 3% respecto de 2015. Tres países representan el 79% de esta área total (EE. UU., 39%; Brasil, 27%; Argentina, 13%) (ISAAA, 2016).

Argentina ha transformado su agricultura basada en importantes innovaciones tecnológicas. Estos cambios incluyeron la adopción de cultivos genéticamente modificados diseñados para ser resistentes a herbicidas específicos, principalmente glifosato y glufosinato.

Un promedio de aproximadamente 200 millones de toneladas de glifosato fueron aplicadas anualmente en una superficie que creció de 25 a más de 40 millones de hectáreas desde 1996 a 2016, produciendo un total de más de 110 millones de toneladas de cultivos (soja, entre otros) (Ministerio de Agroindustria de Argentina, 2016).

Los ingredientes activos mencionados son usados principalmente en la agricultura como herbicidas no selectivos en el control de malezas de pre-emergencia y como agentes desecantes antes de la cosecha, aunque se han registrado otros usos no agrícolas. Pueden encontrarse bajas concentraciones de residuos químicos en alimentos, agua, suelos y otras muestras ambientales, exponiendo, de esta manera, a los humanos y al ganado a riesgos toxicológicos a través de sus dietas (Duke y col., 2003; Demonte y col., 2018).

Debido a las razones expuestas, se decidió estudiar las siguientes matrices: agua, suero sanguíneo y miel, tres matrices de complejidad analítica, con composiciones bien diferentes que

podrían permitir el conocimiento del destino de los herbicidas (glifosato y glufosinato) utilizados en el agro.

1.3.1. Agua

Los agroquímicos representan potenciales fuentes de contaminación ambiental. Los ambientes acuáticos son sistemas vulnerables, receptores naturales de las sustancias emitidas por las actividades agrícolas e industriales (Manahan, 2007). Los impactos generados por las prácticas agrícolas sobre la calidad del agua derivan fundamentalmente del aporte difuso de las fugas de agroquímicos por deriva, escurrimiento o erosión y del aporte puntual debido a prácticas mal implementadas, como pueden ser pulverizaciones sobre cursos de agua, carga y lavado de equipos aplicadores y acumulación de envases vacíos en cursos de agua (Sasal y col., 2017).

El glifosato es el herbicida más utilizado a escala mundial y, actualmente, la información referida a su efecto sobre el agua resulta insuficiente.

Diversos estudios han demostrado el impacto ambiental de la utilización de glifosato. En el suelo, es adsorbido mediante uniones fosfato y degradado por microorganismos, lo que determina una escasa movilidad tanto del glifosato como de su principal metabolito, AMPA. Sin embargo, estudios de lixiviación y escurrimiento indican que puede ser transportado hacia las capas profundas del suelo o hacia cursos de agua superficiales cuando su aplicación se realiza previo a lluvias intensas (Flury 1996; Jaynes y col., 2001; Petersen y col., 2002; Sasal y col., 2010; De Fiori y col., 2012). En consecuencia, se han detectado glifosato y AMPA en cursos de agua superficial aledaños a campos agrícolas (Aparicio y col., 2013; Etchegoyen, 2014; Ayarragaray y col., 2015; Sasal y col., 2017; Okada y col., 2019).

Debido a que existe gran diferencia entre límites de residuos de glifosato fijados para agua de consumo humano como para reservorios de agua dulce para la protección de la vida acuática dependiendo de las agencias que fijan estos parámetros, y a su vez, que el glifosato ha sido clasificado por la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada, la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Cámara de Fitosanitarios Argentina como un producto de mediana a baja peligrosidad, pero, sin embargo, la Agencia Internacional para la Investigación sobre Cáncer (IARC) dependiente de la OMS lo ha reclasificado e incluido en el grupo 2A, como producto probablemente cancerígeno (Guyton y col., 2015) la detección de glifosato en agua constituye una temática que genera preocupación entre los diferentes actores de la comunidad rural y urbana, habiéndose generalizado percepciones de riesgo en la opinión pública. La ausencia de información fehaciente ha agudizado la sensibilidad social, requiriéndose un abordaje metodológico adecuado.

1.3.2. Suero sanguíneo

En 1996, la revolución de la ingeniería genética aplicada a los cultivos agrícolas introdujo cultivos tolerantes a herbicidas genéticamente modificados. Desde entonces, las áreas de cultivo destinadas a cultivos genéticamente modificados se han extendido principalmente en países sudamericanos como Argentina, Brasil, Bolivia, Paraguay y Uruguay (Fischer y col., 2014) y el herbicida glifosato se ha convertido en uno de los herbicidas más utilizados a nivel mundial (Benbrook, 2016). Además, en la última década, los agricultores aumentaron las tasas de aplicación de glifosato y pulverizaron con más frecuencia para combatir las malezas resistentes (Benbrook, 2016). Dado el uso extenso y aumentado de este herbicida, tanto el principio activo como su metabolito se han detectado en aire (Chang y col., 2011), en suelo (Ibañez y col., 2005; Ibañez y col., 2006; Botero-Coy y col., 2013; Ávila-Vázquez y col., 2017; Primost y col., 2017), en polvo respirable (Méndez y col., 2017), en agua (Kjær y col., 2011; Battaglin y col., 2014; Ronco y col., 2016; Demonte y col., 2018), así como en alimentos que pueden ser consumidos por humanos o ganado (Bai y Ogbourne, 2016). Además, se detectó una tendencia hacia el aumento de las concentraciones de glifosato en muestras de orina de individuos expuestos a la actividad agrícola y no agrícola en Europa, lo que probablemente refleja técnicas analíticas más sensibles, un uso más frecuente en la práctica agrícola y/o mayores residuos en alimentos (Krüger y col., 2014a; Niemann y col., 2015). Esta evidencia muestra que existe un riesgo de exposición ambiental al herbicida glifosato, lo que subraya las preocupaciones sobre sus posibles efectos sobre la salud humana (Milesi y col., 2018).

Todos los animales y humanos que consuman soja modificada genéticamente para ser tolerante al glifosato, incorporan cantidades desconocidas de este herbicida. Los residuos de glifosato en tejidos y órganos de animales alimentados con alimento genéticamente modificado (soja, maíz, etc.) no se consideran en la legislación. La influencia de los residuos de glifosato en la calidad de los productos animales destinados a la alimentación humana es casi desconocida. La incorporación de harina de soja genéticamente modificada en la alimentación de pollos de engorde afecta significativamente el parámetro de color de la carne (Stadnik y col., 2011).

Este herbicida, junto con su metabolito asume un papel fundamental durante la ingestión accidental o intencional en humanos. Se han acumulado muchos casos en los que víctimas ingieren estos herbicidas en un intento de suicidio (Matsukawa y col., 1991; Hirose y col., 1999; Lee y col., 2000; Ohtake y col., 2001; Hori y col., 2003; Lee y col., 2009). Por lo tanto, desde la perspectiva de la investigación de la muerte, un método analítico rápido y sensible que sea capaz de identificar y confirmar la presencia de estos herbicidas es de suma importancia.

1.3.3. Miel

La apicultura es una actividad de gran importancia económica y eco-sistémica por los valiosos productos alimenticios que provee y el decisivo rol que cumple la polinización en la producción global de alimentos. Argentina es un país destacado en el mundo por esta actividad, es el primer exportador mundial y el tercer productor mundial de miel de muy alta calidad. Por su parte, Santa Fe es una de las provincias de producción destacada (1118 productores, 3506 apiarios, 278085 colmenas). El país exporta miel principalmente a los mercados de Estados Unidos y de la Unión Europea, abriéndose en 2019 el mercado Chino.

La “calidad” de la miel se apoya en atributos como la “limpieza” (debe estar libre de residuos y sustancias extrañas, cuyas fuentes son los tratamientos ilegales o legales, el procesamiento o la contaminación ambiental), la “frescura” (el envejecimiento altera sus propiedades), debe ser “natural” (sin adulteraciones y con un mínimo de manipulación) y “saludable” (con sus múltiples cualidades nutritivas y terapéuticas preservadas).

Respecto a su limpieza-inocuidad, resulta de gran incumbencia la presencia indeseada de residuos y contaminantes químicos. Tanto por residuos originados en los tratamientos terapéuticos aplicados a la colmena, como por el uso de agroquímicos en la agricultura moderna que potencialmente contaminan la cadena apícola. En este último aspecto se han producido, muy recientemente, cambios importantes. Se ha superado ya el criterio que ponía gran énfasis en la existencia de residuos de fármacos veterinarios en la miel (antibacterianos, antiparasitarios, sustancias prohibidas -cloranfenicol-, etc.) para dar lugar a nuevos condicionantes, enfatizándose en los residuos de plaguicidas (glifosato y plaguicidas de uso difundido, tanto herbicidas como insecticidas y fungicidas). También emerge el interés por contaminantes de origen ambiental o natural como los alcaloides pirrolizidínicos, entre otros.

Lo cierto, es que se acepta universalmente la utilización de plaguicidas como agentes químicos necesarios para combatir malezas, enfermedades, insectos y otras plagas que afectan negativamente todo tipo de cultivos y la producción de alimentos. No obstante, estas moléculas actúan como biocidas y sus formulaciones presentan toxicidad no sólo para la plaga que combaten sino que también, en distintos grados, impactan en la naturaleza y el hombre.

Siguiendo el impacto de estas prácticas en la apicultura, se ha demostrado que los polinizadores pueden ponerse en contacto con los plaguicidas de diversas maneras, por sus alimentos como el néctar, el polen y el agua, incluida el agua exudada por las plantas y mientras vuelan a través de partículas de polvo y rocío o químicos volátiles diluidos en el aire, el suelo, las hojas y otros. Hay trabajos donde reportan altas concentraciones de glifosato en muestras de miel que coinciden con muestras recolectadas de apiarios ubicados en la proximidad a áreas cultivadas, lo que sugiere la migración del herbicida desde el sitio de uso a otras áreas a través de las abejas,

por lo que las prácticas de gestión para reducir la migración de plaguicidas no son efectivas y deben reevaluarse cuidadosamente (Berg y col., 2018).

En cuanto a glifosato, Argentina, en conjunto con Estados Unidos y Brasil, aplican el 80% del total mundial de este herbicida. En nuestro país desde 1996 se aplica a una variedad de cultivos transgénicos encabezados por la soja, con una carga anual importante (200 mil toneladas). Como consecuencia, existen evidencias (Demonte y col., 2018; Aparicio y col., 2018) sobre el estatus de verdadera ubicuidad alcanzado por este compuesto en nuestro país, es decir se lo encuentra en concentraciones variables en todo tipo de muestras, principalmente en agua, suelos y alimentos. Asimismo, el informe anual más reciente de EFSA (mayo 2019) sobre monitoreo de residuos de plaguicidas en alimentos en la UE (correspondiente al período 2017), reporta una significativa incidencia de la presencia de glifosato en miel y productos de apicultura. También, en 2018 Alemania interrumpió la importación por hallar niveles de concentración de glifosato superiores a 50 µg/kg en mieles argentinas.

Para atender a los mencionados cambios en los requisitos de calidad e inocuidad es necesario revisar y actualizar los protocolos de calidad existentes.

Sin embargo, y focalizados en el problema de la “limpieza” por residuos químicos, cabe remarcar la gran dificultad que presenta la adopción de soluciones que eliminen o minimicen la problemática, dado que la mayoría de las variables determinantes son incontrolables para el apicultor, ya que tiene serias limitaciones para manejar la actividad agrícola en el entorno del apiario, la flora natural, las malezas, y los cultivos a los cuales acceden las abejas, las variaciones climáticas (lluvias, vientos, temperatura, sequías, etc.). Además, se suma la escasez de conocimientos tanto a nivel local como global, de muchos de los fenómenos relacionados con el transporte y la distribución de los plaguicidas en el ambiente y más específicamente en la colmena.

Son un hecho los efectos indeseados en el ambiente, en los alimentos y en la salud, derivados del uso de plaguicidas como herramienta importante en la agricultura contemporánea, ya que parte de los principios activos y otros ingredientes de los formulados aplicados no cumplen su objetivo agronómico y se liberan en forma no controlada al ambiente alcanzando distintos destinos, incluso llegan a integrar las cadenas alimentarias y terminan, finalmente, impactando en la biota, la vida y la salud del hombre por diversas vías.

Muchos de los residuos de los plaguicidas aplicados son especialmente negativos para los polinizadores de los que dependen más de un tercio de los cultivos alimentarios del mundo. La presencia de apicultores y colmenas debe ser considerada como una fortaleza en resguardo de la sustentabilidad ambiental y la biodiversidad del planeta.

1.4. INSTRUMENTAL Y METODOLOGÍAS PARA LA DETERMINACIÓN DE GLIFOSATO Y COMPUESTOS RELACIONADOS

La determinación de residuos de plaguicidas se ha llevado tradicionalmente a cabo mediante técnicas cromatográficas, tanto cromatografía gaseosa (GC) como cromatografía líquida (LC), usando diferentes tipos de detectores (MS, UV, fluorescencia). El acoplamiento a espectrometría de masa, principalmente GC-MS, ha sido la técnica de referencia durante muchos años en este campo. Sin embargo, la retirada paulatina de la mayoría de los plaguicidas tradicionales (organoclorados y organofosforados) por motivos de toxicidad y persistencia en el ambiente, ha provocado la introducción de nuevas materias activas, de menor toxicidad y más fácilmente degradables. La mayoría de los nuevos plaguicidas resultan ser más polares, de tipo iónico y su determinación mediante GC-MS resulta problemática. Este hecho, junto con los grandes avances producidos en el acoplamiento LC-MS de los últimos años, ha provocado que esta técnica sea cada vez más utilizada, de modo que en la actualidad se ha convertido imprescindible en los laboratorios especializados en análisis de residuos de plaguicidas (Hernández, 2010).

A diferencia de GC-MS en donde el analizador de cuadrupolo (Q) permite obtener buenos resultados analíticos, en LC-MS este analizador resulta menos adecuado por el elevado ruido de fondo y, especialmente, por la suave ionización producida en las interfases de ionización a presión atmosférica (API), lo que conduce a una pobre fragmentación y espectros de masa con pocos iones (generalmente $[M+H]^+$). El uso de la espectrometría de masa en tándem (MS/MS) aumenta la sensibilidad y la especificidad de los métodos, y por esta razón, el número de aplicaciones que utilizan LC-MS/MS ha aumentado drásticamente en los últimos años.

Con respecto a la determinación masa en tándem con instrumentos de baja resolución, se debe monitorear un mínimo de dos transiciones para un hallazgo seguro, junto con la medición de la relación iónica entre ambas transiciones registradas.

Hoy en día, el analizador más atractivo en el análisis de residuos de plaguicidas es el triple cuadrupolo (QqQ), permitiendo trabajar en tándem, con excelente sensibilidad y selectividad gracias a la adquisición de transiciones específicas (modo de trabajo SRM), que difícilmente son compartidas por otros componentes de la matriz. LC-MS/MS QqQ es una técnica muy poderosa, con un excelente potencial para el análisis rápido, sensible y fiable de la gran mayoría de plaguicidas y sus metabolitos, con la excepción de los compuestos más apolares y/o volátiles, como piretroides y algunos organofosforados (Hernández y col., 2005; Marín y col., 2006, 2009). Al trabajar con triple cuadrupolo (modo MS/MS), el ruido de fondo se reduce significativamente y aumenta la relación señal/ruido y sólo la adquisición de iones del producto que se forma a partir de los iones precursores seleccionados se monitorea y detecta (Wong y col., 2018).

Las características físico-químicas del glifosato son muy diferentes a las de la mayoría de los plaguicidas, debido a su carácter anfotérico y elevada polaridad, características que implican una mayor complejidad a la hora del análisis de este herbicida en matrices de composición compleja.

Uno de los problemas principales que se agrega a las dificultades para perfeccionar el conocimiento existente sobre el comportamiento químico del glifosato y también la efectividad de los sistemas de control, es sin duda la metodología analítica. Los requerimientos de las normativas existentes varían de 0,1-900 µg/L para aguas, 0,01 mg/kg para alimentos infantiles (CE, 2006).

La mayoría de los métodos analíticos reportados son complicados, con una preparación de la muestra larga y compleja, con métodos que requieren normalmente una etapa de derivatización previa, con el fin de mejorar la separación cromatográfica y facilitar la retención de glifosato y los compuestos relacionados (AMPA y glufosinato).

Los primeros métodos utilizaron una buena variedad de técnicas basadas en la cromatografía líquida con detectores de fluorescencia y detectores de gases (NPD-detector de nitrógeno-fósforo y FPD-detector fotométrico de llama) (Tadeo y col., 2000; Kataoka y col., 1995). Estos métodos presentan la dificultad del procedimiento debido a la etapa extra de derivatización ya sea pre-columna con 9-fluorenilmetilcloroformato (FMOC-Cl) o post-columna utilizando O-ftalaldehído (OPA), o la utilización de anhídrido trifluoroacético (TFAA) y trifluoroetanol o TFAA y diazometano.

Más recientemente, el advenimiento de nuevas tecnologías ha revolucionado la química analítica de plaguicidas. Principalmente, se han impuesto los métodos denominados multi-residuos a las distintas configuraciones de cromatografía líquida y/o gaseosa con espectrometría de masa (Fernández-Alba, 2005; Alder, 2006) que permiten, mediante preparación de muestras muy simplificadas, efectuar el análisis simultáneo de una gran cantidad de compuestos en las matrices alimentarias más complejas (Lehotay y col., 2008, 2010). Por ello, es normal, hoy en día, obtener información de más de 100 compuestos en un solo análisis (Diez y col., 2006; Mol y col., 2007; Pizzutti y col., 2009). En este universo no es posible incorporar sencillamente al glifosato por sus características químicas (ácido orgánico muy polar, anfótero, soluble en agua e insoluble en solventes orgánicos y con alta sensibilidad al pH). Debido a esto, la extracción de este herbicida de los sustratos como cereales y/o vegetales, muchos de los cuales presentan extracciones en medios orgánicos o acuosos con acidez muy variable, requieren un tratamiento diferenciado, siendo también más costosos. De ahí, que sea normalmente excluido de los planes de monitoreo intensivos y requiera ser determinado con métodos de compuestos simples, como ocurre con los análisis de cereales y vegetales (Hjorth y col., 2010). Uno de los métodos más

usados para la determinación de glifosato y glufosinato en cereales utiliza derivatización con TFAA/heptafluorobutanol y GC-MS (Alferness y Wiebe, 2001) y otras variantes (Börjesson y Torstensson, 2000).

Para el análisis de agua se han introducido gran variedad de enfoques que se caracterizan por el análisis directo, sin el paso de derivatización (Bauer y col., 1999; Hao y col., 2011; Marek y Koskinen, 2014; Guo y col., 2016). Las técnicas cromatográficas todavía muestran algunos inconvenientes, por lo tanto, lograr metodologías simples y confiables con el uso de estos enfoques sigue siendo un desafío. Entre las técnicas que incluyen la etapa de derivatización, se destaca claramente el caso de la formación de derivados de FMOC-Cl y la detección mediante LC-MS/MS. Se han podido lograr niveles de detección de ultra traza utilizando etapas de limpieza como partición L-L o pasos de concentración mediante extracción en fase sólida (SPE) como variantes incorporadas mediante configuraciones en línea empleando sistemas LC-MS/MS (Ibáñez y col., 2005, 2006; Hanke y col., 2008; ISO, 2014; Poiger y col., 2016). Mallet (2014) propuso un sistema automatizado de arquitectura abierta de UPLC.

También, son utilizadas técnicas de cromatografía de iones con espectrometría de masa pero con dificultades para cuantificar el nivel de concentración bajo (0,01 mg/kg) coincidente con valores límites establecidos por algunas legislaciones más exigentes (CE, 2006). Se ha avanzado en etapas de limpieza simplificadas extrayendo con metanol y ácido fórmico 1% basadas en los principios de simplificación similar a QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe) aunque adaptado para compuestos no afines al mismo (Lehotay y col., 2005; Anastassiades y col., 2009, 2019) mediante análisis por LC-MS/MS con columnas iónicas siendo mejor el funcionamiento con fuentes de ionización por electrospray en modo negativo (ESI-) que positivo (ESI+), de esta manera se eliminan los pasos extras de la derivatización, resultando menor el tiempo de análisis. También con base en LC-MS/MS ESI- con límites de cuantificación del orden de 0,01 mg/kg para glifosato en cereales, hay métodos que no necesitan derivatización (Fussell y col., 2009). Respecto a métodos analíticos que no requieren el paso de derivatización, también se pueden mencionar las técnicas de determinación directa de glifosato y AMPA mediante cromatografía líquida de alta resolución usando plasma acoplado inductivamente con espectrómetro de masa de triple cuadrupolo (ICP-MS/MS) donde se logran límites de detección de 8 µg/L, notablemente menor que el límite obtenido mediante cromatografía líquida con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD) de 300 µg/L (Pimenta y col., 2019).

El glifosato es un compuesto problemático, una sustancia de difícil tratamiento analítico en muchas matrices, en las que no existen soluciones completas.

En este panorama los ensayos rápidos de screening merecen una mención por su potencialidad para el control masivo, su relativa sencillez y bajo costo. Los kits específicos con base en técnicas

inmunoquímicas han cobrado mucha difusión, mayoritariamente los kits ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), donde las aplicaciones ambientales (aguas y suelos) ocupan un gran espacio. Es posible encontrar kits ELISA para dosaje de organofosfatos y carbamatos (a base de colinesterasa y en placas), kits en base a placas y/o tubo o técnicas de partículas magnéticas para glifosato y otros plaguicidas (Senyuva y Gilbert, 2010).

La búsqueda de métodos que permitan bajar los límites de detección/cuantificación y simplificar la etapa preparativa para la determinación de glifosato y compuestos relacionados son motivo de la intensa actividad científica aprovechando las ventajas de la alta sensibilidad y selectividad de la instrumentación disponible. Esto caracteriza la compleja estructura, que presentan en la actualidad los laboratorios destinados al estudio de residuos químicos.

Hoy en día, el desarrollo de métodos sensibles y multi-residuos para la determinación de plaguicidas se ha convertido en un problema importante, debido al uso intensivo de productos fitosanitarios y los estrictos requisitos legales de la Unión Europea para la calidad del agua y otras matrices para consumo humano. La mayoría de los plaguicidas y metabolitos que normalmente alcanzan el agua ambiental, y especialmente el agua subterránea, son de polaridad media/alta. Esto hace que LC-MS/MS sea la técnica más apropiada para su análisis, ya que conduce a resultados satisfactorios tanto desde el punto de vista de la cuantificación como de la confirmación (Marín y col., 2009).

La técnica LC-MS/MS se muestra como la más atractiva actualmente para el análisis de residuos de glifosato y compuestos relacionados (AMPA y glufosinato), a pesar de requerir una etapa de derivatización pre o post columna dependiendo del reactivo derivatizante utilizado cuando se emplean columnas cromatográficas de fase reversa compatibles con las técnicas de rutina para análisis multi-residuos.

1.4.1. Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa

Anteriormente la técnica de cromatografía de líquidos era poco utilizada para el análisis de residuos de plaguicidas. Sin embargo, el desarrollo de compuestos cada vez más polares, de menor volatilidad y más termolábiles, que no pueden ser analizados por cromatografía gaseosa, impulsaron un aumento del número de métodos analíticos para determinación de residuos de plaguicidas empleando cromatografía líquida, primero utilizando detectores UV y fluorescencia, posteriormente detector de arreglo de diodos (LC-DAD) y más recientemente, espectrómetro de masa, LC-MS y LC-MS/MS que proveen una gran sensibilidad y eficiencia (Soler y Picó, 2007; Gan y Bondarenko, 2008).

1.4.1.1. Cromatografía líquida de ultra alta eficiencia (UHPLC)

La UHPLC se ha desarrollado como una técnica de separación innovadora y poderosa basada en el uso de columnas que contienen fases estacionarias de tamaño de partículas más pequeñas que la HPLC convencional (<2 μm). Esto ha llevado a una mayor resolución y sensibilidad, y a un tiempo de análisis más corto.

UHPLC en combinación con espectrometría de masa (EM) en tándem ha demostrado ser una excelente herramienta analítica para determinaciones multi-residuos en aguas ambientales de compuestos como productos farmacéuticos y medicamentos, toxinas y plaguicidas. Sin embargo, para aprovechar las ventajas de UHPLC no es suficiente acoplar un espectrómetro de masa en tándem convencional debido a sus limitaciones de velocidad de exploración, se necesitan analizadores de triple cuadrupolo de adquisición más rápida.

1.4.1.2. Espectrometría de masa

En los últimos años el uso de LC-MS/MS ha crecido enormemente, principalmente debido a la alta sensibilidad que permite alcanzar niveles de detección muy bajos, y a la elevada capacidad para la identificación y confirmación de los analitos debido a la posibilidad de realizar espectros de masa, lo que ha permitido el desarrollo de métodos sensibles capaces de identificar contaminantes a niveles traza en alimentos y muestras ambientales (Jeannot y col., 2000; Carabias-Martínez y col., 2003; 2004; García-Reyes y col., 2007; Hanke y col., 2008; Chamkasem y Harmon, 2016; Chamkasem y col., 2016; Demonte y col., 2018).

En general un espectrómetro de masa permite la separación de las moléculas de acuerdo a su relación masa/carga (m/z). El mismo consiste básicamente en un sistema de ionización, un analizador selectivo de masas y un detector de iones. Dado que un espectrómetro de masa produce y manipula iones en fase gaseosa, debe operar en ambientes con alto vacío. En LC-MS las moléculas son ionizadas a presión atmosférica, formándose un grupo característico de iones de diferentes relaciones m/z que al ser separados se obtiene un registro donde se representan sus abundancias relativas vs. m/z de los mismos y se constituye lo que se denomina espectro de masas.

Los métodos optimizados de plaguicidas consisten en escaneos de MS/MS que son sensibles, selectivos y proporcionan cuantificación e identificación para cientos de compuestos en una inyección. La mayoría de los métodos de plaguicidas multi-residuos utilizan este enfoque dirigido de masas en tándem con triple cuadrupolo. Sin embargo, estos procedimientos de SRM tienen sus limitaciones para analizar tantos plaguicidas en una amplia variedad de matrices. El desarrollo de estos métodos requiere el manejo de parámetros cromatográficos y de espectrometría de masa, tales como tiempos de retención, iones precursores, transiciones de

productos MS/MS y sus energías de colisión, para optimizar la detección del analito objetivo. GC-MS/MS y LC-MS/MS son enfoques que requieren, a priori, información característica sobre los analitos que deben ingresarse al sistema MS/MS para que puedan ser detectados y analizados (Wong y col., 2018).

En la Figura 4 se puede observar un esquema de un sistema LC-MS.

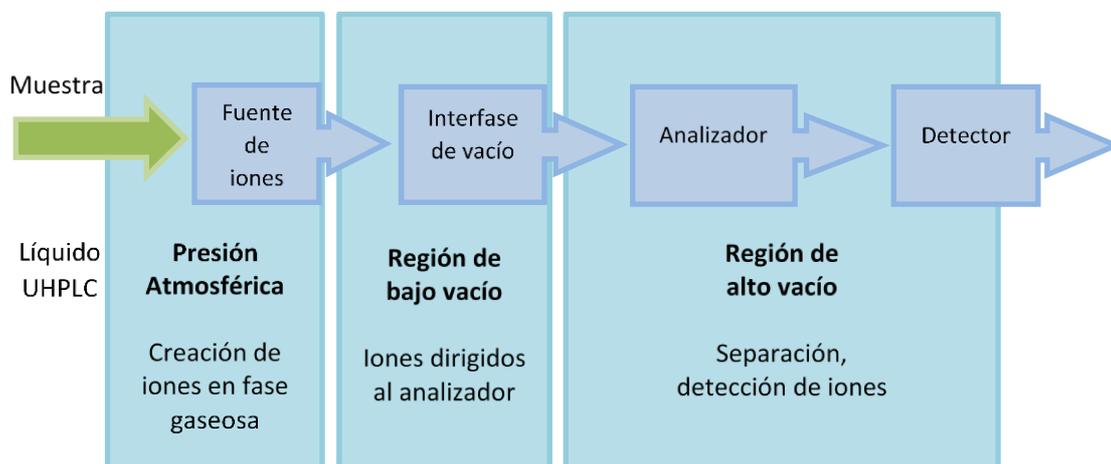


Figura 4. Esquema de un sistema LC-MS.

Sistemas de ionización

Existen varios diseños de interfases y fuentes para sistemas LC-MS, primero aparecieron las fuentes por spray térmico y por haz de partículas, pero la verdadera evolución se produjo con la aparición de las fuentes de ionización a presión atmosférica (API). Es un proceso de ionización suave, a presión atmosférica, con una alta eficiencia en comparación con otras formas de ionización convencionales. El modo más difundido por su amplio campo de aplicación es la ionización a presión atmosférica por electrospray (ESI). También existen otras fuentes que operan a presión atmosférica como la ionización química a presión atmosférica (APCI) y la fotoionización a presión atmosférica (APPI). En la Figura 5 se muestra el campo de aplicación de estos modos de ionización junto a la ionización por impacto electrónico (EI) que se utiliza en GC.

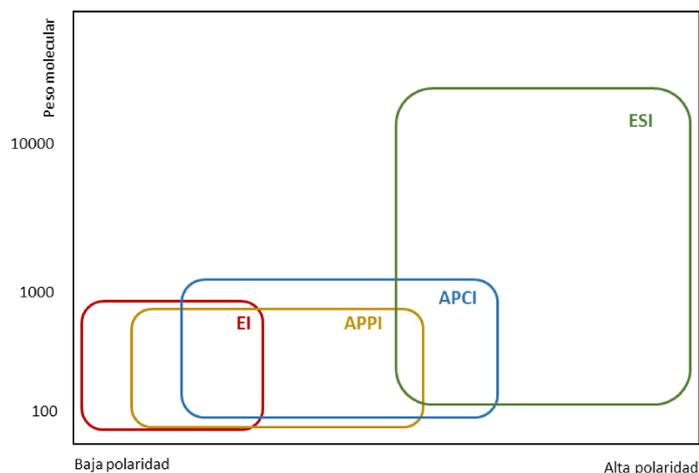


Figura 5. Campo de aplicación de los distintos modos de ionización.

La fuente que se utilizó en el presente trabajo fue la de ionización por electrospray (ESI) la cual se describe a continuación.

Ionización por electrospray (ESI)

En modo positivo, el efluente del LC es bombeado a través de una aguja nebulizadora que se encuentra a un potencial bajo y éste pasa a través de un electrodo semicilíndrico que se encuentra a un alto potencial. La diferencia de potencial producida entre la aguja y el electrodo genera un campo eléctrico que carga la superficie del líquido y forma gotas cargadas. Éstas son conducidas a través de un capilar que por medio de un gas a alta temperatura (N_2) elimina el solvente no cargado. A medida que las gotas atraviesan el capilar, las cargas positivas migran hacia la superficie de la gota mientras que las cargas negativas permanecen en el centro de ésta. Paralelamente, el solvente continúa evaporándose hasta que el tamaño de la gota es tan pequeño que se rompe. En este momento el campo eléctrico generado es tal que logra ionizar el analito eliminando el resto del solvente, generando así iones cargados (sin solvente). Una vez obtenidos los iones, se introducen en el analizador, separándolos así de las moléculas neutras (Figura 6). Dadas las características de ESI, su aplicación es indicada principalmente para el análisis de compuestos polares.

Descripción general de la fuente de ionización por electrospray (ESI)

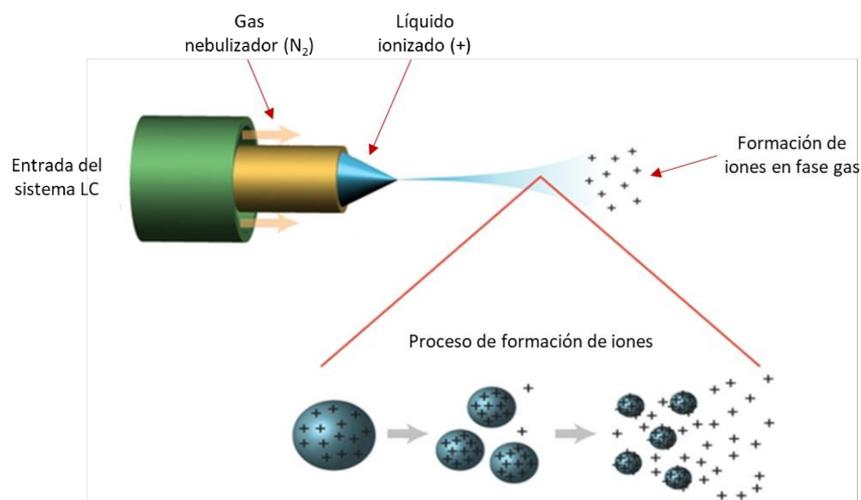


Figura 6. Esquema del proceso de formación de iones en ESI.

La formación de iones por ESI puede ser positiva o negativa. En ESI+, los iones son generados por la adición de un ion positivo a la molécula neutra (ejemplo: H⁺, NH₄⁺, Na⁺). Estos iones positivos son conocidos como “aductos”. En cambio, en ESI-, los iones son generados por la adición de un ion negativo a la molécula neutra (ejemplo: OH⁻).

ESI es un proceso de ionización en solución líquida, por esa razón, las moléculas que tienen más tendencia a ionizarse en solución tendrán señales más intensas. El uso de aditivos en la fase móvil puede ayudar a incrementar la señal en ESI, por ejemplo: la adición de algún ácido, como ácido fórmico, ayuda a incrementar la señal de analitos en ESI+ al favorecer la formación del analito protonado en la solución.

Efecto de la composición de la solución en ESI:

- La ionización por electrospray tiende a funcionar mejor cuando la solución tiene un alto porcentaje de composición orgánica ya que la reducción del tamaño de las gotas cargadas para formar los iones en estado gaseoso es favorecida por la presencia de dichas soluciones.

- La ionización por electrospray se ve favorecida por la presencia de iones en la solución. Esto se consigue con la presencia de iones en la parte acuosa, como por ejemplo H₃O⁺, OH⁻, NH₄⁺, Na⁺.

Una vez generados los iones son enfocados hacia el analizador, para lo cual pasan por una zona de vacío intermedio (interfase de vacío).

En los últimos años, ha habido un desarrollo notorio desde las distintas firmas comerciales en el diseño y optimización de esta fase, siendo el objetivo principal enfocar los iones de interés de manera cuantitativa y evitar que pasen los iones provenientes de la matriz para lograr mayor sensibilidad.

Los equipos de la empresa Waters presentan lo que se conoce como disposición de Z-spray, que permite que más iones entren en la zona de cuadrupolos.

Analizadores

Desde la fuente de ionización utilizada, los iones son transferidos al espectrómetro de masa, donde son separados según su relación m/z . El analizador opera en condiciones de vacío que aseguran el desplazamiento de los iones con la máxima eficacia. Los diferentes tipos de analizadores incorporados en los sistemas LC-MS/MS son el triple cuadrupolo (QqQ), el tiempo de vuelo (TOF) y sistemas híbridos: cuadrupolo acoplado a trampa de iones lineal y cuadrupolo acoplado a tiempo de vuelo. El sistema triple cuadrupolo se explica más detalladamente ya que fue el empleado en el presente trabajo.

Analizador Simple Cuadrupolo (Q)

Consiste en dos pares de barras metálicas de la misma longitud y diámetro alineados entre sí y equidistantes de un eje central imaginario. Un par está a potencial eléctrico positivo y el otro a potencial negativo. A cada par se le aplica una combinación de voltajes de corriente continua (DC) y de radiofrecuencia (RF) de tipo oscilatorio, actuando un par como filtro de masas altas y el otro como filtro de masas bajas. Para una dada amplitud de voltajes de DC y de RF (que pueden ser variados por el operador), sólo los iones con una relación m/z resuenan adquiriendo una trayectoria estable que les permite atravesar el cuadrupolo y alcanzar el detector. Los otros iones se desestabilizan, cambian su trayectoria e impactan en las barras. De esta forma, el cuadrupolo se comporta como un filtro de paso de banda, generalmente configurado para transmitir iones con una determinada relación m/z (operación en modo SIM, "single ion monitoring"). En el caso de querer obtener un barrido de masas abarcando un amplio rango de m/z (modo de barrido), DC y RF se varían mientras su relación se mantiene constante. La masa que logra pasar por el cuadrupolo está relacionada en forma lineal con la amplitud de voltaje aplicado, lo que hace que las operaciones de control y calibración vía computadora se simplifiquen notoriamente (Fernández-Alba A.R., 2005).

El cuadrupolo puede trabajar en dos modos diferentes, uno por monitoreo de un ion seleccionado (SIM) y otro por barrido (SCAN). En modo SCAN no resulta suficientemente sensible, por lo que para la identificación y cuantificación se suele operar en modo SIM. Operando en este modo (filtro de masas), previamente se necesita cargar las relaciones m/z de los fragmentos a detectar, aquellas relaciones m/z no configuradas en el sistema no serán detectadas. El rango lineal de estos detectores suele ser mayor que el de otros detectores, y tienen una alta velocidad de barrido. Tiene un limitado poder de resolución (baja exactitud en

la relación m/z obtenida comparada con otros detectores de masa) y es limitado el uso con masas altas. Es decir que es ideal para trabajar en la detección y cuantificación de compuestos conocidos. Para el caso de monitoreo de compuestos desconocidos, dado que el modo de barrido es poco sensible, se corre el riesgo de no detectar adecuadamente los plaguicidas presentes. Para estos casos hay que emplear otros analizadores más adecuados que permitan identificar compuestos desconocidos.

Analizador Triple Cuadrupolo (QqQ)

Consiste en tres cuadrupolos simples, dispuestos consecutivamente, pero el segundo actúa como celda de colisión en lugar de actuar como filtro de masas.

En este tipo de configuraciones se generan iones precursores y productos que luego se analizan en diferentes espacios físicos.

Los iones provenientes de la fuente de ionización ingresan en el primer cuadrupolo donde se selecciona el ion precursor, el cual es fragmentado en la celda de colisión y por último, los iones producto se separan en el segundo cuadrupolo y se conducen al detector.

Según los modos de operación de barrido (SCAN) o de monitoreo de ion seleccionado (SIM) con que se opere cada uno de los dos cuadrupolos (Q1 y Q3), se pueden definir 4 modos de operación en los instrumentos que poseen triple cuadrupolo.

En el primer modo, denominado “barrido de ion-producto” (“ion-product scan”), el primer cuadrupolo selecciona o enfoca un ion molecular del compuesto de interés y envía solamente este ion hacia la celda de colisión, donde se fragmenta para generar el espectro de masas. Este modo es útil para identificación de un compuesto desconocido o para obtención del espectro de un determinado analito, que será comparado con el espectro del compuesto que se quiere identificar.

El segundo modo de funcionamiento se llama “monitoreo de reacciones múltiples” (MRM, “multiple reaction monitoring”), en el cual Q1 selecciona el ion de interés y lo envía a la celda de colisión donde es fragmentado, mientras que en Q3 se monitorea un ion producto (ó 2 ó 3) específico seleccionado. Cuando se acopla este experimento con el uso de estándares marcados isotópicamente, se logran excelentes resultados cuantitativos con elevada sensibilidad, debido al hecho que cualquier efecto matriz que pueda ocurrir en la primera etapa del espectrómetro de masa, le ocurre tanto al analito como a su estándar marcado. Esto permite obtener análisis con bajo ruido, logrando valores más sensibles, compatibles con los límites de detección de plaguicidas exigidos por las normativas vigentes.

El tercer modo de operación es el denominado “experimento de pérdidas neutras” (“neutral loss experiment”). En este modo Q1 y Q3 realizan el barrido de masas de forma sincronizada de

manera que las pérdidas neutrales de iones moleculares detectados en Q1 pueden asociarse con su espectro apropiado. Luego, el instrumento calcula la masa perdida entre Q1 y Q3 y encuentra todas las señales de la masa especificada. Esta técnica puede resultar útil para la detección de compuestos desconocidos de una misma familia, sin embargo la sensibilidad decrece cuando un QqQ opera de esta manera, aumentando el límite de detección.

El cuarto modo de operación de un triple cuadrupolo se denomina “barrido de ión precursor” (“precursor-ion scan”). En este modo de operación, la primera etapa del QqQ realiza un barrido, mientras que en la segunda se enfoca un ion discreto seleccionado. Esta operación puede utilizarse cuando el ion fragmento producido en la celda de colisión es específico para una familia de compuestos de plaguicidas. Luego, es posible reconstruir el espectro de masas completo de cada uno de los picos detectados, con la posibilidad de detectar compuestos desconocidos. El espectro completo de cada uno de los picos cromatográficos reconstruido de una relación m/z dada es el espectro del ion precursor (Fernández-Alba A.R., 2005).

En el presente estudio se trabajó con un analizador triple cuadrupolo operando en modo MRM (Figura 7).

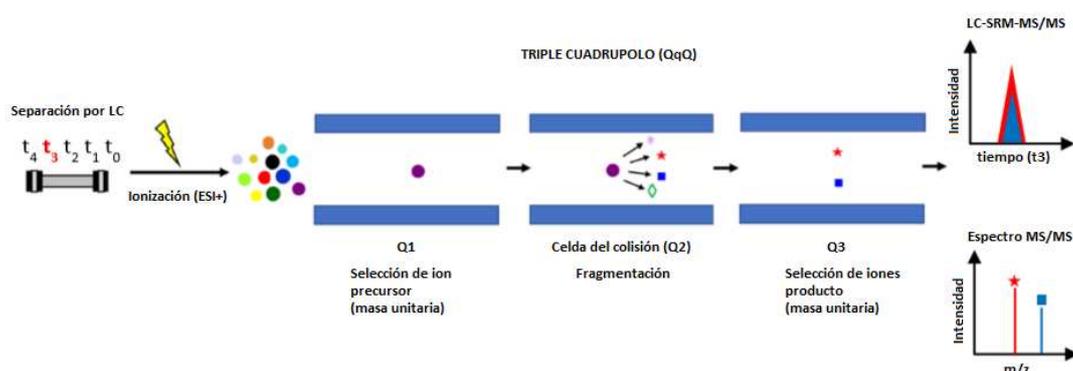


Figura 7. Esquema de operación del analizador triple cuadrupolo en modo MRM. Imagen adaptada del trabajo Wong y col., 2018.

Detector

El detector empleado generalmente en sistemas cromatográficos acoplados a espectrometría de masa es del tipo fotomultiplicador. En este último la corriente de iones se transforma en una corriente de electrones mediante un dinodo de conversión, que convierte tanto los iones positivos como los negativos en electrones, la cual se amplifica en continuo efecto cascada. La señal del multiplicador es convertida en voltaje, además de amplificarse, y finalmente convertida en una señal digital procesándose mediante el hardware y software del sistema.

Cuando el fotón choca contra el fotocátodo se produce un electrón. Este electrón es atraído hacia el primer dinodo (gracias a una diferencia de potenciales). Al chocar con el primer dinodo, varios electrones son eyectados. Cada dinodo está posicionado a mayor voltaje, lo que origina

que los electrones se dirijan al siguiente dinodo creando un número mayor de electrones. Al chocar con el ánodo, se genera una señal que es grabada como intensidad de corriente.

En principio, pueden utilizarse tantas placas como se quiera, aunque generalmente se utilizan entre 10 y 16.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Objetivo general

Generar conocimientos que permitan optimizar la actual base científica disponible para el diagnóstico, el análisis de riesgos, las acciones de prevención, control y corrección de residuos de herbicidas y/o plaguicidas considerados de interés en la zona central del país y de difícil solución analítica.

Con el estudio se propone generar nuevas metodologías analíticas para determinar niveles traza de plaguicidas analíticamente dificultosos y sus metabolitos, no compatibles con los sistemas multi-residuos, en matrices medioambientales (aguas) y alimentarias complejas, como así también tejidos y fluidos biológicos. Se experimentarán técnicas cromatográficas-espectrométricas de masa, y métodos innovadores de preparación de muestras, para ser aplicadas en estudios de ocurrencia dentro de la región productiva agropecuaria y agroindustrial. Los resultados esperados contribuirán a aportar conocimientos para solucionar problemas de salud pública, de impacto ambiental y de la producción regional.

Objetivos específicos

- Aplicar nuevos materiales y técnicas a la preparación de muestras y resolución analítica de residuos de glifosato, glufosinato y sus metabolitos.
- Desarrollar procesos analíticos con base en la cromatografía y espectrometría de masa en tándem (UHPLC-MS/MS, GC-MS/MS) aportando nuevos conocimientos teóricos y prácticos.
- Contribuir mediante la aplicación de estas metodologías avanzadas a la generación de conocimientos e información sobre el comportamiento químico y distribución en ambientes y alimentos de fitosanitarios (herbicidas, fungicidas y otros).
- Contribuir con conocimientos útiles para la evaluación de estrategias para el uso eficiente y sustentable de fitosanitarios en la cadena fruti-hortícola regional.

CAPÍTULO 2

MATERIALES, EQUIPAMIENTO E INSTRUMENTACIÓN

CAPÍTULO 2. MATERIALES, EQUIPAMIENTO E INSTRUMENTACIÓN

2.1. MATERIALES

2.1.1. Analitos y reactivos

Los estándares sólidos de glifosato (97,0%), AMPA (98,0%), glufosinato de amonio (97,5%), glufosinato-FMOC (94,5%), glifosato-FMOC (91,5%) y AMPA-FMOC (98,0%) se obtuvieron de Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Alemania). Del mismo proveedor se han obtenido los estándares de glifosato y AMPA marcados isotópicamente (Glifosato 1,2-¹³C₂ 15N y AMPA 13C 15N), los cuales eran soluciones acuosas de 100 mg/L cada una.

Se prepararon soluciones individuales de 1000 mg/L en agua para glifosato, AMPA y glufosinato y en metanol para los estándares derivatizados (glifosato-FMOC, AMPA-FMOC y glufosinato-FMOC). También se prepararon soluciones intermedias de 100 y 1 mg/L por dilución de las soluciones madres en agua y metanol. Para el caso de los compuestos marcados isotópicamente se prepararon soluciones madre e intermedias en agua de 11 y 1 mg/L, respectivamente. Todas las soluciones estándares se almacenaron en viales de vidrio a -18°C.

Las soluciones del reactivo derivatizante FMOC-Cl (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.) y del buffer tetraborato de sodio decahidratado (Anedra, San Fernando, BA, Argentina) fueron preparadas disolviendo los reactivos en acetonitrilo y agua, respectivamente, a los niveles de concentración requeridos para cada método de derivatización. Se utilizó metanol, acetonitrilo y agua grado UHPLC (Optima™, Fisher Scientific, NJ, USA) como solvente y para preparar las fases móviles de todos los métodos cromatográficos. Para la etapa de limpieza de los extractos se utilizaron cartuchos de extracción en fase sólida OASIS® HLB 6cc, 200 mg de sorbente y 30 µm tamaño de partícula (Waters, Milford, MA, EE.UU.) y diclorometano calidad plaguicida (Sintorgan, Buenos Aires, Argentina).

Como promotores de ionización para la fase móvil se utilizaron acetato de amonio (AcHN₄) de 98% de pureza (Anedra, San Fernando, BA, Argentina) y ácido fórmico 98% (Optima™, Fisher Scientific, NJ, USA).

En las distintas etapas de las metodologías analíticas ensayadas se utilizaron reactivos de laboratorio: ácido clorhídrico, 36,5%-38% (Cicarelli, San Lorenzo, Argentina), hidróxido de potasio (Anedra, San Fernando, BA, Argentina), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) sal disódica (Cicarelli, San Lorenzo, Argentina), carbonato de sodio anhidro (Merck, Burlington, MA, USA).

2.1.2. Materiales de laboratorio

En cuanto a materiales de vidrio, se utilizaron elementos de uso común en el trabajo de laboratorio: pipetas, bolpipetas, matraces aforados, vasos de precipitados, probetas, tubos de ensayos, de distintos volúmenes y tamaños. Y materiales de plástico, fueron utilizados tubos de centrífuga de 15 y 50 mL de capacidad, como así tubos Eppendorf de 2 mL de capacidad.

También fueron usadas pipetas automáticas marca Eppendorf (Hamburgo, Alemania) de distintos volúmenes para lograr mayor precisión y exactitud.

Para el control del pH en las distintas metodologías fueron empleadas cintas de pH de 0-14 marca Merck (Burlington, MA, USA).

2.2. EQUIPAMIENTO E INSTRUMENTACIÓN

2.2.1. Equipos de laboratorio

Durante el desarrollo y la optimización de las distintas metodologías analíticas ensayadas se utilizaron diferentes instrumentos: balanza analítica (Mettler Toledo, modelo AB204), centrífuga (CAVOUR-VT 3216, 3500 RPM), micro centrífuga de ultra velocidad (ultracentrífuga) marca DLAB (Beijin, China), vortex (MS1, Minishaker IKA), baño termostático (modelo Masson, Argentina), agitador mecánico (Bioelec, Argentina).

Así como heladeras y freezers para la conservación de las muestras.

2.2.2. Instrumentación analítica

Para el análisis cromatográfico se utilizó un cromatógrafo líquido de ultra alto rendimiento ACQUITY UPLC™ (Waters, Milford, MA, USA) compuesto por una bomba binaria, mezclador y degasificador de solventes que controlan la fase móvil con una presión límite de 15000 psi (aproximadamente 1000 bar), un muestreador automático (Waters, Milford, MA, USA), con capacidad para 96 viales de 2 mL, que controla el sistema de inyección capaz de tomar volúmenes comprendidos entre 1-10 µL, y un horno para la columna.

Se emplearon columnas cromatográficas C18 ACQUITY UPLC™ (Waters, Milford, MA, USA). Columna BEH-C18 (Ethylene Bridged Hybrid - BEH) de 100 × 2,1 mm di y 1,7 µm de tamaño de partícula y columna HSS-C18 (High Strength Silica - HSS) de 100 x 2,1 mm di y 1,8 µm de tamaño de partícula.

El cromatógrafo se encuentra acoplado a un espectrómetro de masa de triple cuadrupolo Micromass TQD (Waters, Manchester, UK) equipado con fuente de ionización por electrospray (ESI) capaz de operar en modo positivo y negativo.

Para el control del equipo, adquisición de datos y procesamiento de los resultados se utilizó el software MassLynx v 4.1 (Waters, Manchester, UK). En la Figura 8 se puede observar el equipo utilizado.



Figura 8. Equipo de cromatografía líquida acoplado a espectrometría de masa con analizador de triple cuadrupolo (UHPLC-MS/MS) utilizado durante este trabajo. PRINARC, FIQ, UNL.

CAPÍTULO 3

DETERMINACIÓN DE GLIFOSATO, AMPA Y GLUFOSINATO EN AGUA

CAPÍTULO 3. DETERMINACIÓN DE GLIFOSATO, AMPA Y GLUFOSINATO EN AGUA

Una parte importante de este trabajo consistió en el desarrollo de una metodología analítica con el objetivo de poder determinar glifosato, su principal metabolito y glufosinato en agua y matrices acuosas relacionadas, utilizando un proceso analítico más simplificado respecto a los existentes, asegurando suficiente selectividad y exactitud. Temática que constituye un desafío analítico en la actualidad como se ha mencionado en la introducción.

El desarrollo ameritó la realización de ensayos experimentales en laboratorio que posibilitaron la introducción de innovación y mejora de las metodologías existentes y su correspondiente validación. Todas las metodologías ensayadas se basaron en la derivatización previa con FMOC-Cl y posterior análisis cromatográfico acoplado a espectrometría de masa. Las metodologías así obtenidas se aplicaron a la medición de las concentraciones de los analitos en aguas subterráneas, superficiales y de ensayos realizados a campo, correspondientes a varios estudios de casos seleccionados de interés regional. Estas actividades son descritas en el presente capítulo.

3.1. OBJETIVOS

Los objetivos propuestos para este estudio consistieron en desarrollar una metodología simplificada para la determinación de glifosato, AMPA y glufosinato en agua utilizando la estrategia de derivatización con FMOC-Cl y la detección mediante UHPLC-MS/MS y aplicar el método a estudios realizados a campo y analizar muestras de aguas subterráneas y superficiales de distintos sitios de la región central de Argentina.

3.2. RESUMEN

En este trabajo se describe el desarrollo de un método para la determinación simultánea de glifosato, AMPA y glufosinato en agua. El método propuesto incluye una etapa de pre-tratamiento de la muestra, derivatización y posterior limpieza de los extractos mediante partición líquido-líquido con diclorometano. Tras la preparación de la muestra, los extractos fueron analizados mediante cromatografía líquida de ultra alto rendimiento acoplada a espectrometría de masa de triple cuadrupolo (UHPLC-MS/MS). La identificación y confirmación de los compuestos de interés se basó en la medida de la relación m/z de los iones seleccionados, un ion precursor y dos iones producto. Los resultados obtenidos fueron satisfactorios en términos de linealidad, selectividad, exactitud y precisión (REC 70-105% con DER $\leq 11\%$). Se obtuvieron límites de cuantificación adecuados para los propósitos de monitoreo (0,6; 0,2 y 0,1

µg/L para glifosato, AMPA y glufosinato, respectivamente, los cuales se resumen más adelante en la Tabla 6) y la metodología adoptada fue validada y aplicada al análisis de muestras de agua reales. Estas aplicaciones han aportado información de gran interés sobre la ocurrencia y el comportamiento de los analitos estudiados en aguas subterráneas y superficiales de la región central del país que cuenta con una importante actividad agropecuaria.

3.3. DESARROLLO DEL MÉTODO

3.3.1. Optimización del sistema cromatográfico

En este estudio se utilizó el equipo UHPLC-MS/MS Waters descrito en el Capítulo 2. Para el análisis cromatográfico fueron evaluadas dos columnas cromatográficas de fase reversa diferentes. Columna 1: BEH-C18 (100 × 2,1 mm di, 1,7 µm de tamaño de partícula) y columna 2: HSS-C18 (100 × 2,1 mm di, 1,8 µm de tamaño de partícula).

También, se probaron dos fases móviles y gradientes distintos para aumentar la respuesta instrumental y obtener mejores parámetros cromatográficos como resolución, asimetría y forma de pico.

La fases móviles utilizadas estuvieron compuestas por un componente acuoso A: 0,5 mM NH₄Ac (fase móvil 1) y H₂O:ACN 98:2 + 0,1% ácido fórmico (AF) (fase móvil 2) y un componente orgánico B: metanol (fase móvil 1) y acetonitrilo + 0,1% AF (fase móvil 2).

Los programas de gradiente de fase móvil para la separación cromatográfica fueron, para la fase móvil 1: de 0 a 0,5 min isocrático (90% A: 10% B); de 0,5 a 1,5 min aumento lineal de B de 10 a 95%; de 1,5 a 1,6 min aumento lineal de B de 95 a 100%; e isocrático (100% B) de 1,6 a 2,6 min. Las condiciones iniciales se restablecieron en 0,1 min y la columna volvió a estar equilibrada en 2,7 min, dando como resultado un tiempo de corrida total de 5 min.

Y para la fase móvil 2: de 0 a 0,25 min isocrático (95% A: 5% B); de 0,25 a 7 min aumento lineal de B de 5 a 100%; de 7 a 8 min disminución lineal de B de 100 a 75%; de 8 a 8,5 min disminución lineal de B de 75 a 40%; de 8,5 a 9 min disminución lineal de B de 40 a 5% y las condiciones iniciales se volvieron a equilibrar en 1 min, lo que dio como resultado un tiempo total de corrida cromatográfica de 10 min.

Ambas columnas fueron operadas con un caudal de 0,35 mL/min y una temperatura de trabajo de 40°C y, en todos los casos, el volumen de inyección fue de 10 µL mediante muestreador automático.

En cuanto a los resultados obtenidos respecto a la selección de la fase móvil, inicialmente se probaron varias combinaciones de agua-metanol (Hanke y col., 2008; Zelaya y col., 2010; Poiger y col., 2016) y agua-acetonitrilo (Vreeken y col., 1998; Ibáñez y col., 2006; Cullum y Schuhn, 2013;

Daouk y col., 2013; Mallet, 2014) con la columna BEH-C18 (columna 1) y, posteriormente, se evaluó el desempeño de la columna HSS-C18 (columna 2). En las Figuras 9 y 10 se muestran los cromatogramas de la inyección de una mezcla de estándares de glifosato-FMOC, AMPA-FMOC y glufosinato-FMOC (100 µg/L) en solvente utilizando las distintas fases móviles y columnas.

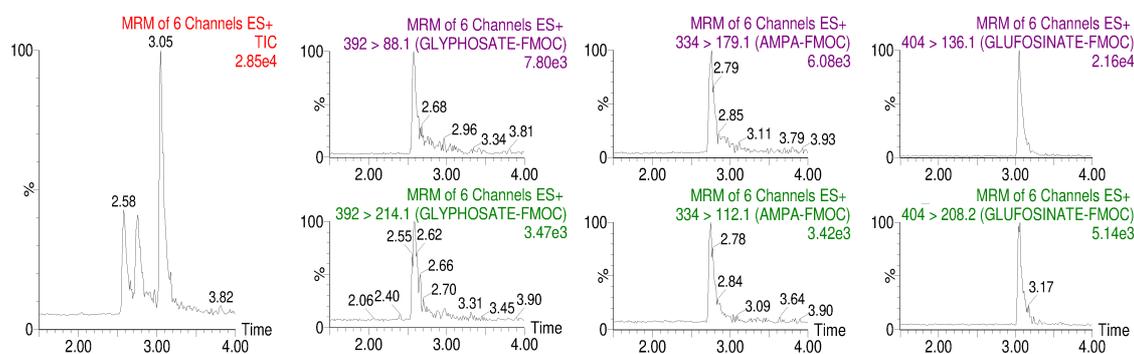


Figura 9. Cromatogramas TIC y MRM de glifosato-FMOC, AMPA-FMOC y glufosinato-FMOC de una solución estándar preparada en solvente (100 µg/L) usando la columna 1: ACQUITY UPLC BEH® y la fase móvil 2: solvente A: H₂O:ACN 98:2 + 0,1% AF, solvente B: ACN + 0,1% AF. Ancho de base del pico: 26,5, 25,8 y 25,8, relaciones S/N: 96, 86 y 437 para glifosato-FMOC, AMPA-FMOC y glufosinato-FMOC, respectivamente.

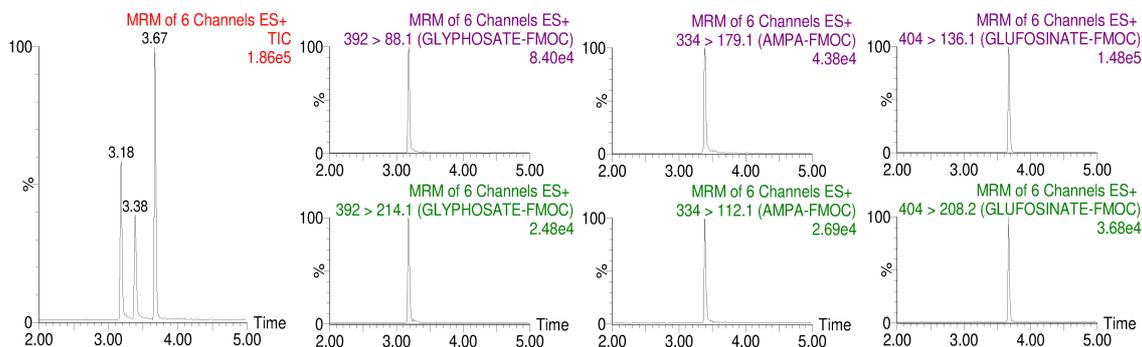


Figura 10. Cromatogramas TIC y MRM de glifosato-FMOC, AMPA-FMOC y glufosinato-FMOC de una solución estándar preparada en solvente (100 µg/L) usando la columna 2: ACQUITY UPLC HSS® y la fase móvil 2: solvente A: H₂O:ACN 98:2 + 0,1% AF, solvente B: ACN + 0,1% AF. Ancho de base del pico: 15,1, 14,5 y 13,2, relaciones S/N: 536, 537 y 2104 para glifosato-FMOC, AMPA-FMOC y glufosinato-FMOC, respectivamente.

En conclusión, para determinar qué columna y fase móvil utilizar se analizaron las condiciones cromatográficas de las dos columnas y las dos fases móviles. Los resultados indicaron buena selectividad, tiempo de retención relativamente corto (<5 min), mayor sensibilidad, mejor forma y resolución del pico para los tres analitos derivatizados utilizando la fase móvil 2 (agua-acetonitrilo) y la columna 2 (HSS-C18). También, se observó un aumento de las áreas de las transiciones de cuantificación y confirmación así como de la relación señal/ruido (S/N).

Luego de evaluar los resultados obtenidos, se concluyó que la combinación apropiada resulta de la columna 2 (HSS-C18) y la fase móvil 2 (agua-acetonitrilo).

3.3.2. Optimización del sistema espectrométrico

Se trabajó en un estudio quimiométrico para evaluar la influencia de los parámetros instrumentales en la respuesta de los tres analitos, considerando solamente la optimización de la fuente de ionización.

Para lograr una mejor respuesta de los parámetros espectrométricos, se estudiaron las condiciones instrumentales sobre las bases de diseños estadísticos de experimentos, utilizando el software Design Expert 7.0. Los parámetros incluidos en el modelo fueron: voltaje de capilar (VC), voltaje de extractor (VE), temperatura de fuente (TF), temperatura de desolvatación (TD), flujo de gas de desolvatación (FD) y flujo de gas de cono (FC).

Debido a que el número de variables a optimizar era considerable, y para comenzar se decidió un procedimiento rápido, uno de los diseños que se adaptaban a nuestro objetivo era un diseño factorial fraccionado, ya que para una optimización completa se necesitaría un número bastante mayor de experiencias. Basándonos en el diseño elegido, la cantidad de experimentos a realizar fue dada por 2^{k-p} , siendo k el número de factores y p indica los tiempos de fraccionamiento o reducción del diseño. Se adoptó un modelo de diseño 2^{6-2} con 3 repeticiones del punto central, resultando un número total de 19 corridas. El punto central se correspondió con las condiciones instrumentales que se estaban utilizando en la determinación de glifosato, AMPA y glufosinato extraídas de bibliografía (Ibáñez y col., 2006; Hanke y col., 2008; Zelaya y col., 2010), siendo TF: 120°C, TD: 400°C, VC: 2 kV, VE: 3 V, FD: 800 L/h y FC: 10 L/h, y para el diseño factorial propuesto se utilizaron rangos de valores óptimos del equipo para favorecer el buen funcionamiento y la vida útil del mismo: voltaje de capilar (1-4 kV), voltaje de extractor (1-6 V), temperatura de fuente (100-140°C), temperatura de desolvatación (300-500°C), flujo de gas de desolvatación (600-1000 L/h) y flujo de gas de cono (5-20 L/h).

Cada corrida se inyectó por triplicado y entre las corridas se inyectó solvente, para tener más tiempo de estabilización instrumental entre las experiencias.

Los modelos de diseño de experimentos escogidos para la optimización de los parámetros espectrométricos son modelos estadísticos clásicos cuyo objetivo es averiguar si determinados factores influyen en la respuesta de interés y, si existe influencia de algún factor, poder cuantificarla.

Un diseño factorial fraccionado es un diseño en el cual se realiza un subconjunto seleccionado o "fracción" de las corridas experimentales incluidas en el diseño factorial completo. Los diseños factoriales fraccionados son una opción adecuada cuando los recursos son limitados o el número de factores incluidos en el diseño es grande, porque utilizan menos corridas que los diseños factoriales completos, a pesar de que parte de los efectos principales y las interacciones de dos factores se confunden y no se pueden separar de los efectos de otras interacciones de orden

superior. Por lo general, se presupone que los efectos de orden superior son insignificantes para obtener información sobre los efectos principales y las interacciones de orden bajo con menos corridas. En el diseño factorial fraccionado se investigan algunas de todas las posibles combinaciones de los niveles de los factores.

Luego de realizar el diseño de experimentos y analizar los resultados obtenidos, las condiciones instrumentales optimizadas fueron:

Voltaje de extractor: 1 V

Voltaje de capilar: 1 kV

Temperatura de fuente: 140°C

Temperatura de desolvatación: 500°C

Flujo de gas de desolvatación: 600 L/h

Flujo de gas de cono: 20 L/h

Se utilizó ionización en modo positivo (variable no incluida en el diseño) utilizando nitrógeno como gas de desolvatación y gas de cono. En la celda de colisión se utilizó argón a $4,4 \cdot 10^{-3}$ mbar y 0,1 mL/min para producir los fragmentos de los iones respectivos y el modo de adquisición fue MRM. Los valores de m/z para los iones precursores y fragmentos para cada compuesto específico junto con sus respectivos voltajes de cono y valores de energía de colisión se muestran en la Tabla 3. El tiempo de permanencia (dwell time) fue de 0,1 s para todos los compuestos.

Tabla 3. Parámetros MS/MS de glifosato, AMPA, glufosinato y estándar marcado isotópicamente derivatizados con FMOC-Cl.

Compuesto	Voltaje de cono (V)	Ion precursor (m/z)	Ion producto (m/z) ^a	Energía de colisión (eV)
Glifosato-FMOC	20	392,0	Q 88,1	30
			q 214,1	10
AMPA-FMOC	20	334,0	Q 179,1	20
			q 112,1	15
Glufosinato-FMOC	30	404,0	Q 136,1	25
			q 208,2	10
Glifosato 2C13, N15-FMOC	20	395,0	Q 91,1	30
			q 217,1	10
AMPA C13, N15-FMOC	20	336,0	Q 181,1	20
			q 114,1	15

^aQ: Transición de cuantificación; q: Transición de confirmación.

Realizando este diseño de experimentos se pudieron optimizar las condiciones espectrométricas obteniendo resultados satisfactorios, ya que la variable de respuesta elegida (área de pico

cromatográfica) se vio incrementada para los tres analitos estudiados, esto se vio beneficiado por la optimización previa de las condiciones cromatográficas (columna 2 y fase móvil 2).

Las Figuras 11, 12 y 13 muestran una comparación de cromatogramas de cada analito antes (a) y después (b) del diseño de experimentos, utilizando la columna HSS-C18 y la fase móvil constituida por agua-acetonitrilo. En ellas se puede observar el aumento de la sensibilidad lograda, donde glifosato incrementó su área cromatográfica en 100%, AMPA en 120% y glufosinato en 52%.

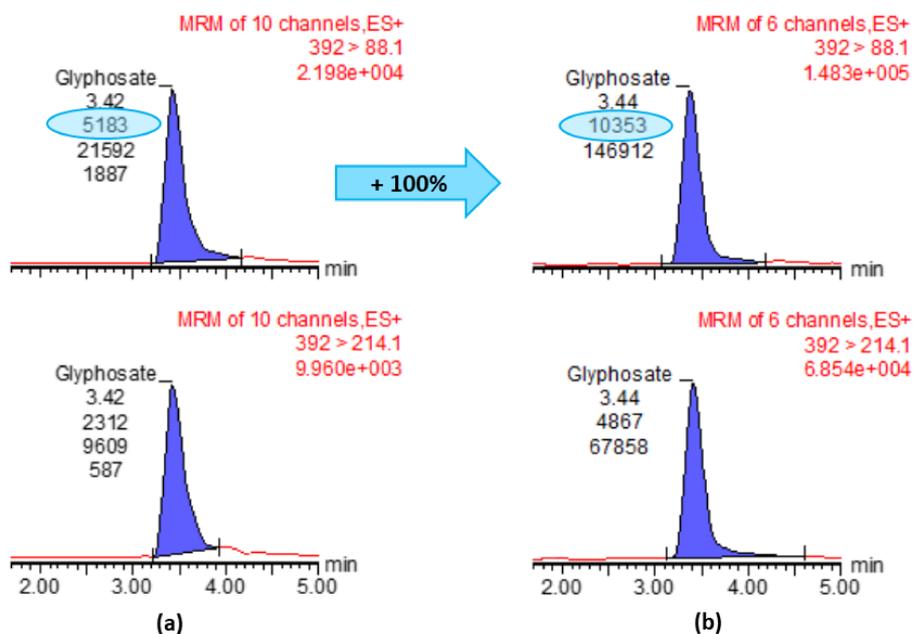


Figura 11. Cromatogramas de glifosato obtenidos al inyectar una solución estándar preparada en solvente (100 µg/L) antes (a) y después (b) de la optimización del sistema espectrométrico, utilizando la columna 2 (HSS-18) y FM 2 (agua-acetonitrilo).

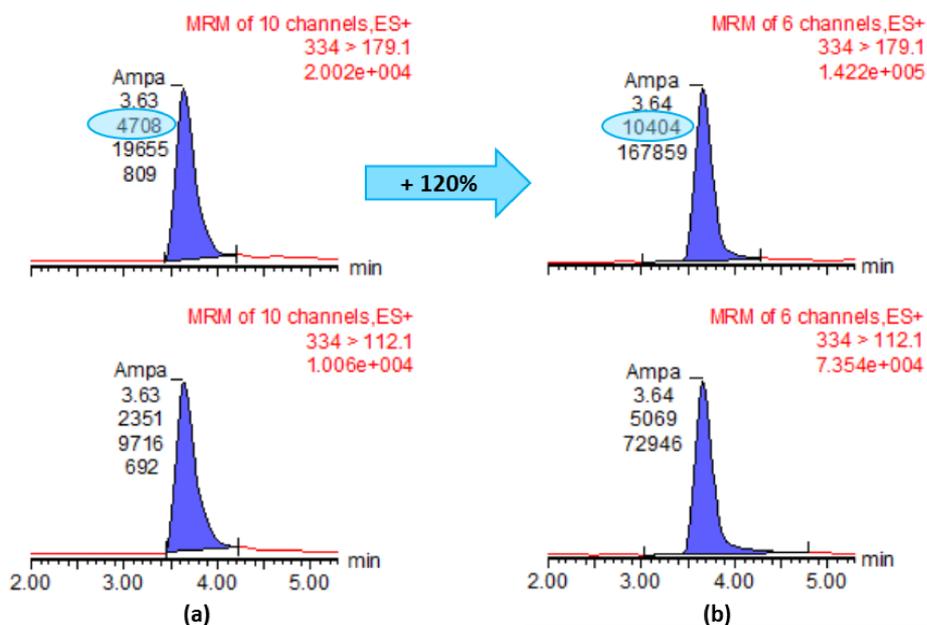


Figura 12. Cromatogramas de AMPA obtenidos al inyectar una solución estándar preparada en solvente (100 µg/L) antes (a) y después (b) de la optimización del sistema espectrométrico, utilizando columna 2 (HSS-18) y FM 2 (agua-acetonitrilo).

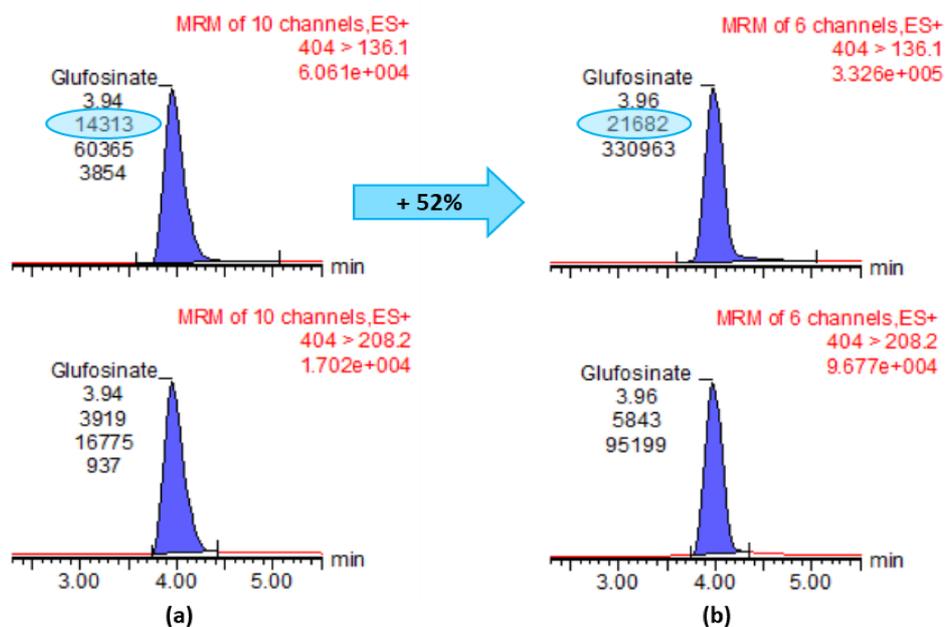


Figura 13. Cromatogramas de glufosinato obtenidos al inyectar una solución estándar preparada en solvente (100 µg/L) antes (a) y después (b) de la optimización del sistema espectrométrico, utilizando la columna 2 (HSS-18) y FM 2 (agua-acetonitrilo).

La sensibilidad lograda con la optimización cromatográfica y espectrométrica llevaron a la adopción de estas condiciones instrumentales para las etapas posteriores de desarrollo y validación de las metodologías analíticas propuestas para las distintas matrices evaluadas (agua y suero sanguíneo).

3.3.3. Ensayos comparativos sobre la etapa de preparación de la muestra

Descripción del experimento

Fueron evaluadas y adaptadas al objetivo del trabajo cuatro alternativas reportadas en bibliografía, basadas en la derivatización pre-columna con FMOC-Cl para los tres analitos en estudio. Se consideraron diferentes aspectos de los procedimientos experimentales: acondicionamiento de la muestra antes de la etapa de derivatización, concentración del reactivo derivatizante, volumen y concentración del buffer, tiempo de reacción y alternativas de limpieza de los extractos (Tabla 4).

Tabla 4. Resumen de las etapas de las cuatro metodologías analíticas desarrolladas.

	MÉTODO A	MÉTODO B	MÉTODO C	MÉTODO D
Muestra	40 mL	10 mL	3 mL	3 mL
Acidificación	pH 1 (1 h)	pH 1 (1 min)	pH 1	pH 1
Estándar interno	Gli 1,2-13C2 15N AMPA 13C 15N	Gli 1,2-13C2 15N AMPA 13C 15N	Gli 1,2-13C2 15N AMPA 13C 15N	Gli 1,2-13C2 15N AMPA 13C 15N
Neutralización	pH 6-7	pH 6-7	pH 6-7	pH 6-7
Derivatización	buffer borato 40 mM FMOC-Cl 6,5 mM	buffer borato 5% FMOC-Cl 12 g/L	buffer borato 40 mM FMOC-Cl 6 g/L ACN	buffer borato 40 mM FMOC-Cl 6 g/L ACN
Reacción	2 h	Noche (22°C)	Noche (22°C)	2 h (22°C)
Limpieza	SPE	SPE Partición	SPE	Partición

- *Método A:* consiste en el método propuesto por Hanke y col. (2008) adaptado para lograr mejor manejo en el laboratorio. Se redujo a la mitad la escala de volúmenes y se implementó SPE-C18 offline como etapa de limpieza.

El procedimiento propuesto comprendió los siguientes pasos: una alícuota de muestra de 40 mL fue tomada en un tubo de centrifuga de 50 mL de capacidad. Para eliminar posibles interacciones de glifosato con componentes de la matriz, la muestra se acidificó con HCl 6 M a pH 1, y para maximizar la disociación de los posibles complejos de analito-cación, el pH 1 se mantuvo durante una hora. Posteriormente, la muestra fue enriquecida con la mezcla de estándar interno marcado isotópicamente (glifosato 1,2-13C2 15N y AMPA 13C 15N) y se neutralizó con KOH 6 M. Se añadieron 5 mL del buffer borato 40 mM y 5 mL de la solución de FMOC-Cl 6,5 mM. Luego de agitar el tubo, se dejó reaccionar durante 2 horas a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo, la reacción se detuvo acidificando la solución aproximadamente

a pH 3 con ácido fórmico. La muestra derivatizada, fue diluida con 50 mL de agua y se añadieron 2 mL de EDTA 1 M.

Como etapa de limpieza se practicó SPE-C18 offline. Los cartuchos fueron acondicionados con 5 mL de metanol seguido de 5 mL de ácido fórmico al 0,1%. Las muestras derivatizadas se extrajeron a una velocidad de flujo aproximado de 2,5 mL/min. Posteriormente, se eliminó el exceso de agua dejando pasar aire a través de los cartuchos durante 30 min. Para eliminar los subproductos de la reacción, los cartuchos se lavaron con 3,5 mL de diclorometano y nuevamente se secaron con aire durante otros 30 min. Los analitos se eluyeron con 9 mL de metanol sin usar vacío. El metanol fue evaporado hasta sequedad y el volumen se reconstituyó con 500 µL de fase móvil para obtener las condiciones iniciales para la inyección cromatográfica, luego los extractos fueron filtrados con filtros de jeringa de nylon de 0,2 µm y transferidos a un vial para su análisis mediante UHPLC-MS/MS.

Para evaluar el rendimiento de la metodología ensayada se practicaron estudios de recuperación, fortificando las muestras (matriz libre de analitos) previamente. La fortificación se realizó por triplicado en dos niveles de concentración: 0,25 y 2,5 µg/L obteniendo porcentajes de recuperación menores al 60 % con desviaciones estándares relativas entre 15-40% para los tres analitos.

- *Método B*: se basa en el método propuesto por Ibáñez y col. (2006) reemplazando SPE-C18 online por SPE-C18 offline y proponiendo una limpieza mediante partición líquido-líquido con diclorometano, además de controlar el pH (1 y 6-7).

El procedimiento comenzó tomando una alícuota de 10 mL de muestra y transfiriéndola a un tubo de centrífuga de 50 mL. La muestra de agua se acidificó a pH 1 para liberar el glifosato de los componentes de la matriz con HCl 6 M y se mantuvo el pH por 1 min. Luego se añadió el estándar marcado isotópicamente (glifosato 1,2-¹³C₂ 15N y AMPA 13C 15N) y la muestra se neutralizó con KOH 6 M. Acto seguido se agregaron 0,6 mL de buffer borato al 5% (pH 9) y 0,6 mL de FMOC-Cl 12 g/L, se agitó y se dejó que la reacción tenga lugar durante toda la noche a temperatura ambiente.

La muestra derivatizada se filtró a través de un filtro de jeringa de 0,45 µm y se acidificó con HCl para lograr pH 1,5.

Para la etapa de limpieza se practicaron dos alternativas: SPE y partición líquido-líquido.

Opción SPE: los cartuchos fueron acondicionados con 5 mL de metanol seguido de 5 mL de ácido fórmico al 0,1%. Las muestras derivatizadas se extrajeron a una velocidad de flujo aproximado de 2,5 mL/min. Posteriormente, se eliminó el exceso de agua dejando pasar aire a través de los cartuchos durante 30 min. Para eliminar los subproductos de la reacción, los cartuchos se

lavar con 3,5 mL de diclorometano y nuevamente se secaron con aire durante otros 30 min. Los analitos se eluyeron con 9 mL de metanol sin usar vacío. El metanol fue evaporado hasta sequedad y el volumen se reconstituyó con 500 μ L de fase móvil para obtener las condiciones iniciales para la inyección cromatográfica, luego los extractos fueron filtrados con filtros de jeringa de nylon de 0,2 μ m y transferidos a un vial para su análisis mediante UHPLC-MS/MS.

Opción partición: a una porción de 4 mL de extracto se le agregaron 4,5 mL de diclorometano, se agitó vigorosamente y una fracción de la fase acuosa fue extraída, filtrada con filtro de jeringa de nylon de 0,2 μ m y transferida a un vial para su análisis por UHPLC-MS/MS.

Se practicaron estudios de recuperación para evaluar el rendimiento de las dos alternativas propuestas, para lo cual se evaluaron, por triplicado, dos niveles de concentración, 10 y 100 μ g/L y se obtuvieron los siguientes resultados: para la opción que tiene SPE como etapa de limpieza se lograron porcentajes de recuperación menores al 50% con desviaciones estándares relativas entre 10-50% para los tres analitos, mientras que para la opción que tiene partición líquido-líquido como etapa de limpieza, los porcentajes de recuperación estuvieron entre 60-130% con desviaciones estándares relativas entre 10-20% para los tres analitos.

- *Método C*: se basa en el trabajo de Zelaya y col. (2010) introduciendo un paso de limpieza de extracción en fase sólida offline y ajustes en los volúmenes de HCl y KOH para lograr el pH adecuado.

Una alícuota de 3 mL de muestra fue transferida a un tubo de centrifuga de 15 mL. La muestra se acidificó a pH 1 para liberar el glifosato de los componentes de la matriz con 100 μ L de HCl 6 M. Se añadió el estándar marcado isotópicamente (glifosato 1,2- $^{13}C_2$ 15N y AMPA ^{13}C 15N) y luego, la muestra fue neutralizada con KOH 6 M (pH 6-7). Para la derivatización, se agregaron 0,5 mL de buffer borato 40 mM, 0,5 mL de FMOC-Cl 6 g/L y 0,5 mL de acetonitrilo, se agitó y se dejó reaccionar durante toda la noche a temperatura ambiente.

Luego del tiempo de reacción, la muestra fue diluida con 50 mL de ácido fórmico al 1% para comenzar con la etapa de limpieza mediante SPE.

Los cartuchos fueron acondicionados con 5 mL de metanol seguido de 5 mL de ácido fórmico al 0,1%. Las muestras derivatizadas se extrajeron a una velocidad de flujo aproximado de 2,5 mL/min. Posteriormente, se eliminó el exceso de agua dejando pasar aire a través de los cartuchos durante 30 min. Los cartuchos fueron lavados con 10 mL de agua y 10 mL de diclorometano y nuevamente se secaron dejando pasar aire durante 30 min. Los analitos se eluyeron con 5 mL de metanol sin usar vacío. El metanol fue evaporado hasta sequedad y el volumen se reconstituyó con 500 μ L de fase móvil para obtener las condiciones iniciales para la

inyección, luego los extractos fueron filtrados con filtros de jeringa de nylon de 0,2 μm y transferidos a un vial para su análisis mediante UHPLC-MS/MS.

Los estudios de recuperación para evaluar este método sólo fueron en un solo nivel de concentración de 100 $\mu\text{g/L}$ por triplicado. Los porcentajes de recuperación estuvieron por debajo del 45% con desviaciones estándares relativas entre 30-40% para los tres analitos.

- *Método D*: fue diseñado en base al trabajo de Zelaya y col. (2010) introduciendo ajustes en el volumen de HCl y KOH y practicando una reducción en el tiempo de reacción.

Una alícuota de 3 mL de muestra fue transferida a un tubo de centrífuga de 15 mL. La muestra se acidificó para liberar el glifosato de los componentes de la matriz con 100 μL de HCl 6 M (pH 1). Se añadió el estándar marcado isotópicamente (glifosato 1,2- $^{13}\text{C}_2$ 15N y AMPA ^{13}C 15N) y luego, la muestra fue neutralizada con KOH 6 M (pH 6-7). Para la derivatización, se agregaron 0,5 mL de buffer borato 40 mM, 0,5 mL de FMOC-Cl 6 g/L y 0,5 mL de acetonitrilo, se agitó y se dejó reaccionar durante 2 horas a temperatura ambiente y al resguardo de la luz.

La etapa de limpieza consistió en una partición líquido-líquido. A la muestra derivatizada se le adicionaron 4,5 mL de diclorometano, se agitó vigorosamente y una fracción de la fase acuosa fue extraída, filtrada con filtro de jeringa de nylon de 0,2 μm y transferida a un vial para su análisis por UHPLC-MS/MS.

Para evaluar el rendimiento de la metodología propuesta se practicaron ensayos de recuperación, fortificando las muestras previamente, en el nivel de 100 $\mu\text{g/L}$ por triplicado. Se lograron porcentajes de recuperación de 105, 96 y 100% con desviaciones estándares relativas de 12, 14 y 8% para glifosato, AMPA y glufosinato, respectivamente.

Resultados y discusión

-Pre-acondicionamiento de la muestra: acondicionar la muestra antes de la etapa de derivatización es un punto crítico en el análisis de aguas naturales, dado que normalmente tienen un rico contenido de cationes multivalentes que interactúan con el comportamiento anfotérico de los analitos estudiados para formar complejos estables que impiden una reacción adicional con el reactivo derivatizante. Esto es particularmente importante en el caso de aguas subterráneas, donde se ha visto que es una fuente de errores en determinaciones anteriores utilizando FMOC-Cl (Ibáñez y col., 2006; Freuze y col., 2007). La acidificación fuerte es la forma más simple y efectiva de evitar la presencia de estos complejos interferentes, reportándose diferentes tiempos de espera para liberar al glifosato. Dado que esta variable también debe considerarse, se evaluaron tres períodos de tiempo diferentes a pH 1 (Ibáñez y col., 2006): 1 h, 1 min y sin tiempo de espera. La adición de 100 μL de HCl 6 M sin tiempo de espera (método D)

fue suficiente para alcanzar un pH 1 produciendo buenos resultados posteriores y reduciendo el tiempo de análisis, por lo que se adoptó esta alternativa.

Antes de continuar con los pasos de la derivatización, se agrega el estándar interno marcado isotópicamente. El uso de glifosato y AMPA marcado con isótopos (glifosato 1,2-¹³C₂ ¹⁵N y AMPA ¹³C ¹⁵N) es útil para seguir el comportamiento de la reacción de derivatización, minimizando las variaciones y los efectos de la matriz. Se han efectuado cálculos de recuperaciones con los compuestos marcados para ser utilizados como medida de control de calidad en todas las ejecuciones.

Después del pre-acondicionamiento ácido, es muy importante neutralizar el medio para permitir que el reactivo de bufferizado logre y mantenga el medio alcalino adecuado para que se produzca la reacción de derivatización (pH 9). Durante este estudio, este paso de neutralización demostró ser crítico. El volumen fijo de solución alcalina equivalente al volumen y concentración de HCl agregado como se describe en la mayoría de las metodologías consultadas no fue suficiente para asegurar una buena neutralización en todos los casos. Por ejemplo, la adición de volúmenes fijos según lo propuesto por Ibáñez y col. (2006) (200 µL de HCl 6 M + 200 µL de KOH 6 M) y Zelaya y col. (2010) (80 µl de cada uno de los mismos reactivos) para neutralizar las altas concentraciones de HCl condujeron a obtener soluciones finales con pH variable, ya que depende en gran medida de la composición de la muestra. Además, se observó una reacción de derivatización incompleta que conducía a valores de recuperación bajos y, por lo tanto, se requirió un ajuste controlado del pH mediante la adición de la solución KOH 6 M para alcanzar un pH neutro (pH 6-7).

-Derivatización: para la reacción de derivatización se indicó como óptimo un pH alcalino igual a 9 (Moye y Boning, 1979). Sin embargo, el tipo de buffer, las condiciones de bufferizado ni la reacción adecuada se han adoptado de manera uniforme. Desde hace tiempo se sabe que la concentración de buffer borato de sodio es crítica porque un exceso puede interferir con los solventes del sistema cromatográfico y, a concentraciones más bajas, la capacidad de bufferizado puede ser insuficiente para completar la derivatización. Por esa razón, es necesario adoptar el paso de neutralización previo, como se mencionó anteriormente. Además, en este estudio, se evaluaron tres formas diferentes de utilizar el buffer borato. Las concentraciones finales de buffer, analizado con referencia al volumen inicial de muestra fueron 1,9 y 3 g/L para los métodos A y B, y 2,5 g/L para los métodos C y D, respectivamente. Este rango de concentración está de acuerdo con los métodos de referencia y otros reportados en la literatura. En el presente estudio, el método D seleccionado cuenta con un valor intermedio de buffer, lo cual es suficiente para lograr los buenos resultados obtenidos.

La cantidad requerida de reactivo de derivatización también es fundamental para garantizar una reacción completa y reproducible. Esta cantidad se determinó experimentalmente en un rango de concentraciones entre 0,3 y 1 g/L de FMOC-Cl, referido al volumen inicial de muestra de cada procedimiento probado. La relación molar estequiométrica 1:1 de glifosato:FMOC-Cl muestra un bajo rendimiento de compuestos derivatizados. Se debe utilizar un exceso de reactivo derivatizante para lograr una derivatización completa de los analitos presentes en la muestra. Por esa razón, se utiliza una relación molar más amplia de analito:reactivo que oscila entre 1:10-10⁵. Sin embargo, aunque el exceso de FMOC-Cl es común a todas las técnicas consultadas, su optimización es importante ya que el reactivo que no reacciona se convierte en una impureza indeseable, produciendo la formación de subproductos durante la reacción. El FMOC-Cl es altamente reactivo en agua (reacción de un cloruro de acilo con agua) formando el producto FMOC-OH, este subproducto tiene la desventaja de que es menos soluble en agua que los analitos derivatizados y puede precipitar, perturbando así el rendimiento de la columna cromatográfica. Dicha precipitación también puede reducir la eficiencia de la ionización y, por consiguiente, afectar la robustez y la sensibilidad del método en general (Hanke y col., 2008). Para resolver este problema, se incluye un paso de limpieza en el procedimiento. En este estudio, de optimización de las metodologías propuestas, se usaron tres relaciones molares de glifosato:FMOC-Cl, 1:0,8·10⁵ (método A), 1:4,7·10⁵ (método B) y 1:6,5·10⁵ (método C y D) considerando un nivel de concentración de 10 µg/L de glifosato en la muestra de agua. La relación más alta correspondió al método D, método seleccionado, el cual resultó adecuado sin añadir problemas debido al exceso de reactivo y a las impurezas de los subproductos.

El glifosato y los compuestos relacionados son solubles en agua y muy poco solubles en solventes orgánicos. En contraste, el reactivo derivatizante es casi insoluble en agua, y por esta razón, la adición de acetona o acetonitrilo en diferentes concentraciones facilita la reacción. Zelaya y col. (2010) experimentaron con un rango de 10 a 65% de acetonitrilo para establecer una proporción adecuada de acetonitrilo/agua, sin observar cambios en los rendimientos de la derivatización en todo el rango estudiado. Se consideró apropiada la incorporación adicional de acetonitrilo y, considerando el amplio rango adecuado para ese propósito, se eligió una proporción relativamente baja para favorecer la reacción pero evitando un exceso de solvente indeseable. Por lo tanto, para el método D finalmente seleccionado, se agregaron 0,5 mL de acetonitrilo (~20%) con resultados reproducibles.

Además de las condiciones del medio y la cantidad de reactivo derivatizante, el tiempo de reacción es otra variable importante porque tiene que ocurrir una reacción completa y también, llevar el menor tiempo posible para proporcionar una duración aceptable del análisis. Sin embargo, en la literatura se informa un amplio rango de tiempos de reacción, siendo la opción

más reportada aquella donde se deja la reacción durante toda la noche para asegurar una reacción completa y también para adaptarse a un esquema de un período de dos días (Vreeken y col., 1998; Ibáñez y col., 2006; Zelaya y col., 2010; Cullum y Schuhn, 2013; Poiger y col., 2016). También, otros autores proponen un tiempo de reacción más corto de 2 h trabajando a temperatura ambiente (Hanke y col., 2008) y en condiciones de oscuridad (Daouk y col., 2013), e incluso la ISO N° 16308 (2014) indica un período de 30 min en condiciones de oscuridad. A su vez, se han propuesto tiempos de reacción de 30 min y calentamiento a 60°C (Mallet, 2014) y 100°C (Cullum y Schuhn, 2013). Durante este trabajo se realizaron experiencias con diferentes tiempos de reacción: 2 h, 5 h y durante toda la noche, demostrando que todos ellos eran adecuados para lograr una reacción completa y reproducible. Se obtuvieron recuperaciones satisfactorias para los tres analitos a dos niveles de concentración (10 y 100 µg/L) al ejecutar el método D con los tiempos de reacción mencionados anteriormente (Tabla 5). Durante el período de reacción las muestras fueron protegidas de la exposición a la luz.

Teniendo en cuenta los resultados experimentales y los antecedentes citados existentes en la literatura, se seleccionó 2 h como un tiempo de reacción razonable para minimizar la duración total del análisis, evitando el calentamiento laborioso y los períodos de reacción prolongados.

Tabla 5. Evaluación del tiempo de reacción de derivatización aplicando el método D (n=3)^a.

Compuesto	2 horas		5 horas		Durante la noche	
	% Recuperados (%DER) ^b		% Recuperados (%DER) ^b		% Recuperados (%DER) ^b	
	10 µg/L	100 µg/L	10 µg/L	100 µg/L	10 µg/L	100 µg/L
Glifosato	119 (1)	98 (9)	117 (4)	99 (2)	119 (8)	99 (6)
AMPA	118 (5)	100 (6)	112 (3)	105 (2)	110 (4)	95 (5)
Glufosinato	95 (3)	79 (8)	94 (8)	81 (4)	94 (2)	75 (2)

^aTres muestras de agua adicionadas a 10 y 100 µg/L cada una.

^bDesviación Estándar Relativa (%).

-Limpieza de los subproductos de reacción: para lograr extractos más limpios y compatibles con el sistema cromatográfico, se realizaron varias alternativas de limpieza para eliminar el exceso de reactivos y subproductos de la reacción.

A los extractos, se les suele realizar un tratamiento L-L con solventes adecuados antes de realizar un paso de SPE. Muchos métodos han reportado la utilización satisfactoria de un paso de concentración y limpieza online por medio de SPE-C18 (Ibáñez y col., 2005, 2006; Hanke y col., 2008; Poiger y col., 2016), con configuraciones instrumentales automatizadas (Cullum y Schuhn, 2013; Mallet, 2014) y más escasamente desarrollando alternativas offline (Daouk y col., 2013; ISO, 2014). Se han observado más diferencias entre estos métodos con respecto al tratamiento L-L con solventes, cuando se usa, principalmente acetato de etilo y diclorometano. La mayoría

de los procedimientos de SPE representan pasos adicionales laboriosos y requieren mayor tiempo. Por esta razón, con el objetivo de desarrollar metodologías más simples, confiables y a menor costo, se analizaron alternativas de limpieza basadas en SPE clásico, fuera de línea, utilizando cartuchos C18 y partición L-L.

Para la concentración y limpieza de los analitos utilizando cartuchos de SPE offline, se utilizó un volumen de lavado de diclorometano de 3,5 mL después de acondicionar y cargar el extracto derivatizado para eliminar las impurezas de los productos derivados de FMOC-Cl antes de la elución final con metanol. El procedimiento de SPE, a pesar de que es más laborioso, es necesario y efectivo para que la concentración de los analitos cumpla con las regulaciones de agua más exigentes (por ejemplo: 0,1 µg/L de la UE). Sin embargo, en el presente estudio, este paso no dio resultados completamente satisfactorios en términos de recuperaciones (métodos A y B opción 1). Un procedimiento alternativo que utiliza 10 mL de agua y 10 mL de diclorometano tampoco mejoró los resultados (método C). Por lo tanto, estos resultados preliminares hicieron que se explore el comportamiento del sistema sin la etapa de SPE y se introduzca un solo paso de lavado con diclorometano después de la derivatización (método B, opción 2 y método D) obteniendo mejores resultados en ambos casos. Como consecuencia, se continuó el trabajo experimental centrado en la optimización y la validación del procedimiento definido como método D. Este procedimiento consiste en introducir un paso de limpieza rápida basado en una partición L-L con diclorometano de manera simplificada, ya que utiliza sólo un pequeño volumen de solvente (4,5 mL), un tiempo muy corto (10 s de agitación vigorosa) y es capaz de lograr una eliminación completa de los residuos de la reacción y otras impurezas. En este estudio, la partición con diclorometano demostró ser muy efectiva al proporcionar extractos muy limpios de todos los tipos de muestras de agua en estudio, a tal punto, que el sistema cromatográfico requirió poco mantenimiento, siendo compatible con el uso de los dos tipos de columnas cromatográficas C18 analizadas y, en el caso de la columna cromatográfica HSS-C18, que se utilizó de forma continua y exclusiva para la determinación de glifosato en análisis de rutina en una variedad de matrices con este método, no se observaron cambios en el rendimiento luego de un gran número de inyecciones (>9150).

En la estrategia propuesta, evitar la concentración previa por SPE compromete la capacidad de detección y cuantificación del método, sin embargo, los límites de cuantificación alcanzados con valores por debajo del nivel del µg/L para los tres analitos, son adecuados para propósitos de control de rutina para muchos países que tienen estándares de calidad de agua fijados por encima de esos niveles de concentración.

En conclusión, a partir de la evaluación inicial de los resultados obtenidos de cada uno de los enfoques propuestos, se seleccionó el método D para una mayor optimización y validación, ya que simplificó los pasos principales de la operación y se obtuvieron resultados satisfactorios en cuanto a valores de recuperación. En la Figura 14 se representa esquemáticamente el método analítico seleccionado.

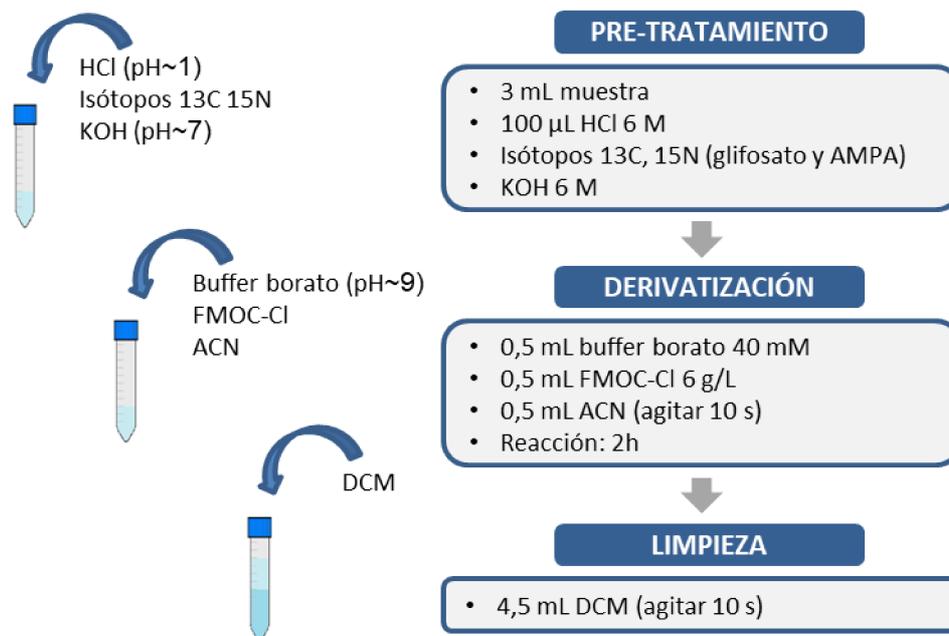


Figura 14. Resumen esquemático del procedimiento para determinar glifosato, AMPA y glufosinato en muestras de agua.

3.3.4. Validación del método D seleccionado

El conjunto de estudios y ensayos de las variables más relevantes realizadas durante la fase de desarrollo llevó a la adquisición de información significativa y recolección de datos analíticos, que fueron utilizados para orientar y facilitar el procedimiento de validación final del método D adoptado. La validación se realizó en base a los criterios que establece el documento SANTE/11945/2015 (EC, 2015) para el control de calidad del análisis de residuos de plaguicidas. Durante este proceso se evaluó exactitud y precisión, linealidad, efecto matriz y límites de detección y cuantificación.

Rango de linealidad

La linealidad del método se evaluó analizando cinco soluciones estándar de los tres analitos por triplicado en el rango de 0,1 a 100 $\mu\text{g/L}$ (0,1; 0,5; 1; 10 y 100). La linealidad se consideró satisfactoria a partir del análisis de regresión, logrando un coeficiente de correlación superior a 0,99 y residuos inferiores a $\pm 20\%$ en todos los casos (Figuras 15, 16 y 17).

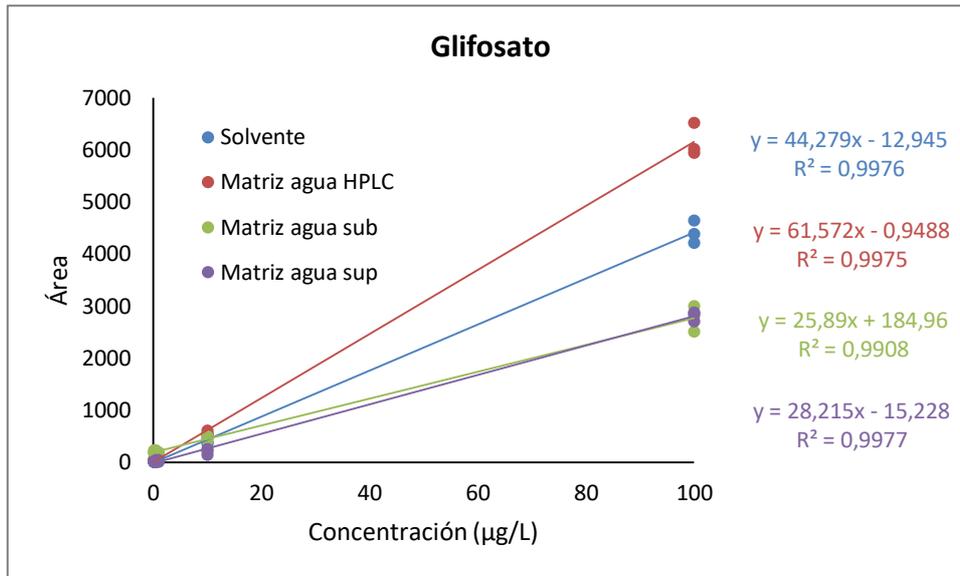


Figura 15. Calibraciones de glifosato en solvente y matriz: agua HPLC, agua subterránea (sub), agua superficial (sup).

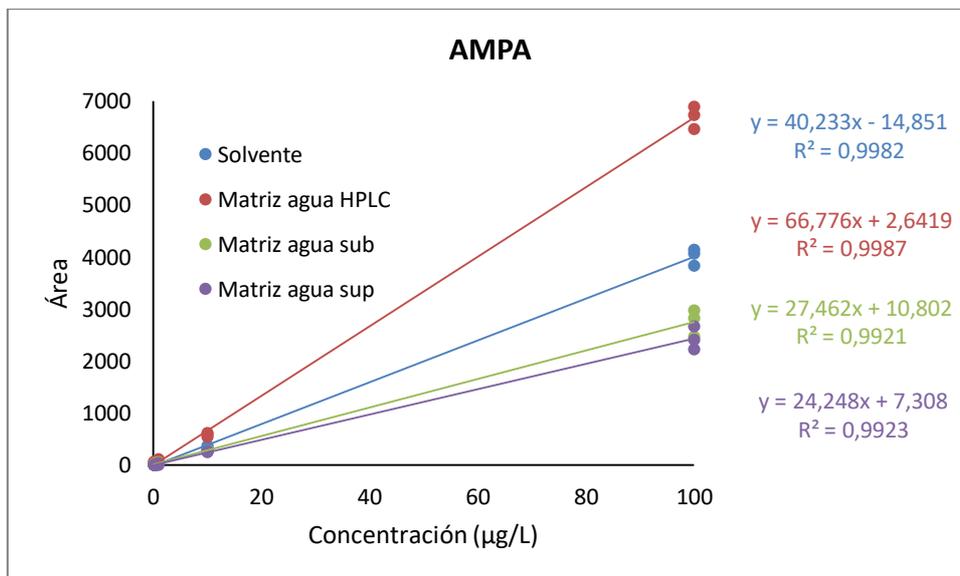


Figura 16. Calibraciones de AMPA en solvente y matriz: agua HPLC, agua subterránea (sub), agua superficial (sup).

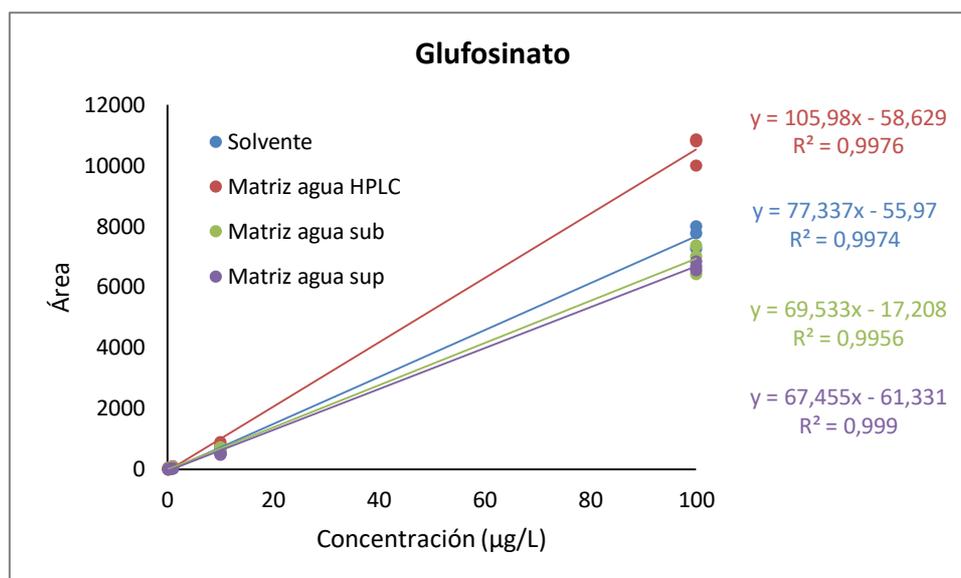


Figura 17. Calibraciones de glufosinato en solvente y matriz: agua HPLC, agua subterránea (sub), agua superficial (sup).

Efecto matriz

Las interferencias de la matriz se estudiaron mediante curvas de calibrado realizadas en solvente (componente A de la fase móvil 2) y diferentes tipos de matrices, tales como agua superficial, subterránea y blanco de reactivos. Luego se evaluó el efecto matriz mediante un cálculo que relaciona las pendientes de ambas regresiones lineales utilizando la siguiente fórmula (Kwon y col., 2012):

$$\% \text{ Efecto matriz} = \frac{(\text{pendiente matriz} - \text{pendiente solvente})}{\text{pendiente solvente}} \cdot 100$$

Se observó una interferencia de matriz negativa de -36 a -41% para glifosato, -32 a -40% para AMPA y -10 a -13% para glufosinato considerando agua subterránea y superficial. Este efecto probablemente es debido a la salinidad de la muestra y el contenido de materia orgánica, fuentes importantes de variabilidad y por esta razón se debe considerar a la hora del cálculo de las concentraciones. En contraste, se observó una interferencia positiva en las respuestas de los tres analitos (40% glifosato, 65% AMPA y 37% glufosinato) cuando se utilizó blanco de reactivos para la calibración (agua HPLC). Este comportamiento es menos frecuente cuando se utiliza ionización por electrospray, una explicación a este fenómeno sería la presencia de menor cantidad de interferentes (sales minerales) que compiten en el proceso de ionización favoreciendo la ionización de los tres analitos.

El documento SANTE establece un criterio de $\pm 20\%$ para aceptar el efecto matriz. Para glifosato y AMPA el efecto es mayor, por lo que se debe utilizar calibraciones en presencia de la matriz

para realizar el cálculo de concentraciones. En cambio, para glufosinato se podría utilizar calibración en solvente. Sin embargo, los procedimientos de cuantificación, para los tres analitos, se realizaron utilizando como referencia las curvas de calibrado en matriz y teniendo en cuenta el origen de la fuente de agua en estudio (Figuras 15, 16 y 17).

Exactitud y precisión

Para evaluar la exactitud y precisión de la metodología analítica el documento SANTE indica que deben probarse al menos dos niveles de concentración. Las recuperaciones se determinaron tanto intra-día como inter-día mediante el análisis de muestras blanco fortificadas a tres niveles de concentración (1, 10 y 100 µg/L) por quintuplicado, obteniendo resultados que oscilan entre 70-105% con valores de DER ≤11% en todos los casos (Tabla 6). Cabe mencionar que se realizó un experimento de recuperación adicional en los niveles de LC respectivos para los tres analitos. A su vez, se determinaron la repetibilidad intra-día y la precisión inter-día en dos niveles de concentración (1 y 100 µg/L), obteniendo los resultados que se muestran a continuación en la Tabla 6.

Tabla 6. Cifras de mérito del método analítico D (n=5)^a.

Compuesto	Recuperados %		Repetibilidad %DER		Precisión intermedia %DER		LD µg/L	LC µg/L
	1 µg/L	100 µg/L	1 µg/L	100 µg/L	1 µg/L	100 µg/L		
Glifosato	70-80	95-105	3	4	7	7	0,2	0,6
AMPA	80-90	90-95	4	2	11	5	0,1	0,2
Glufosinato	70-80	93-97	3	2	9	4	0,01	0,1

^aCinco muestras de agua adicionadas a 1 y 100 µg/L cada una.

Límite de detección y cuantificación

A pesar de lo expresado por el documento SANTE, los límites de detección y cuantificación se estimaron usando la relación S/N.

El límite de detección (LD) fue determinado como la menor concentración de analito que producía un pico cromatográfico con un valor de relación S/N de 3 para la transición de cuantificación, mientras que, el límite de cuantificación (LC) fue estimado como la menor concentración de analito que producía un pico cromatográfico con un valor de relación S/N de 10 para la transición de cuantificación. De esta manera, para el método D evaluado, los LD y LC en agua fueron de 0,2 y 0,6 µg/L para glifosato; 0,1 y 0,2 µg/L para AMPA y 0,01 y 0,1 µg/L para glufosinato. Estos valores son adecuados para el cumplimiento de los niveles máximos de glifosato en agua permitidos por la normativa argentina y otras extranjeras.

3.4. APLICACIÓN A MUESTRAS REALES

El método propuesto se aplicó al análisis de muestras reales provenientes de diferentes zonas de las provincias de Santa Fe y Entre Ríos, pertenecientes a la región central de Argentina. Esta metodología desarrollada no sólo permitió determinar glifosato, AMPA y glufosinato en trabajos de investigación, sino que, además le permitió al PRINARC, laboratorio perteneciente a la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Nacional del Litoral, realizar servicios a terceros para control y monitoreo de estos herbicidas en el medio ambiente.

3.4.1. Determinación de glifosato, AMPA y glufosinato en agua de tambos

Descripción del experimento

La metodología optimizada y validada fue aplicada al estudio de los tres analitos en aguas que se suministran a los animales productores de leche. Las muestras de agua subterránea se obtuvieron directamente de la salida del pozo en cada tambo, utilizando procedimientos de muestreo estandarizados siguiendo un protocolo de INTA (INTA, 2011) y posteriormente se almacenaron a -18°C hasta el día del análisis. La extracción del agua de los pozos se realiza, principalmente, a través de molinos de viento, o bien, mediante bombas mecánicas.

El plan de muestreo incluyó 125 muestras de agua subterránea y 33 muestras de agua superficial provenientes de los tanques a cielo abierto, tomadas de 40 tambos ubicados en la región central de la provincia de Santa Fe, en los departamentos Castellanos y Las Colonias (Figura 18). Se llevó a cabo durante las cuatro estaciones climáticas: primavera del año 2012, verano, otoño e invierno del año 2013 en el marco de un proyecto de investigación PICT-ANPCYT desarrollado en colaboración con INTA Rafaela, dedicado a evaluar residuos y contaminantes químicos en la leche y las dietas animales de los tambos santafesinos.



Figura 18. Sitios de muestreo geo-referenciados correspondientes a los 40 tambos seleccionados, para el estudio. Departamentos Castellanos y Las Colonias, Santa Fe, Argentina.

Respecto al sistema de acuíferos, el área de estudio pertenece a la llanura Chaco-Pampeana, en la cual los reservorios de agua dulce corresponden a geoformas que favorecen la infiltración y el almacenamiento de aguas meteóricas. Los suelos son de tipo Argiudoll con un horizonte B2t que contiene un porcentaje de arcillas cercano al 60% (Tujchneider y col., 2002). La profundidad de los pozos muestreados varió en todos los casos entre 20 y 25 m. En el departamento Castellanos, los niveles freáticos fueron de 4,2 y 2,2 m durante la primavera 2012 y el verano 2013, respectivamente, y aproximadamente de 10,3 y 8,8 m durante las mismas temporadas en el departamento Las Colonias. Para caracterizar la composición química de las muestras se realizaron análisis físico-químicos en cada temporada de muestreo de las aguas obtenidas. El rango de concentraciones encontrado para los parámetros representativos fue el siguiente (expresado en mg/L): sólidos disueltos (696-5423), sólidos suspendidos (0-400), cloruro (28-1552), sulfato (20-1637), calcio (6-168), potasio (6-2460), sodio (191-1610), magnesio (4-111) y valores de pH y conductividad en el rango de 7,1-8,4 y 2,2-10,3 mS/cm, respectivamente.

Esta región incluye la cuenca lechera más importante de Argentina, que comparte la tierra con otras actividades agrícolas, como la producción extensiva de cultivos (soja, trigo, maíz, girasol y sorgo), la mayoría de ellos se basan en cultivos genéticamente modificados que exigen una gran carga de glifosato y otros agroquímicos como ayuda tecnológica a las prácticas de labranza cero.

Resultados y discusión

El análisis de agua subterránea mostró resultados positivos para glifosato y AMPA en 66% y 96% de las 125 muestras totales, respectivamente.

Sin embargo, se verificó una incidencia menor de valores cuantificados (por encima de los LC respectivos) de 15% y 53% de glifosato y AMPA, respectivamente (Figura 19). En las muestras de agua subterránea analizadas, los valores cuantificados encontrados para glifosato oscilaron entre 0,6 y 11,3 µg/L, y para AMPA entre 0,2 y 6,5 µg/L. No se observó presencia de glufosinato (todos los valores hallados fueron <LD).

Se analizó un segundo grupo de 33 muestras de agua provenientes de tanques abiertos de donde los animales beben, estas aguas están en contacto con el medio ambiente del tambo, expuestas a lluvias, polvo y aire de los campos agrícolas circundantes. En este caso, los resultados mostraron una mayor presencia de los herbicidas estudiados. Las muestras positivas aumentaron a 76% (33% cuantificado) y 97% (61% cuantificado) para glifosato y AMPA, respectivamente. Las concentraciones de glifosato variaron de 0,6 a 21,2 µg/L, y para AMPA de 0,2 a 4,2 µg/L. Contrariamente a lo que se encontró en el agua subterránea, se verificó la presencia de trazas de glufosinato en estas aguas. Las detecciones positivas aumentaron a 55% con valores cuantificados (3%) en el nivel de 0,1 µg/L (Tabla 7 y Figura 19).

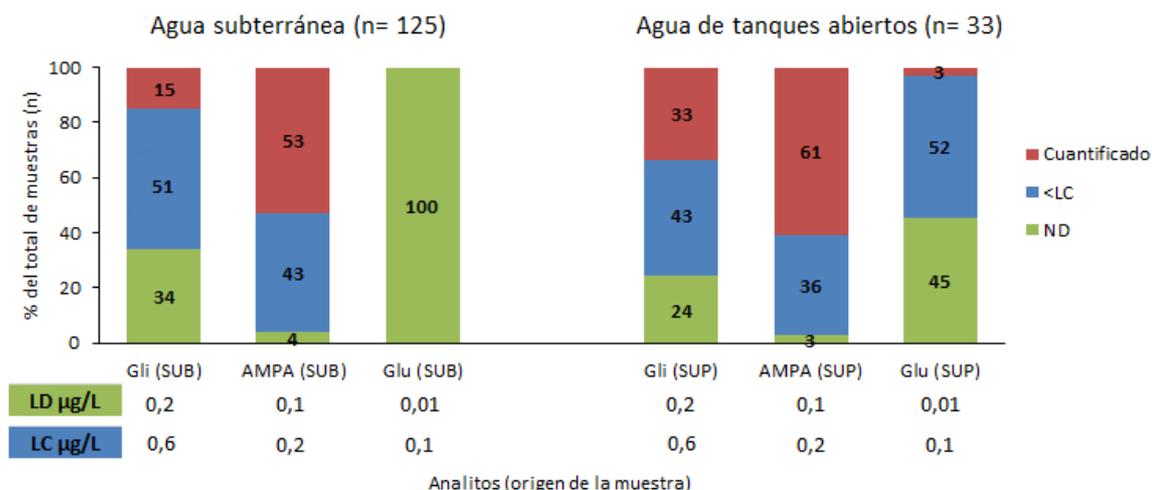


Figura 19. Resultados correspondientes a la determinación de glifosato, AMPA y glufosinato en muestras de agua subterránea (SUB) y agua de tanques a cielo abierto (SUP), expresadas como porcentaje del total de muestras. Los resultados se agruparon en: no detectado (ND=menor al LD) en verde, menor que el límite de cuantificación (<LC) en azul y valores cuantificados en rojo. Para el cálculo de la media, sólo se consideraron los valores cuantificados (ver Tabla 7).

Tabla 7. Valores medios cuantificados y el rango de concentración (LC a valores cuantificados máximos) de glifosato, AMPA y glufosinato encontrados en muestras de agua subterránea y agua de bebederos de 40 tambos de la región central de Santa Fe, Argentina. (Ver Figura 19).

	Agua subterránea			Agua de bebederos		
	Glifosato	AMPA	Glufosinato	Glifosato	AMPA	Glufosinato
n (total)	125	125	125	33	33	33
n (cuantificado)	19	66	-	11	20	1
Media [µg/L]	2,1	0,5	-	5,6	0,8	0,1
Rango [µg/L]	0,6-11,3	0,2-6,5	-	0,6-21,2	0,2-4,2	0,1-0,1

El aumento en la aparición de trazas de glifosato y AMPA se verificó con las muestras analizadas en las estaciones de primavera y verano. Estos hallazgos corresponden a la exposición a través de las prácticas agrícolas en la región. Por ejemplo, la siembra de soja comienza en el mes de octubre y se extiende hasta enero. Se realiza bajo siembra directa, sin labranza previa. Antes de esto, se debe hacer un barbecho químico para comenzar la campaña con un lote limpio, esto se logra a través del control químico de las malezas presentes (pastos anuales de hoja ancha). Antes de la aparición de la soja, se puede hacer una aplicación con herbicidas pre-emergentes, incluido glifosato.

A modo de ejemplo, la Figura 20 muestra cromatogramas representativos de los tres analitos en el análisis de una muestra de agua subterránea naturalmente contaminada y de una muestra de agua adicionada. Los positivos encontrados fueron confirmados a través de las medidas de masa exacta mediante el equipamiento utilizado (UHPLC-MS/MS), demostrando la utilidad de esta técnica para la determinación de estos tres analitos en muestras de agua.

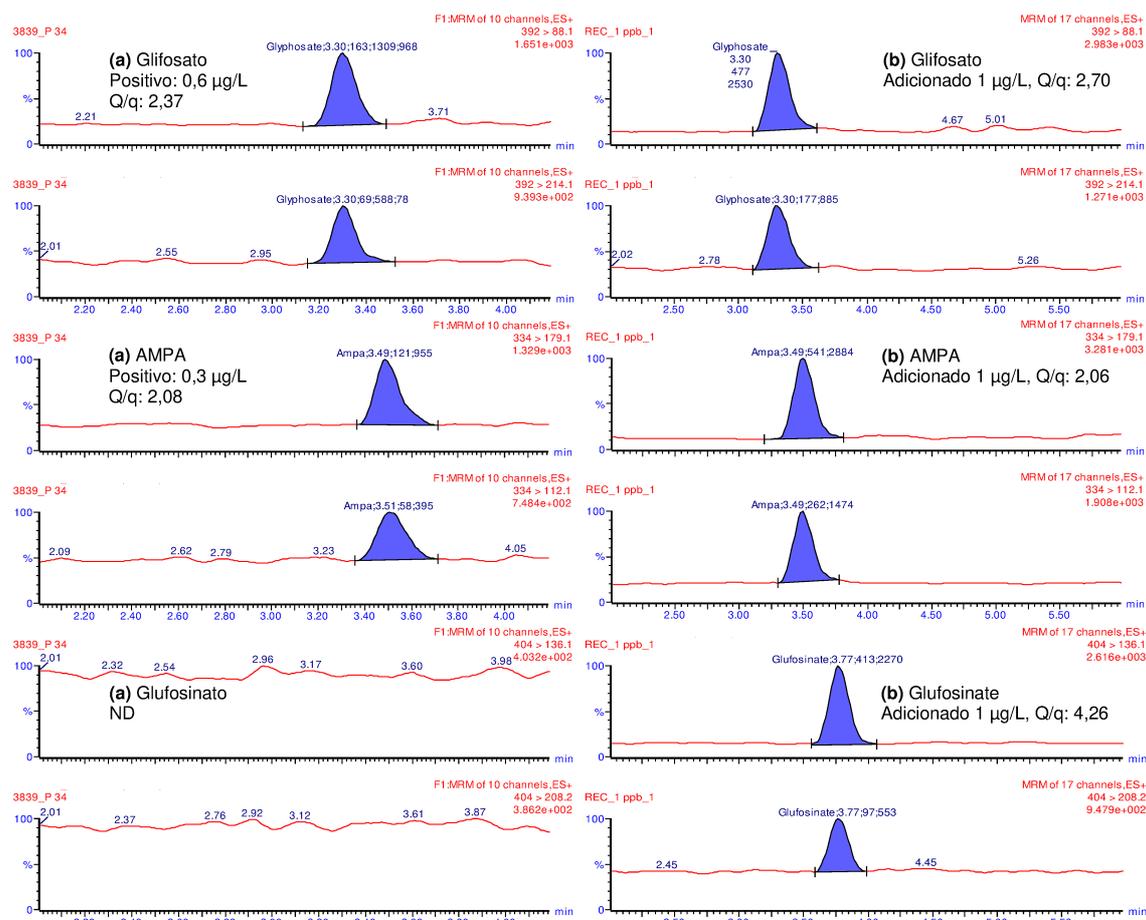


Figura 20. Cromatogramas del análisis de una muestra de agua subterránea utilizando el método D validado con la columna 2 y fase móvil 2. a) Muestra positiva en el LC para glifosato y AMPA (glifosato 0,6 µg/L, AMPA 0,3 µg/L) y b) agua adicionada a un nivel de 1 µg/L para los tres analitos.

Se puede concluir con respecto a los valores encontrados en nuestro estudio, que se observaron niveles bajos, que cumplían con las tolerancias aplicables del país y otras regulaciones extranjeras. No obstante, si bien los niveles de concentración hallados fueron bajos, se verificó una considerable frecuencia de aparición de los compuestos, principalmente glifosato y AMPA, en los acuíferos, evidenciando que los mismos están siendo impactados tras el uso intensivo de estos agroquímicos durante las dos últimas décadas.

3.4.2. Determinación de glifosato y AMPA movilizados por escorrentía. Relación fósforo-glifosato

Descripción del experimento

El método desarrollado permitió, que en colaboración con el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Estación Experimental Agropecuaria Paraná (INTA-EEA Paraná), Entre Ríos, Argentina, se realice este trabajo donde el objetivo fue evaluar la relación que existe entre glifosato y la aplicación de fertilizantes de fósforo en condiciones a campo, y su contribución a

la contaminación debido a la escorrentía de aguas superficiales, ya que, la aplicación de glifosato y fertilizantes de fósforo a los cultivos de soja es una práctica que generalmente se realiza a principios de la primavera, que coincide con las lluvias que producen escorrentía en la región pampeana, por lo que resulta relevante realizar dicha investigación.

El ensayo se realizó en los campos de la estación experimental de INTA Paraná, en una parcela sin labranza, con rotación de cultivos: trigo, soja y maíz. El suelo es de tipo Aquic Argiudoll de la serie Tezanos Pinto. El suelo cuenta con un horizonte superficial de color oscuro, que va de lodoso-arcilloso-limoso a arcilloso-limoso, que consiste en un 27,6% de arcilla que es predominantemente de tipo ilítico. El horizonte A presenta una capacidad de intercambio catiónico de 23,8 mequiv/100 g (Ca^{2+} 16,3%; Mg^{2+} 2,7%; K^+ 1,9%; Na^+ 0,1% y H^+ 4,7%) y 2,65% de materia orgánica (Soil Map Plan, 1998). Un horizonte argílico se ubica debajo de 17 cm.

Se realizaron cuatro tratamientos en tres fechas de simulación de lluvia después de la aplicación del fertilizante y el herbicida: 24 h después (fecha de simulación 1), 5 días después (fecha de simulación 2) y 8 días después (fecha de simulación 3), con un diseño completamente aleatorio con 36 parcelas de 1 m².

Los tratamientos fueron:

- Control (C): sin aplicación de agroquímicos.
- Glifosato (GL): 3 L/ha de glifosato, producto comercial.
- Fósforo (P): 100 kg/ha de superfosfato de calcio triple.
- Fósforo + Glifosato (P+GL): 100 kg/ha de superfosfato de calcio triple + 3 L/ha de glifosato, producto comercial.

Después de la aplicación manual de glifosato y fertilizante, las simulaciones de lluvia a campo se realizaron utilizando un pequeño simulador portátil. El microsimulador consiste en un prisma cuadrado metálico de hierro ángulo. Tiene 1,5 m de altura y 0,25 m por lado, y paredes de acrílico transparentes que actúan como cortavientos (Figura 21). En la parte superior hay un soporte de caja con 49 tubos de plástico que producen gotas. Esta caja tiene una alimentación de agua desde un depósito colocado en uno de los bordes de la estructura. El depósito se gradúa en milímetros de agua aplicada a las microparcels. A su vez, la base del yacimiento se puede variar en altura, proporcionando diferentes presiones para formar las gotas. Las gotas formadas tienen diámetros promedio de aproximadamente 4,7 mm. La escorrentía se recibe a través de un embudo en un contenedor graduado (mm) en un lado del marco inferior. Con este dispositivo, se aplica una intensidad de lluvia constante entre 10 y 130 mm/h para cada sitio de prueba.

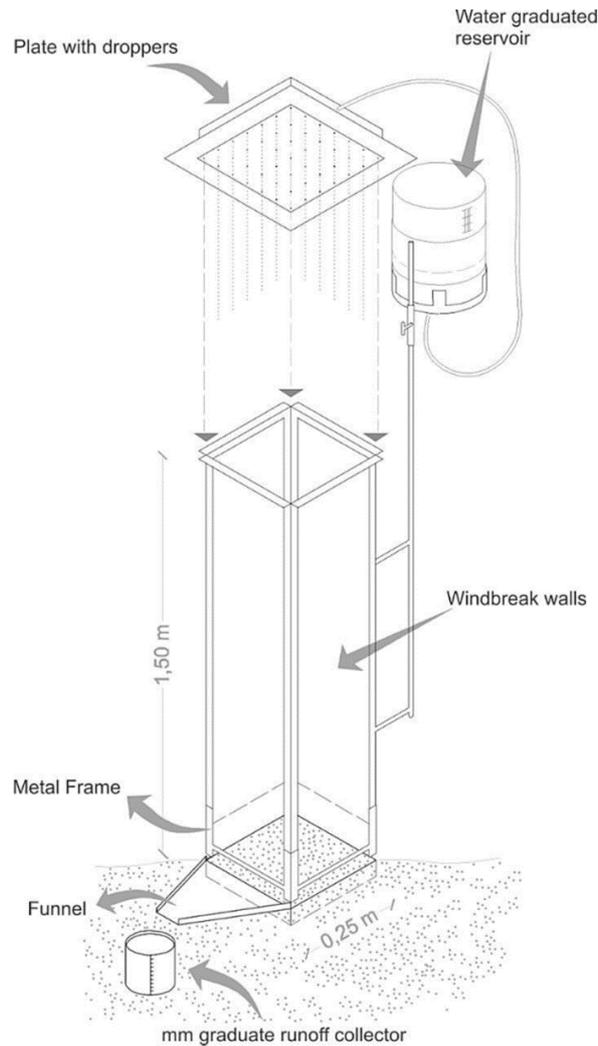


Figura 21. Esquema del simulador de lluvia portátil.

Una vez iniciado el proceso de simulación, el muestreo se realizó cuando comenzó la escorrentía. Para lo cual, se recolectó agua de escorrentía a intervalos de 5 min, en el reservorio graduado, hasta verificar que la escorrentía era constante. Luego de obtener tres mediciones constantes consecutivas, durante aproximadamente 1 h significó que la tasa de infiltración básica había sido lograda.

Los volúmenes de agua totales recolectados a través de la experiencia oscilaron entre 1,5-2,5 L y se usaron para calcular las tasas de infiltración y escorrentía. Las muestras se filtraron y almacenaron a -18°C , posteriormente se analizaron químicamente para detectar fósforo soluble, glifosato y AMPA.

Resultados y discusión

En cuanto a glifosato y AMPA en el agua de escorrentía se encontró que la concentración de glifosato osciló entre 18,6 y 1552,9 $\mu\text{g/L}$. Este hallazgo resalta la presencia de glifosato en todos

los tratamientos, incluido el control, probablemente porque dos meses antes del ensayo, en la parcela se aplicó, para el control de malezas, una dosis de 3 L/ha del mismo producto comercial utilizado en esta investigación.

Se observó una interacción significativa entre las fechas de simulación y los diferentes tratamientos (Tabla 8). El tratamiento con P+GL en la primera fecha de simulación presentó una mayor concentración de glifosato en agua (19 veces la del control). En la misma fecha, el tratamiento con la misma dosis de herbicida sin P mostró aproximadamente la mitad de la concentración de glifosato en el agua de escorrentía. La concentración disminuyó durante los días posteriores a la aplicación, y los tratamientos sin glifosato no fueron diferentes en ninguna de las fechas.

Tabla 8. Análisis de varianza de la concentración de glifosato.

Fecha de simulación	Tratamientos ^a (µg/L)			
	P+GL	GL	P	C
1	1417,6 a	767,2 b	40,1 d	74,1 d
2	277,9 c	168,8 cd	26,9 d	39,4 d
3	133, 1 cd	65,5 d	29,8 d	32, 6 d

^aDiferentes letras indican diferencias significativas (Tukey $\alpha=0,05$).

La concentración de AMPA también presentó una interacción significativa entre el tratamiento y la fecha de simulación (Tabla 9). Con el tratamiento con P+GL, no se observaron diferencias significativas entre las fechas, lo que implica que la degradación de la molécula de glifosato fue inmediata en la aplicación, sin presentar diferencias entre el primer y el octavo día después de la aplicación.

Tabla 9. Análisis de varianza de la concentración de AMPA

Fecha de simulación	Tratamientos ^a (µg/L)			
	P+GL	GL	P	C
1	453,7 a	561,5 a	144,6 b	199,6 b
2	478,4 a	127,7 b	184,6 b	160,4 b
3	543,3 a	262,2 b	175,1 b	171,8 b

^aDiferentes letras indican diferencias significativas (Tukey $\alpha=0,05$).

La determinación de la concentración de glifosato + AMPA presentó una interacción significativa entre el tratamiento y la fecha de simulación. En la Figura 22, se observa que P+GL fue significativamente diferente del tratamiento con GL en la misma fecha. Para las otras fechas de simulación, el tratamiento con P+GL fue diferente de los otros tratamientos.

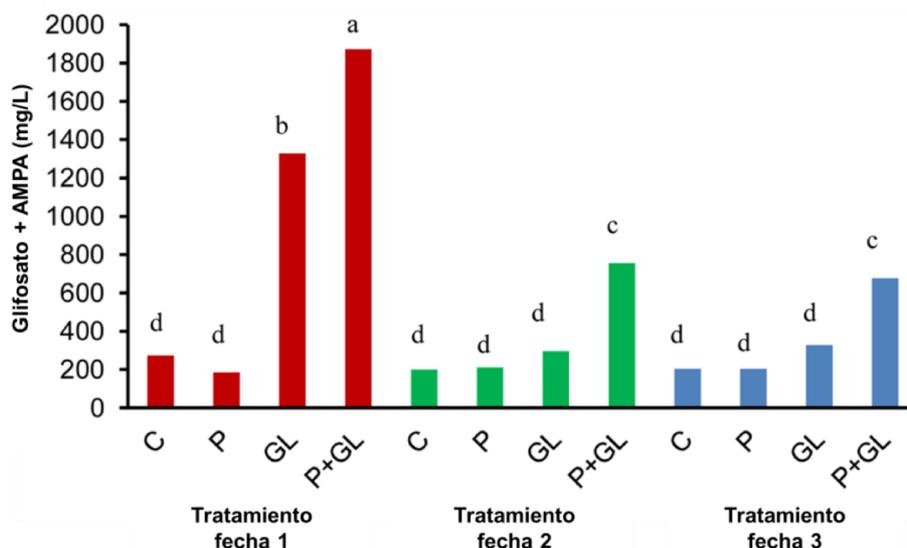


Figura 22. Análisis de varianza para la concentración de glifosato + AMPA ($\mu\text{g/L}$). Letras diferentes indican diferencias significativas (Tukey $\alpha=0,05$).

Las diferencias en la concentración de glifosato en suelo fueron evidentes (Figura 23). No se observó diferencia entre los tratamientos que no se pulverizaron con glifosato, y el tratamiento con GL tuvo la concentración más alta, lo que confirma que 24 h después de la pulverización, el P ocupó los sitios de intercambio en P+GL.

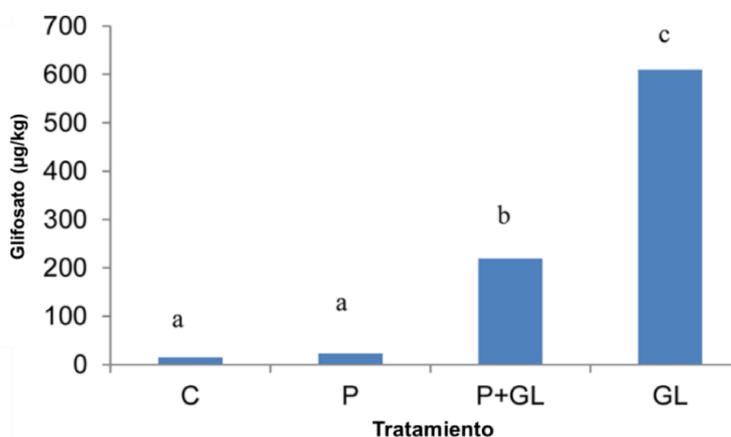


Figura 23. Análisis de varianza para la concentración de glifosato ($\mu\text{g/kg}$) en los primeros 5 cm del suelo antes de cada simulación de lluvia. Letras diferentes indican diferencias significativas (Tukey $\alpha=0,05$).

Después del tratamiento con P+GL, el 28% del glifosato aplicado se perdió en el agua de escorrentía. En el caso del tratamiento con GL a la misma dosis, las pérdidas fueron 2,5 veces menores que las del tratamiento con P+GL, lo que indica que la práctica de la fertilización con fosfato y la aplicación de glifosato aumentan significativamente la pérdida de glifosato por escurrimiento.

Morillo y col. (1997) informaron que el glifosato puede actuar en el suelo de manera similar al fosfato, posiblemente a través de su grupo fosfato. Según los resultados obtenidos por Zhao y col. (2009) el efecto de la aplicación de fosfato sobre la movilidad del glifosato en diferentes suelos se debe a la combinación del pH reducido que produce la adición de una solución de fosfato ácido y la repulsión entre el glifosato y el fosfato pre-absorbido.

En conclusión, con el estudio de condiciones a campo se pudo verificar interacción significativa entre fósforo y glifosato en los sitios de sorción del suelo estudiado sin labranza, permitiendo conocer que la aplicación de fertilizantes fosforados aumenta la pérdida de glifosato por escorrentía causada por la lluvia luego de la aplicación (Sasal y col., 2015).

3.4.3. Determinación de glifosato, AMPA y glufosinato en aguas superficiales provenientes de servicios analíticos brindados a la comunidad

Descripción del experimento

El método analítico desarrollado y optimizado durante este trabajo pudo aplicarse en el PRINARC como un servicio más aplicado a la comunidad para la determinación de glifosato, AMPA y glufosinato en muestras ambientales, permitiendo que el laboratorio pueda expandir el horizonte de análisis realizados.

Las muestras de aguas superficiales (arroyos, ríos, lagunas) fueron suministradas por diferentes organismos estatales de la provincia de Santa Fe y Entre Ríos y corresponden a sitios de monitoreo; al ingresar al laboratorio fueron refrigeradas hasta el día del análisis.

Resultados y discusión

Se analizaron muestras provenientes de dos provincias del litoral argentino, en un período de 5 años. Todas las muestras corresponden a aguas superficiales.

Las muestras de Santa Fe fueron un total de 62. En este caso, las muestras positivas se correspondieron a 34% para glifosato, 42% para AMPA y 3% para glufosinato. Evidenciándose valores cuantificados (por encima del LC establecido) en 23%, 31% y 2% para glifosato, AMPA y glufosinato, respectivamente. Las concentraciones de glifosato oscilaron entre 0,7 y 93 µg/L, de AMPA entre 0,6 y 4 µg/L y de glufosinato sólo una muestra fue cuantificada en 1 µg/L.

En cuanto a las muestras de Entre Ríos resultaron ser 84 en total. Los resultados mostraron mayor presencia de los herbicidas estudiados comparados con las muestras provenientes de Santa Fe. Se encontró un 70% de muestras positivas para glifosato, 69% para AMPA y no hubo muestras positivas de glufosinato. Con un total de 58% de muestras cuantificadas para glifosato

y 56% para AMPA. Las concentraciones de glifosato variaron entre 0,6 y 28 µg/L y de AMPA entre 0,6 y 5 µg/L (Tabla 10 y Figura 24).

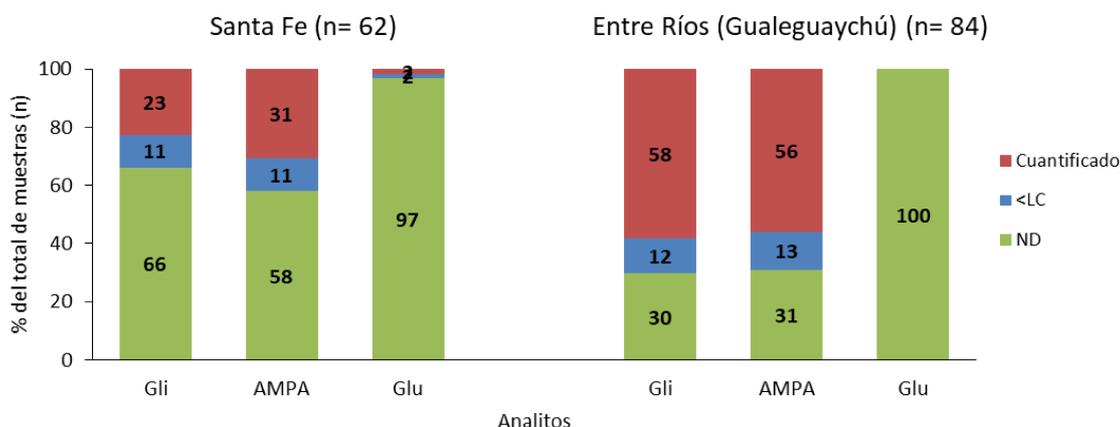


Figura 24. Resultados correspondientes a la determinación de glifosato, AMPA y glufosinato en muestras de agua superficial de las provincias de Santa Fe y Entre Ríos, expresadas como porcentaje del total de muestras. Los resultados se agruparon en: no detectado (ND=menor al LD) en verde, menor que el límite de cuantificación (<LC) en azul y valores cuantificados en rojo. Para el cálculo de la media, sólo se consideraron los valores cuantificados (ver Tabla 10).

Tabla 10. Valores medios cuantificados y el rango de concentración (LC a valores cuantificados máximos) de glifosato, AMPA y glufosinato encontrados en muestras de agua superficial de las provincias de Santa Fe y Entre Ríos (Ver Figura 24).

	Muestras de Santa Fe			Muestras de Entre Ríos		
	Glifosato	AMPA	Glufosinato	Glifosato	AMPA	Glufosinato
n (total)	62	62	62	84	84	84
n (cuantificado)	14	19	1	49	47	-
Media [µg/L]	10,2	1,3	1	2,2	5,1	-
Rango [µg/L]	0,7-93	0,6-4	1-1	0,6-28	0,6-5,1	-

Estos estudios muestran que los valores de concentración obtenidos durante el análisis de las muestras de origen superficial (ríos, arroyos) provenientes de distintos cursos de agua evidencian una considerable frecuencia de aparición de glifosato y AMPA reflejando el uso intensivo de este herbicida en las dos provincias localizadas en la región central de Argentina, donde se destaca una alta producción agrícola.

3.5. CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO 3

Después de evaluar diferentes estrategias preliminares, se desarrolló un método que involucra una derivatización con FMOC-Cl mediante análisis por UHPLC-MS/MS para la determinación de glifosato, AMPA y glufosinato en muestras de agua. El enfoque propuesto muestra varias diferencias y ventajas con respecto a otros métodos disponibles, centrándose principalmente en su mayor simplicidad y utilidad para el análisis de rutina e investigación con niveles de

concentración menores al $\mu\text{g/L}$ (glifosato: 0,6; AMPA: 0,2 y glufosinato: 0,1 $\mu\text{g/L}$) compatibles con la normativa argentina y otras normas de calidad de agua extranjeras. El método presenta un paso de limpieza rápida offline que consiste en una agitación de 10 segundos con 4,5 mL de diclorometano después de la reacción de derivatización (evitando el paso de SPE) e inyección en el sistema UHPLC-MS/MS.

El método validado se aplicó a un estudio donde se analizaron 158 muestras de agua provenientes de 40 tambos que contribuyeron a obtener información sobre las concentraciones de los herbicidas en estudio presentes en el agua de una importante región agrícola de nuestro país. Los resultados mostraron una alta frecuencia de aparición de glifosato y, en mayor grado, su metabolito AMPA en niveles traza en aguas subterráneas, hallando valores de concentración entre 0,6-11,3 $\mu\text{g/L}$ y 0,2-6,5 $\mu\text{g/L}$, respectivamente. Con un aumento en la ocurrencia y niveles encontrados en aguas de tanques abiertos (0,6-21,2 $\mu\text{g/L}$ y 0,2-4,2 $\mu\text{g/L}$). El glufosinato es un herbicida de uso menos frecuente y sólo se encontró en muestras de tanques a cielo abierto a un nivel por debajo del LC (52% de las muestras) y se cuantificó sólo en una de ellas (0,1 $\mu\text{g/L}$). Este es el primer estudio que informa niveles de estos herbicidas en el agua de las zonas rurales de Argentina, representando una información útil para la evaluación de riesgos ambientales y para fines de gestión.

En las condiciones a campo se pudo verificar una interacción significativa entre fósforo y glifosato. La relación entre la aplicación de fertilizantes a base de fósforo y glifosato, y su contribución a la contaminación por escorrentía no se había identificado en las condiciones a campo, por lo que se desconocía el impacto ambiental de la interacción de estas dos prácticas, siendo las más utilizadas en condiciones de labranza cero. Como tal, los resultados obtenidos refuerzan la necesidad de realizar estudios adicionales para comprender las interacciones fósforo-glifosato en suelos en condiciones reales para establecer tiempo y condiciones optimizadas en la práctica actual para reducir los riesgos de contaminación por escorrentía. Estos resultados son de gran importancia para minimizar el impacto ambiental en el entorno argentino, donde las prácticas de siembra directa se extienden a >20 Mha.

Respecto a las muestras analizadas como parte de los servicios brindados por el PRINARC a la comunidad, dejan en evidencia la presencia de glifosato, AMPA y en menor proporción, glufosinato en el medio ambiente. Estos resultados pueden servir como punto de partida para tomar medidas de control y así mitigar la contaminación de los cursos de agua.

CAPÍTULO 4

DETERMINACIÓN DE GLIFOSATO, AMPA Y GLUFOSINATO EN SUERO SANGUÍNEO

CAPÍTULO 4. DETERMINACIÓN DE GLIFOSATO, AMPA Y GLUFOSINATO EN SUERO SANGUÍNEO

Durante este trabajo se realizaron ensayos experimentales de laboratorio para desarrollar y optimizar una metodología analítica con el objetivo de determinar, de manera simultánea, glifosato, AMPA y glufosinato en muestras de suero sanguíneo utilizando un procedimiento analítico simple con suficiente selectividad y exactitud.

Los ensayos realizados consistieron en la derivatización de la muestra con FMOC-Cl y posterior análisis mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa.

El método analítico optimizado y validado fue aplicado para medir la concentración de glifosato y AMPA en muestras reales de suero, provenientes de estudios de investigación realizados con ratas y ovejas.

4.1. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo consistió en desarrollar y optimizar una metodología analítica para determinar glifosato, AMPA y glufosinato en suero sanguíneo mediante una etapa de derivatización con FMOC-Cl y posterior análisis utilizando cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa en tándem (UHPLC-MS/MS). Y como objetivo específico se planteó aplicar dicho método al análisis de muestras reales.

4.2. RESUMEN

En este capítulo se describen los ensayos realizados para determinar glifosato, su metabolito, AMPA y glufosinato en suero sanguíneo. El método analítico propuesto consiste en una primera etapa de precipitación de las proteínas que contiene la muestra con acetonitrilo, seguida de la etapa de derivatización con FMOC-Cl y, finalmente, análisis por UHPLC-MS/MS.

Los resultados de la validación fueron satisfactorios en términos de linealidad, selectividad, precisión y precisión intermedia. Las recuperaciones para los tres analitos fueron superiores al 100%, 109 para glifosato y 105 para AMPA y glufosinato con desviaciones estándares relativas menores al 15%; 12, 8 y 11 para glifosato, AMPA y glufosinato, respectivamente. El límite de cuantificación obtenido fue de 1 µg/L para los tres analitos.

La metodología validada permitió el análisis de muestras reales de suero de animales (ratas y ovejas).

4.3. DESARROLLO DEL MÉTODO

4.3.1. Sistema instrumental

Las concentraciones de glifosato, AMPA y glufosinato en suero se midieron mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa en tándem, utilizando el equipo UHPLC-MS/MS Waters descrito anteriormente en el Capítulo 2. Los valores de los parámetros instrumentales empleados fueron obtenidos mediante la optimización del sistema cromatográfico y espectrométrico que se detalla en el Capítulo 3, Secciones 3.3.1. y 3.3.2.

El análisis cromatográfico se realizó con la columna de fase reversa ACQUITY UPLC™ HSS C18 (100 x 2,1 mm, 1,8 µm de tamaño de partícula), con una temperatura de 40°C y la fase móvil consistió en H₂O:ACN 98:2 + 0,1% AF (componente A) y ACN + 0,1% AF (componente B) con un flujo de 0,35 mL/min. El programa de gradiente de fase móvil fue de 0 a 0,25 min isocrático (95% A: 5% B); de 0,25 a 7 min aumento lineal de B de 5 a 100%; de 7 a 8 min disminución lineal de B de 100 a 75%; de 8 a 8,5 min disminución lineal de B de 75 a 40%; de 8,5 a 9 min disminución lineal de B de 40 a 5% y las condiciones iniciales se volvieron a equilibrar en 1 min, resultando un tiempo total de corrida cromatográfica de 10 min. El volumen de inyección fue de 10 µL.

Para la determinación espectrométrica los parámetros operativos del sistema fueron: fuente de ionización por electrospray modo positivo, voltaje de capilar 1 kV, voltaje de extractor 1 V, temperatura de fuente 140°C, temperatura de desolvatación 500°C, flujo de gas de desolvatación 600 L/h y flujo de gas de cono 20 L/h. La información de los iones m/z utilizados en el análisis se resumen en la Tabla 3 (Sección 3.3.2.), utilizando un valor de 0,1 s de dwell time para todos los compuestos.

4.3.2. Optimización de la etapa de preparación de la muestra

Descripción del experimento

Las muestras de suero se sometieron a derivatización utilizando FMOC-Cl como agente derivatizante previo precipitado de las proteínas según el método propuesto por Bernal y col. (2010).

El procedimiento analítico comienza transfiriendo 500 µL de suero sanguíneo (blanco, blanco enriquecido con estándares o muestras de suero experimentales) a un tubo Eppendorf de 2 mL, luego se añade el estándar interno marcado isotópicamente (50 µL de una solución de 100 µg/L que contiene la mezcla de glifosato y AMPA marcados) y se agregan 250 µL de acetonitrilo. La mezcla se agita en vórtex durante 1 min, se coloca en ultrasonido durante 10 min y se centrifuga a 15000 rpm durante 15 min a temperatura ambiente para precipitar las proteínas.

Posteriormente, se recogen 500 μL del sobrenadante y se transfieren a un tubo Eppendorf nuevo para repetir una vez más la etapa de precipitación de las proteínas. El sobrenadante (500 μL) se derivatiza con la adición de 84 μL de buffer borato (40 mM, pH 9) y 84 μL de FMOC-Cl (6 g/L) permitiendo que la reacción tenga lugar durante 2 horas a temperatura ambiente y al resguardo de la luz.

Después del tiempo de reacción, se realiza la etapa de limpieza de los extractos mediante partición L-L con diclorometano (500 μL de extracto/ 500 μL de DCM). Finalmente, 10 μL de la fase acuosa se inyectan en el sistema UHPLC-MS/MS (Figura 25).

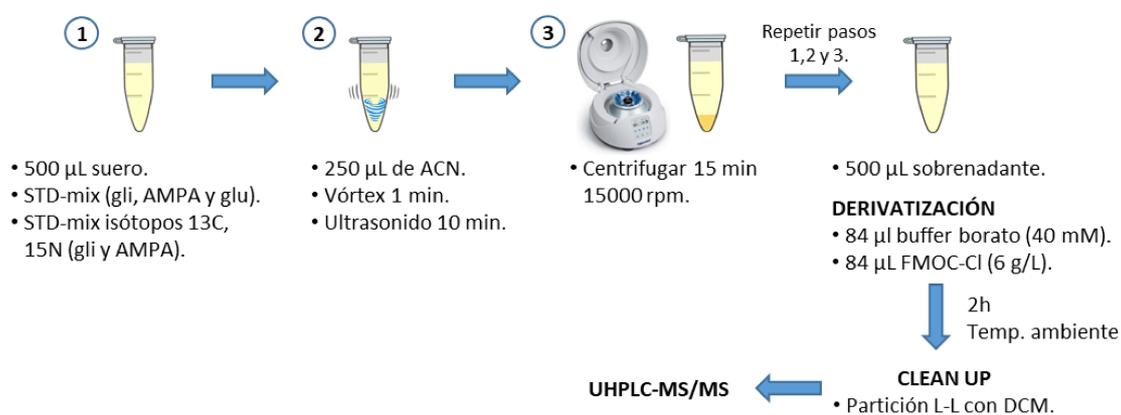


Figura 25. Resumen esquemático de la metodología analítica para la determinación de glifosato, AMPA y glufosinato en suero sanguíneo.

Resultados y discusión

-Pre-acondicionamiento de la muestra: el acondicionamiento de la muestra es un paso sumamente importante ya que las características de los analitos estudiados son similares a las de los aminoácidos, componentes principales de las proteínas, que se encuentran en gran proporción en la matriz analizada. Debido a esta similitud aumentan las complicaciones al medir estos residuos en los productos de origen animal.

Por lo expresado, se requiere un paso previo donde se puedan eliminar completamente las proteínas presentes en la muestra. En la literatura se enumeran distintos procedimientos para tal fin: agregado de acetonitrilo (Motojyuku y col., 2008; Bernal y col., 2010; Zouaoui y col., 2013); calentamiento (100°C), congelamiento (-80°C), descongelamiento, centrifugación y filtrado (Krüger y col., 2014); membrana de ultrafiltración (Yoshioka y col., 2011), entre otros.

Debido a la facilidad y bajo costo, en nuestro estudio se procedió a la precipitación de las proteínas mediante el agregado de acetonitrilo. En un principio, el laboratorio no contaba con la micro centrífuga de ultra velocidad por lo que la precipitación no logró ser completa utilizando

una centrifuga de 5000 rpm, causando problemas cromatográficos y obteniendo valores de recuperación menores al 40%.

Puesto que no se lograban resultados apropiados para la etapa de precipitación de las proteínas se probaron técnicas alternativas como membranas de ultrafiltración, con las que tampoco se obtuvieron resultados satisfactorios y el costo del análisis era considerablemente mayor.

Finalmente, optimizando los volúmenes y utilizando la micro centrifuga, adquirida por el laboratorio, pudo lograrse la precipitación exitosa de las proteínas, obteniendo resultados satisfactorios: extractos limpios y porcentajes de recuperación cercanos al 100% (Figura 26).

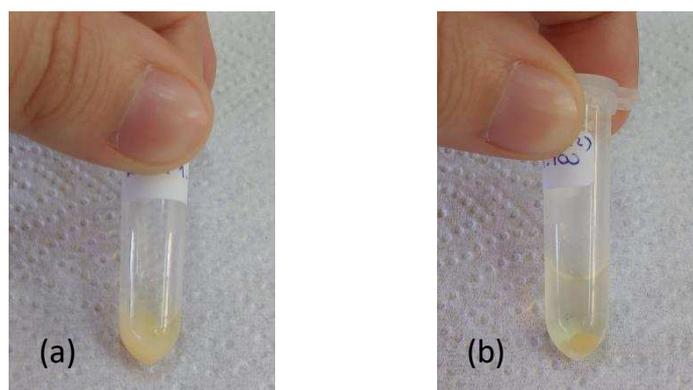


Figura 26. Fotografías tomadas durante la precipitación a las proteínas. a) Agregado de los primeros 250 μ L de ACN. b) Agregado de los segundos 250 μ L de ACN.

-Derivatización y limpieza: las etapas de derivatización y limpieza de los extractos de este método analítico están inspiradas en las respectivas etapas optimizadas para la determinación de los mismos analitos en muestras de agua (Capítulo 3, Sección 3.3.3.). Se utilizaron los mismos reactivos y concentraciones para el buffer borato y para el reactivo derivatizante, 40 mM y 6 g/L, respectivamente. Para la limpieza de los extractos se practicó la misma partición L-L con diclorometano optimizada oportunamente. Los volúmenes de adición fueron relativos al volumen inicial de muestra.

Como conclusión, a partir de los ensayos experimentales realizados, y evaluando los resultados obtenidos de cada una de las pruebas propuestas, el método logrado pudo ser validado, ya que permitió resolver uno de los puntos críticos del procesamiento, como es la eliminación de las proteínas de la muestra antes de la reacción de derivatización, además de lograr porcentajes de recuperación óptimos.

4.3.3. Validación del método optimizado

Para controlar la calidad del análisis de los residuos de glifosato, AMPA y glufosinato se realizaron ensayos y estudios de laboratorio siguiendo las directivas del documento de validación SANTE/11813/2017 (EC, 2017), mediante la determinación del límite de cuantificación, linealidad, selectividad, efecto matriz, precisión y exactitud.

Estudio de recuperación

Las recuperaciones se determinaron tanto intra-día como inter-día mediante el análisis de muestras blanco fortificadas a tres niveles de concentración (1, 2 y 10 µg/L) por quintuplicado, con resultados que oscilaron entre 81-120% y DER <16% en todos los casos (Tabla 11).

Tabla 11. Cifras de mérito del método analítico (n=5)^a.

Compuesto	Recuperados %		Repetibilidad %DER		Precisión intermedia %DER		LC µg/L
	1 µg/L	10 µg/L	1 µg/L	10 µg/L	1 µg/L	10 µg/L	
Glifosato	91-120	97-112	12	6	12	7	1
AMPA	93-112	81-110	8	16	11	13	1
Glufosinato	83-114	92-103	11	5	14	7	1

^aCinco muestras de suero blanco enriquecidas a 1 y 10 µg/L cada una.

Límite de cuantificación

El LC para los tres analitos se estableció mediante fortificaciones con estándares de glifosato, AMPA y glufosinato sobre muestras blanco de suero sanguíneo humano. Se fijó como la concentración de fortificación más baja probada en la que las recuperaciones estaban entre 70-120% con desviaciones estándares relativas por debajo del 20% realizando cinco repeticiones, siendo 1 µg/L para los tres analitos. Las recuperaciones promedio obtenidas fueron 109% para glifosato, 105% para AMPA y 105% para glufosinato con DER de 12, 8 y 11%, respectivamente.

Linealidad

La linealidad del método se evaluó analizando ocho soluciones estándares de los tres analitos por triplicado en el rango de 1 a 500 µg/L (1, 5, 10, 25, 50, 100, 250 y 500 µg/L). La linealidad a partir del análisis de regresión se consideró satisfactoria, logrando un coeficiente de correlación superior a 0,99 y residuos inferiores a ± 20% en todos los casos (Figuras 27, 28 y 29).

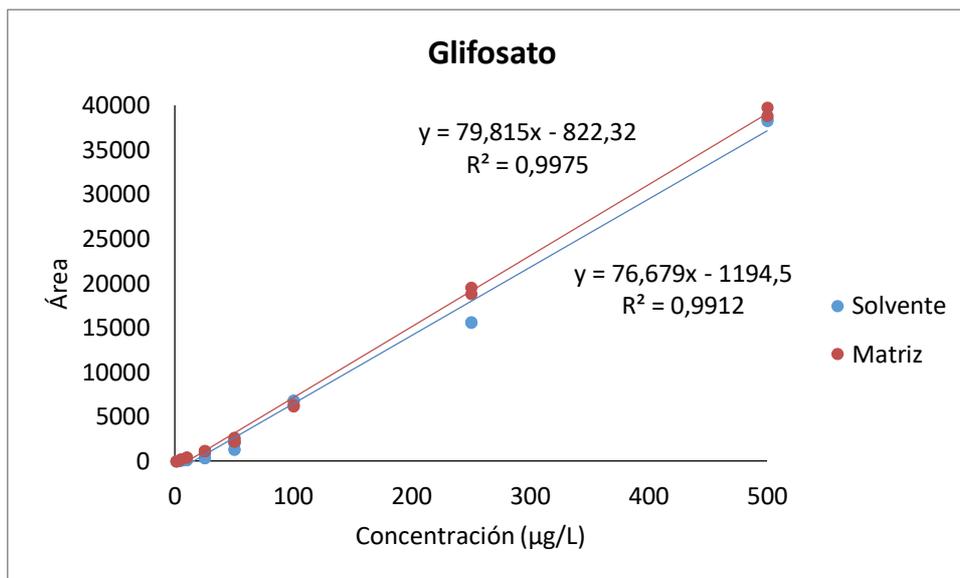


Figura 27. Calibraciones de glifosato en matriz (suero sanguíneo) y solvente.

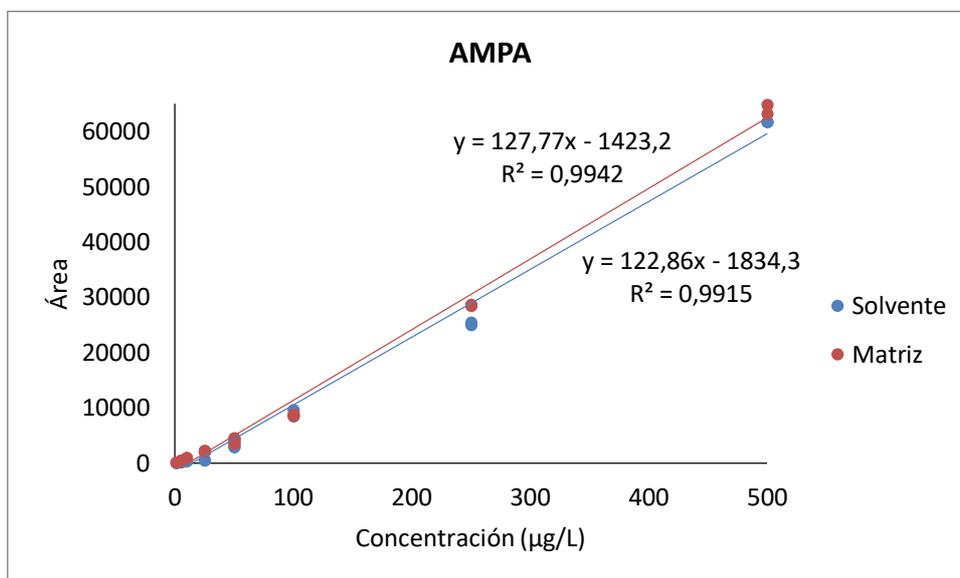


Figura 28. Calibraciones de AMPA en matriz (suero sanguíneo) y solvente.

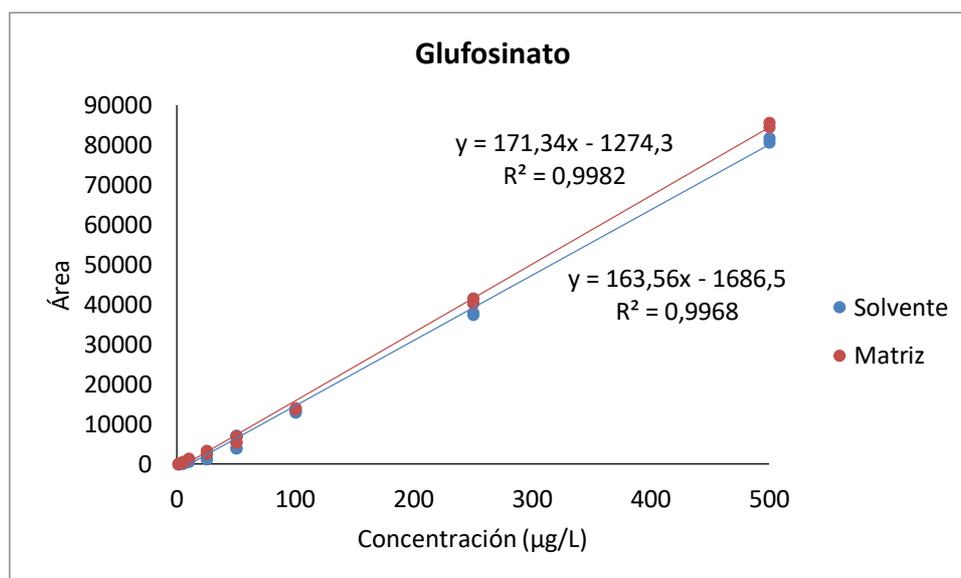


Figura 29. Calibraciones de glufosinato en matriz (suero sanguíneo) y solvente.

Efecto matriz

Los efectos de la matriz (EM) se evaluaron mediante la comparación de las pendientes de las curvas de calibración en solvente y matriz siguiendo la fórmula:

$$\%EM = \frac{\text{pendiente matriz}}{\text{pendiente solvente}} \cdot 100$$

Los valores de %EM encontrados fueron 104 para glifosato y AMPA y 105 para glufosinato. Se observó que para los tres analitos el efecto matriz estaba dentro del 5% de diferencia y se consideró un efecto leve, menor al 20% que establece el documento SANTE (Figuras 27, 28 y 29). Como no se observaron efectos significativos de ionización o interferencias en esta matriz, es posible utilizar estándares en solventes para la cuantificación precisa de los analitos. A pesar de esto, los cálculos de cuantificación se realizaron utilizando curvas de calibración en matriz.

Selectividad

La selectividad del método se demostró mediante el análisis en una matriz independiente, la cual estaba libre de los analitos estudiados. Ambas transiciones de iones de cuantificación y confirmación se utilizaron para determinar la selectividad de cada uno de los analitos.

Precisión y exactitud

La evaluación de la precisión y exactitud del método se realizó mediante estudios de recuperación adicionando muestras de suero sanguíneo humano blanco en dos niveles de

concentración diferentes. La guía SANTE establece evaluar un mínimo de 5 réplicas en el límite de cuantificación objetivo del método y, al menos otro nivel superior, en el rango de 2-10xLC. Las muestras se fortificaron a 1 y 10 µg/L por quintuplicado. Los porcentajes de recuperación promedio de cada nivel de fortificación estuvieron dentro del rango de 81-120% con una DER ≤16%. El resumen de los resultados se puede observar en la Tabla 11.

Con los resultados obtenidos de la validación del procedimiento analítico se puede demostrar que es apto para el propósito deseado y es un método confiable y reproducible.

En la Tabla 11 se resumen las principales cifras de mérito obtenidas en el proceso de validación.

4.4. APLICACIÓN A MUESTRAS REALES

El método analítico desarrollado se aplicó al análisis de muestras reales provenientes de dos estudios de investigación llevados a cabo por el Instituto de Salud y Ambiente del Litoral (ISAL), Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral (UNL)-Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Santa Fe, Argentina.

Los estudios de investigación tuvieron como objetivo principal evaluar en animales el efecto de la exposición al herbicida glifosato, suministrado por distintas vías. En esta oportunidad se trabajó con ratas y ovejas.

4.4.1. Determinación de glifosato y AMPA en suero sanguíneo de rata

Descripción del experimento

El presente estudio se llevó a cabo para investigar si la exposición perinatal (gestación más lactancia) a dosis de glifosato altera el rendimiento reproductivo femenino y/o induce efectos de segunda generación relacionados con anomalías congénitas o alteraciones en el crecimiento. Para llevar a cabo la investigación se utilizaron ratas de raza derivada de Wistar, criadas y alojadas en un ambiente controlado ($22 \pm 2^\circ\text{C}$; luces encendidas de 6 a 20 h) en jaulas de acero inoxidable con camas de madera, y se utilizó una formulación de glifosato comercializada en Argentina (Magnum super II) que contiene 66,2% de sal de glifosato potásica (equivalente a 54% p/v de ácido de glifosato) como ingrediente activo, coadyuvantes e ingredientes inertes.

Los animales recibieron el herbicida a través del alimento en dos dosis: baja y alta, de 2 y 200 mg de glifosato por kg de peso corporal por día de gestación (DG), respectivamente.

Las hembras preñadas (F0) se alojaron individualmente y se asignaron al azar a uno de los siguientes grupos de tratamiento oral: grupo control (n=7) provisto de alimento a base de pienso de laboratorio, grupo de dosis baja de glifosato (G-DB; n=7) provisto de alimento suplementado con herbicida en una dosis de 2 mg de glifosato/kg de peso corporal/día, y grupo de dosis alta

de glifosato (G-DA; n=7) provisto de alimento suplementado con herbicida en una dosis de 200 mg de glifosato/kg de peso corporal/día.

La pasta a base de alimento para laboratorio se preparó mezclando cantidades optimizadas de pellets y agua, para los grupos de tratamiento con el herbicida se añadió la formulación comercial de glifosato al agua de acuerdo con las dosis estudiadas. La integridad del glifosato en el alimento se verificó mediante la medición de su concentración durante tres días consecutivos. El procedimiento analítico utilizado cuenta con tres etapas: extracción del analito, similar a la descrita por Oulkar y col. (2017), derivatización y análisis mediante UHPLC-MS/MS del extracto acuoso según el método optimizado para el análisis de aguas, detallado en el Capítulo 3, Sección 3.3.3. (Figura 30).

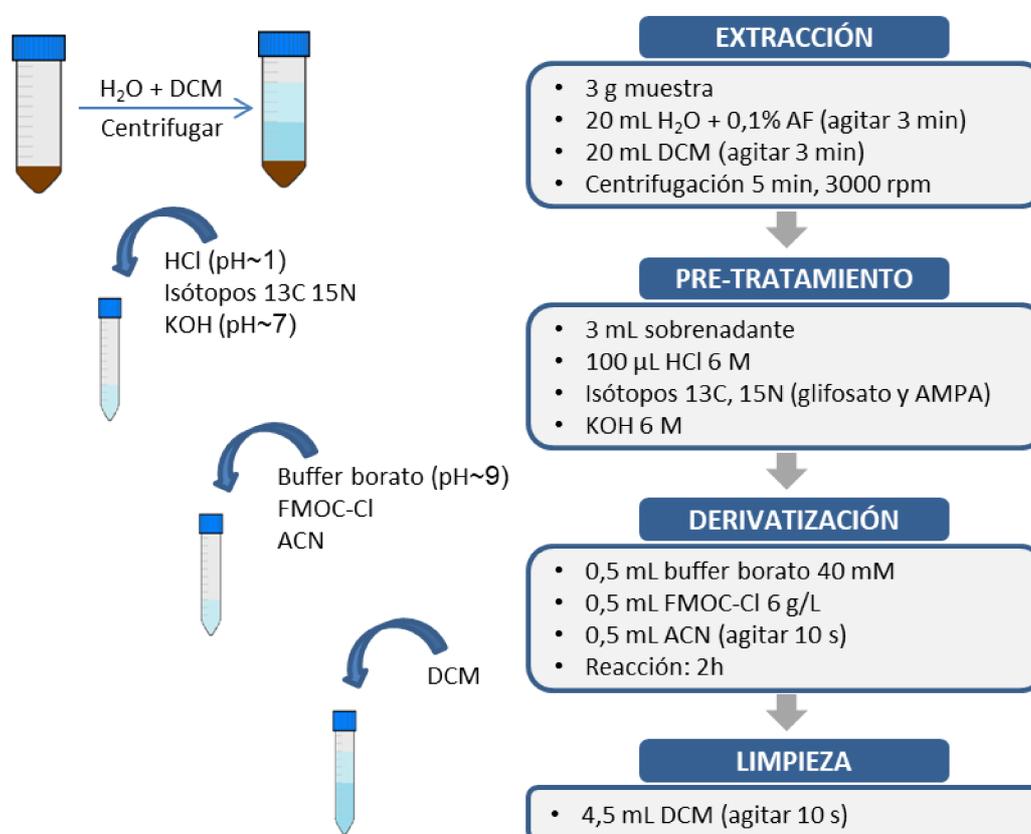


Figura 30. Resumen esquemático del procedimiento para determinar glifosato y AMPA en el alimento suministrado a las ratas durante el diseño experimental.

El tratamiento oral duró desde el DG 9 hasta el final del destete, día de lactancia (DL) 21. Luego de este período, se recolectó sangre de las madres (F0) en dos momentos diferentes: (1) al final de la gestación, DG 22, y (2) al destete, DL 21, y se determinaron los niveles séricos de glifosato y AMPA alcanzados en los animales siguiendo el procedimiento analítico descrito en la Sección 4.3.2., para evaluar la investigación.

Las crías hembras F1, al destete, en el día postnatal (DPN) 21 se alojaron en grupos de acuerdo con los tratamientos (control o expuesto a glifosato).

Las hembras F1 se aparearon para evaluar su desempeño reproductivo y lograr identificar efectos de segunda generación en la descendencia F2.

En la Figura 31 se muestra una representación esquemática del diseño experimental llevado a cabo durante este estudio.

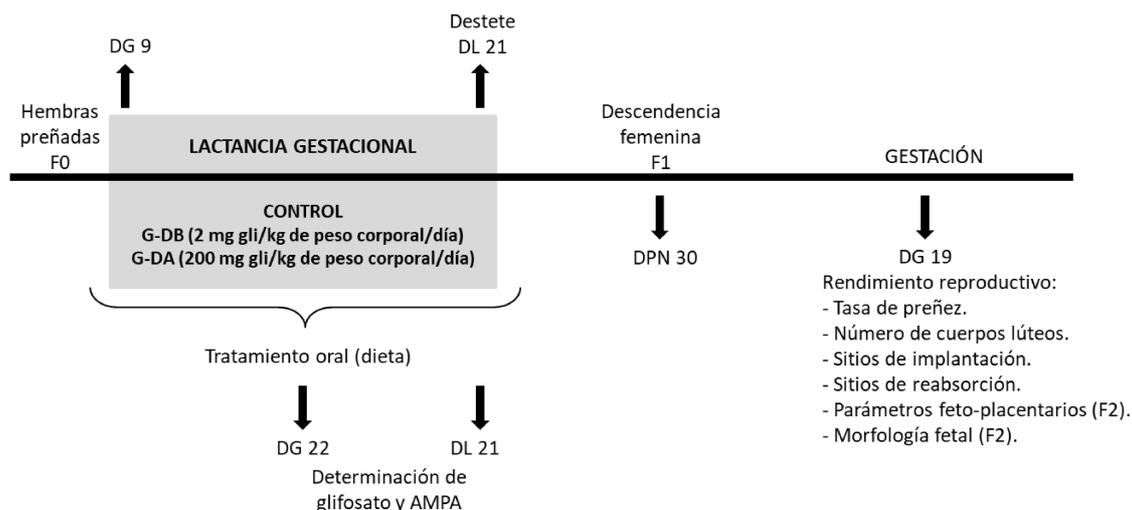


Figura 31. Representación esquemática del protocolo experimental utilizado para estudiar los efectos de la exposición perinatal (gestación más lactancia) de glifosato en dosis baja (G-DB) y alta (G-DA) en el rendimiento reproductivo de ratas F1 y en su descendencia F2.

DG: día de gestación. DL: día de lactancia. DPN: día postnatal.

Resultados y discusión

Para ambas dietas (dosis baja y alta del herbicida) las concentraciones de glifosato en el alimento a base de pellets no cambiaron con el tiempo, lo que sugiere que se preservó la integridad del herbicida. Como se esperaba, no se encontraron niveles detectables de glifosato ni AMPA en el alimento destinado a los animales pertenecientes al grupo control.

La ingesta de alimentos durante el embarazo y la lactancia no se vio afectada en las hembras F0 expuestas al herbicida, y tampoco se detectaron cambios en el peso corporal promedio. En la Tabla 12 se muestran las dosis promedio reales de glifosato, calculadas en función del peso corporal promedio de las madres y el consumo de alimento durante el embarazo y la lactancia.

Tabla 12. Dosis diarias del herbicida suministradas a las hembras F0 y niveles séricos de glifosato y AMPA.

	Control	G-DB	G-DA
Dosis teórica (mg/kg de peso corporal/día)	0	2	200
Ingesta de alimento (g/día)	29,14±0,61	29,39±0,69	29,65±0,42
Peso corporal promedio (g)	259,00±3,48	257,90±3,10	252,70±4,60
Dosis real promedio (mg/kg peso corporal/día)	0	3,69±0,07	352,20±4,78
Nivel de glifosato en suero (mg/L)	ND	0,039±0,006	3,8±1,2
Nivel de AMPA en suero (mg/L)	ND	ND	ND

Los datos se muestran como el promedio ± el error de la media de 7 presas F0 por grupo.
ND: no detectado.

Aunque las dosis reales de glifosato alcanzadas efectivamente en ambos grupos expuestos al herbicida resultaron más altas que las dosis teóricas ($3,69 \pm 0,07$ en lugar de 2 mg/kg de peso corporal/día en el grupo de G-DB, y $352,2 \pm 4,78$ en lugar de 200 mg/kg de peso corporal/día en el grupo de G-DA), las mismas se encuentran dentro del mismo orden de magnitud, manteniendo una diferencia de 100 veces entre las dos dosis reales de glifosato.

Las concentraciones séricas medias de glifosato en las madres F0 al final del período de lactancia fueron: $0,039 \pm 0,006$ mg/L para el grupo G-DB, y $3,8 \pm 1,2$ mg/L para el grupo G-DA. Nuevamente, vale la pena señalar que se observó una diferencia de 100 veces al comparar las concentraciones de glifosato de las hembras F0 de los dos grupos tratados. En cuanto a las concentraciones séricas de AMPA, no se encontraron niveles detectables en ninguno de los dos grupos expuestos al herbicida. Y, en los animales control, no se detectaron niveles de glifosato ni AMPA.

En cuanto a las concentraciones séricas de AMPA, no se encontraron niveles detectables en las hembras tratadas ni a dosis bajas ni altas del herbicida. Anadón y col. (2009) indica que el glifosato se metaboliza muy mal a AMPA después de la administración oral en ratas Wistar, y este metabolito podría ser el resultado de la acción microbiana intestinal. Este metabolito despierta gran preocupación por ser más persistente que el propio glifosato en el medio ambiente (Battaglin y col. 2005) y hay evidencia de efectos genotóxicos para AMPA en estudios in vitro e in vivo (Mañas y col., 2009; Roustan y col., 2014).

Los resultados que se han obtenido muestran que el glifosato administrado por vía oral durante el embarazo y la lactancia en una dosis de 2 o 200 mg de glifosato/kg de peso corporal/día no induce toxicidad materna, es decir, mortalidad o cambios en la ganancia y la longitud del peso corporal gestacional.

La exposición a glifosato no alteró el aumento de peso corporal de las crías hembras F1, pero, aunque todas las ratas F1 expuestas al herbicida quedaron preñadas, se detectó un número menor de sitios de implantación. La descendencia F2 de ambos grupos expuestos a glifosato

mostró retraso en el crecimiento, evidenciado por un menor peso y longitud fetal, asociado con una mayor incidencia de fetos pequeños para la edad gestacional. Un hallazgo sorprendente del presente trabajo de investigación fue la aparición de anomalías congénitas estructurales en la descendencia F2 cuyas madres F1 habían estado expuestas a la dosis alta de glifosato. Tales malformaciones fetales incluían fetos unidos y extremidades anormalmente desarrolladas. Aunque las anomalías fetales en F2 ocurrieron en un número relativamente pequeño de animales, se encontró una correlación estadísticamente significativa con la exposición al herbicida.

Concluyendo, los resultados obtenidos mostraron que la exposición perinatal (gestación más lactancia) a dosis de glifosato altera el resultado reproductivo femenino e induce efectos adversos de segunda generación en ratas. Los hallazgos actuales, en conjunto con los obtenidos previamente por el grupo de investigación del ISAL, sugieren que el glifosato podría actuar como perturbador endócrino, y resaltan la importancia de evaluar diferentes vías de administración, dosis y duración de la exposición a este herbicida, ya que los efectos sobre la fertilidad pueden ser diferentes (Milesi y col., 2018).

4.4.2. Determinación de glifosato y AMPA en suero sanguíneo de oveja

Descripción del experimento

El objetivo principal de este estudio fue comparar el efecto de la exposición, oral y subcutánea, al herbicida glifosato en el sistema reproductivo femenino (ovarios y útero) de ovejas frisonas. Para este fin, las ovejas fueron expuestas a una dosis de glifosato suministrada por dos vías. El ensayo se llevó a cabo utilizando una formulación comercial de glifosato, Roundup Full II®, líquido soluble en agua que contiene 54 % p/v de glifosato.

Durante la investigación, las ovejas frisonas (madres y descendencia) permanecieron en condiciones naturales, y después del nacimiento, se asignaron ovejas al azar a uno de los grupos experimentales:

Grupo 1: Solución salina administrada por inyecciones subcutáneas (scControl, n=6).

Grupo 2: Solución salina administrada por vía oral (oControl, n=6).

Grupo 3: Formulación comercial de glifosato disuelto en solución salina a 2 mg/kg de peso corporal administrado por inyecciones subcutáneas (scG, n=5).

Grupo 4: Formulación comercial de glifosato disuelto en solución salina a 2 mg/kg de peso corporal administrado por vía oral (oG, n=5).

La dosis de 2 mg/kg de peso corporal/día es del orden de magnitud de la dosis de referencia (DRf) de 1 mg/kg de peso corporal/día reasignada para glifosato por la Agencia de Protección Ambiental (EPA, 2017).

La solución salina o el glifosato se administraron diariamente desde el día postnatal (DPN) 1 al 14, ya sea por inyecciones subcutáneas o por administración oral.

El experimento tuvo una duración de 45 días. En el DPN 15 se extrajo sangre de los animales para analizar glifosato y AMPA en el suero sanguíneo. Luego, en el DPN 45 los animales fueron sacrificados y se procedió a la recolección de tejido (ovario y útero) y suero sanguíneo, para diferentes propósitos, y así lograr obtener información valiosa respecto al efecto que tiene el herbicida glifosato.

Resultados y discusión

Luego de la exposición al herbicida, los niveles medios de glifosato en suero al final del período de exposición (DPN 15) fueron: $123,9 \pm 101,1$ µg/L en animales expuestos a scG y $255,3 \pm 182,2$ µg/L en animales expuestos a oG. Aunque se observó una tendencia a niveles más bajos de glifosato en animales expuestos a scG, no se encontraron diferencias significativas con respecto a los expuestos a oG. Al finalizar el experimento, 30 días después de finalizada la exposición al herbicida, en el DPN 45, no se detectó glifosato ni AMPA en ninguno de los animales experimentales (scG y oG). Este resultado podría explicarse por el tiempo de vida media del glifosato y la baja tasa de bioacumulación debido a su naturaleza hidrofílica (Anadón y col., 2009; Bus, 2015).

Con respecto al suero de los animales del grupo control, no mostraron niveles detectables de glifosato tanto en el DPN 15 como en el 45, lo que demuestra que los animales experimentales no estaban contaminados con el herbicida por el medio ambiente.

En cuanto a AMPA, tampoco se encontraron niveles detectables en los dos momentos de toma de muestra, lo que sugiere un metabolismo limitado de glifosato en AMPA por acción microbiana intestinal, considerando que el rumen presenta un desarrollo funcional escaso en ovejas en el DPN 15 (Baldwin y Connor, 2017). Además, según datos en animales, la transformación significativa de glifosato a AMPA en mamíferos es muy poco probable (Niemann y col., 2015).

La exposición de los mamíferos a sustancias químicas del medio ambiente durante un período crítico de desarrollo podría afectar procesos importantes que predisponen a enfermedades crónicas en el futuro, especialmente aquellos relacionados con el desarrollo y la funcionalidad del ovario y el útero (Rivera y col., 2011; Spencer y col., 2012; Ziv-Gal y Flaws, 2016; Ingaramo y col., 2016, 2017; Van Bruggen y col., 2018), ya que la exposición al herbicida alteró la

histomorfología ovárica y los parámetros moleculares en los dos órganos estudiados (ovario y útero) tanto en ovejas expuestas a glifosato por vía oral como subcutánea.

En conclusión, los resultados muestran que los niveles séricos de glifosato al final del período de exposición (DPN 15) fueron similares independientemente de la vía de administración.

Toda información recolectada mediante tratamientos con especies domésticas tiene importancia tanto biomédica como comercial. Los animales de granja, como las ovejas, pueden ser altamente susceptibles a la fumigación con herbicidas y debe considerarse relevante lograr una explicación de hasta qué punto la exposición a glifosato puede determinar la productividad y/o la salud del animal.

Los resultados obtenidos son valiosos, pero los efectos observados no se pueden atribuir al propio glifosato, los coadyuvantes o la mezcla del producto comercial (Alarcón y col., 2019).

4.5. CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO 4

Ha sido posible desarrollar un método analítico que permite la determinación simultánea de glifosato, AMPA y glufosinato mediante una metodología relativamente simple y fácil de implementar en análisis de rutina. A pesar de tener un paso de derivatización, que aumenta el tiempo de análisis, esto permite obtener un límite de cuantificación bajo, necesario para poder cuantificar residuos o niveles traza en muestras reales.

A su vez, fue posible utilizar la metodología optimizada y validada en muestras de suero reales, trabajando en conjunto con el Instituto de Salud y Ambiente del Litoral de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas para poder conocer el efecto que tiene el herbicida glifosato en animales expuestos a éste por diferentes vías.

En los últimos años, el glifosato ha recibido una atención significativa por parte de la población general y las agencias reguladoras de todo el mundo. Las preocupaciones de la salud humana acerca de este herbicida han surgido principalmente debido al uso intensivo y prolongado en las últimas dos décadas, junto con su nuevo uso como desecante antes de la cosecha que puede aumentar el riesgo de exposición a la dieta. La detección de glifosato y su metabolito en alimentos y en estudios con animales de laboratorio y domésticos, así como poblaciones humanas, sugiere que los niveles de exposición actuales al herbicida podrían inducir resultados adversos para la salud (Myers y col., 2016). Además, resulta preocupante no saber si los efectos adversos causados son provocados por el principio activo (glifosato), los coadyuvantes o ambos que actúan de forma sinérgica. Varios estudios que comparan efectos de productos comerciales a base de glifosato, coadyuvantes y el principio activo (glifosato) han revelado que los productos

comerciales son más tóxicos que el propio glifosato, sugiriendo que los coadyuvantes no serían compuestos inocuos (Richard y col., 2005; Mesnage y col., 2013; Defarge y col., 2016).

Teniendo en cuenta la controversia sobre este tema, bajo la condición del experimento desarrollado durante esta investigación, no se pueden atribuir los efectos adversos encontrados, sobre la reproducción y el desarrollo, al glifosato, los coadyuvantes o ambos. Otro punto a tener en cuenta es el hecho de que la composición de las formulaciones de glifosato comerciales varía entre marcas y países (los coadyuvantes, el tipo y concentración de sal de glifosato) y, por lo tanto, es difícil comparar sus efectos. Por esa razón, a la luz de los resultados obtenidos, no se puede asegurar que los efectos adversos detectados sean provocados por todas las formulaciones de glifosato que se comercializan actualmente.

Por todo lo expresado, es de extrema relevancia poder contar con un método analítico simple, rápido y confiable para la determinación de este herbicida y su metabolito en suero sanguíneo, lo que es necesario para la continuidad de los estudios de esta problemática.

CAPÍTULO 5

DETERMINACIÓN DE GLIFOSATO, AMPA Y GLUFOSINATO EN MIEL

CAPÍTULO 5. DETERMINACIÓN DE GLIFOSATO, AMPA Y GLUFOSINATO EN MIEL

Se realizaron ensayos experimentales de laboratorio para poder desarrollar una metodología analítica con el objetivo de determinar simultáneamente glifosato, AMPA y glufosinato en miel utilizando un procedimiento analítico simple, confiable y reproducible.

Las pruebas realizadas consistieron en derivatización de la muestra con FMOC-Cl y posterior análisis mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa.

El método analítico optimizado y validado fue aplicado a la medición de la concentración de los analitos en muestras reales de miel y néctar, provenientes de la zona central de Argentina, provincias de Santa Fe y Entre Ríos.

5.1. OBJETIVOS

El objetivo principal fue desarrollar una metodología analítica basada en la estrategia de derivatización pre-columna con FMOC-Cl y análisis mediante UHPLC-MS/MS para determinar glifosato, AMPA y glufosinato en miel y matrices de composición similar (néctar). Y en este marco, el objetivo específico fue aplicar el método optimizado y validado a muestras reales para poder conocer a qué valores de glifosato, su metabolito y glufosinato están expuestos los insectos polinizadores y como consecuencia, el producto de consumo humano que ellos elaboran.

5.2. RESUMEN

En este capítulo se describe el desarrollo de un método para la determinación de glifosato, AMPA y glufosinato en miel. La metodología propuesta engloba tres etapas: extracción, derivatización con FMOC-Cl y limpieza de los extractos, mediante análisis por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa en tándem.

Los resultados obtenidos de la validación del método fueron satisfactorios lográndose niveles de recuperación en el rango de 70-120% y DER por debajo del 20% tal como lo establece la normativa SANTE/11813/2017 (EC, 2017). Las recuperaciones promedio obtenidas en el nivel de concentración del límite de cuantificación (5 µg/kg) fueron 81% para glifosato, 82% para AMPA y 73% para glufosinato con %DER de 12, 16 y 11, respectivamente.

La metodología propuesta, luego de la optimización y validación realizadas, fue utilizada para analizar muestras reales de miel y néctar.

5.3. DESARROLLO DEL MÉTODO

5.3.1. Sistema cromatográfico

La determinación de glifosato, AMPA y glufosinato en miel se realizó mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa en tándem, utilizando el equipo UHPLC-MS/MS Waters descrito en el Capítulo 2.

Los parámetros cromatográficos empleados fueron obtenidos mediante la optimización realizada durante el análisis de muestras de agua, los cuales se describen detalladamente en el Capítulo 3, Sección 3.3.1.

Para el análisis cromatográfico se utilizó una columna de fase reversa, ACQUITY UPLC™ HSS C18 (100 x 2,1 mm, 1,8 µm de tamaño de partícula) y una temperatura de 40°C. La fase móvil consistió en H₂O:ACN 98:2 + 0,1% AF (componente A) y ACN + 0,1% AF (componente B) con una velocidad de flujo de 0,35 mL/min. El gradiente de fase móvil fue de 0 a 0,25 min isocrático (95% A: 5% B); de 0,25 a 7 min aumento lineal de B de 5 a 100%; de 7 a 8 min disminución lineal de B de 100 a 75%; de 8 a 8,5 min disminución lineal de B de 75 a 40%; de 8,5 a 9 min disminución lineal de B de 40 a 5% y las condiciones iniciales se volvieron a equilibrar en 1 min, resultando el tiempo total de corrida cromatográfica de 10 min. El volumen de inyección fue de 10 µL.

5.3.2. Optimización del sistema espectrométrico

Al realizar la optimización del sistema espectrométrico, se decidió considerar sólo las variables de la fuente de ionización, para evaluar la interacción de los parámetros instrumentales en la respuesta de los tres analitos en conjunto.

Para lograr una mejor respuesta, se estudiaron las condiciones instrumentales sobre las bases de diseños estadísticos de experimentos, utilizando el software Design Expert 7.0. Los parámetros incluidos en el modelo fueron: voltaje de capilar (VC), voltaje de extractor (VE), temperatura de fuente (TF), temperatura de desolvatación (TD), flujo de gas de desolvatación (FD) y flujo de gas de cono (FC).

Se inició el experimento con un diseño factorial. Este tipo de diseño no permite explorar completamente una amplia región del espacio de los factores, pero proporciona información útil con un número relativamente reducido de corridas por cada factor y se pueden identificar tendencias importantes, que luego son utilizadas como punto de partida en experimentos adicionales.

Para el diseño factorial se utilizaron rangos de valores óptimos para el buen funcionamiento y vida útil del equipo: voltaje de capilar (1-4 kV), voltaje de extractor (2-6 V), temperatura de fuente (120-150°C), temperatura de desolvatación (250-450°C), flujo de gas de desolvatación

(800-1000 L/h) y flujo de gas de cono (5-20 L/h) para identificar cuáles son las variables que influyen en el sistema.

Luego de analizar los resultados se observó que voltaje de capilar, flujo de gas de desolvatación y flujo de gas de cono son variables que no influyen para ninguno de los analitos en estudio, y por tal motivo se decide trabajar con los valores mínimos de cada parámetro indicados en el diseño. La temperatura de fuente es una variable influyente para AMPA y glufosinato no así para glifosato, indicando que el valor óptimo estaría cerca del mínimo seteado. El voltaje de extractor y la temperatura de desolvatación resultaron ser variables influyentes para los tres analitos, siendo el valor óptimo cercano al mínimo seteado para el voltaje de extractor y el valor máximo para la temperatura de desolvatación.

Como resultado final del diseño factorial, se pudo identificar que las variables VE, TF y TD necesitan ser optimizadas, por lo cual se decide trabajar con otro tipo de diseño experimental. Como se necesita explorar una región donde se estima que existe una configuración óptima, se puede ampliar un diseño factorial y formar un diseño central compuesto.

El diseño central compuesto es un diseño de superficie de respuesta, que es un conjunto de técnicas avanzadas de diseño de experimentos que ayudan a entender mejor y optimizar la respuesta. La metodología del diseño de superficie de respuesta se utiliza con frecuencia para refinar los modelos después de haber determinado los factores importantes utilizando diseños de cribado o factoriales, especialmente si se sospecha que existe curvatura en la superficie de respuesta a obtener.

La diferencia entre una ecuación de superficie de respuesta y la ecuación de un diseño factorial es la adición de los términos cuadráticos que permiten modelar la curvatura en la respuesta, lo que la hace útil para entender o mapear una región de una superficie, hallar los niveles de las variables que optimizan una respuesta y seleccionar las condiciones operativas para cumplir con las especificaciones. Las ecuaciones de superficie de respuesta modelan cómo los cambios en las variables afectan una respuesta de interés.

Mediante el diseño central compuesto fueron optimizados los parámetros que resultaron ser influyentes en el diseño factorial. De esta manera, el voltaje del extractor se optimizó entre 1-2,2 V, la temperatura de fuente entre 100-120°C y la temperatura de desolvatación entre 400-450°C realizando un diseño central compuesto con 5 puntos centrales y $\alpha=1,68179$.

Se obtuvo una superficie de respuesta con un valor de 0,936 de deseabilidad, lo que es un muy buen valor, cercano a 1, que es lo ideal (Figura 32).

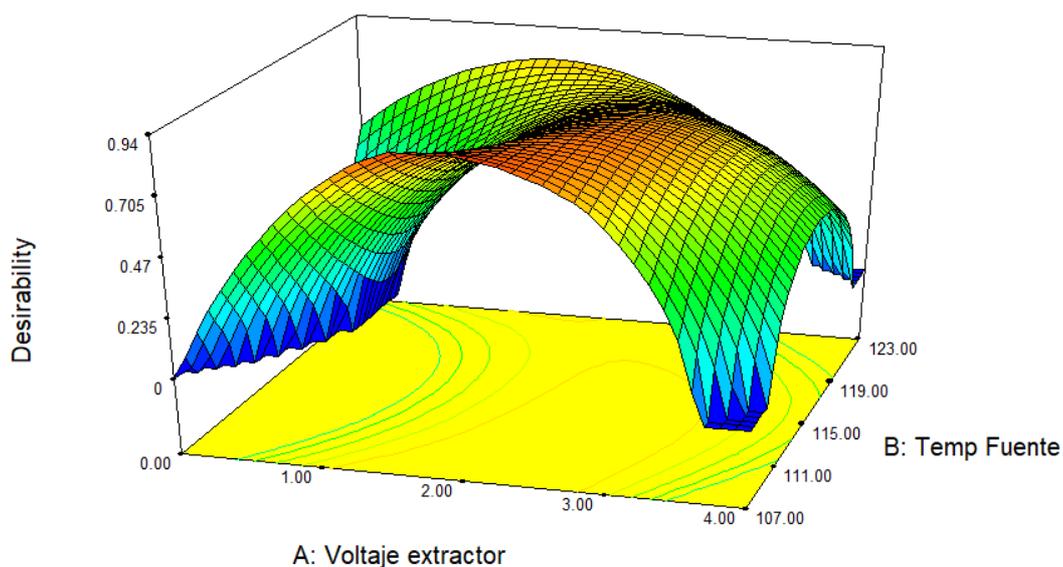


Figura 32. Respuesta en el espacio tridimensional obtenida luego de optimizar los parámetros influyentes. Deseabilidad: 0,936.

La combinación de factores obtenida después del análisis y el modelado de las respuestas (área de los picos cromatográficos de cada analito) por mínimos cuadrados, logrando un valor de deseabilidad de 0,936 es:

Voltaje de extractor: 2 V

Voltaje de capilar: 2 kV

Temperatura de fuente: 107°C

Temperatura de desolvatación: 462°C

Flujo de gas de desolvatación: 800 L/h

Flujo de gas de cono: 5 L/h

Los valores de m/z de los iones precursores y fragmentos, voltajes de cono y energías de colisión para cada analito son los que se presentan en la Tabla 3 (Sección 3.3.2.) y el dwell time fue 0,1 s para todos los compuestos.

El objetivo de esta optimización era aumentar la sensibilidad de la detección y poder lograr límites de detección y cuantificación bajos, que sean comparativos con los LMR establecidos para matrices alimentarias.

El diseño predice valores de áreas de pico para cada analito cuando se empleen los parámetros optimizados inyectando la misma solución utilizada durante el diseño (mezcla de estándares de glifosato-FMOC, AMPA-FMOC y glufosinato-FMOC de 100 µg/L en fase móvil). En la Figura 33 se observan dichos valores.

Factor	Name	Level	Low Level	High Level	Std. Dev.	Coding
A	Voltaje extractor	1.85	1.00	2.20	0.000	Actual
B	Temp Fuente	107.18	110.00	120.00	0.000	Actual
C	Temp Desolvatación	461.36	400.00	450.00	0.000	Actual

*** WARNING - One or more factor value(s) is outside of the design space.

Response	Prediction	SE Mean	95% CI low	95% CI high	SE Pred	95% PI low	95% PI high
Glifosato	27510		26372.51	28696.46		26102.36	28993.46
AMPA	36260.3	370.06	35354.77	37165.80	469.13	35112.36	37408.21
Glufosinato	45194		41443.60	48517.73		19398.02	57985.42

Figura 33. Predicción de los valores de respuesta a obtener repitiendo las inyecciones con los valores óptimos de las variables influyentes en el diseño.

Para finalizar el diseño de experimentos se realizaron inyecciones para verificar que los valores predichos se cumplieran. En las Figuras 34, 35 y 36 se muestran los picos cromatográficos obtenidos con las condiciones espectrométricas optimizadas (b) comparados con picos cromatográficos obtenidos con las condiciones instrumentales antes de la optimización (a).

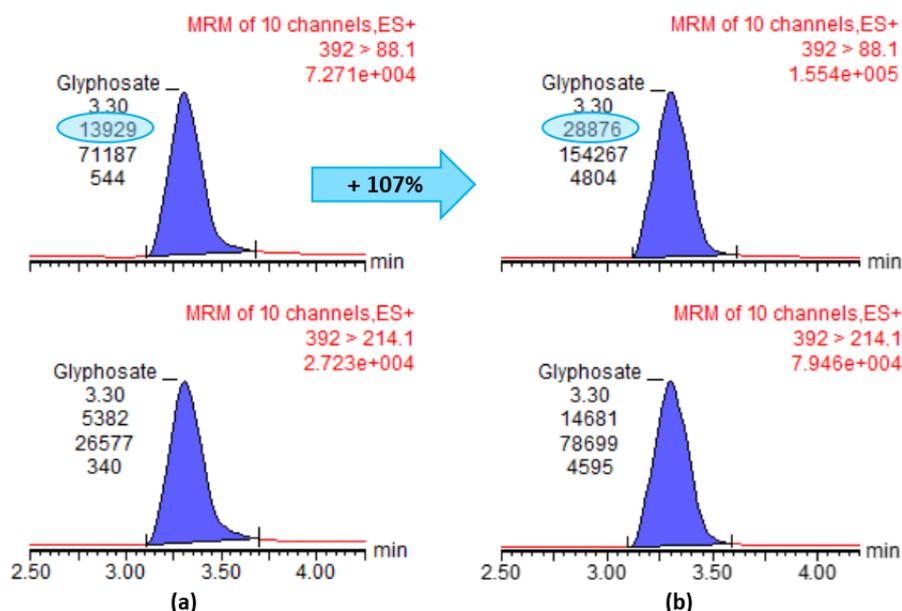


Figura 34. Comparación de picos cromatográficos de glifosato antes (a) y después (b) de la optimización espectrométrica.

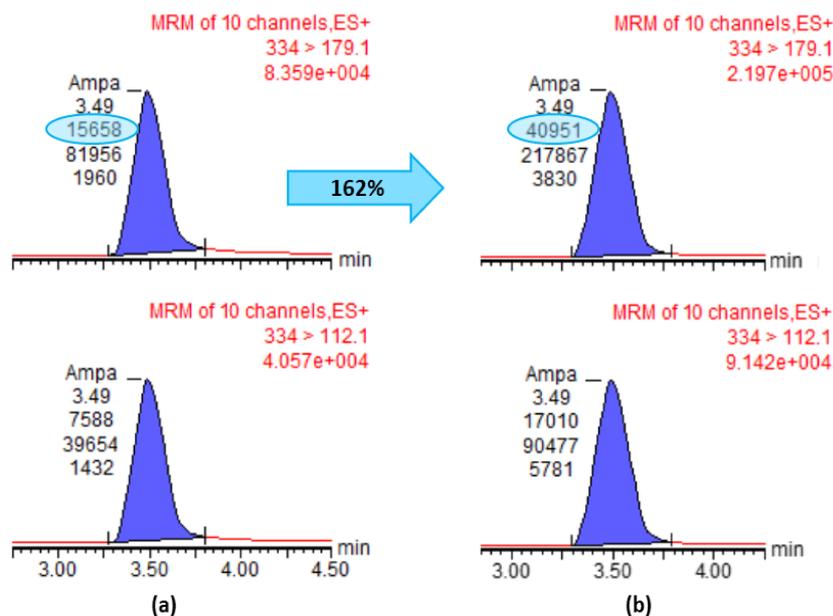


Figura 35. Comparación de picos cromatográficos de AMPA antes (a) y después (b) de la optimización espectrométrica.

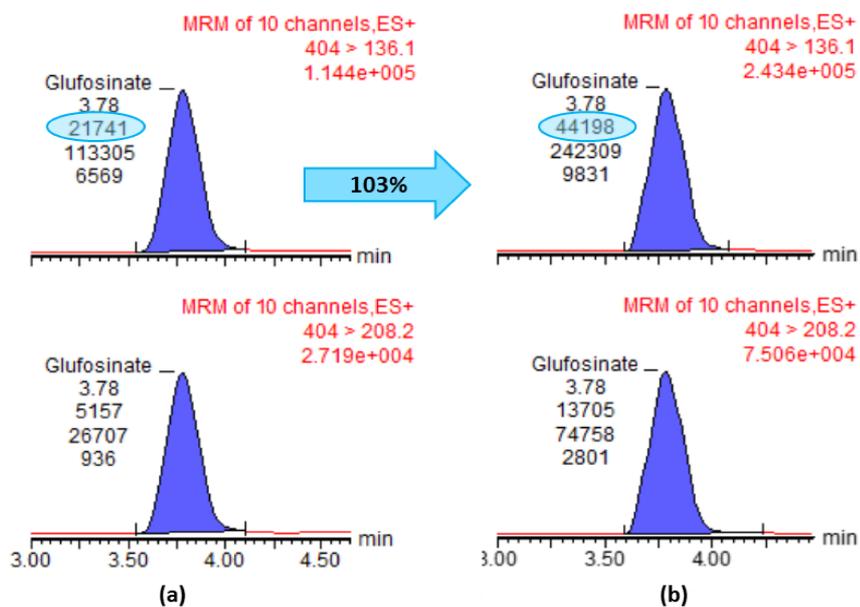


Figura 36. Comparación de picos cromatográficos de glufosinato antes (a) y después (b) de la optimización espectrométrica.

En esta etapa se evaluó la sensibilidad cromatográfica de los analitos estudiados con los parámetros espectrométricos optimizados mediante el diseño de experimentos realizado.

Se observó un incremento en el área de la transición de cuantificación analizada del 107% para glifosato, 162% para AMPA y 103% para glufosinato. Y, al observar los valores de las áreas de los picos cromatográficos de las gráficas (b) se puede verificar que los valores predichos por el diseño se cumplen.

Resumiendo, la Figura 37 muestra un esquema de la optimización realizada a través del diseño de experimentos llevado a cabo para la optimización de los parámetros del sistema espectrométrico.

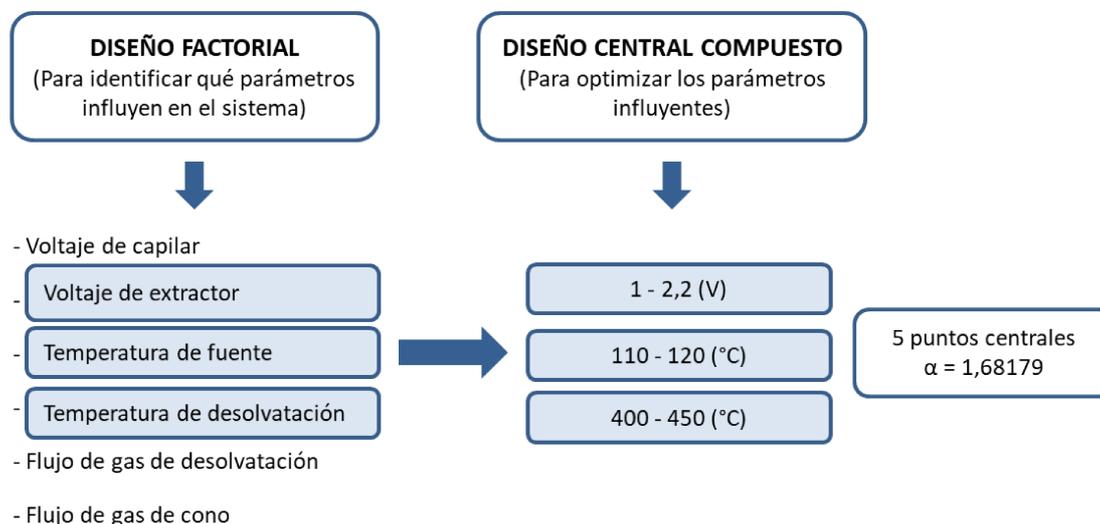


Figura 37. Resumen esquemático de la optimización espectrométrica realizada mediante diseño factorial y diseño central compuesto.

El diseño de experimentos realizado permitió lograr un incremento en las áreas de los tres analitos estudiados, aumentar la sensibilidad analítica y, por consiguiente, conseguir mejores límites de detección y cuantificación del método analítico a desarrollar.

5.3.3. Optimización de la etapa de preparación de la muestra

Descripción del experimento

Para determinar simultáneamente glifosato, AMPA y glufosinato en muestras de miel fueron evaluadas y adaptadas al objetivo del trabajo distintas alternativas según bibliografía consultada. Se consideraron diferentes aspectos de los procedimientos experimentales: solventes de extracción, volumen y concentración del reactivo derivatizante, volumen y concentración del buffer borato así como otros reactivos para lograr el pH óptimo (pH 9), tiempo de reacción y alternativas de limpieza de los extractos.

En cuanto a los solventes de extracción evaluados se pueden mencionar:

- Agua/diclorometano (Li y col., 2007; Oulkar y col., 2017).
- Agua/metanol, método QuPPE (Anastassiades y col., 2019).
- Agua/acetonitrilo (Thompson y col., 2014).
- Agua (Ehling y col., 2015; Thompson y col., 2019).
- Ácido acético/EDTA, método FDA (Chamkasem y col., 2016).
- EDTA, método utilizado en la compañía Cipsa Honey de Buenos Aires.

También fueron probados distintos reactivos, concentraciones y volúmenes para lograr la basicidad adecuada:

- Buffer borato de sodio 40 y 50 mM (Hanke y col., 2008; Zelaya y col., 2010; Ehling y col., 2015; Demonte y col., 2018).
- Hidróxido de potasio 6 M.
- Carbonato de sodio 0,1 M (Thompson y col., 2019).

En la etapa de limpieza de los extractos también se realizaron pruebas mediante partición L-L con diclorometano (Zelaya y col., 2010; Demonte y col., 2018), SPE (Cipsa honey, Thompson y col., 2019) y no limpieza de los extractos.

Para cada una de las pruebas realizadas se practicaron ensayos de recuperación en dos niveles de concentración, 10 y 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, por triplicado. Las muestras de miel, pesadas en tubos de centrífuga de 50 mL fueron colocadas en un baño termostatzado a 40-50°C por 5 min hasta lograr la fluidez necesaria, posteriormente se adicionaron con la mezcla de estándares (glifosato, AMPA y glufosinato) y se agitaron en vórtex para homogeneizar. Luego se procedió con la etapa de extracción, derivatización y limpieza de cada una de las alternativas evaluadas. Los resultados obtenidos para cada prueba eran satisfactorios en cuanto a valores de recuperación (70-120%, DER <20%) para el nivel más bajo de adición, mientras que para el nivel más alto evaluado, 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, los valores de recuperación no superaban el 40-50%.

Al evaluar los resultados de todos los ensayos realizados se decidió seguir trabajando con la metodología propuesta por Thompson y col., 2019 con ciertas modificaciones implementadas para lograr un buen desempeño en nuestro laboratorio.

La metodología empleada cuenta con una etapa de extracción de los analitos con agua, seguida de la reacción de derivatización con adición de Na_2CO_3 para lograr el pH 9 y limpieza de los extractos obtenidos mediante partición L-L (Demonte y col., 2018).

Se comienza el procesamiento colocando 2 g de miel en tubos de centrífuga de 50 mL de capacidad, se calienta la muestra en baño termostatzado a 40-50°C por 5 min, luego se adicionan 10 mL de agua, se agita en vórtex 30 s hasta lograr que la muestra quede totalmente disuelta y se colocan los tubos en agitador mecánico a 150 rpm por 30 min. Pasado este tiempo se procede a tomar una alícuota de la solución (miel disuelta en agua) para realizar el paso de derivatización y se trabaja con tubos Eppendorf de 2 mL de capacidad. Se toman 0,5 mL de la muestra disuelta y se adicionan 0,5 mL de Na_2CO_3 0,1 M para acondicionar el medio alcalino y lograr el pH 9 adecuado. Finalmente, se agregan 0,2 mL de FMOC-Cl 50 mg/mL, se agita en vórtex 10 s y se deja que la reacción tenga lugar durante 2 h a temperatura ambiente y al resguardo de la luz.

Pasado el tiempo de reacción se procede a realizar la partición L-L, se adicionan 0,75 mL de diclorometano, se agita en vórtex 10 s y se centrifuga en micro centrífuga de alta velocidad (14500 rpm, 5 min). La parte acuosa se extrae para el análisis instrumental (Figura 38).

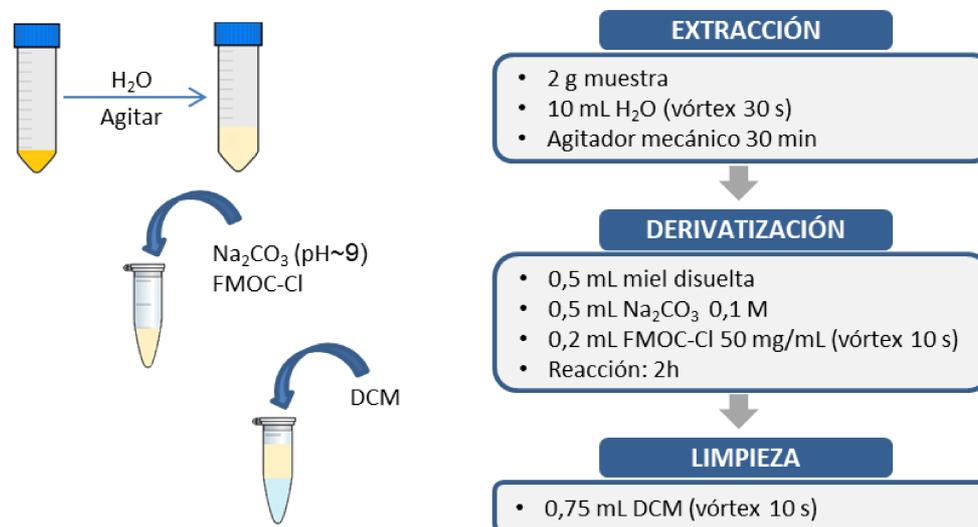


Figura 38. Resumen esquemático de la metodología analítica desarrollada y optimizada para determinar simultáneamente glifosato, AMPA y glufosinato en miel.

Resultados y discusión

Tanto el paso de extracción como derivatización resultaron ser críticos a la hora de obtener una metodología analítica trabajando con una matriz tan compleja como la miel.

Uno de los primeros inconvenientes que hubo en el paso de derivatización es que el pH 9, adecuado para que tenga lugar la reacción, no se lograba con el agregado de volúmenes y concentraciones de buffer borato similares a las utilizadas en las técnicas analíticas desarrolladas en el presente trabajo. Por tal motivo, se probaron experimentalmente distintos volúmenes y concentraciones de dicho reactivo, variando las concentraciones en un rango de 2,5 a 10 g/L, analizadas con referencia al volumen inicial de extracto tomado para la derivatización. Sin embargo, el pH 9 no se pudo lograr ni con la concentración más alta. Es por ello que se intentó con otros reactivos para lograr la basicidad requerida: KOH y Na₂CO₃, con cada uno de ellos sí se logró obtener pH 9. Con respecto al Na₂CO₃, propuesto por Thompson y col., 2019, se realizó el mismo cálculo que para el buffer borato dando como resultado una concentración de 10,6 g/L. Agregando volumen y concentración establecidos en dicho método se lograba el pH 9 óptimo para la reacción, por lo que no se practicaron más pruebas y se siguió trabajando con este reactivo y sus proporciones.

La concentración del reactivo derivatizante fue otra variante que tuvo que ser optimizada, ya que es fundamental para garantizar que la reacción sea completa y reproducible. Debido a que

los valores de recuperación obtenidos eran menores al 40-50% con DER >20% para el nivel de 100 µg/kg cuando se utilizaban concentraciones de FMOC-Cl similares a las de metodologías desarrolladas en el presente estudio, se decidió probar concentraciones más elevadas. Esta cantidad se determinó experimentalmente en un rango de concentraciones entre 1 y 20 g/L de FMOC-Cl, referido al volumen inicial de extracto tomado para la derivatización en cada procedimiento evaluado. Cabe aclarar que se debe utilizar un exceso de reactivo derivatizante para lograr una derivatización completa de los analitos presentes en una muestra. Si bien, el uso de exceso de FMOC-Cl es usual, se debe optimizar, debido a que la cantidad de reactivo que no reacciona se convierte en una impureza indeseable que genera subproductos durante la reacción. A pesar de ello, para el nivel de 100 µg/kg se debe realizar una dilución de la muestra puesto que no se pudo lograr un buen resultado de recuperación (50%). El método resultó apropiado hasta una concentración de 50 µg/kg utilizando la concentración más alta de FMOC-Cl evaluada (Thompson y col., 2019), todas las muestras que arrojen un valor de concentración por arriba de éste deben ser analizadas nuevamente realizando una dilución.

Cabe mencionar que el tiempo de reacción también fue optimizado, dejando reaccionar sólo dos horas como así toda la noche. Los resultados obtenidos no mostraron diferencias estadísticamente significativas, por lo que se optó por el menor tiempo de reacción.

En cuanto a la etapa de limpieza, la implementación de un paso de SPE, beneficioso para concentrar la muestra y lograr límites de detección y cuantificación más bajos y obtener extractos más limpios a la hora del análisis instrumental, no produjo mejores resultados que la partición L-L con diclorometano. Por lo expresado, se decidió realizar la partición como etapa de limpieza en lugar del paso de SPE, el cual requiere mayor tiempo e incrementa el costo del análisis.

En conclusión se logró un método analítico simple y reproducible, a pesar de contar con una etapa de derivatización, con un tiempo de reacción y análisis comparativo con los tiempos de las metodologías de las demás matrices analizadas en el presente trabajo. Además, pudo ser aplicado para el análisis de muestras reales, lo que permite conocer la exposición que hay frente a uno de los herbicidas más utilizados a nivel mundial, su metabolito y otro herbicida como el glufosinato.

5.3.4. Validación del método optimizado

La validación del método analítico desarrollado para el análisis de miel se realizó siguiendo los criterios que establece el documento SANTE/11813/2017 (EC, 2017) para realizar la validación de procedimientos analíticos destinados a la determinación de residuos de plaguicidas en

alimentos y piensos. Durante el proceso de validación se evaluó rango de linealidad, efecto matriz, exactitud y precisión y el límite de cuantificación del método optimizado.

Linealidad

La linealidad del método se evaluó en solvente y matriz (extractos de miel blanco) en el rango de 1 a 50 µg/L (1, 5, 10, 25 y 50 µg/L), considerándose satisfactoria obteniendo coeficientes de correlación superiores a 0,99 y residuos inferiores a ± 20% en todos los casos (Figuras 39, 40 y 41).

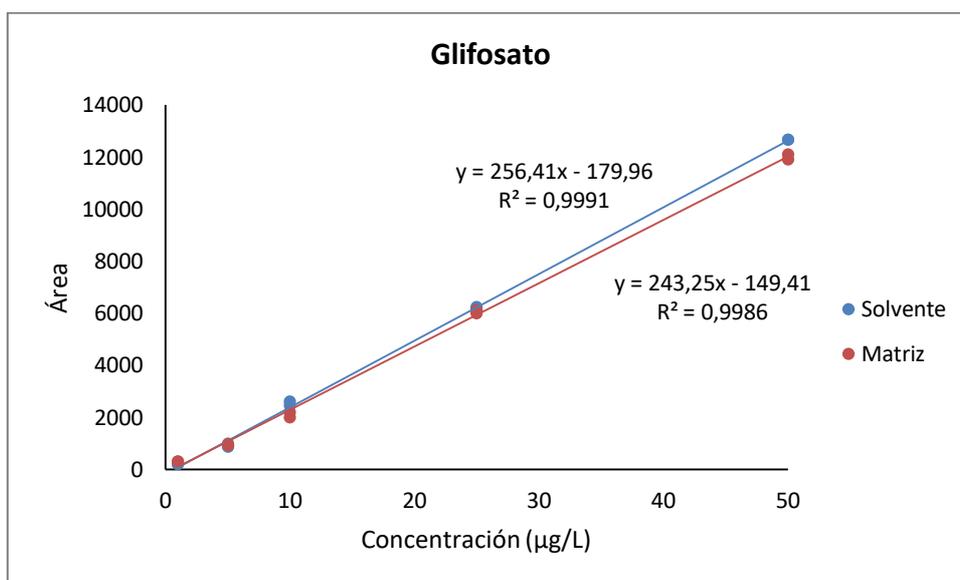


Figura 39. Calibraciones de glifosato en matriz (miel) y solvente.

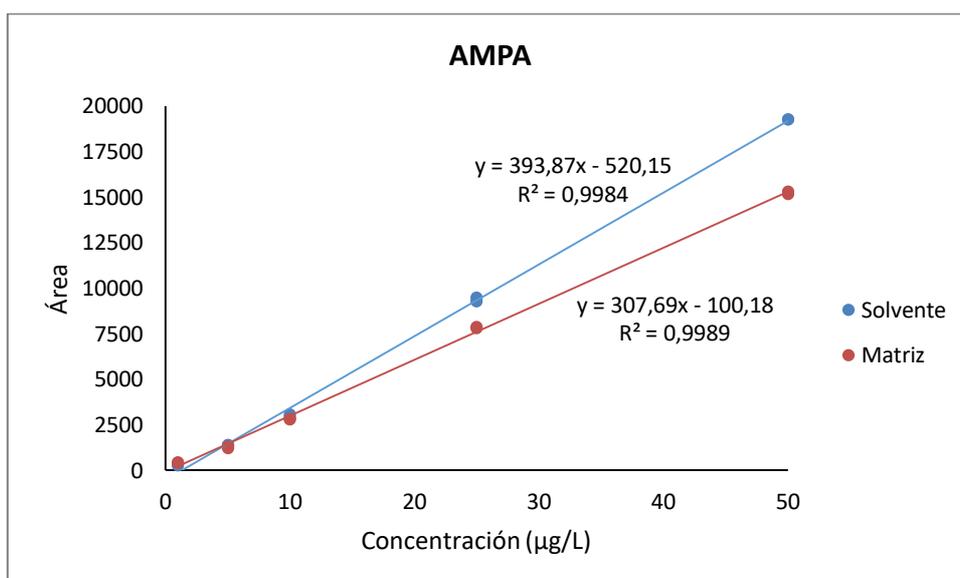


Figura 40. Calibraciones de AMPA en matriz (miel) y solvente.

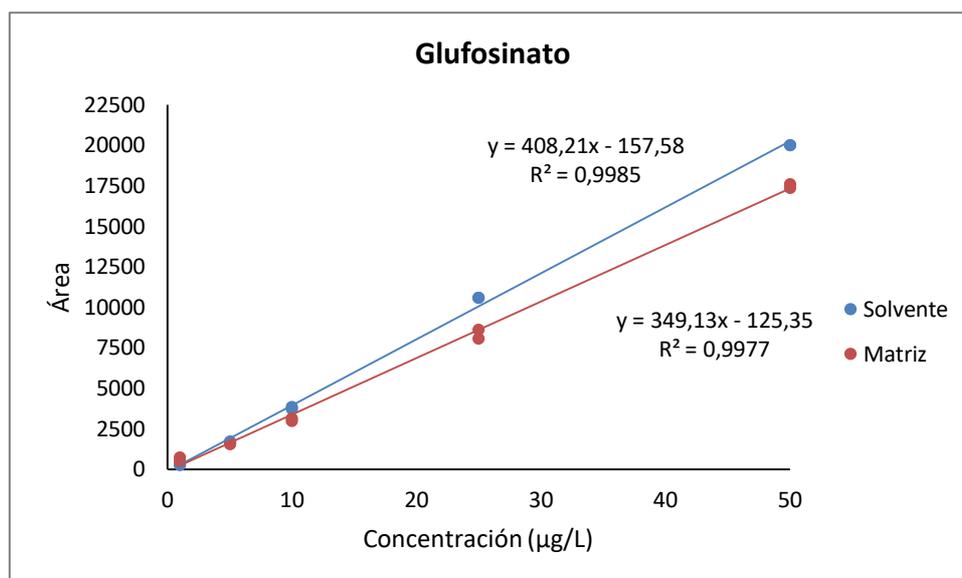


Figura 41. Calibraciones de glufosinato en matriz (miel) y solvente.

Efecto matriz

Los efectos de la matriz (incremento o supresión de la señal) pueden deberse a los componentes de la propia matriz que se co-extraen durante el procesamiento de la muestra e interfieren en la ionización de los compuestos. Este efecto fue evaluado para cada analito comparando las pendientes de las curvas de calibración realizadas en solvente y matriz mediante la fórmula:

$$\%EM = \frac{\text{pendiente matriz}}{\text{pendiente solvente}} \cdot 100$$

Los valores de %EM encontrados fueron 95 para glifosato, 78 para AMPA y 85 para glufosinato. Lo que indica una disminución de la señal del 5% para glifosato, 22% para AMPA y 15% para glufosinato. El documento SANTE/11813/2017 establece un criterio de aceptación de $\pm 20\%$ para el efecto matriz, situación que se verifica para glifosato y glufosinato, no así para AMPA que excede este criterio por 2%. Esto significa que para calcular la concentración de AMPA se debe utilizar la curva de calibrado en matriz, no así para glifosato y glufosinato donde puede utilizarse la curva de calibrado en solvente. Sin embargo, se adoptó el uso de la curva de calibrado en matriz para realizar los cálculos de concentración de los tres analitos estudiados independientemente del efecto matriz calculado para cada uno de ellos.

Exactitud y precisión

El documento SANTE/11813/2017 tiene como criterio de validación que la exactitud y precisión deben evaluarse con un mínimo de 5 réplicas en el límite de cuantificación objetivo del método y, al menos otro nivel superior, en el rango de 2-10xLC. Por lo expresado anteriormente, se

realizaron ensayos de recuperación mediante el análisis de muestras de miel blanco fortificadas a cuatro niveles de concentración (5, 10, 25 y 50 µg/kg). En la Tabla 13 se resumen los valores de %REC obtenidos para los tres analitos en los niveles de concentración 5 y 25 µg/kg. Cabe mencionar que el nivel de 50 µg/kg fue evaluado para determinar hasta qué concentración el método analítico propuesto era considerado aceptable, conociendo %REC y %DER.

Para evaluar la precisión del método se analizó la DER de los valores de recuperación obtenidos para cada nivel de concentración ensayado. Se determinó la repetibilidad intra-día mediante porcentajes de recuperación obtenidos de 5 réplicas de cada nivel adicionado realizadas un mismo día, y la reproducibilidad inter-día analizando las recuperaciones obtenidas en ensayos realizados en días diferentes (Tabla 13).

Todos los compuestos presentaron valores de recuperación dentro del rango 70-120% y DER <20% como queda establecido en el documento SANTE.

Límite de cuantificación

El LC para los tres analitos se estableció mediante fortificaciones con estándares de glifosato, AMPA y glufosinato, sobre muestras de miel blanco, fijándose como la concentración de adición más baja probada en la que las recuperaciones estaban entre 70-120% con DER por debajo del 20%, basada en cinco repeticiones. Se determinó, entonces, que el LC es de 5 µg/kg para los tres analitos.

Las recuperaciones promedio obtenidas fueron 81% para glifosato, 82% para AMPA y 73% para glufosinato con %DER de 12, 16 y 11, respectivamente.

Se resumen en la siguiente tabla las cifras de mérito obtenidas en el experimento de validación del método analítico desarrollado y optimizado en el presente trabajo de investigación. Los resultados hallados durante este proceso demuestran que la metodología analítica es confiable y reproducible, con un límite de cuantificación compatible con la Regulación Europea que establece un LMR de glifosato en miel de 50 µg/kg (UE, 2013).

Tabla 13. Cifras de mérito del método analítico (n=5)^a.

Compuesto	Recuperados %		Repetibilidad %DER		Precisión intermedia %DER		LC µg/kg
	5 µg/kg	25 µg/kg	5 µg/kg	25 µg/kg	5 µg/kg	25 µg/kg	
Glifosato	70-97	75-83	12	3	12	9	5
AMPA	65-105	65-80	16	6	18	13	5
Glufosinato	67-83	70-88	11	8	17	12	5

^aCinco muestras de miel adicionadas a 5 y 25 µg/kg cada una.

5.4. APLICACIÓN A MUESTRAS REALES

El método analítico desarrollado se pudo aplicar para analizar muestras reales provenientes de diferentes zonas de las provincias de Santa Fe y Entre Ríos, pertenecientes a la región central de Argentina.

Se determinaron glifosato, AMPA y glufosinato en muestras de miel procedentes de apiarios colocados en distintas zonas de la provincia de Santa Fe, y en muestras de néctar pertenecientes a trabajos de investigación desarrollados a campo en la provincia de Entre Ríos.

5.4.1. Determinación de glifosato, AMPA y glufosinato en miel

Descripción del experimento

La metodología optimizada y validada fue aplicada para determinar glifosato, AMPA y glufosinato en miel.

El muestreo incluyó 48 muestras provenientes de distintas zonas de la provincia de Santa Fe, lo que se vio reflejado en los distintos aromas y colores que presentaron las muestras. El aroma, sabor y color de la miel son determinados por las plantas de las cuales las abejas recogen el néctar. El color de las muestras fue desde los tonos blancos hasta los pardos oscuros, aunque predominaron los tonos castaños-claros.

Resultados y discusión

El análisis de miel mostró resultados positivos para glifosato y AMPA en 92% y 8% de las 48 muestras totales, respectivamente. Se verificaron valores cuantificados (por encima del LC establecido) del 63% para glifosato y 4% para AMPA (Figura 42).

Los valores cuantificados encontrados para glifosato oscilaron entre 5 y 119 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y para AMPA entre 6 y 7 $\mu\text{g}/\text{kg}$. No se observó presencia de glufosinato, todos los valores hallados estuvieron por debajo del límite de detección (Tabla 14 y Figura 42).

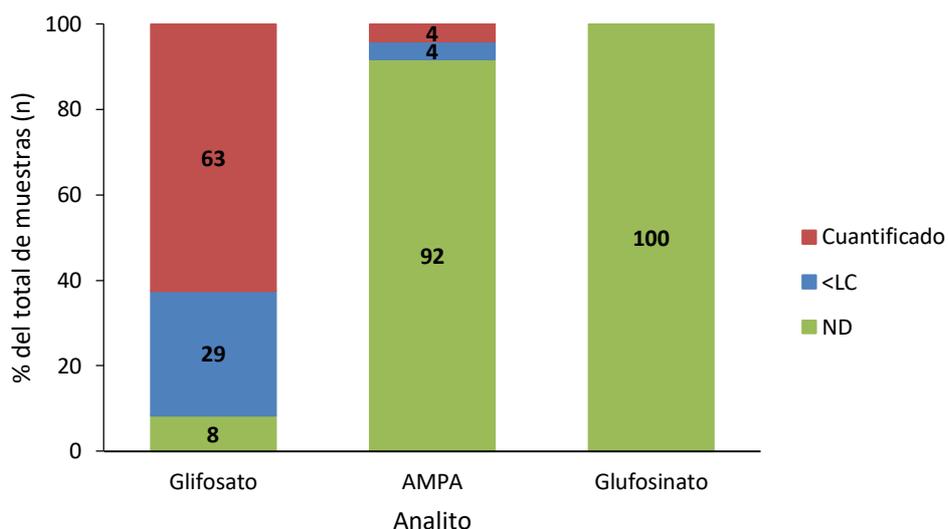


Figura 42. Resultados correspondientes a la determinación de glifosato, AMPA y glufosinato en muestras de miel, expresadas como porcentaje del total de muestras. Los resultados se agruparon en: no detectado (ND=menor al LD) en verde, menor al límite de cuantificación (<LC) en azul y valores cuantificados en rojo. (Ver Tabla 14).

Tabla 14. Valores medios cuantificados y el rango de concentración (LC a valores máximos cuantificados) de glifosato, AMPA y glufosinato encontrados en muestras de miel. (Ver Figura 42).

	Glifosato	AMPA	Glufosinato
n (total)	48	48	48
n (cuantificado)	30	2	-
Media [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	25,6	6,5	-
Rango [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	5-119	6-7	-

Se puede concluir que, en cuanto a los valores encontrados en el presente estudio, se observó que la mayoría de las muestras presentó niveles de concentración por debajo del límite máximo de residuo de 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ establecido por la Unión Europea, sólo 6 muestras de las 48 analizadas estaban por encima de él. No obstante, si bien la mayoría de las concentraciones halladas estaban dentro del valor permitido, se verificó una alta incidencia de glifosato en la miel, dejando en evidencia el impacto que tiene el uso de plaguicidas en el ámbito agrícola.

5.4.2. Determinación de glifosato y AMPA en néctar

Trabajo en colaboración con personal del Centro de Investigación Científica y de Transferencia Tecnológica a la Producción de la Universidad Autónoma de Entre Ríos (CICYTTP-CONICET/FCyT-UADER).

Descripción del experimento

Debido a que existe evidencia científica que revela una marcada disminución de insectos polinizadores en diferentes ecosistemas del mundo y, que la intensificación agrícola junto al uso de plaguicidas se posicionan como las principales causas de ello, pero no existe consenso respecto de los principales mecanismos de exposición de los plaguicidas a las abejas y sus principales productos de consumo humano (miel-polen), se pretende abordar esta experiencia. Para tal fin, se colectó miel inmadura (néctar) de colmenas próximas a un lote de soja, que se pulverizó en floración con tres productos fitosanitarios de diferentes grados de letalidad hacia las abejas (entre ellos glifosato). Se tomaron muestras de néctar previo a las pulverizaciones y con posterioridad a las mismas. Sobre dichas muestras se realizaron análisis químicos en busca de residuos de los plaguicidas aplicados.

El estudio fue desarrollado en un lote agrícola sembrado con soja, y en uno de sus límites se colocó, previo a la floración del cultivo, un grupo de tres colmenas de *Apis mellifera* para posibilitar la presencia de estos insectos durante la floración del cultivo.

Sobre el lote de soja se aplicaron dosis de los plaguicidas recomendadas por el fabricante de cada producto.

Para este estudio, las muestras fueron recolectadas 24 h antes de la aplicación, minutos antes de la aplicación y a las 48 h posteriores a la aplicación del herbicida, ensayos denominados Pre-ap. A, Pre-ap. B y Post-ap., respectivamente (Figura 43).

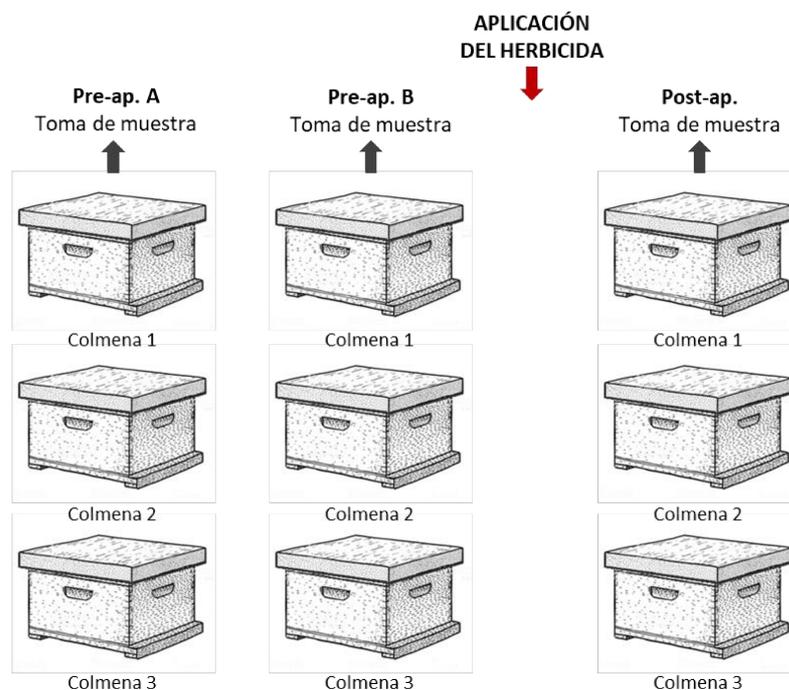


Figura 43. Representación esquemática de la toma de muestra de néctar llevada a cabo durante el experimento desarrollado a campo.

Resultados y discusión

Se realizó el análisis de miel inmadura con la metodología desarrollada que se describe en la Sección 5.3.3. (Figura 38) obteniéndose valores de concentración de glifosato y AMPA en todas las muestras analizadas (Tabla 15).

Cabe destacar que para el néctar se hicieron ensayos de recuperación en un nivel más bajo de concentración para determinar el límite de cuantificación en esta matriz. Se pudo lograr un LC de 2 µg/kg con porcentajes de recuperación superiores al 80% y desviaciones estándares relativas por debajo del 20% al adicionar néctar blanco en este punto de concentración. Esto puede explicarse debido a la diferencia que existe, en cuanto a composición, entre néctar y miel. El néctar es una solución formada principalmente por agua, sales minerales y azúcares segregados por las flores, su composición es variable según la fuente floral de la que proviene y en general, contiene entre 70 y 90% de agua, mientras que la miel sólo contiene un 20%. Las abejas elaboradoras introducen el néctar dentro de las celdas del panal donde se evapora el agua hasta lograr la miel.

La cantidad de agua en la matriz es una de las principales diferencias de la composición, es por ello que en el néctar, líquido acuoso, se pudo obtener mejor desempeño analítico.

Tabla 15. Resultados de glifosato y AMPA obtenidos en las muestras de néctar.

Muestras	Glifosato (µg/kg)	AMPA (µg/kg)	Tratamiento
Pre-ap. A - Colmena 1	11 ± 2	<LC (1)	Pre-pulverización
Pre-ap. A - Colmena 2	6 ± 1	2 ± 0,4	
Pre-ap. A - Colmena 3	10 ± 2	2 ± 0,4	
Pre-ap. B - Colmena 1	8 ± 2	2 ± 0,4	
Pre-ap. B - Colmena 2	6 ± 1	2 ± 0,4	
Pre-ap. B - Colmena 3	10 ± 2	2 ± 0,4	
Post-ap. - Colmena 1	25 ± 5	4 ± 1	Post-pulverización
Post-ap. - Colmena 2	26 ± 5	5 ± 1	
Post-ap. - Colmena 3	24 ± 5	4 ± 1	

Durante el experimento sólo se aplicó glifosato al cultivo de soja próximo a las colmenas estudiadas, es por ello que no fue detectado glufosinato, herbicida analizado junto a glifosato y AMPA en las muestras de néctar.

En cuanto a los valores hallados de glifosato y AMPA, éstos evidencian la contaminación a la que están expuestas tanto flores como abejas al herbicida utilizado en el experimento. Al analizar los resultados se observa un incremento en los valores de glifosato y AMPA posterior a la aplicación del herbicida, pero cabe mencionar que previamente a la aplicación ya había residuos

del herbicida en la colmena, lo cual indica que las abejas están expuestas a un ambiente contaminado.

5.5. CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO 5

Se pudo desarrollar una metodología analítica para la determinación de glifosato, AMPA y glufosinato en miel y matrices similares (néctar). Además, la metodología pudo validarse obteniendo resultados satisfactorios que demuestran que el método es confiable.

Con la optimización de los parámetros del sistema espectrométrico, mediante diseño de experimentos, se logró mejorar la sensibilidad analítica permitiendo lograr límites de cuantificación compatibles con las regulaciones existentes (50 µg/kg de la UE).

A su vez, empleando la metodología analítica desarrollada se podría establecer la distribución espacial de la ocurrencia de estos herbicidas, establecer fuentes probables de contaminación y contribuir a proponer medidas de mitigación y prevención, ya que los valores de concentración hallados de glifosato y su metabolito en muestras de miel y néctar son un reflejo de la contaminación a la que están expuestos los ecosistemas agrícolas de la región central de Argentina. Esta situación observada también en otras mieles del país, incluyendo aquellas que corresponden a producciones orgánicas, genera un impacto importante sobre la calidad en general de las mieles argentinas y en particular en su exportación, actividad en la que la Argentina tiene una posición destacada en el comercio mundial.

CAPÍTULO 6

CONCLUSIÓN FINAL Y CONTRIBUCIONES

CAPÍTULO 6. CONCLUSIÓN FINAL Y CONTRIBUCIONES

6.1. CONCLUSIÓN FINAL

La determinación de los herbicidas seleccionados presenta dificultades analíticas complejas ya que se trata de compuestos muy polares con fuerte tendencia a ligarse a iones presentes en la matriz dificultando la separación y reproducibilidad, no volátiles (incompatibles con cromatografía gaseosa), muy solubles en agua y poco solubles en solventes orgánicos, son compuestos altamente dependientes del pH con comportamiento anfótero (glifosato presenta 4 valores de pKa).

La alternativa de la derivatización presenta ventajas importantes, mejora la retención en LC, aumenta la masa y la sensibilidad en el detector LC-MS, puede ser compatible con otros detectores (fluorescencia), es una reacción relativamente reproducible y permite obtener recuperaciones satisfactorias trabajando con estándares marcados isotópicamente. También presenta desventajas como mayor trabajo durante la preparación de las muestras, incremento del tiempo total del análisis, mayor riesgo de dañar el sistema cromatográfico, ya que la derivatización con FMOC-Cl produce como subproducto FMOC-OH por hidrólisis y decarboxilación en medio acuoso, el cual es indeseado porque es menos soluble en agua que los analitos derivatizados, por lo que puede bloquear el capilar de la fuente o estropear la columna cromatográfica.

Desde el punto de vista analítico, toda reacción de derivatización es normalmente una desventaja por las complicaciones que acarrea, en trabajo, tiempo y performance analítica. Es indudable que la sustitución confiable de la derivatización es una meta importante de solución aun no consolidada.

El presente trabajo permitió contribuir al desarrollo de metodologías analíticas para la determinación de glifosato, AMPA y glufosinato en muestras de diversos orígenes y complejidad de la matriz, como son ambientales, biológicas y alimentarias, experimentando en las etapas más importantes de las mismas: preparación previa de la muestra, reacción de derivatización, limpieza de los extractos y optimización del sistema instrumental.

El empleo de UHPLC-MS/MS permitió alcanzar límites de detección bajos, compatibles con normativas nacionales y extranjeras.

El desarrollo de estas metodologías instrumentales permitió explorar la potencialidad de la técnica aplicada al campo del análisis de los compuestos seleccionados en diferentes matrices. Se evaluaron distintas alternativas hasta lograr cifras de mérito acordes a las reglamentaciones.

Y se pudo realizar el análisis de muestras reales, de suma importancia para saber el destino que tienen estos herbicidas luego de ser aplicados.

Con los resultados hallados en el análisis de muestras de agua subterráneas de la provincia de Santa Fe, departamentos Las Colonias y Castellanos, se observa que hay evidencia de la transferencia de compuestos desde el ambiente externo a los acuíferos funcionales con el riesgo potencial de profundizar la contaminación en el futuro.

Considerando los resultados obtenidos de los estudios experimentales con animales de laboratorio, donde fueron detectados efectos adversos en los animales expuestos al herbicida glifosato, resulta preocupante no saber si dichos efectos detectados son provocados por el principio activo (glifosato), los coadyuvantes o ambos, que actúan de forma sinérgica. Hay varios estudios que revelan que la formulación comercial es más tóxica que el ingrediente activo, lo que sugiere que los coadyuvantes incorporados no son inocuos. A pesar de la controversia existente, poder contar con una metodología analítica para determinar los tres analitos estudiados resulta sumamente interesante para poder seguir la investigación.

A su vez, cabe mencionar que los resultados obtenidos del análisis de miel y productos de la colmena (néctar) evidencian la contaminación y ubicuidad del glifosato en el ambiente. Esta situación resulta particularmente preocupante, tanto por sus potenciales efectos en la salud de los consumidores, como así también en las dificultades que acarrea para la exportación de mieles argentinas, que por su calidad han alcanzado un destacado sitio en el mercado internacional. Por ello también resulta una importante contribución contar con metodologías analíticas más accesibles, compatibles con los estándares internacionales, aptas para ser utilizadas para orientar las necesarias medidas de corrección y prevención del problema.

La reflexión más importante que se debe hacer a partir de estos hallazgos es la evaluación del estado de la influencia de las prácticas agrícolas que utilizan estos herbicidas de manera intensiva y el efecto resultante en la integridad de los recursos (hídricos, biota, fauna y flora) involucrados como así también respecto a la inocuidad de los alimentos que se producen y se consumen en nuestro país. Todos los resultados obtenidos resultan de importancia para lograr instalar planes de monitoreo y control de estos herbicidas en el ambiente y en la producción alimentaria, para mantener bajo control y minimizar sus efectos sobre la salud pública, la economía y la preservación del ambiente.

6.2. DIFUSIÓN CIENTÍFICA DE LOS RESULTADOS

La realización de esta tesis permitió realizar contribuciones científicas que fueron agregadas a la bibliografía mediante publicaciones y presentaciones en congresos, que resultaron sumamente importantes para la evaluación de la situación actual de la contaminación que se evidencia por el uso intensivo de estos herbicidas.

Publicaciones realizadas en revistas de interés científico:

Determination of glyphosate, AMPA and glufosinate in dairy farm water from Argentina using a simplified UHPLC-MS/MS method. Demonte, L.D., Michlig, N., Gaggiotti, M., Adam, C.G., Beldoménico, H.R., Repetti, M.R., *Sci. Total Environ.* 645, 34-43 (2018). DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.06.340.

Neonatal exposure to a glyphosate-based herbicide alters the histofunctional differentiation of the ovaries and uterus in lambs. Alarcón, R., Ingaramo, P.I., Rivera, O.E., Dioguardi, G.H., Repetti, M.R., Demonte, L.D., Milesi, M.M., Varayoud, J., Muñoz de Toro, M., Luque, E.H. *Mol. Cell. Biochem.* 482, 45-56 (2019). DOI: 10.1016/j.mce.2018.12.007.

Perinatal exposure to a glyphosate-based herbicide impairs female reproductive outcomes and induces second-generation adverse effects in Wistar rats. Milesi, M.M., Lorenz, V., Pacini, G., Repetti, M.R., Demonte, L.D., Varayoud, J., Luque, E.H. *Arch. Toxicol.* 92(8), 2629-2643 (2018). DOI: 10.1007/s00204-018-2236-6.

Monitoreo de glifosato en agua superficial en Entre Ríos. La investigación acción participativa como metodología de abordaje. Sasal, M.C., Wilson, M.G., Sione, S.M., Beghetto, S.M., Gabioud, E.A., Oszust, J.D., Paravani, E.V., Demonte, L.D., Repetti, M.R., Bedendo, D.J., Medero, S.L., Goette, J.J., Pautasso, N., Schulz, G.A. *RIA. Revista de Investigaciones Agropecuarias*, 43(2), 195-205 (2017).

Determinación de la concentración de glifosato en agua mediante la técnica de inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA). Paravani, E.V., Sasal, M.C., Sione, S.M., Gabioud, E.A., Oszust, J.D., Wilson, M.G., Demonte, L., Repetti, M.R. *Rev. Int. Contam. Ambie.* 32(4), 399-406 (2016). DOI: 10.20937/RICA.2016.32.04.03.

Glyphosate loss by runoff and its relationship with phosphorus fertilization. Sasal, M., Demonte, L., Cislighi, A., Gabioud, E., Oszust, J., Wilson, M., Michlig, N., Beldomenico, H., Repetti, M.R. *J. Agric. Food Chem.* 63, 4444-4448 (2015). DOI: 10.1021/jf505533r.

Participación en congresos nacionales e internacionales:

VII Congreso Argentino de Química Analítica. Mendoza, Argentina. 2013. Póster.

XXIV Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo y II Reunión Nacional Materia Orgánica y Sustancias Húmicas. Bahía Blanca, Argentina. 2014. Póster.

XIX Encuentro de Jóvenes Investigadores. Santa Fe, Argentina. 2015. Presentación oral.

Congreso Argentino de Espectrometría de Masas (CAEM).

- II CAEM. Los Cocos, Córdoba, Argentina. 2014. Póster.

- III CAEM. Rosario, Santa Fe, Argentina. 2016. Póster.

Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología Ambiental.

- II Congreso. Buenos Aires, Argentina. 2015. Póster.

- III Congreso. Santa Fe, Argentina. 2017. Presentación oral.

VII Congreso Argentino de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental (SETAC). San Luis, Argentina, 2018. Póster.

Latin American Pesticide Residue Workshop (LAPRW).

- 4th LAPRW, Bogotá, Colombia. 2013. Póster.

- 5th LAPRW, Santiago de Chile, Chile. 2015. Póster.

- 6th LAPRW, San José, Costa Rica. 2017. Póster.

- 7th LAPRW, Foz do Iguazú, Brasil. 2019. Póster.

European Pesticide Residue Workshop (EPRW).

- 10th EPRW, Dublin, Irlanda. 2014. Póster.

- 11th EPRW, Limassol, Chipre. 2016. Póster.

- 12th EPRW, Munich, Alemania. 2018. Póster.

13th IUPAC International Congress of Pesticide Chemistry. San Francisco, Estados Unidos. 2014.
Póster.

Premios y distinciones:

Premio al Mejor Trabajo Científico presentado bajo la modalidad póster en el VII Congreso Argentino de Química Analítica realizado en la Ciudad de Mendoza, Argentina del 1 al 4 de Octubre de 2013.

Trabajo: "Comparación de dos metodologías para la determinación de glifosato, glufosinato y AMPA mediante UHPLC-MS/MS".

Autores: Demonte, L., Repetti, M.R., Michlig, N., García, S., De Jesús, J.J., Beldoménico, H.

Premio al Mejor Trabajo del 5th Latin American Pesticide Residue Workshop (LAPRW), otorgado por la American Chemical Society.

Trabajo: "Development and validation of a simplified method for the determination of glyphosate, AMPA and glufosinate in water".

Autores: Demonte, L., Michlig, N., García, S., De Jesús, J.J., Beldoménico, H., Repetti, M.R.

CAPÍTULO 7

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CAPÍTULO 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alarcón, R., Ingaramo, P.I., Rivera, O.E., Dioguardi, G.H., Repetti, M.R., Demonte, L.D., Milesi, M.M., Varayoud, J., Muñoz de Toro, M., Luque, E.H., 2019. Neonatal exposure to a glyphosate-based herbicide alters the histofunctional differentiation of the ovaries and uterus in lambs. *Mol. Cell. Biochem.* 482, 45-56. DOI: 10.1016/j.mce.2018.12.007.
- Albers, C.N., Banta, G.T., Hansen, P.E., Jacobsen, O.S., 2009. The influence of organic matter on sorption and fate of glyphosate in soil—Comparing different soils and humic substances. *Environ. Pollut.* 157(10), 2865-2870. DOI: 10.1016/j.envpol.2009.04.004.
- Alder, L., Greulich, K., Kempe, G., Vieth, B., 2006. Residue Analysis of 500 High Priority Pesticides: Better by GC-MS or LC-MS/MS? *Mass Spectrom. Rev.* 25, 838-865. DOI: 10.1002/mas.20091.
- Alferness, P.L., Wiebe, L.A., 2001. Determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in crops by capillary gas chromatography with mass-selective detection. Collaborative Study. *J. AOAC Int.* 84(3), 823-845.
- Al-Rajab, A.J., Schiavon, M., 2010. Degradation of ¹⁴C-glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) in three agricultural soils. *J. Environ. Sci.* 22(9), 1374-1380. DOI: 10.1016/s1001-0742(09)60264-3.
- Anadón, A., Martínez-Larrañaga, M.R., Martínez, M.A., Castellano, V.J., Martínez, M., Martín, M.T., Nozal, M.J., Bernal, J.L., 2009. Toxicokinetics of glyphosate and its metabolite aminomethyl phosphonic acid in rats. *Toxicol. Lett.* 190, 91-95. DOI: 10.1016/j.toxlet.2009.07.008.
- Anastassiades, M., Kolberg, D.I., Eichhorn, E., Benkenstein, A., Wachtler, A-K., Zechmann, S., Mack, D., Wildgrube, C., Barth, A., Sigalov, I., Görlich, S., Dörk, D., Cerchia, G., 2019. Quick method for the analysis of numerous highly polar pesticides in foods of plant origin via LC-MS/MS involving simultaneous extraction with methanol (QuPPE-Method) (Enero 2019), EU Reference Laboratories for Residues of Pesticides, Version 10. Disponible en: http://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlSRM/meth_QuPPE-PO_EurlSRM.pdf (Accedido Febrero 2019).
- Anastassiades, M., Mack, D., Kolberg, D.I., 2009. Progress in the analysis of pesticides not amenable to multiresidue methods. Conferencia de cierre en el 2nd Latin American Pesticide Residue Workshop. Santa Fe, Argentina.
- Aparicio, V., De Geronimo, E., Marino, D., Primost, J., Carriquiriborde, P., Costa, J.L., 2013. Environmental fate of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in surface waters and soil of agricultural basins. *Chemosphere* 93(9), 1866-1873. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2013.06.041.
- Aparicio, V.C., Aimar, S., De Gerónimo, E., Mendez, M. J., Costa, J.L., 2018. Glyphosate and AMPA concentrations in wind-blown material under field conditions. *Land Degrad Dev.* 29(5), 1317-1326. DOI:10.1002/ldr.2920.
- Arregui, M.C., Scotta, R.R., Sánchez, D., 2009. Fitotoxicidad del barbecho químico en trigo y maíz. *Agrociencia* 43, 595-601.
- Arroyave, J.M., Waiman, C.C., Zanini, G.P., Avena, M.J., 2016. Effect of humic acid on the adsorption/desorption behavior of glyphosate on goethite. Isotherms and kinetics. *Chemosphere* 145, 34-41. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2015.11.082.

- Ávila-Vázquez, M., Maturano, E., Etchegoyen, A., Difilippo, F., Maclean, B., 2017. Association between cancer and environmental exposure to glyphosate. *Int. J Clin Med.* 8, 73-85. DOI: 10.4236/ijcm.2017.82007.
- Ayarragaray, M., Regaldo, L., Reno, U., Gutiérrez, M.F., 2015. Monitoreo de glifosato y ácido aminometilfosfónico (AMPA) en ambientes acuáticos cercanos a la ciudad de San Justo (Santa Fe, Argentina). Tesis de maestría en Gestión Ambiental. FICH-UNL.
- Bai, S.H., Ogbourne, S.M., 2016. Glyphosate: environmental contamination, toxicity and potential risks to human health via food contamination. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23(19), 18988-19001. DOI: 10.1007/s11356-016-7425-3.
- Baldwin, R.L., Connor, E.E., 2017. Rumen function and development. *Vet. Clin. Food Anim. Pract.* 33(3), 427-439. DOI: 10.1016/j.cvfa.2017.06.001.
- Battaglin, W.A., Kolpin, D.W., Scribner, E.A., Kuivila, K.M., Sandstrom, M.W., 2005. Glyphosate, other herbicides, and transformation products in Midwestern streams. *J Am Water Resour Assoc.* 41(2), 323-332. DOI: 10.1111/j.1752-1688.2005.tb03738.x.
- Battaglin, W.A., Meyer, M.T., Kuivila, K.M., Dietze, J.E., 2014. Glyphosate and Its Degradation Product AMPA Occur Frequently and Widely in U.S. Soils, Surface Water, Groundwater, and Precipitation. *J Am Water Resour Assoc.* 50(2), 275-290. DOI: 10.1111/jawr.12159.
- Bauer, K.-H., Knepper, T.P., Maes, A., Schatz, V., Voihsel, M., 1999. Analysis of polar organic micropollutants in water with ion chromatography-electrospray mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 837, 117-128. DOI: 10.1016/S0021-9673(99)00048-5.
- Beldoménico, H.R., García, S.R., De Jesús, J.J., Repetti, M.R., 2012. Residuos de plaguicidas, Material de Estudio para la asignatura Residuos Químicos Contaminantes de los Alimentos, Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral. Apunte impreso, accesible en Librería CEIQ-FIQ-UNL. Versión consultada: Revisión 2do. Cuatrimestre de 2012, 1-159.
- Benbrook, C.M., 2016. Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. *Environ Sci Eur* 28:3. DOI: 10.1186/s12302-016-0070-0.
- Berg, C.J., King, H.P., Delenstarr, G., Kumar, R., Rubio, F., Glaze, T., 2018. Glyphosate residue concentrations in honey attributed through geospatial analysis to proximity of large-scale agriculture and transfer off-site by bees. *PLOS ONE* 13(7), 1-18. DOI: 10.1371/journal.pone.0198876.
- Bernal, J., Bernal, J.L., Martín, M.T., Nozal, M.J., Anadón, A., Martínez-Larrañaga, M.R., Martínez, M.A., 2010. Development and validation of a liquid chromatography-fluorescence-mass spectrometry method to measure glyphosate and aminomethylphosphonic acid in rat plasma. *J. Chromatogr. B* 878, 3290-3296. DOI: 10.1016/j.jchromb.2010.10.013.
- Börjesson, E., Torstensson, L., 2000. New methods for determination of glyphosate and (aminomethyl)phosphonic acid in water and soil. *J. Chromatogr. A* 886, 207-216. DOI: 10.1016/S0021-9673(00)00514-8.
- Botero-Coy, A.M., Ibáñez, M., Sancho, J.V., Hernández, F., 2013. Improvements in the analytical methodology for the residue determination of the herbicide glyphosate in soils by liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1292, 132-141. DOI: 10.1016/j.chroma.2012.12.007.
- Bus, J.S., 2015. Analysis of Moms across America report suggesting bioaccumulation of glyphosate in U.S. mother's breast milk: implausibility based on inconsistency with available body of glyphosate animal toxicokinetic, human biomonitoring, and physico-

- chemical data. Regul. Toxicol. Pharmacol. 73, 758-764. DOI: 10.1016/j.yrtph.2015.10.022.
- CAA, 2019. Código Alimentario Argentino. Capítulo VIII Alimentos Lácteos. Capítulo XII Bebidas hídricas. Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica Ministerio de Salud de la Nación, Argentina. Disponible en: <https://www.argentina.gob.ar/anmat/codigoalimentario> (Accedido Diciembre 2019).
- Carabias-Martínez, R., Rodríguez-Gonzalo, E.R., Fernández-Laespada, M.E., Calvo-Seronero, L., Sánchez-San Román F.J., 2003. Evolution over time of the agricultural pollution of waters in an area of Salamanca and Zamora (Spain). *Water Res.* 37, 928-938. DOI: 10.1016/s0043-1354(02)00366-4.
- Carabias-Martínez, R., Rodríguez-Gonzalo, E.R., Herrero-Hernández, E., Hernández-Méndez, J., 2004. Simultaneous Determination of Phenyl-and Sulfonylurea Herbicides in Water by Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography with UV Diode Array or Mass Spectrometric Detection. *Anal. Chim. Acta* 517, 71-79. DOI: 10.1016/s0021-9673(01)01613-2.
- CCME, 2019. Canadian Council of Ministers of the Environment (Consejo Canadiense de Ministros del Medio Ambiente). Pautas de Calidad de Canadá. Disponible en: https://www.ccme.ca/en/resources/canadian_environmental_quality_guidelines/index.html (Accedido Noviembre 2019).
- CE, 1998. Comisión Europea, 1998. Directiva 98/83/CE del Consejo del 3 de noviembre de 1998 relativa a la calidad de las aguas destinadas al consumo humano. *Diario Oficial de la Comunidad Europea* L 330/32, 5.12.98, p. 1-23. Disponible en: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:31998L0083&from=ES> (Accedido Noviembre 2019).
- CE, 2006. Comisión Europea, 2006. Directiva (CE) N° 125/2006 de la Comisión relativa a los alimentos elaborados a base de cereales y alimentos infantiles para lactantes y niños de corta edad. *Diario Oficial de la Comunidad Europea* L 339/16, 6.12.2006, p. 1-20. Disponible en: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:32006L0125&from=ES> (Accedido Noviembre 2019).
- CE, 2009. Comisión Europea, 2009. Reglamento (CE) N° 1107/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo relativo a la comercialización de productos fitosanitarios y por el que derogan las Directivas 79/117/CEE y 91/414/CEE del Consejo. *Diario Oficial de la Comunidad Europea* OJ L 309, 24.11.2009, p. 1-50. Disponible en: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:309:0001:0050:ES:PDF> (Accedido Noviembre 2019).
- CEPA, 2019. Canadian Environmental Protection Act (CEPA). Disponible en: <https://www.canada.ca/en.html> (Accedido Noviembre 2019).
- Chamkasem, N., Harmon, T., 2016. Direct determination of glyphosate, glufosinate, and AMPA in soybean and corn by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 408(18), 4995-5004. DOI: 10.1007/s00216-016-9597-6.
- Chamkasem, N., Morris, C., Harmon, T., 2016. Direct determination of glyphosate, glufosinate, and AMPA in honey by liquid chromatography/tandem mass spectrometer. Southeast Regional Laboratory, U.S. Food and Drug Administration, Atlanta, GA.
- Chang, F.C., Simcik, M.F., Capel, P.D., 2011. Occurrence and fate of the herbicide glyphosate and its degradate aminomethylphosphonic acid in the atmosphere. *Environ. Toxicol. Chem.* 30, 548-555. DOI: 10.1002/etc.431.

- Codex Alimentarius, 2019. Glosario de términos. Disponible en: <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/dbs/pestres/glossary/es/> (Accedido Mayo 2019).
- Codex Alimentarius, 2019b. Base de datos de LMR de plaguicidas. Disponible en: <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/dbs/pestres/pesticides/es/> (Accedido Noviembre 2019).
- CONICET, 2009. Informe del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET): Evaluación de la información científica vinculada al glifosato en su incidencia sobre la salud humana y el ambiente.
- Cullum, N., Schuhn, B., 2013. Analysis of glyphosate and AMPA in drinking water with the Agilent 1200 Infinity Series Online SPE Solution. Agilent Technologies, Application note, publication number 5991-3208EN.
- Daouk, S., Grandjean, D., Chevre, N., De Alencastro, L.F., Pfeifer, H-R., 2013. The herbicide glyphosate and its metabolite AMPA in the Lavaux vineyard area, western Switzerland: Proof of widespread export to surface waters. Part I: Method validation in different water matrices. *J. Environ. Sc. Health B* 48, 717-724. DOI: 10.1080/03601234.2013.780535.
- Defarge, N., Takács, E., Lozano, V.L., Mesnage, R., Spiroux de Vendômois, J., Séralini, G.E., Székács, A., 2016. Co-formulants in glyphosate-based herbicides disrupt aromatase activity in human cells below toxic levels. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 13, 264. DOI: 10.3390/ijerp h1303 0264.
- Demonte, L.D., Michlig, N., Gaggiotti, M., Adam, C.G., Beldoménico, H.R., Repetti, M.R., 2018. Determination of glyphosate, AMPA and glufosinate in dairy farm water from Argentina using a simplified UHPLC-MS/MS method. *Sci. Total Environ.* 645, 34-43. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.06.340.
- Di Fiori, E., Pizarro, H., Dos Santos, A.M., Cataldo, D., 2012. Impact of the invasive mussel *Limnoperna fortunei* on glyphosate concentration in water. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 81, 106-113. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2012.04.024.
- Díez, C., Traag, W.A., Zommer, P., Marinero, P., Atienza, J., 2006. Comparison of an acetonitrile extraction/portioning and “dispersive solid-phase extraction” method with classical multi-residue methods for the extraction of herbicide residues in barley samples. *J. Chromatogr. A* 1131, 11-23. DOI: 10.1016/j.chroma.2006.07.046.
- Duke, S.O., Rimando, A.M., Pace, P.F., Reddy, K.N., Smeda, R.J., 2003. Isoflavone, glyphosate and aminomethylphosphonic acid levels in seeds of glyphosate-treated, glyphosate-resistant soybean. *J. Agr. Food Chem.* 51, 340-344. DOI: 10.1021/jf025908i.
- EFSA, 2014. European Food Safety Authority, 2014. The 2012 European Union Report on pesticide residues in food. *EFSA Journal* 12.
- Ehling, S., Reddy, T.M., 2015. Analysis of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in nutritional ingredients and milk by derivatization with fluorenylmethyloxycarbonyl chloride and liquid chromatography–mass spectrometry. *J Agr. Food Chem.* 63(48), 10562-10568. DOI: 10.1021/acs.jafc.5b04453.
- EPA, 2017. Glyphosate. Dietary exposure analysis in support of registration review. <https://www.regulations.gov/document?D=EPA-HQ-OPP-2009-0361-0071> (Accedido Enero 2019).
- EPA, 2018. Edition of the Drinking Water Standards and Health Advisories Tables, Marzo 2018. Office of Water, U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC. Disponible en:

- <https://www.epa.gov/sites/production/files/2018-03/documents/dwtable2018.pdf>
(Accedido Noviembre 2019).
- EPA, 2019. Environmental Protection Agency (EPA), Washington, DC, United States of America (USA). Disponible en: <https://www.epa.gov/> (Accedido Noviembre 2019).
- EPA, 2019b. Valores de referencia de vida acuática y evaluaciones de riesgo ecológico para plaguicidas registrados, actualizados al 30 de septiembre de 2019. Disponible en: <https://www.epa.gov/pesticide-science-and-assessing-pesticide-risks/aquatic-life-benchmarks-and-ecological-risk> (Accedido Noviembre 2019).
- Etchegoyen, A., 2014. Distribución de plaguicidas en aguas y sedimentos de fondo en los principales afluentes de la cuenca del Paraguay-Paraná. Trabajo Final de Licenciatura, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP, p. 84.
- European Commission (EC), 2015. Directorate-general for Health and Food Safety, Safety of the Food Chain Pesticides and Biocides, SANTE/11945/2015, Guidance Document on Analytical Quality Control and Method Validation Procedures for Pesticides Residues Analysis in Food and Feed. Supersedes SANCO/12571/2013, Implemented by 01/01/2016.
https://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/09_Untersuchungen/00_Rechtsgrundlagen/01_EU/Qualitätssicherung_Pestizidanalytik_SANTE_11945_2015.pdf?__blob=publicationFile&v=4 (Accedido Octubre 2019).
- European Commission (EC), 2017. Directorate-general for Health and Food Safety, Safety of the Food Chain Pesticides and Biocides, SANTE/11813/2017, Guidance Document on Analytical Quality Control and Method Validation Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed. Supersedes SANTE/11945/2015, Implemented by 01/01/2018.
https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides_mrl_guidelines_wrkdc_2017-11813.pdf (Accedido Septiembre 2019).
- Faber, M.J., Stephenson, G.R., Thompson, D.G., 1997. Persistence and leachability of glufosinate-ammonium in a northern Ontario terrestrial environment. *J. Agr. Food Chem.* 45, 3672-3676. DOI: 10.1021/jf970045s.
- FAO, 2017. Presentación y evaluación de los datos sobre residuos de plaguicidas para la estimación de los límites máximos de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos. Publicaciones FAO, Roma. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-i5452s.pdf> (Accedido Noviembre 2019).
- Fernández-Alba AR. (Ed.), 2005. Chromatographic-Mass Spectrometric Food Analysis for Trace Determination of Pesticide Residues *Comprehensive analytical Chemistry*, Vol. XLIII; Elsevier, Holanda.
- Fischer, R., Byerlee, D., Edmeades, G., 2014. Crop yields and global food security: will yield increase continue to feed the world? Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra.
- Flury, M., 1996. Experimental evidence of transport of pesticides through field soil. A review. *J. Environ. Qual.* 25(1), 25-45. DOI: 10.2134/jeq1996.00472425002500010005x.
- Freuze, I., Jadas-Hecart, A., Royer, A., Communal, P-Y., 2007. Influence of complexation phenomena with multivalent cations on the analysis of glyphosate and aminomethyl phosphonic acid in water. *J. Chromatogr. A* 1175, 197-206. DOI: 10.1016/j.chroma.2007.10.092.

- Fussell, R.J., Dickinson, M., Findlay, D., 2009. The analysis of glyphosate and other ionic pesticides using suppressed ion chromatography-tandem mass spectrometry. 2nd Latin American Pesticide Residues Workshop (LAPRW). Junio 2009, Santa Fe, Argentina.
- Gallina, M.A., Stephenson, G.R., 1992. Dissipation of [¹⁴C]Glufosinate ammonium in two Ontario soils. *J. Agr. Food Chem.* 40, 165-168.
- Gan, J., Bondarenko, S., 2008. Determination of pesticides in water. In *analysis of pesticides in food and environmental samples*, Tadeo, J.L., Ed. CRC Press, Taylor & Francis Group: Boca Raton, 2008.
- García-Reyes, J.F., Hernando, M.D., Molina-Díaz A., Fernández-Alba A.R., 2007. Comprehensive screening of target, non-target and unknown pesticides in food by LC-TOF-MS. *Trends Anal. Chem.* 26, 828-841. DOI: 10.1016/j.trac.2007.06.006.
- Guo, H., Riter, L.S., Wujcik, C.E., Armstrong, D.W., 2016. Direct and sensitive determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in environmental water samples by high performance liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1443, 93-100. DOI: 10.1016/j.chroma.2016.03.020.
- Guyton, K.Z., Loomis, D., Grosse, Y., Ghisassi, F., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Scocciati, C., Mattock, H., Straif, K., 2015. Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate. *The Lancet Oncology* 16(5), 490-491. DOI: 10.1016/s1470-2045(15)70134-8.
- Hanke, I., Singer, H., Hollender, J., 2008. Ultratrace-level determination of glyphosate, aminomethylphosphonic acid and glufosinate in natural waters by solid-phase extraction followed by liquid chromatography–tandem mass spectrometry: performance tuning of derivatization, enrichment and detection. *Anal. Bioanal. Chem.* 39, 2265-2276. DOI: 10.1007/s00216-008-2134-5.
- Hao, C., Morse, D., Morra, F., Zhao, X., Yang, P., Nunn, B., 2011. Direct aqueous determination of glyphosate and related compounds by liquid chromatography/tandem mass spectrometry using reversed-phase and weak anion-exchange mixed-mode column. *J. Chromatogr. A* 1218, 5638-5643. DOI: 10.1016/j.chroma.2011.06.070.
- Hernández, F., 2010. Análisis de residuos de plaguicidas polares, con especial énfasis en el herbicida glifosato: problemática analítica, en: Camino, M., Aparicio V. (Eds.), *Aspectos ambientales del uso de glifosato*, pp. 9-15. https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-aspectos_ambientales_del_uso_de_glifosato__version_pa.pdf (Accedido Mayo 2019).
- Hernández, F., Pozo, O.J., Sancho, J.V., López, F.J., Marín, J.M., Ibáñez, M., 2005. Strategies for quantification and confirmation of multi-class polar pesticides and transformation products in water by LC-MS/MS using triple quadrupole and hybrid quadrupole-time of flight analysers. *Trends Anal. Chem.* 24(7), 596-612. DOI: 10.1016/j.trac.2005.04.007.
- Hirose, Y., Kobayashi, M., Koyama, K., Kohda, Y., Tanaka, T., Honda, H., Hori, Y., Yoshida, K., Kikuchi, M., 1999. A toxicokinetic analysis in a patient with acute glufosinate poisoning. *Hum. Exp. Toxicol.* 18(5), 305-308. DOI: 10.1191/096032799678840110.
- Hjorth, K., Hermann, S.S., Christensen, H.B., Poulsen, M.E., 2010. Cereals and feeding stuff-production, consumption and pesticides (Version 4). CRL for Cereals and Feeding Stuff National Food Institute Danish Technical University. Disponible en: https://www.eurl-pesticides.eu/library/docs/cf/Cereals%20and%20feedingstuff%202009%20_4_.pdf (Accedido Noviembre 2019).

- Hoerlein, G., 1994. Glufosinate (phosphinothricin), a natural amino acid with unexpected herbicidal properties. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 138, 73-145. DOI: 10.1007/978-1-4612-2672-7_4.
- Hori, Y., Fujisawa, M., Shimada, K., Hirose, Y., 2003. Determination of the herbicide glyphosate and its metabolite in biological specimens by gas chromatography-mass spectrometry. A case of poisoning by Roundup herbicide. *J. Anal. Toxicol.* 27, 162-166. DOI: 10.1093/jat/27.3.162.
- Ibáñez, M., Pozo, O.J., Sancho, J.V., López, F.J., Hernández, F., 2005. Residue determination of glyphosate, glufosinate and aminomethylphosphonic acid in water and soil samples by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1081, 145-155. DOI: 10.1016/j.chroma.2005.05.041.
- Ibáñez, M., Pozo, O.J., Sancho, J.V., López, F.J., Hernández, F., 2006. Re-evaluation of glyphosate determination in water by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1134, 51-55. DOI: 10.1016/j.chroma.2006.07.093.
- Ingaramo, P.I., Varayoud, J., Milesi, M.M., Guerrero Schimpf, M., Muñoz de Toro, M., Luque, E.H., 2016. Effects of neonatal exposure to a glyphosate-based herbicide on female rat reproduction. *Reproduction* 152, 403-415. DOI: 10.1530/REP-16-0171.
- Ingaramo, P.I., Varayoud, J., Milesi, M.M., Guerrero Schimpf, M., Alarcón, R., Muñoz de Toro, M., Luque, E.H., 2017. Neonatal exposure to a glyphosate-based herbicide alters uterine decidualization in rats. *Reprod Toxicol.* 73, 87-95. DOI: 10.1016/j.reprotox.2017.07.022.
- INTA, 2011. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Protocolo de muestreo, transporte y conservación de muestras de agua con fines múltiples (consumo humano, abrevado animal y riego). https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-protocolo_de_muestreo_de_aguas_inta.pdf (Accedido Mayo 2019).
- ISAAA, 2016. International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA). Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2016. Brief 52. <https://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/52/download/isaaa-brief-52-2016.pdf> (Accedido Mayo 2019).
- ISO, 2014. International Standardization Organization (ISO) N° 16308, September 2014. Water quality-Determination of glyphosate and AMPA-Method using high performance liquid chromatography (HPLC) with tandem mass spectrometric detection.
- Jaynes, D.B., Ahmed, S.I., Kung, K.J.S., Kanwar, R.S., 2001. Temporal dynamics for preferential flow to a subsurface drain. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 65, 1368-1376. DOI: 10.2136/sssaj2001.6551368x.
- Jeannot, R., Sabik, H., Sauvard, E., Genin, E., 2000. Application of liquid chromatography with mass spectrometry combined with photodiode array detection and tandem mass spectrometry for monitoring pesticides in surface waters. *J. Chromatogr. A* 879, 51-71. DOI: 10.1016/S0021-9673(00)00098-4.
- Kataoka, H., Ryu, S., Sakiyama, N., Makita, M., 1996. Simple and rapid determination of the herbicides glyphosate and glufosinate in river water, soil and carrot samples by gas chromatography with flame photometric detection. *J. Chromatogr. A* 726, 253-258. DOI: 10.1016/0021-9673(95)01071-8.
- Kjær, J., Ernstsen, V., Jacobsen, O.H., Hansen, N., de Jonge, L.W., Olsen, P., 2011. Transport modes and pathways of the strongly sorbing pesticides glyphosate and pendimethalin

- through structured drained soils. *Chemosphere*, 84(4), 471-479. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2011.03.029.
- Krüger, M., Schledorn, P., Schrödl, W., Hoppe, H-W., Lutz, W., Shehata, A.A., 2014a. Detection of glyphosate residues in animals and humans. *J Environ Anal Toxicol* 4:210. DOI: 10.4172/2161-0525.1000210.
- Krüger, M., Schrödl, W., Pedersen, I., Shehata, A.A., 2014b. Detection of glyphosate in malformed piglets. *J. Environ. Anal. Toxicol.* 4, 230. DOI: 10.4172/2161-0525.1000230.
- Kwon, H., Lehotay, S.J., Geis-Asteggiante, L., 2012. Variability of matrix effects in liquid and gas chromatography–mass spectrometry analysis of pesticide residues after QuEChERS sample preparation of different food crops. *J. Chromatogr. A* 1270, 235-245. DOI: 10.1016/j.chroma.2012.10.059.
- Lee, H-L., Chen, K-W., Chi, C-H., Huang, J-J., Tsai, L-M., 2000. Clinical Presentations and Prognostic Factors of a Glyphosate - Surfactant Herbicide Intoxication A Review of 131 Cases. *Acad. Emerg. Med.*, 7(8), 906-910. DOI: 10.1111/j.1553-2712.2000.tb02069.x.
- Lee, H-Y., Song, S-Y., Lee, S-H., Lee, S-Y., Kim, S-H., Ryu, S-W., 2009. Vasogenic edema in striatum following ingestion of glufosinate-containing herbicide. *J. Clin. Neurosci.* 16(10), 1372-1373. DOI: 10.1016/j.jocn.2009.03.037.
- Lehotay, S., Mastovka, K., Lightfield, A.R., 2005. Use of buffering and other means to improve results of problematic in a fast and easy method for residue analysis of fruits and vegetables. *J. AOAC Int.*, 88(2), 615-629.
- Lehotay, S.J., Mastovska, K., Amirav, A., Fialkov, A.B., Alon, T., Martos, P.A., de Kok, A., Fernández-Alba, A.R., 2008. Identification and confirmation of chemical residues in food by chromatographic-mass spectrometry and other techniques. *Trends Anal. Chem.* 27(11), 1070-1090. DOI: 10.1016/j.trac.2008.10.004.
- Lehotay, S.J., Son, K.A., Kwon, H., Koesukwiwat, U., Fu, W., Mastovska, K., Hoh, E., Leepipatpiboon, N., 2010. Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. *J. Chromatogr. A* 1217(16), 2548-2560. DOI: 10.1016/j.chroma.2010.01.044.
- Li, B., Deng, X., Guo, D., Jin, S., 2007. Determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid residues in foods using high performance liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry. *Chin. J. Chromatogr.* 25(4), 486–490. DOI: 10.1016/S1872-2059(07)60017-0.
- López, S.L., Aiassa, D., Benítez-Leite, S., Lajmanovich, R., Mañas, F., Poletta, G., Sánchez, N., Simoniello, M.F., Carrasco A.E., 2012. Pesticides used in South American GMO-based agriculture: A review of their effects on humans and animal models. In Fishbein, J.C., Heilman, J.M. (Eds): *Advances in Molecular Toxicology*, Vol. 6, Amsterdam: The Netherlands, 41-75.
- Mallet, C., 2014. Analysis of glyphosate, glufosinate and AMPA in tap and surface water using open-architecture UPLC with 2D-LC technology. <http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720005169en.pdf> (Accedido Mayo 2019).
- Manahan S.E., 2007. *Introducción a la química ambiental*. Ed. Reverté. Barcelona, España, 725 pp.
- Mañas, F., Peralta, L., Raviolo, J., Ovando, H.G., Weyers, A., Ugnia, L., Cid, M.G., Larripa, I., Gorla, N., 2009. Genotoxicity of AMPA, the environmental metabolite of glyphosate,

- assessed by the Comet assay and cytogenetic tests. *Ecotoxicol. Environ. Safety* 72(3), 834-837. DOI: 10.1016/j.etap.2009.02.001.
- Marek, L.J., Koskinen, W.C., 2014. Simplified analysis of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in water, vegetation and soil by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Pest. Manag. Sci.* 70(7), 1158-1164. DOI: 10.1002/ps.3684.
- Marín, J.M., Gracia-Lor, E., Sancho, J.V., López, F.J., Hernández, F., 2009. Application of ultra-high-pressure liquid chromatography - tandem mass spectrometry to the determination of multi-class pesticides in environmental and wastewater samples: Study of matrix effects. *J. Chromatogr. A* 1216, 1410-1420. DOI: 10.1016/j.chroma.2008.12.094.
- Marín, J.M., Sancho, J.V., Pozo, O.J., López, F.J., Hernández, F., 2006. Quantification and confirmation of anionic, cationic and neutral pesticides and transformation products in water by on-line solid phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1133, 204-214. DOI: 10.1016/j.chroma.2006.08.055.
- Matsukawa, Y., Hachisuka, H., Sawada, S., Horie, T., Kitammi, Y., Nishijima, S., 1991. Bialaphos Poisoning With Apnea and Metabolic Acidosis. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 29(1), 141-146. DOI: 10.3109/155636591090386.
- Méndez, M.J., Aimar, S.B., Aparicio, V.C., Ramirez Haberkon, N.B., Buschiazzi, D.E., De Gerónimo, E., Costa, J.L., 2017. Glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) contents in the respirable dust emitted by an agricultural soil of the central semiarid region of Argentina. *Aeol. Res.* 29, 23-29. DOI: 10.1016/j.aeolia.2017.09.004.
- Mesnager, R., Bernay, B., Séralini, G.E., 2013. Ethoxylated adjuvants of glyphosate-based herbicides are active principles of human cell toxicity. *Toxicology* 313, 122-128. DOI: 10.1016/j.tox.2012.09.006.
- Milesi, M.M., Lorenz, V., Pacini, G., Repetti, M.R., Demonte, L.D., Varayoud, J., Luque, E.H., 2018. Perinatal exposure to a glyphosate-based herbicide impairs female reproductive outcomes and induces second-generation adverse effects in Wistar rats. *Arch. Toxicol.* 92(8), 2629-2643. DOI: 10.1007/s00204-018-2236-6.
- Ministerio de Agroindustria de Argentina, 2016. Agroindustrial data, 2015-2016 agricultural estimates. <https://datos.agroindustria.gob.ar/dataset/estimaciones-agricolas/archivo/95d066e6-8a0f-4a80-b59d-6f28f88eacd5> (Accedido Mayo 2019).
- Mol, H., Rooseboom, A., Van Dam, R., Roding, M., Arondeus, K., Sunarto, S., 2007. Modification and re-validation of the ethyl acetate-based multi-residue method for pesticide in produce. *Anal. Bioanal. Chem.* 389, 1715-1754. DOI: 10.1007/s00216-007-1357-1.
- Morillo, E., Undabeytia, T., Maqueda, C., 1997. Adsorption of glyphosate on the clay mineral montmorillonite: effect of Cu(II) in solution and adsorbed on the mineral. *Environ. Sci. Technol.* 31, 3588-3592. DOI: 10.1021/es970341l.
- Motojyuku, M., Saito, T., Akieda, K., Otsuka, H., Yamamoto, I., Inokuchi, S., 2008. Determination of glyphosate, glyphosate metabolites, and glufosinate in human serum by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 875, 509-514. DOI: 10.1016/j.jchromb.2008.10.003.
- Moye, H.A., Boning, A.J., 1979. A versatile fluorogenic labelling reagent for primary and secondary amines: 9-fluorenylmethyl chloroformate. *Anal. Lett.* 12 (B1), 25-35. DOI: 10.1080/00032717908082516.
- Myers, J.P., Antoniou, M.N., Blumberg, B., Carroll, L., Colborn, T., Everett, L.G., Hansen, M., Landrigan, P.J., Lanphear, B.P., Mesnager, R., Vandenberg, L.N., vom Saal, F.S., Welshons, W.V., Benbrook, C.M., 2016. Concerns over use of glyphosate-based herbicides and risks

- associated with exposures: a consensus statement. *Environ. Health* 15, 19. DOI: 10.1186/s12940-016-0117-0.
- Niemann, L., Sieke, C., Pfeil, R., Solecki, R., 2015. A critical review of glyphosate findings in human urine samples and comparison with the exposure of operators and consumers. *J. Verbr. Lebensm.* 10, 3-12. DOI: 10.1007/s00003-014-0927-3.
- Ohtake, T., Yasuda, H., Takahashi, H., Goto, T., Suzuki, K., Yonemura, K., Hishida, A., 2001. Decreased plasma and cerebrospinal fluid glutamine concentrations in a patient with bialaphos poisoning. *Hum. Exp. Toxicol.* 20, 429-434. DOI: 10.1191/096032701682692973.
- Okada, E., Costa, J.L., Bedmar, F. 2016. Adsorption and mobility of glyphosate in different soils under no-till and conventional tillage. *Geoderma* 263, 78-85. DOI: 10.1016/j.geoderma.2015.09.009.
- Okada, E., Allinson, M., Barral, M. P., Clarke, B., Allinson, G., 2019. Glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) are commonly found in urban streams and wetlands of Melbourne, Australia. *Water Res.* 115139. DOI: 10.1016/j.watres.2019.115139.
- OMS, 2009. The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification: 2009. Disponible en: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44271/9789241547963_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y (Accedido Noviembre 2019).
- OMS, 2018. Guías para la calidad del agua de consumo humano, 4° edición. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/272403/9789243549958-spa.pdf?ua=1> (Accedido Noviembre 2019).
- OMS, 2019. Datos y cifras. Disponible en: <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/pesticide-residues-in-food> (Accedido Octubre 2019).
- Oulkar, D.P., Hingmire, S., Goon, A., Jadhav, M., Ugare, B., Shabeer Thekkumpurath, A., 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. *J. AOAC Int.* 100(3), 1-9. DOI: 10.5740/jaoacint.17-0046.
- PAN, 2019. Pesticide Action Network (PAN) Data Base. Disponible en: http://www.pesticideinfo.org/Search_Chemicals.jsp (Accedido Septiembre 2019).
- Petersen, C.T., Holm, J., Koch, C.B., Jensen, H.E., Hansen, S., 2002. Movement of pendimethalin, ioxynil and soil particles to field drainage tiles. *Pest Manag. Sci.* 59, 85-96. DOI: 10.1002/ps.609.
- Pimenta, E.M., da Silva, F.F., Barbosa, E.S., Cacique, A.P., Cassimiro, D.L., de Pinho, G.P., Silvério, F.O. 2019. Quantification of glyphosate and AMPA by HPLC-ICP-MS/MS and HPLC-DAD: a comparative study. *J. Braz. Chem. Soc.*, 00, 1-7. DOI: 10.21577/0103-5053.20190175.
- Pizzutti, I.R., de Kok, A., Hiemstra, M., Wickert, C., Prestes, O.D., 2009. Method validation and comparison of acetonitrile and acetone extraction for the analysis of 169 pesticides in soya grain by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J.Chromatogr. A* 1216, 4539-4552. DOI: 10.1016/j.chroma.2009.03.064.
- Poiger, T., Buerge, I.J., Bächli, A., Müller, M.D., Balmer, M.E., 2016. Occurrence of the herbicide glyphosate and its metabolite AMPA in surface waters in Switzerland determined with

- on-line solid phase extraction LC-MS/MS. *Environ Sci. Pollut. Res.* 24(2), 1588-1596. DOI: 10.1007/s11356-016-7835-2.
- Poisot, A.S., Speedy, A., Kueneman, E., 2004. Good Agricultural Practices – a working concept. Background paper for the FAO Internal Workshop on Good Agricultural Practices. Rome, Italy 27-29 October 2004. Disponible en <http://www.fao.org/tempref/docrep/fao/010/ag856e/ag856e00.pdf> (Accedido Agosto 2019).
- Pórfido, O.D., 2014. Los plaguicidas en la República Argentina. Ed. Buenos Aires: Ministerio de Salud de la Nación, 2013. 192 p. ISBN 978-950-38-0160-4. Disponible en: http://www.msal.gob.ar/images/stories/bes/graficos/0000000341cnt-14-Plaguicidas_Argentina.pdf (Accedido Noviembre 2019).
- PPDB, 2019. University of Hertfordshire: Pesticide Properties DataBase (PPDB). <https://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/> (Accedido Septiembre 2019).
- Primost, J.E., Marino, D.J., Aparicio, V.C., Costa, J.L., Carriquiriborde, P., 2017. Glyphosate and AMPA, “pseudo-persistent” pollutants under real-world agricultural management practices in the Mesopotamic Pampas agroecosystem, Argentina. *Environ Pollut* 229, 771-779. DOI: 10.1016/j.envpol.2017.06.006.
- Rendon-von Osten, J. y 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. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 14(6), 595. DOI: 10.3390/ijerph14060595.
- Richard, S., Moslemi, S., Sipahutar, H., Benachour, N., Seralini, G.E., 2005. Differential effects of glyphosate and roundup on human placental cells and aromatase. *Environ. Health Perspect.* 113, 716-720. DOI: 10.1289/ehp.7728.
- Rivera, O.E., Varayoud, J., Rodríguez, H.A., Muñoz-de-Toro, M., Luque, E.H., 2011. Neonatal exposure to bisphenol A or diethylstilbestrol alters the ovarian follicular dynamics in the lamb. *Reprod. Toxicol.* 32, 304-312. DOI: 10.1016/j.reprotox.2011.06.118.
- Ronco A.E., Marino D.J.G., Abelando M., Almada P., Apartin C.D., 2016. Water quality of the main tributaries of the Paraná Basin: glyphosate and AMPA in surface water and bottom sediments. *Environ. Monit. Assess.* 188, 458. DOI: 10.1007/s10661-016-5467-0.
- Roustan, A., Aye, M., De Meo, M., Di Giorgio, C., 2014. Genotoxicity of mixtures of glyphosate and atrazine and their environmental transformation products before and after photoactivation. *Chemosphere* 108, 93-100. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2014.02.079.
- SAGPyA, 1999. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación. Resolución 350/99 ‘Manual de Procedimientos, Criterios y Alcances para el Registro de Productos Fitosanitarios en la República Argentina’. Disponible en: <http://servicios.infoleg.gob.ar/infolegInternet/anexos/55000-59999/59812/norma.htm> (Accedido Mayo 2019).
- Santa Fe, 1994. Ley N° 11220. Prestación y regulación de los servicios sanitarios. Legislatura de la Provincia de Santa Fe, Argentina. Disponible en: <https://www.santafe.gov.ar/normativa/getFile.php?id=222757&item=107685&cod=84da10893ac46c0d0da282dc091c2bb6> (Accedido Enero 2020).
- Sasal, M.C., Andriulo, A.E., Wilson, M.G., Portela, S.I., 2010. Pérdidas de glifosato por drenaje y escurrimiento en molisoles bajo siembra directa. *Inf. Tecnol.* 21(5), 135-142. DOI: 10.1612/inf.tecnol.43741it.09.

- Sasal, M., Demonte, L., Cislighi, A., Gabioud, E., Oszust, J., Wilson, M., Michlig, N., Beldomenico, H., Repetti, M.R., 2015. Glyphosate loss by runoff and its relationship with phosphorus fertilization. *J. Agric. Food Chem.* 63, 4444-4448. DOI: 10.1021/jf505533r.
- Sasal, M.C., Wilson, M.G., Sione, S.M., Beghetto, S.M., Gabioud, E.A., Oszust, J.D., Paravani, E.V., Demonte, L.D., Repetti, M.R., Bedendo, D.J., Medero, S.L., Goette, J.J., Pautasso, N., Schulz, G.A., 2017. Monitoreo de glifosato en agua superficial en Entre Ríos. La investigación acción participativa como metodología de abordaje. *Revista de Investigaciones Agropecuarias* 43 (2), 195-205. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/864/86452401016.pdf> (Accedido Diciembre 2019).
- SENASA, 2010. Resolución N° 934/10, Productos agropecuarios: Requisitos que deben cumplir los productos y subproductos agropecuarios para consumo interno. Disponible en: <http://www.senasa.gob.ar/normativas/resolucion-934-2010-senasa-servicio-nacional-de-sanidad-y-calidad-agroalimentaria> (Accedido Octubre 2019).
- SENASA, 2011. Resolución N° 559/11, Productos veterinarios: límites de residuos en alimentos de origen animal. Disponible en: <http://www.senasa.gob.ar/normativas/resolucion-559-2011-senasa-servicio-nacional-de-sanidad-y-calidad-agroalimentaria> (Accedido Octubre 2019).
- SENASA, 2012. Resolución N° 608/12, Productos alimenticios: Límites Máximos de Residuos. Disponible en: <http://www.senasa.gob.ar/resolucion-6082012> (Accedido Octubre 2019).
- Senyuva, H.Z., Gilbert, J., 2010. Immunoaffinity column clean-up techniques in food analysis: a review. *J. Chromatogr. B* 878, 115-132. DOI: 10.1016/j.jchromb.2009.05.042.
- Soler, C., Picó, Y., 2007. Recent trends in liquid chromatography-tandem mass spectrometry to determine pesticides and their metabolites in food. *Trends Anal. Chem.* 26, 103-115. DOI: 10.1016/j.trac.2006.08.005.
- Spencer, T.E., Dunlap, K.A., Filant, J., 2012. Comparative developmental biology of the uterus: insights into mechanisms and developmental disruption. *Mol. Cell. Endocrinol.* 354, 34-53. DOI: 10.1016/j.mce.2011.09.035.
- Sprankle, P., Meggitt, W.F., Penner, D., 1975. Rapid inactivation of glyphosate in the soil. *Weed Sci.*, 23, 224-228. DOI: 10.1017/S0043174500052917.
- Sprankle, P., Meggitt, W.F., Penner, D. 1975b. Adsorption, mobility, and microbial degradation of glyphosate in the soil. *Weed Sci.*, 23, 229-234. DOI: 10.1017/S0043174500052929.
- Stadnik, J., Karwowska, M., Dolatowski, Z.J., Swiatkiewicz, S., Kwiatek, K., 2011. Effect of genetically modified insect resistant corn (Mon 810) and glyphosate tolerant soybean meal (Roundup Ready) on physico-chemical properties of broiler's breast and thigh muscles. *Bull Vet Inst Pulawy* 55: 541-546.
- Subsecretaría de Recursos Hídricos de la Nación, 2003. Desarrollos de niveles guía nacionales de calidad de agua ambiente correspondientes a glifosato. Junio 2003. Disponible en: <https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/documento53.pdf> (Accedido Noviembre 2019).
- Tadeo, J.L., Sánchez-Brunete, C., Pérez, R.A., Fernández, M.D., 2000. Analysis of herbicide residues in cereals, fruits and vegetables. *J. Chromatogr. A* 882, 175-191. DOI: 10.1016/S0021-9673(00)00103-5.
- Thompson, H.M., Levine, S.L., Doering, J., Norman, S., Manson, P., Sutton, P., von Mérey, G., 2014. Evaluating exposure and potential effects on honeybee brood (*Apis mellifera*) development using glyphosate as an example. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 10(3), 463-470. DOI: 10.1002/ieam.1529.

- Thompson, T.S., van den Heever, J.P., Limanowka, R.E., 2019. Determination of glyphosate, AMPA, and glufosinate in honey by online solidphase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Addit. Contam. Part A*, 1-13. DOI: 10.1080/19440049.2019.1577993.
- Tujchneider, O., Paris, M., D'Elía, M., Perez, M., 2002. Model of management of underground water resources in the center-west of the Province of Santa Fe (Argentina), *Revista Latino-Americana de Hidrogeología (Latin-American Magazine of Hydrogeology)* 2, 91-102. <http://revistas.ufpr.br/hidrogeologia/article/viewFile/2626/2168> (Accedido Diciembre 2019).
- UE, 2013. Unión Europea, 2013. Reglamento (UE) N° 293/2013 de la Comisión del 20 de marzo de 2013, que modifica los anexos II y III del Reglamento (CE) N° 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo por lo que respecta a los límites máximos de residuos de benzoato de emamectina, espinosad, espirotetramato, etofenprox, etoxazol, flutriafol, fosmet, glifosato y piraclostrobin, en determinados productos. *Diario Oficial de la Comunidad Europea OJ L 96*, 5.4.2013, p. 1-30. Disponible en: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:32013R0293&from=ES> (Accedido Noviembre 2019).
- Van Bruggen, A.H.C., He, M.M., Shin, K., Mai, V., Jeong, K.C., Finckh, M.R., Morris, J.G., 2018. Environmental and health effects of the herbicide glyphosate. *Sci. Total Environ.* 616-617, 255-268. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2017.10.309.
- Vreeken, R.J., Speksnijder, P., Bobeldijk-Pastorova, I., Noij, Th.H.M., 1998. Selective analysis of the herbicides glyphosate and aminomethylphosphonic acid in water by on-line solid-phase extraction-high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 794, 187-199. DOI: 10.1016/S0021-9673(97)01129-1.
- Wong, J.W., Wang, J., Chow, W., Carlson, R., Jia, Z., Zhang, K., Hayward, D.G., Chang, J.S., 2018. Perspectives on Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry for Pesticide Screening in Foods. *J. Agric. Food Chem.*, 66, 9573-9581. DOI: 10.1021/acs.jafc.8b03468.
- Yoshioka, N., Asano, M., Kuse, A., Mitsuhashi, T., Nagasaki, Y., Ueno, Y., 2011. Rapid determination of glyphosate, glufosinate, bialaphos, and their major metabolites in serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using hydrophilic interaction chromatography. *J. Chromatogr. A* 1218, 3675-3680. DOI: 10.1016/j.chroma.2011.04.021.
- Zelaya, M.J., Costa, J.L., Bedmar, F., Aparicio, V., Gianelli, V., Okada, E., Kloosterman, M.E., Gómez Ortiz, A.M., 2010. Análisis de glifosato y AMPA en Balcarce: cromatografía líquida y espectrometría de masas, en: Camino, M., Aparicio V. (Eds.), *Aspectos ambientales del uso de glifosato*, pp. 35-56. https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-aspectos_ambientales_del_uso_de_glifosato__version_pa.pdf (Accedido Mayo 2019).
- Zhao, B., Zhang, J., Gong, J., Zhang, H., Zhang, C., 2009. Glyphosate mobility in soils by phosphate application: laboratory column experiments. *Geoderma* 149, 290-297. DOI: 10.1016/j.geoderma.2008.12.006
- Ziv-Gal, A., Flaws, J.A., 2016. Evidence for bisphenol A-induced female infertility: a review (2007-2016). *Fertil Steril* 106, 827-856. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2016.06.027.
- Zouaoui, K., Dulaurent, S., Gaulier, J.M., Moesch, C., Lachâtre, G., 2013. Determination of glyphosate and AMPA in blood and urine from humans: About 13 cases of acute intoxication. *Forensic Sci. Int.* 226, e20-e25. DOI: 10.1016/j.forsciint.2012.12.010.