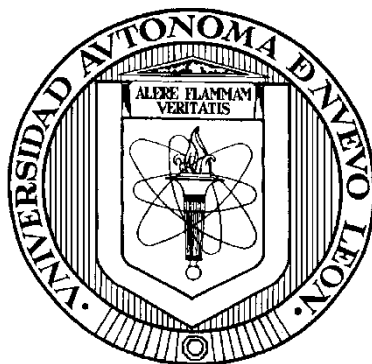


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



**ESTUDIO DE LÍQUIDOS IÓNICOS COMO SOLVENTES DE EXTRACCIÓN
EN EL ANÁLISIS DE GLIFOSATO EN AGUA**

Por

Q.C.B. DANIELA JUDITH PADILLA ALONSO

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

Diciembre, 2014

**ESTUDIO DE LÍQUIDOS IÓNICOS COMO SOLVENTES DE EXTRACCIÓN
PARA EL ANÁLISIS DE GLIFOSATO EN AGUA**

Aprobación de Tesis:



DRA. ROCÍO CASTRO RÍOS
Directora de Tesis



DRA. MARSELA GARZA TAPIA
Co-Directora de Tesis



DR. ABELARDO CHÁVEZ MONTES
Comisión de Tesis



DR. GERARDO ENRIQUE MUÑOZ MALDONADO
Subdirector de Estudios de Posgrado

**ESTUDIO DE LÍQUIDOS IÓNICOS COMO SOLVENTES DE EXTRACCIÓN
PARA EL ANÁLISIS DE GLIFOSATO EN AGUA**

Presentado por:

Q.C.B. DANIELA JUDITH PADILLA ALONSO

Este trabajo se realizó en los Laboratorios del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dra. Rocío Castro Ríos y la co-dirección de la Dra. Marsela Garza Tapia.

FIRMAS

DIRECTORA



Dra. Rocío Castro Ríos

CO-DIRECTORA



Dra. Marsela Garza Tapia

“Haz de tu vida un sueño, y de tu sueño una realidad”

Antoine de Saint-Exupéry

*A Emma Lucía, por ser esa hermosa luz que ilumina mi vida
y por enseñarme esta nueva forma de amor.*

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por la salud, la inteligencia y la sabiduría necesaria para lograr esta meta.

A mis padres Rafael y María de los Ángeles, las mejores personas que en mi vida he de conocer, gracias por ser mi soporte en todo momento y mi gran ejemplo a seguir.

A mis hermanos Karla y Aarón, por estar siempre ahí, apoyándome y ser mis compañeros de vida, los mejores.

A la familia Miranda Padilla por sus ánimos y por darme uno de los regalos más bellos, la gran felicidad de ser tía de esa hermosa chiquita Emma Lucía.

A mis abuelas Esperanza y Clara, por todo su amor y cariño que solo las abuelitas saben dar. A mis abuelos Armando y Alberto, con quienes me hubiera encantado compartir este momento.

A Pepe, por aguantar mi locura provocada por el posgrado, eres un hombre maravilloso, gracias por todo tu apoyo.

A la Dra. Noemi Waksman, por abrirme las puertas del Departamento y darme la oportunidad nuevamente de formar parte de él.

A la Dra. Rocío Castro, gracias por confiar de nuevo en mí, por sus consejos tan valiosos y por ayudarme a crecer personal y profesionalmente.

A Marse, ahora Dra. Marsela Garza Tapia, gracias por toda tu ayuda, consejos y compartir tus secretos sobre los líquidos iónicos, fue un placer haber sido tu primera asesorada.

Al Dr. Abelardo gracias por apoyarme con sus consejos y sus buenos ánimos.

A mis profesores, gracias por compartir los conocimientos y experiencias que me han ayudado a desempeñarme mejor profesionalmente.

A todos los integrantes del Departamento de Química Analítica, que en este tiempo se convirtió en mi segundo hogar.

A Marivel Esparza, por enseñarme los trucos del HPLC y por cada porra que me echabas, por siempre ser tan servicial y alegre.

A mis compañeros de generación y amigos Eduardo, Cesar y Elda, gracias por apoyarme con sus conocimientos, por sufrir juntos y por cada buen momento vivido en este tiempo, en verdad los quiero mucho y mejores compañeros no pude tener.

A los hijos analíticos que con todos sus conocimientos sobre los líquidos iónicos, su apoyo y compañía colaboraron en el desarrollo de este trabajo, Daniel, Roberto Jessy y Omar, muchísimas gracias.

A Juan Francisco y Magda, que no me dejaban solita trabajando por las noches y fines de semana, gracias por la compañía y las risas compartidas.

A mis amigos del inframundo Carlos, Memo, Chuy, Rolando, Ulrich y Selene, y a Byron, fue bien divertido compartir con ustedes esta aventura del posgrado.

A mis amigas Dulce, Martha, Sofía y Yael por sus buenos ánimos, su buena vibra y no dejarme renunciar a este sueño.

A todas y cada una de las personas que de alguna manera colaboraron para poder concluir este proyecto.

Al CONACyT por el apoyo económico brindado.

ÍNDICE

Capítulo	Página
1. Introducción	1
1.1 Glifosato	1
1.2 Métodos de análisis para glifosato	6
1.3 Líquidos iónicos	11
1.4 Microextracción líquido-líquido dispersiva	15
1.4.1 Microextracción líquido-líquido dispersiva con líquidos iónicos asistida por temperatura (TC-IL-DLLME)	21
2. Justificación	24
3. Objetivos	25
3.1 Objetivo General	25
3.2 Objetivos Específicos	26

4. Material y Métodos	27
4.1 Equipo, material y reactivos	27
4.1.1 Equipo	27
4.1.2 Materiales	28
4.1.3 Reactivos	30
4.1.3.1 Estándares	30
4.1.3.2 Líquidos iónicos	30
4.1.3.3 Solventes y otros reactivos	30
4.1.3.4 Muestras	31
4.2 Preparación de soluciones	32
4.2.1 Solución 1 mg/mL de glifosato y AMPA	32
4.2.2 Solución 1 mg/mL de 9-fluoroenilmetilcloroformato	32
4.2.3 Buffer de boratos 50 mM	32
4.3 Metodología	33
4.3.1 Implementación del método cromatográfico	33
4.3.1.1 Optimización de las condiciones de separación cromatográfica	33
4.3.1.2 Optimización de la derivatización con 9-fluoroenil metilcloroformato	37
4.3.1.3 Validación del método cromatográfico	38
4.3.1.3.1 Linealidad	39
4.3.1.3.2 Exactitud	39
4.3.1.3.3 Precisión	40

4.3.1.3.4 Límites de detección y de cuantificación	40
4.3.2 Selección del líquido iónico	41
4.3.2.1 Método con calentamiento de la mezcla fase acuosa-LI	41
4.3.2.2 Método con calentamiento de la fase acuosa	42
4.3.3 Optimización de la microextracción líquido-líquido dispersiva con líquidos iónicos asistida por temperatura (TC-IL-DLLME)	43
4.3.3.1 Optimización de la TC-IL-DLLME con calentamiento de la mezcla fase acuosa-LI	43
4.3.3.2 Optimización de la TC-IL-DLLME con calentamiento de la fase acuosa	44
4.3.4 Evaluación de la TC-IL- DLLME	45
4.3.5 Evaluación de la aplicabilidad de la TC-IL-DLLME a muestras de agua	46
5. Resultados	48
5.1 Implementación del método cromatográfico	48
5.1.1 Optimización de las condiciones de separación cromatográfica	48
5.1.2 Optimización de la derivatización con 9-fluoroenilmetil cloroformato	57
5.1.3 Validación del método cromatográfico	60
5.1.3.1 Linealidad	60
5.1.3.2 Exactitud	61

5.1.3.3	Precisión	63
5.1.3.4	Límites de detección y de cuantificación	64
5.2	Selección del líquido iónico	64
5.3	Optimización de la TC-IL-DLLME	67
5.3.1	Efecto del volumen de LI	67
5.3.2	Efecto del tiempo de calentamiento	69
5.3.3	Efecto del tiempo de enfriamiento	70
5.3.4	Efecto del tiempo de centrifugación	72
5.4	Evaluación de la TC-IL-DLLME	75
5.5	Evaluación de la aplicabilidad de la TC-IL-DLLME a muestras de agua	79
6.	Discusión	85
6.1	Implementación del método cromatográfico	85
6.1.1	Optimización de las condiciones de separación cromatográfica	86
6.1.2	Optimización del procedimiento de derivatización	90
6.1.3	Validación del método cromatográfico	92
6.2	Selección del líquido iónico	94
6.3	Optimización de la TC-IL-DLLME	96
6.3.1	Efecto del volumen de líquido iónico	96
6.3.2	Efecto del tiempo de calentamiento	98
6.3.3	Efecto del tiempo de enfriamiento	99

6.3.4 Efecto del tiempo de centrifugación	100
6.4 Evaluación de la TC-IL-DLLME	101
6.5 Aplicabilidad de la TC-IL-DLLME desarrollada a muestras de agua	104
7. Conclusiones	107
8. Bibliografía	109

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
1. Propiedades fisicoquímicas del glifosato y AMPA.	3
2. Resumen de métodos oficiales de análisis de glifosato en agua.	10
3. Propiedades de algunos líquidos iónicos.	13
4. Aplicaciones de la IL-DLLME.	20
5. Aplicaciones de la TC-IL-DLLME.	23
6. Condiciones de partida del método por cromatografía de fase inversa para el análisis de glifosato y AMPA.	34
7. Condiciones de partida del método cromatográfico para el análisis de glifosato y AMPA empleando HILIC.	35
8. Condiciones de partida del método cromatográfico para el análisis de glifosato y AMPA utilizando una columna de fase inversa de tecnología Aqua.	36
9. Condiciones óptimas de separación en modo HILIC.	51
10. Condiciones finales de separación utilizando una columna de fase inversa Atlantis dC ₁₈ .	55
11. Resultados de la solubilización de FMOC-Cl.	57
12. Condiciones óptimas para la derivatización de glifosato y AMPA con FMOC-Cl.	59
13. % DER de la concentración de los derivados de glifosato y AMPA.	63

14.	Límites de detección y cuantificación del método cromatográfico para el análisis de glifosato y AMPA.	64
15.	Selección del líquido iónico por el método de calentamiento de la mezcla fase acuosa-LI.	65
16.	Selección de líquido iónico por el método de calentamiento de la fase acuosa.	66
17.	Condiciones óptimas de la TC-IL-DLLME empleando el método de calentamiento de la mezcla fase acuosa-LI.	74
18.	Condiciones óptimas de la TC-IL-DLLME con calentamiento de la fase acuosa.	74
19.	Resultados del análisis de una solución de estándares con los métodos de TC-IL-DLLME desarrollados.	76
20.	Límites de detección y de cuantificación del método de TC-IL-DLLME seleccionado.	78
21.	Muestras de agua analizadas.	79
22.	Resultados del análisis de las muestras de agua con y sin pretratamiento.	83
23.	Método desarrollado para el análisis de Glifosato y AMPA en agua.	84

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Estructura química de a) glifosato y b) AMPA.	3
2.	Reacción de derivatización de glifosato con FMOC-Cl.	9
3.	Procedimiento general de una DLLME.	16
4.	Esquema del procedimiento general de la TC-IL-DLLME.	21
5.	Cromatograma obtenido para FMOC-Glifosato (500 µg/L) con una columna C ₈ . Fase móvil acetato de amonio (5 mM, pH 9)–acetonitrilo, en gradiente, 0.5 mL/min, 35°C.	49
6.	Cromatograma obtenido para FMOC-AMPA (500 µg/L) con una columna C ₈ . Fase móvil acetato de amonio (5 mM, pH 9)–acetonitrilo, en gradiente, 0.5 mL/min. 35°C.	49
7.	Cromatogramas obtenidos con las condiciones iniciales en modo HILIC para a) FMOC-Glifosato y b) FMOC-AMPA a 500 µg/L. Columna Kinetex HILIC, fase móvil acetato de amonio (100 mM, pH 7)-acetonitrilo 15:85, 1 mL/min, 40°C.	50

8.	Cromatograma de FMOC-Glifosato (500 $\mu\text{g/L}$) con formación de par iónico en HILIC. Columna Kinetex HILIC, fase móvil acetato de amonio (100 mM, pH 7) con CTAB 10 mM-Acetonitrilo 15:85, 1 mL/min, 40°C.	51
9.	Cromatograma obtenido para FMOC-Glifosato (500 $\mu\text{g/L}$) bajo las condiciones óptimas de separación en modo HILIC (Tabla IX).	52
10.	Cromatograma obtenido para FMOC-AMPA (500 $\mu\text{g/L}$) bajo las condiciones óptimas de separación en modo HILIC (Tabla IX).	52
11.	Cromatograma obtenido en modo HILIC para el FMOC-Glifosato después de 10 inyecciones. Columna Kinetex HILIC, fase móvil acetato de amonio (250 mM, pH 7)-acetonitrilo 15:85, 1.2 mL/min, 40°C.	53
12.	Cromatogramas de a) FMOC-Glifosato y b) FMOC-AMPA obtenidos con una columna Atlantis dC ₁₈ . Fase móvil formiato de amonio (5 mM, pH 3)-acetonitrilo, en gradiente, 0.3 mL/min, 40°C.	54
13.	Cromatograma de FMOC-Glifosato y FMOC-AMPA bajo las condiciones finales de separación en columna de fase inversa Atlantis dC ₁₈ . Fase móvil formiato de amonio (5 mM, pH 3)-acetonitrilo, elución en gradiente, 0.3 mL/min, 45°C	56
14.	Efecto del calentamiento y la agitación en ultrasonido sobre la eficiencia de la derivatización de glifosato y AMPA (n=3).	58
15.	Efecto de la temperatura en la reacción sobre la eficiencia de la derivatización de glifosato y AMPA (n=3).	58
16.	Efecto del tiempo de reacción sobre la eficiencia de la derivatización de glifosato y AMPA (n=3).	59

17.	Curva de calibración obtenida para FMOC-Glifosato.	60
18.	Curva de calibración obtenida para FMOC-AMPA.	61
19.	Gráfica de la concentración calculada en función de la concentración real de FMOC-Glifosato.	62
20.	Gráfica de la concentración calculada en función de la concentración real de FMOC-AMPA.	62
21.	Efecto del volumen de líquido iónico en la TC-IL-DLLME empleando calentamiento de la mezcla fase acuosa-LI (n=3).	68
22.	Efecto del volumen de líquido iónico en la TC-IL-DLLME empleando calentamiento de la fase acuosa (n=3).	68
23.	Efecto del tiempo de calentamiento en la TC-IL-DLLME empleando calentamiento de la mezcla fase acuosa-LI (n=3).	69
24.	Efecto del tiempo de calentamiento en la TC-IL-DLLME empleando calentamiento de la fase acuosa (n=3).	70
25.	Efecto del tiempo de enfriamiento en la TC-IL-DLLME empleando calentamiento de la mezcla fase acuosa-LI (n=3).	71
26.	Efecto del tiempo de enfriamiento en la TC-IL-DLLME empleando calentamiento de la fase acuosa (n=3).	71
27.	Efecto del tiempo de centrifugación en la TC-IL-DLLME empleando calentamiento de la mezcla fase acuosa-LI (n=3).	72
28.	Efecto del tiempo de centrifugación en la TC-IL-DLLME empleando calentamiento de la fase acuosa (n=3).	73
29.	Curva de calibración obtenida para estándares de FMOC-Glifosato analizados por el método TC-IL-DLLME seleccionado (n=3).	77

- 30.** Curva de calibración obtenida para estándares de FMOC-AMPA analizados por el método de TC-IL-DLLME seleccionado (n=3). 78
- 31.** Cromatogramas obtenidos para las muestras de agua adicionadas a 32 $\mu\text{g/L}$ con glifosato y AMPA extraídas con el método de TC-IL-DLLME propuesto. a) Agua de grifo y b) Agua de pozo. Columna Atlantis dC₁₈, fase móvil formiato de amonio (5 mM, pH 3)-acetonitrilo, elución en gradiente, 0.3 mL/min, 45°C. 80
- 32.** Cromatogramas de la extracción de las muestras acidificadas. Adicionadas con glifosato y AMPA a 32 $\mu\text{g/L}$. a) agua de grifo y b) agua de pozo. Sin adicionar; c) agua de grifo y d) agua de pozo. Columna Atlantis dC₁₈, fase móvil formiato de amonio (5 mM, pH 3)-acetonitrilo, elución en gradiente, 0.3 mL/min, 45°C. 81
- 33.** Cromatogramas de la extracción de las muestras acidificadas y agregando EDTA. Adicionadas con glifosato y AMPA a 32 $\mu\text{g/L}$. a) agua de grifo y b) agua de pozo. Sin adicionar; c) agua de grifo y d) agua de pozo. Columna Atlantis dC₁₈, fase móvil formiato de amonio (5 mM, pH 3)-acetonitrilo, elución en gradiente, 0.3 mL/min, 45°C. 82

LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

% DER	Porcentaje de desviación estándar relativa
% R	Porcentaje de recuperación
μL	Microlitro
°C	Grados Celcius
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMPA	Ácido aminometilfosfónico
ANOVA	Análisis de varianza
CG	Cromatografía de gases
CICOPLAFEST	Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas
COFEPRIS	Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios
CTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
DLLME	Microextracción líquido-líquido dispersiva
DMIM-BF₄	Tetrafluoroborato de 1-decil-3-metilimidazolio
EPA	Agencia de Protección Ambiental
FD	Detector de Fluorescencia

FE	Factor de enriquecimiento
FR	Factor de respuesta
FMOCCl	9-fluoroenilmetilcloroformato
HMIM-otf	Triflato de 1-hexil-3-metilimidazolio
HMIM-PF₆	Hexafluorofosfato de 1-hexil-3-metilimidazolio
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
IL-DLLME	Microextracción líquido-líquido dispersiva con líquidos iónicos
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
kg	Kilogramo
L	Litro
LI	Líquido iónico
LLE	Extracción líquido-líquido
LOD	Límite de detección
Log P_{ow}	Coeficiente de partición octanol-agua
LOQ	Límite de cuantificación
LPME	Microextracción en fase líquida
M	Concentración molar
m	Pendiente de la recta
MA-IL-DLLME	Microextracción líquido-líquido dispersiva con líquidos iónicos asistida por microondas
mg	Miligramo
min	Minuto

mL	Mililitro
mM	Concentración milimolar
MS	Espectrometría de Masas
N	Concentración normal
OPA	o-ftalaldehído
r²	Coefficiente de determinación
rpm	Revoluciones por minuto
s	Desviación estándar
Set₃-ntf	Bis(trifluorometil sulfonil) imida de dietil sulfonio
SPE	Extracción en fase sólida
TC-IL-DLLME	Microextracción líquido-líquido dispersiva con líquidos iónicos asistida por temperatura
UA-IL-DLLME	Microextracción líquido-líquido dispersiva con líquidos iónicos asistida por ultrasonido
UV-Vis	Espectroscopia UV-Visible
\bar{x}	Media

RESUMEN

Q.C.B. Daniela Judith Padilla Alonso Fecha de Graduación: Diciembre, 2014
Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina

Título de Tesis: ESTUDIO DE LÍQUIDOS IÓNICOS COMO SOLVENTES
DE EXTRACCIÓN EN EL ANÁLISIS DE GLIFOSATO EN
AGUA

Número de páginas: 124

Candidato para el grado de Maestría
en Ciencias con Orientación en
Química Biomédica

Área de Estudio: Química Biomédica

Propósito y Método del Estudio: El glifosato es un herbicida tóxico cuyo uso se ha incrementado en los últimos años. Entre las características del glifosato destacan la falta de grupos cromóforos y su alta hidrofiliidad. Los métodos de análisis para los compuestos hidrofílicos resultan largos y complejos, debido a su difícil recuperación con técnicas de extracción utilizando solventes orgánicos convencionales, por lo que el uso de líquidos iónicos resulta ser una buena alternativa para el análisis de este tipo de compuestos en técnicas de microextracción en fase líquida. En el presente estudio se desarrolló una metodología para el análisis de glifosato y su principal metabolito, el ácido aminometilfosfónico, en agua. Se desarrolló un método cromatográfico para la determinación de los dos analitos en presencia de líquidos iónicos. Para el establecimiento del método de microextracción líquido-líquido dispersiva con líquidos iónicos asistida por temperatura (T-IL-DLLME), se realizó la selección del líquido iónico y se optimizaron las variables que afectan la eficiencia de este proceso. Por último se evaluó la aplicabilidad del método desarrollado en muestras de agua.

Contribuciones y Conclusiones: El método cromatográfico empleando una columna de fase inversa C₁₈ y detección de fluorescencia, resultó ser lineal, preciso y exacto para el análisis de glifosato y AMPA en presencia del LI DMIM-BF₄. El método de IL-TC-DLLME desarrollado para el análisis de glifosato y AMPA en agua, presentó un buen desempeño además de preconcentrar hasta 5 veces los analitos, lo cual resulta importante considerando las bajas concentraciones de los analitos en las muestras reales. El método de microextracción propuesto es simple y eficiente en el análisis de muestras. Teniendo como límite de detección para el glifosato de 0.27 y para el AMPA de 0.22 µg/L. El límite de cuantificación fue de 0.82 µg/L para el glifosato y de 0.67 µg/L para el AMPA. Se demostró que los líquidos iónicos pueden desempeñarse como solventes de extracción para glifosato y AMPA en métodos de TC-DLLME por lo que pueden considerarse como una buena alternativa a los solventes orgánicos convencionales.

FIRMA DEL ASESOR:



Dra. Rocío Castro Ríos

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Glifosato

Un plaguicida se define como aquella sustancia o mezcla de sustancias que se destina a controlar cualquier plaga, incluidos los vectores que transmiten enfermedades humanas y de animales, las especies no deseadas que causen perjuicio o que interfieran con la producción agropecuaria y forestal, así como las que interfieran con el bienestar del hombre y de los animales [1].

Los herbicidas, son un tipo de plaguicidas utilizados en el control y manejo de malezas. Estos constituyen un grupo importante de plaguicidas de uso agrícola que año con año aumentan su volumen de uso, ya que sustituyen las labores mecánicas y manuales en el campo [1].

El glifosato es un herbicida que ha sido comercializado desde 1973 por la empresa Monsanto, se considera no selectivo debido a que inhibe una enzima presente en todas las plantas, la 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato-sintetasa. Esta enzima participa en la producción de aminoácidos aromáticos que son esenciales para el crecimiento de la planta [2]. El glifosato es un herbicida sistémico y de acción foliar que ingresa a la planta a través de las hojas para después migrar a otras partes del tejido vegetal, gracias a su bajo peso molecular y a su alta solubilidad en agua. Su uso, está autorizado para el control post-emergente de malezas tanto en el área agrícola así como residencial, además de ser utilizado en el control de cultivos ilícitos de cocaína y amapola [2-3].

Cuando el glifosato es aplicado sobre la planta diana, es metabolizado y una pequeña fracción sin transformar llega al suelo, donde es degradado por los microorganismos presentes a su principal metabolito, el ácido aminometilfosfónico (AMPA). Otra fracción del glifosato aplicado se deposita directamente en el suelo, donde también es degradado por los microorganismos y aunque, tiene poca movilidad, puede ser absorbido por otras plantas afectando su crecimiento, o bien pasar hacia aguas profundas mediante lixiviación [4].

La principal vía de contaminación de aguas superficiales es la escorrentía; al igual que en suelos, en el agua el glifosato es degradado principalmente a AMPA por los microorganismos acuáticos. La vida media del glifosato en agua

va de 35 a 63 días, estableciéndose una media de 49 días, esto depende de la mineralogía y del pH del medio [4].

El glifosato es un ácido débil orgánico, formado por una molécula de glicina y una de fosfometilo, su principal metabolito, AMPA, es producto de la ruptura del enlace C-N. Las estructuras químicas de glifosato y de AMPA se presentan en la figura 1 y sus principales propiedades fisicoquímicas se muestran en la tabla I.

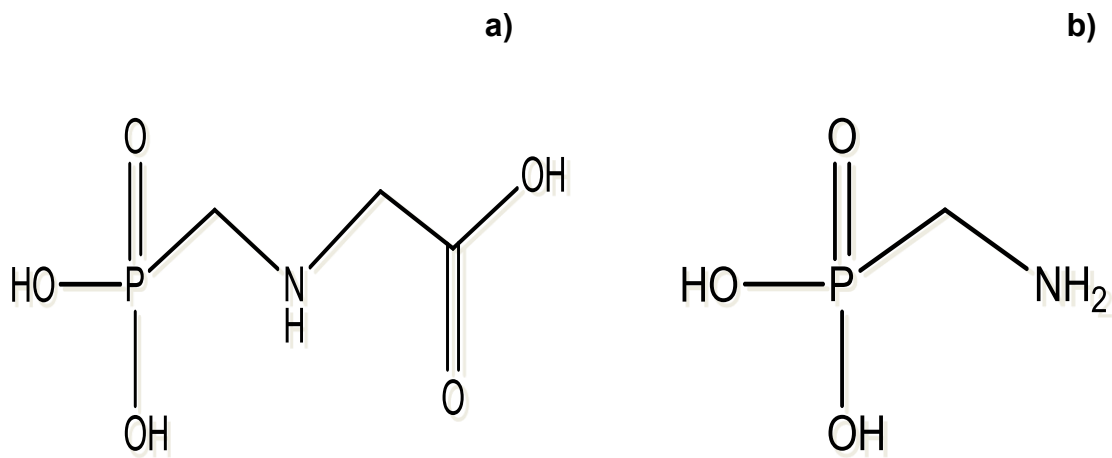


Figura 1. Estructura química de a) glifosato y b) AMPA.

Tabla I. Propiedades fisicoquímicas del glifosato y AMPA.

	Glifosato	AMPA
Fórmula molecular	$C_3H_8NO_5P$	CH_6NO_3P
Nombre IUPAC	N-(fosfonometil)glicina	Ácido aminometilfosfónico
Peso molecular	169.07 g/mol	111.04 g/mol
pKa	0.8, 2.3, 6.0 y 11.0	0.9, 5.6 y 10.2
log P_{ow}	-3.2	-2.76

Como puede verse en la tabla I, el glifosato y el AMPA tienen varios grupos ionizables, por lo que la especie predominante depende del valor de pH del medio en que se encuentren. Los coeficientes de partición octanol/agua (log P_{ow}) de ambos analitos tienen valores negativos, lo cual indica que tienen mayor afinidad por el agua, esto nos da una idea de lo altamente hidrofílicos que son [5]. Esta afinidad por el agua sugiere que el glifosato y el AMPA pueden encontrarse tanto en agua superficial como en agua profunda.

Los organismos reguladores consideran al glifosato como un herbicida de toxicidad moderada, ya que actúa contra una enzima que se encuentra exclusivamente en plantas y está ausente en mamíferos, aves, anfibios, entre otros seres vivos [6-7]. De acuerdo a datos de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA) la exposición crónica al glifosato a través del agua ocasiona daño renal y tiene efectos en la reproducción,

mientras que aún no cuentan con evidencia suficiente para ser clasificado como cancerígeno [8]. Sin embargo, existen numerosos reportes en los cuales los investigadores han realizado estudios in vitro e in vivo donde se ha encontrado que el glifosato actúa como disruptor endócrino y produce daño en el ADN, entre otros efectos adversos relacionados con la inducción de cáncer [9-12].

En México, la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS), a través de la Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas (CICOPLAFEST), autoriza el uso de glifosato en acciones agrícolas y residenciales, catalogándolo como un plaguicida ligeramente tóxico. La ingesta diaria admisible establecida para este plaguicida en nuestro país es de 0.3 mg/kg [1].

El aumento en la utilización de plaguicidas y el consecuente daño al medio ambiente y a la salud, ha llevado a los organismos nacionales e internacionales a regular los niveles de estos compuestos tanto en alimentos como en agua [13]. En Estados Unidos, la EPA estableció una concentración de 0.7 mg/L como nivel máximo para el glifosato en agua [8]. La Comunidad Europea no regula compuestos específicos y en su directiva 98/83/CE establece como concentración máxima admisible para cada plaguicida individual en agua un valor de 0.1 µg/L, mientras que el valor máximo permitido para el total de plaguicidas es 0.5 µg/L [14].

El glifosato es uno de los herbicidas más ampliamente utilizados a nivel mundial, en Estados Unidos la EPA reportó que en el 2003 se utilizaron de 58 a 60 mil toneladas, para el 2005 esta cifra aumentó a 72 mil toneladas alcanzando en el 2007 un uso de 81 a 84 mil toneladas. Es importante resaltar, que desde el 2001 este plaguicida ocupa el primer lugar en el ranking de los plaguicidas de uso agrícola más utilizados en los Estados Unidos [15], por lo que su presencia en el medio ambiente y los daños a la salud ocasionados por la exposición a este han despertado gran interés de estudio [3, 7].

1.2 Métodos de análisis para glifosato

El incremento en el uso del glifosato a nivel mundial, así como el descubrimiento de efectos negativos a la salud provocados por la exposición crónica a éste, ha impulsado un aumento en el desarrollo de metodologías para el análisis de glifosato en aguas, suelos y alimentos.

Sin embargo, los métodos disponibles hasta el momento para su análisis han presentado numerosas desventajas, entre las que se encuentran las bajas recuperaciones, la necesidad de múltiples pasos y el uso de solventes tóxicos [16-19].

Las dificultades en el desarrollo de una metodología para el análisis de glifosato se deben principalmente a su carácter altamente hidrofílico. Debido a esto, es difícil recuperar al glifosato por técnicas de extracción empleando solventes orgánicos de uso común, además su retención en las técnicas cromatográficas resulta difícil en las fases estacionarias normalmente empleadas. Por otra parte, la ausencia de grupos cromóforos hace que sea necesario realizar una derivatización previa para obtener productos que presenten absorción en alguna técnica espectroscópica como UV-VIS o la fluorescencia (FD) [20].

Entre los métodos de extracción utilizados para el análisis de glifosato y AMPA se encuentran la extracción líquido-líquido (LLE) [3], la extracción en fase sólida (SPE) [16], así como el uso de técnicas que utilizan membranas líquidas [17] y resinas de intercambio iónico [18-19], principalmente aplicados a glifosato y AMPA en muestras de agua y suelo. Entre sus desventajas se encuentra que requieren una cantidad elevada de muestra. La extracción utilizando resinas de intercambio iónico es la que ha presentado mejores resultados, sin embargo el procedimiento es largo, complicado e involucra el uso de un número elevado de reactivos [18-19].

Dentro de estas metodologías, debido al carácter iónico del glifosato y del AMPA, predomina el uso de la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), sin embargo existen reportes de la utilización de la cromatografía de gases (CG) [3] y de la electroforesis capilar [21-22].

Para el análisis de glifosato por HPLC se emplean principalmente columnas de fase inversa, aunque también han sido utilizadas la fase normal y recientemente la cromatografía de interacciones hidrofílicas (HILIC) [6, 20, 23, 24]. Tanto para la cromatografía de fase inversa como para la de fase normal es necesario realizar la derivatización de los analitos aun utilizando la espectrometría de masas (MS) como sistema de detección, esto debido a la pobre retención del analito en estas fases estacionarias [16]. Además las columnas de fase normal presentan baja estabilidad y un estrecho rango de pH de trabajo [23]. En el caso de HILIC, hay autores que proponen analizar el glifosato sin derivatización previa, siempre y cuando se cuente con un sistema cromatográfico acoplado a la espectrometría de masas [25-26].

Como se mencionó anteriormente, la carencia de grupos cromóforos en el glifosato y en el AMPA, hace necesario realizar una derivatización para su detección. Para el análisis por HPLC empleando un detector de fluorescencia se han utilizado principalmente el o-ftalaldehído (OPA), en derivatizaciones post-columna y el 9-fluoroenilmetil cloroformato (FMOC-Cl), para derivatizaciones pre-columna, mientras que para la detección por espectroscopia de UV-VIS se emplean reactivos como el 4-cloro-3,5-dinitrobenzotrifluoruro, aunque su aplicación es más limitada [20].

El FMOC-Cl reacciona con aminas primarias y secundarias en medio alcalino (pH 9-9.5) formando los derivados fluorescente a través de una sustitución nucleofílica aromática (Figura 2). Dado que el FMOC-Cl es insoluble en agua y soluble en solventes orgánicos como el acetonitrilo, es necesario incluir en el

medio de reacción un porcentaje de acetonitrilo que en general va de un 10 hasta un 50% [19].

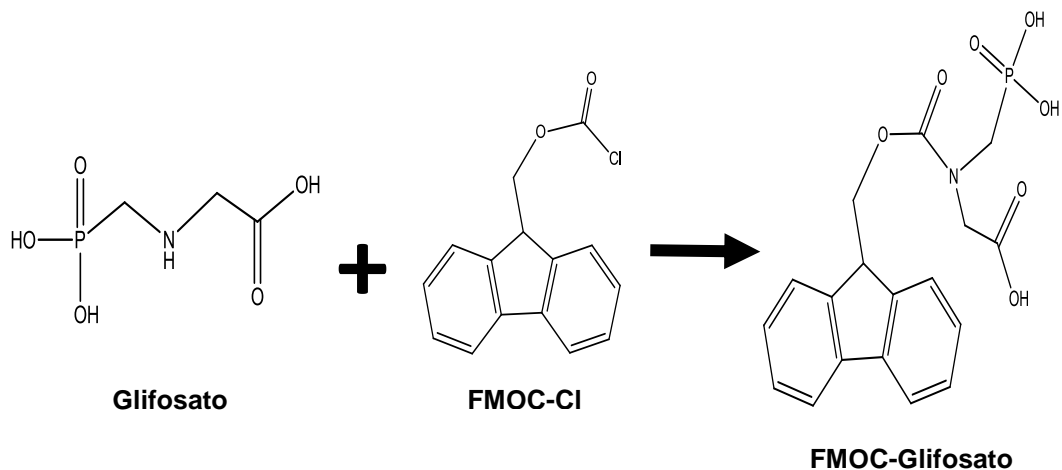


Figura 2. Reacción de derivatización de glifosato con FMOC-Cl

Además del pH del medio y la solubilización del reactivo FMOC-Cl, los parámetros que afectan principalmente el rendimiento de la reacción, son la temperatura y el tiempo de reacción [19, 23].

En la tabla II se presenta un resumen de algunos métodos descritos por organismos oficiales para el análisis para el glifosato en agua.

Es importante mencionar que muchas de las dificultades que se presentan en el análisis de glifosato son comunes para todos los compuestos hidrofílicos, por lo que el desarrollo de nuevos métodos de extracción y de análisis es de gran interés dentro de la Química Analítica, destacando el empleo de líquidos iónicos en el análisis de este tipo de compuestos [27-31].

Tabla II. Resumen de métodos oficiales de análisis de glifosato en agua.

Método	Derivatización Reactivo	Tratamiento de la muestra	Técnica	Condiciones	LOD (µg/L)	Referencia
EPA 547	Post-columa OPA	Filtración	HPLC-FD	Columna: Aminex Fase Móvil: Fosfato diácido de potasio y Metanol	6	[32]
AOAC 991.08	Post-columa OPA	Evaporación	HPLC-FD	Columna: Intercambio catiónico Fase Móvil: Fosfato diácido de potasio y Metanol	0.5	[33]
U.S. Geological Survey	Precolumna FMOC	SPE	HPLC-MS	Columna C ₁₈ Fase Móvil: Acetato de amonio y Acetonitrilo	0.084	[34]

1.3 Líquidos iónicos

Los líquidos iónicos (LIs) son sales orgánicas que se encuentran en estado líquido a temperatura ambiente. Resultan de la combinación de cationes orgánicos y aniones tanto orgánicos como inorgánicos. Estos compuestos son líquidos ya que al estar formados por iones muy asimétricos y de gran tamaño, las fuerzas atractivas catión-anión son muy débiles y por lo tanto se requiere de poca energía para separarlos, transformándolos al estado líquido [35].

Entre las propiedades fisicoquímicas de los LIs destacan:

- Baja presión de vapor
- Mayor densidad que el agua
- Mayor viscosidad que los solventes comúnmente empleados
- Temperatura de fusión en el rango de -90 a 200 °C
- Elevada estabilidad térmica

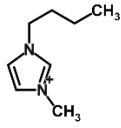
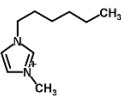
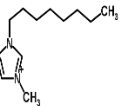
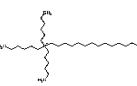
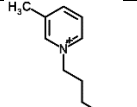
Es por ello que los LIs han sido utilizados como electrolitos, lubricantes, fluidos de transferencia de calor, dispersantes, tensoactivos, medios de reacción, aditivos en cromatografía de líquidos, fases estacionarias y solventes de extracción, además de ser considerados como solventes verdes debido a su baja volatilidad [36].

Tomando en cuenta que se dispone de un gran número de cationes y de aniones para la formación de un LI, se cree que es posible elegir la combinación más apropiada que se adapte a las exigencias de una determinada aplicación, por lo que han sido considerados como solventes de diseño. Se ha estimado que puede haber alrededor de 10^{18} LIs que están potencialmente disponibles para diferentes aplicaciones [37].

El catión es el principal responsable del comportamiento químico, mientras que el anión, aporta la mayor parte de las propiedades físicas. Las propiedades fisicoquímicas resultan de la combinación de las propiedades tanto del catión como del anión, por lo que los LIs pueden ser ácidos, básicos, hidrofílicos, e hidrofóbicos. En general, el anión es usado para controlar la miscibilidad del LI en agua, mientras que el catión puede influir en la hidrofobicidad o en la habilidad del solvente de formar puentes de hidrógeno [37].

Los LIs empleados comúnmente en la Química Analítica están formados por cationes orgánicos que incluyen grupos imidazolio, fosfonio, pirrolidonio, piridinio o amonio cuaternario. Mientras que los aniones son hexafluorofosfato, tetrafluoroborato, alquilsulfato, alquilsulfonato, nitrato, acetato, trifluorometansulfonato, bis(trifluorometilsulfonyl)imida, cloruro o bromuro. Siendo, los LIs del tipo imidazolio los más utilizados, esto debido a que muchas de sus propiedades tales como: punto de fusión, viscosidad y solubilidad, pueden ser ajustables modificando la longitud de la cadena alquímica del anillo imidazolio y del contranión. En la tabla III se muestran algunos de los LIs usados en este campo y algunas de sus propiedades [38].

Tabla III. Propiedades de algunos líquidos iónicos.

Catión	Anión	Líquido iónico	Punto de fusión (°C)	Densidad (g/mL)
	[BF ₄] ⁻	Tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazolio	-75	1.19
	[CF ₃ SO ₃] ⁻	Trifluorometansulfonato de 1-butil-3-metilimidazolio	16.4	1.29
	[PF ₆] ⁻	Hexafluorofosfato de 1-hexil-3-metilimidazolio	-61	1.30
	[BF ₄] ⁻	Tetrafluoroborato de 1-hexil-3-metilimidazolio	-82.4	1.16
	[PF ₆] ⁻	Hexafluorofosfato de 1-octil-3-metilimidazolio	-40	1.22
	[BF ₄] ⁻	Tetrafluoroborato de 1-octil-3-metilimidazolio	-79	1.11
	[(CF ₃ SO ₃) ₂ N] ⁻	bis(trifluorometilsulfonil)imida de 1-octil-3-metilimidazolio	NR	1.32
	[Cl] ⁻	Cloruro de trihexil(tetradecil)fosfonio	-70.15	0.895
	[Br] ⁻	Bromuro de 1-butil-3-metilpiridinio	-43.15	NR

Debido al auge de la Química Verde, el uso de solventes de última generación como los LIs se ha incrementado y estos compuestos han sido usados como nuevos solventes de extracción y separación de diferentes analitos. Estos procedimientos combinados con una adecuada instrumentación analítica han sido aplicados a un diverso número de compuestos tanto orgánicos como inorgánicos [37-38].

La aplicación de los LIs como solventes de extracción en la preparación de la muestra para compuestos orgánicos, se debe principalmente a su capacidad de solubilizar especies orgánicas y su inmiscibilidad en agua. Esta característica los hace particularmente atractivos para el aislamiento y preconcentración de los analitos en soluciones acuosas, por lo que se consideran una valiosa alternativa frente al uso de solventes orgánico volátiles que se emplean principalmente en los procesos de extracción en fase líquida [37].

Debido a la baja afinidad de los compuestos hidrofílicos por los solventes orgánicos convencionales, es que se ha propuesto el uso de los LIs para la extracción y el análisis de este tipo de compuestos. Aunque existen pocos reportes al respecto, los LIs han sido utilizados en el análisis de fármacos hidrofílicos, acrilamida, cafeína, entre otros [27-31].

1.4 Microextracción líquido-líquido dispersiva

Uno de los objetivos de la Química Analítica moderna es la miniaturización, simplificación y automatización del proceso analítico. La introducción de las técnicas de microextracción en fase líquida (LPME) ha contribuido notablemente al cumplimiento de este objetivo.

Las LPME se basan en la clásica extracción líquido-líquido (LLE) que busca reducir el volumen tanto de la muestra como del solvente de extracción, logrando la pre concentración de los analitos, así como altos valores de recuperación con unos pocos microlitros de solvente. La reducción del volumen de solvente y de muestra conlleva a una disminución en la generación de residuos, por lo que esta técnica, dependiendo del solvente con el que se trabaje, puede ser considerada dentro de la química verde por ser amigable con el ambiente y con el analista. Además la LPME puede ser compatible con la Cromatografía de Líquidos, Cromatografía de Gases y la Electroforesis Capilar [39].

Entre las múltiples variantes que se han propuesto para la LPME, se encuentra la microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME). Esta técnica emplea un sistema ternario de solventes, donde uno de los solventes se introduce para favorecer la dispersión del solvente orgánico extractante en la matriz acuosa, lo que permite mejorar la eficiencia en la extracción [40].

En la figura 3 se muestra un esquema del procedimiento para llevar a cabo una DLLME convencional, ésta se realiza inyectando rápidamente de una mezcla del solvente extractante y el solvente dispersante en la muestra; de esta manera se forma una nube de dispersión debida a la cosolvencia del solvente dispersante con las otras dos fases. En este tipo de procesos, el equilibrio de distribución se alcanza inmediatamente debido a la extensa área de contacto entre las gotas del solvente extractante y la muestra. Para recuperar la fase extractante que contiene los analitos, la mezcla se centrifuga [40].

Para la dispersión del solvente extractante en la matriz de la muestra, se ha propuesto sustituir al solvente dispersante por la agitación por ultrasonido y el uso de temperatura [41].

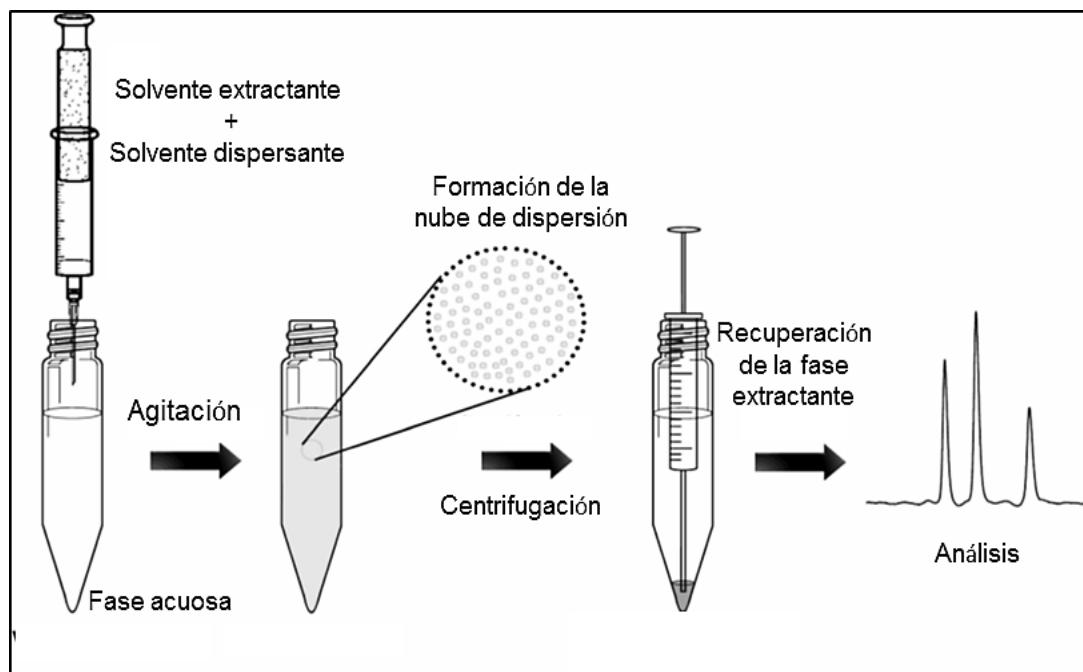


Figura 3. Procedimiento general de una DLLME

En la búsqueda por incrementar la eficiencia de extracción de los analitos en la DLLME, se han desarrollado diferentes variantes, como por ejemplo, la DLLME asistida por vórtex y la DLLME asistida por microondas, entre otras. Además, se han empleados nuevos solventes de extracción como los LIs [42].

Entre las ventajas de la DLLME destacan, su rapidez, simplicidad y eficiencia, además del consumo insignificante de solvente y los altos factores de enriquecimiento. Los cortos tiempos de extracción se deben a la rapidez con la que se alcanza el estado de equilibrio, mientras que los factores de enriquecimiento obtenidos son el resultado de la alta relación de volumen entre la fase donante (fase acuosa) y el aceptor (solvente de extracción). Debido a estas ventajas la DLLME ha sido ampliamente utilizada para la extracción y preconcentración de plaguicidas, hidrocarburos aromáticos policíclicos, fenoles, ácidos grasos, antioxidantes, fármacos, iones metálicos, entre otros compuestos en diferentes tipos de muestras [40-45].

Para aumentar la eficiencia de la extracción es necesario estudiar los parámetros experimentales que afectan el desempeño de la DLLME, entre los que se encuentran la elección del solvente de extracción, la selección del solvente dispersante, el volumen del solvente extractante y del solvente dispersante, así como la proporción entre estos para formar la mejor nube de dispersión, la adición de sales y el pH de la fase acuosa [43, 45].

Como todas las técnicas, la DLLME presenta ciertas limitantes, siendo las principales las relacionadas al solvente de extracción y al solvente de dispersión. El solvente de extracción debe tener una buena capacidad de extracción de los analitos en estudio, ser inmisible con el agua pero más denso que ella. Por su parte, el solvente de dispersión, debe ser miscible con el solvente extractante y con la fase acuosa. Por esta razón, la selección del solvente de extracción y dispersión se convierte en la parte más restrictiva del desarrollo de un método debido al bajo número de solventes orgánicos que cumplen con estos requerimientos, siendo en su mayoría solventes tóxicos como los clorados [40, 45].

Como se mencionó anteriormente, en los últimos años se ha buscado reemplazar los solventes orgánicos convencionales, siendo los LIs una importante alternativa. Basándose en la diversidad de combinaciones de cationes y aniones disponibles, los líquidos iónicos pueden ser adaptados estructuralmente para ser hidrofóbicos o hidrofílicos, así como miscibles o inmiscibles con el solvente dispersante. Además la mayoría de ellos tienen mayor densidad que el agua, lo que facilita la separación de las fases, mientras que su baja presión de vapor favorece la formación de microgotas más estables. Por último, su buena capacidad de extracción para los compuestos orgánicos e inorgánicos, los hace candidatos ideales y potenciales como solventes de extracción para reemplazar a los solventes tóxicos utilizados regularmente en la DLLME. La DLLME en la que se emplean LIs es denominada como IL-DLLME [46-47].

Los LIs han sido usados como solventes de extracción en diversas modalidades de la DLLME, por ejemplo la IL-DLLME asistida por temperatura (TC-IL-DLLME), la IL-DLLME asistida por ultrasonido (UA-IL-DLLME), la IL-DLLME asistida por microondas (MA-IL-DLLME) y la IL-DLLME *in situ* en donde un LI hidrofílico es convertido a hidrofóbico agregando un reactivo de intercambio aniónico [42, 45, 48].

Entre las aplicaciones de la IL-DLLME se encuentran el análisis de iones metálicos, pesticidas, fármacos y otros contaminantes orgánicos en agua, alimentos, orina e incluso en cosméticos, como se muestra en la tabla IV.

Tabla IV. Aplicaciones de la IL-DLLME.

Analitos	Matriz	Análisis	FE	%R	LOD (µg/L)	Referencia
Zinc	Leche	Espectroscopía de Absorción Atómica	71	99-101	0.22	[49]
Antiinflamatorios no esteroideos	Orina	HPLC	73.7-84.6	99.6-107	8.3-32	[50]
Triclosan y tiocarbamato	Agua	HPLC	NR	88-111	0.04-0.58	[51]
Pesticidas órgano-fosforados	Agua	HPLC	200	99.9-117.6	0.1-5	[52]
Fenoles	Cosméticos	Electroforesis capilar	18-60	81.6-119.4	5-100	[53]
Hidrocarburos aromáticos policíclicos	Agua	HPLC	315-346	90.3-103.8	0.00003-0.002	[54]
Piretroides	Miel	HPLC	506-515	101.2-103	0.21-0.38	[55]

NR = No reportado

1.3.1 Microextracción líquida-líquida dispersiva con líquidos iónicos asistida por temperatura (TC-IL-DLLME)

La TC-IL-DLLME a diferencia de la IL-DLLME, utiliza un sistema binario de solventes ya que no se requiere un solvente dispersante como en la IL-DLLME convencional. Tal como se observa en la figura 4, la mezcla de la muestra y el LI, es sometida a calentamiento para miscibilizar el solvente extractante con la matriz de la muestra. Posteriormente la mezcla se somete a un enfriamiento brusco para formar una nube de dispersión formada por microgotas, lo que resulta en un área de contacto muy grande entre el solvente extractante y el analito, posteriormente es necesario centrifugar para recuperar la fase extractante [48].

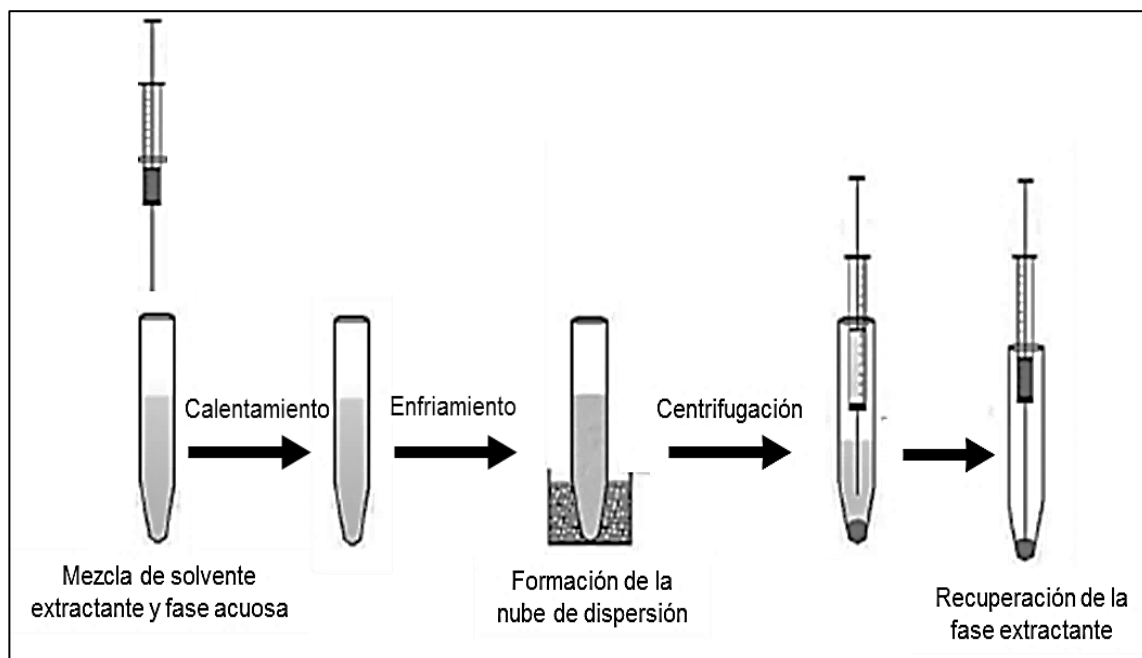


Figura 4. Esquema del procedimiento general de la TC-IL-DLLME.

En el caso de la TC-IL-DLLME, la eficiencia de la extracción depende del volumen de LI, la temperatura de calentamiento, la temperatura de enfriamiento (la cual es considerada como el tiempo de extracción) y el tiempo y temperatura de centrifugación.

Algunas aplicaciones de los LIs como solventes de extracción en la TC-DLLME se muestran en la tabla V, éstas incluyen el análisis de piretroides, vanadio, triclosan y otros plaguicidas en agua, obteniendo buenos porcentajes de recuperación, así como altos valores de preconcentración [48]. Sin embargo, no hay reportes de la aplicación de esta técnica empleando LIs como solventes de extracción en el análisis de glifosato.

Tabla V. Aplicaciones de la TC-IL-DLLME

Analito	Matriz	Análisis	FE	%R	LOD ($\mu\text{g/L}$)	Referencia
Antraquinonas	Ruibarbo	HPLC-UV	174-213	95.2-108.5	0.5-2.2	[56]
DDT	Agua	HPLC-UV	50	87.4-110	0.24	[57]
Pesticidas organofosforados	Agua	HPLC-UV	50	88.2-103.6	0.17-0.29	[58]
Piroxicam	Plasma/Orina	Espectrofluorimetría	NR	95.5-104	0.046	[59]
Piretroides	Agua	HPLC-UV	NR	76.7-135.6	0.28-0.6	[60]
Hidrocarburos aromáticos policíclicos	Agua	HPLC-UV	NR	83.5-118	0.0005-0.88	[61]
Carbamatos	Agua	HPLC-UV-	NR	82.6-108	0.45-1.4	[62]
di(2-etilhexil)ftalato	Orina	HPLC-UV	115	80.4-112.5	0.96	[63]
Bifenilos policlorinados y éteres de difenilos polibrominados	Agua/Orina	HPLC-UV	278-342	81-127	0.1-0.4	[64]
Aminas aromáticas	Agua	HPLC-UV	NR	86.3-98.9	0.39-0.63	[65]
Ésteres de ftalatos y piretroides	Agua	HPLC-UV	NR	85.5-102.5	0.23-0.47	[66]
Clorobencenos	Agua	HPLC-UV	187-298	91-109	0.05-0.1	[67]
Filtros UV	Agua	HPLC-UV	240-350	88-116	0.2-5	[68]

NR = No Reportado

CAPÍTULO 2

JUSTIFICACIÓN

Siendo el glifosato un herbicida tóxico cuyo uso se ha incrementado en los últimos años a nivel mundial, resulta necesario monitorear su presencia en agua.

Por su carácter hidrofílico los métodos de análisis existentes resultan largos, complejos y costosos, involucrando el uso de solventes orgánico volátiles que comprometen el bienestar del analista y del medio ambiente.

Tomando en cuenta las propiedades como disolventes verdes de los líquidos iónicos y su amplia aplicación en técnicas de microextracción, es posible pensar que estos compuestos pueden ser de utilidad en el análisis de glifosato.

CAPÍTULO 3

OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Evaluar el uso de los líquidos iónicos como solventes de extracción para el análisis de glifosato y de su principal metabolito, el ácido aminometilfosfónico (AMPA), en agua.

3.2 Objetivos Específicos

1. Implementar un método para el análisis de glifosato y AMPA por cromatografía de líquidos.
2. Desarrollar un método de microextracción líquido-líquido dispersiva asistida por temperatura con líquidos iónicos (IL-TC-DLLME) para el análisis de glifosato y AMPA.
3. Evaluar la aplicabilidad del método en el análisis de muestras de agua.

CAPÍTULO 4

MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Equipo, material y reactivos

4.1.1 Equipo

- Balanza Semianalítica (AND, GX-200).
- Baño con temperatura controlada (Haake C1).
- Baño de Ultrasonido (Branson, Bransonic3510).
- Bomba de vacío (Modelo SA55NXGTE-4870).
- Centrífuga con control de temperatura (ThermoScientific, IEC Centra CL3).
- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución Waters Alliance 2695, equipado con desgasificador en línea, bomba cuaternaria, automuestreador, horno de columna y detector de fluorescencia.
- Cronómetro.

- Incubadora (DAIGGER, Combi-SVI2DX).
- Plataforma de agitación (VWR International, Nutating mixer).
- Potenciómetro (Hach, SensION pH).
- Sistema purificador de agua (Elga, PureLab UHQII).
- Vórtex (Barnstead International, Thermolyne 37600).

4.1.2 Materiales

- Columna Atlantis dC₁₈ (2.1 x 150 mm, 3 μm; Waters).
- Columna Kinetex HILIC (4.6 x 50 mm, 2.6 μm; Phenomenex).
- Columna Zorbax Eclipse XDB C₈ (4.6 x 100 mm, 3.5μm; Agilent).
- Espátulas.
- Frascos para reservorios de fase móvil de 500 mL (Schott Duran).
- Filtros de Nylon de 13 mm, 0.2 μm (Millex, Millipore).
- Filtros de Nylon de 33 mm, 0.45 μm (Millex, Millipore).
- Gradilla para tubos de ensayo.
- Insertos cónicos de vidrio de 300 μL, con resorte al fondo (Agilent).
- Jeringas desechables de 1 mL (NormJect).
- Matraces de aforación de 5, 10, 25, 50, 100, 250 y 500 mL (Pyrex).
- Membranas de Nylon de 47 mm, 0.45 μm (Millipore).
- Microjeringas de 10, 25, 100 y 500 μL (Hamilton).
- Papel filtro #2 (Whatman).

- Pipetas Automáticas de 20-200 y 200-1000 μ L (Eppendorf).
- Pipetas volumétricas de 1, 2, 3, 5, 10 y 15 mL.
- Pinzas de tres dedos.
- Pinzas para termómetro.
- Probetas de 100 y 250 mL (Kimax).
- Puntillas para pipeta automática (VWR).
- Sistema de filtración (Millipore).
- Soporte universal.
- Termómetro -20 a 110 °C (Brannan).
- Tubos cónicos de 5 mL con tapa de rosca (Kimble Chase).
- Tubos de polipropileno de 1.5 mL (Eppendorf).
- Viales de vidrio de 2 mL con tapa de rosca y septa de PTFE/Silicon (Agilent).
- Viales de vidrio de 3 mL con tapa de rosca (Wheaton).

4.1.3 Reactivos

4.1.3.1 Estándares

- Glifosato, Pestanal, Fluka.
- Ácido aminometilfosfónico, 99 %, Aldrich.

4.1.3.2 Líquidos iónicos

- Bis(trifluorometilsulfonil)imida de trietilsulfonio, 99 %, Iolitec.
- Hexafluorofosfato de 1-hexil-3-metilimidazolio, 99 %, Iolitec.
- Tetrafluoroborato de 1-decil-3-metilimidazolio, >98 %, Iolitec.
- Triflato de 1-hexil-3-metilimidazolio, 99 %, Iolitec.

4.1.3.3 Solventes y otros reactivos

- 9-fluoroenilmetilcloroformato (Fmoc-OH), ≥ 99 %, Fluka.
- Acetato de amonio, ≥ 99 %, Fluka.
- Acetonitrilo grado HPLC, J.T. Baker.
- Ácido acético, ≥ 99.8 %, Fluka.
- Ácido bórico, ≥ 99.5 %, Sigma Aldrich.
- Ácido clorhídrico, 36.5-38 %, J.T. Baker.
- Ácido fórmico, ACS Reagent 88 al 91 %, Fluka.
- Agua bidestilada, Laboratorios Monterrey.

- Cloruro de metileno, Chromasolv.
- Ácido etilendiaminotetraacético, sal disódica, 99-101 %, Productos Químicos Monterrey.
- Formiato de amonio, ≥ 99 %, Fluka.
- Hidróxido de amonio, 28-30 %, ACS Reagent, Sigma Aldrich.
- Hidróxido de sodio, ≥ 98 %, Fluka.
- Tetraborato de sodio, 99 %, Sigma Aldrich.

4.1.3.4 Muestras

- Agua de grifo, Facultad de Medicina, UANL, Monterrey, Nuevo León.
- Agua de pozo, Montemorelos, Nuevo León.

4.2 Preparación de soluciones

4.2.1 Solución 1 mg/mL de glifosato y AMPA

Se pesaron 10 mg de glifosato y 10 mg de AMPA y se disolvieron en 10 mL de agua desionizada. Esta solución se almacenó a 4°C por 3 meses.

4.2.2 Solución 1 mg/mL de 9-fluoroenilmetilcloroformato

Se pesaron 10 mg de 9-fluoroenilmetilcloroformato y se disolvieron en 10 mL de acetonitrilo grado HPLC. La solución se almacenó a 4°C y en la oscuridad.

4.2.3 Buffer de boratos 50 mM, pH 9.5

Se prepararon 25 mL de un buffer de boratos 50 mM, pesando 0.163 g de tetraborato de sodio y 0.028 g de ácido bórico. Se disolvieron en agua desionizada a 50°C y se conservó a 4°C.

4.3 Metodología

4.3.1 Implementación del método cromatográfico

Para implementar el método cromatográfico empleado en el análisis de glifosato y AMPA en presencia de líquidos iónicos, se utilizó un cromatógrafo de líquidos Waters Alliance 2695 equipado con bomba cuaternaria, desgasificador en línea, automuestreador, horno de columna y con detector de fluorescencia.

4.3.1.1 Optimización de las condiciones de separación cromatográfica

Para optimizar las condiciones del sistema cromatográfico se emplearon soluciones acuosas del estándar de glifosato y AMPA a una concentración de 500 µg/L, las cuales antes de ser analizadas fueron derivatizadas con el reactivo FMOC-Cl de acuerdo al método establecido por Hanke [16]. Brevemente, una alícuota del estándar de glifosato y AMPA fue llevado a pH aproximado de 9 adicionando buffer de boratos (50 mM, pH de 9.5) y se dejó reaccionar por dos horas a temperatura ambiente con el reactivo derivatizante FMOC-Cl.

Las condiciones de partida utilizadas utilizando una columna C₈, fueron las establecidas por el Departamento de Estudios Geológicos de los Estados Unidos [34] y se muestran en la tabla VI.

Tabla VI. Condiciones de partida del método por cromatografía de fase inversa para el análisis de glifosato y AMPA.

Columna	Zorbax XDB C ₈ (4.6x100 mm, 3.5 μm)	
Fase móvil	A: Acetato de amonio (5 mM, pH 9) B: Acetonitrilo	
	Tiempo	%B
	0	5
	8.5	17
	18.5	60
	22.5	100
Flujo	0.5 mL/min	
Temperatura de columna	35°C	
Volumen de inyección	5 μL	
Detección por Fluorescencia	$\lambda_{exc} = 260 \text{ nm}$ $\lambda_{em} = 310 \text{ nm}$	

Debido a los resultados obtenidos, para la cromatografía de fase inversa utilizando la columna C₈ no se realizaron ajustes en ninguno de los otros parámetros del método cromatográfico de partida.

Para el modo HILIC las condiciones iniciales se muestran en la tabla VII.

Tabla VII. Condiciones de partida del método cromatográfico para el análisis de glifosato y AMPA empleando HILIC.

Columna	Kinetex HILIC (4.6x50 mm, 2.6 μ m)
Fase móvil	A: Acetato de amonio 100 mM pH 7 B: Acetonitrilo 15:85 (A:B)
Flujo	1 mL/min
Temperatura de columna	40°C
Volumen de inyección	5 μ L
Detección por Fluorescencia	$\lambda_{exc} = 260 \text{ nm}$ $\lambda_{em} = 310 \text{ nm}$

Debido a los resultados obtenidos con las condiciones iniciales, fue necesario realizar la optimización de las condiciones de separación. Para lo cual, primeramente se evaluó el efecto del pH de la fase acuosa evaluando valores de pH de 3, 5, 6 y 7. También se optimizó la fuerza iónica de la fase acuosa, para lo cual se utilizó acetato de amonio a una concentración de 100, 250 y 500 mM. En cuanto a la proporción de la fase acuosa en la fase móvil, se probaron un 10, 15 y 20%. La temperatura de la columna fue probada a 35 y 40°C, mientras que el flujo fue modificado a 1 y 1.2 mL/min.

Por último, en la evaluación de la columna de fase inversa Atlantis dC18, se siguieron las condiciones de partida descritas por Krueve [24], las cuales se muestran en la tabla VIII.

Tabla VIII. Condiciones de partida del método cromatográfico para el análisis de glifosato y AMPA utilizando una columna de fase inversa de tecnología Aqua.

Columna	Atlantis dC ₁₈ (4.6x150 mm, 3.5 μm)	
Fase Móvil	A: Formiato de amonio (5 mM, pH 3) B: Acetonitrilo	
Gradiente	Tiempo	%B
	0	20
	23.4	41.6
	32.4	41.6
	43.6	100
	54.9	100
	61.6	20
	90	20
Flujo	0.2 mL/min	
Temperatura de columna	40°C	
Detección por Fluorescencia	$\lambda_{exc} = 260 \text{ nm}$ $\lambda_{em} = 310 \text{ nm}$	

Utilizando las condiciones iniciales no se obtuvieron buenos resultados por lo que se optimizó la composición de la fase móvil utilizando un 35, 38 y 40% de solvente orgánico (acetonitrilo). También se probaron diferentes temperaturas de la columna, 40 y 45°C. Por último se evaluó el flujo a 0.2 y 0.3 mL/min.

Utilizando la columna Atlantis dC₁₈ se obtuvieron los mejores resultados por lo que se evaluó el comportamiento del LI seleccionado en el sistema cromatográfico, para lo cual se adicionaron 10, 15, 20 y 25 µL de LI en la solución de los analitos.

4.3.1.2 Optimización de la derivatización con 9-fluoroenilmetil cloroformato

Con el fin de mejorar la señal cromatográfica, una vez establecidas las condiciones de separación se optimizaron los factores que afectan la eficiencia de la derivatización con FMOC-Cl.

Como se mencionó anteriormente, el procedimiento de derivatización empleado fue el propuesto por Hanke [16], haciendo una adaptación a microescala con el fin de disminuir los costos y la generación de residuos. Para la derivatización, una alícuota de 800 µL de un estándar de glifosato y AMPA a una concentración de 500 µg/L se llevó a un pH aproximado de 9 agregando 100 µL del buffer de boratos (50 mM, pH 9.5). Se agregaron 100 µL de la solución FMOC-Cl (1 mg/mL), se agitó en vórtex y se dejó reaccionar por 2 horas a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo de reacción, se agregaron 10 µL de ácido fórmico al 90% para detener la reacción. La solución obtenida fue filtrada utilizando filtros de nylon de 0.2 µm y para retirar el exceso de reactivo derivatizante y otros productos formados durante la reacción, se

realizó una extracción con 500 μL de diclorometano HPLC. Se recuperó la fase acuosa, la cual fue llevada al HPLC para su análisis.

Las variables incluidas en la optimización de la derivatización fueron: la temperatura de reacción, el tiempo de reacción, agitación en ultrasonido y el contenido de acetonitrilo en la solución. Para obtener las condiciones óptimas se modificó una variable y el resto de las condiciones se mantuvieron fijas. El análisis de los datos se llevó a cabo mediante un análisis de varianza (ANOVA) de un solo factor utilizando el programa Microsoft Excel 2010.

Los valores estudiados para cada uno de los parámetros optimizados fueron los siguientes: el contenido de acetonitrilo, 10, 20 y 30%, tipo de agitación por ultrasonido, temperatura de reacción a temperatura ambiente, 30 y 40°C y tiempo de reacción, de 20, 40 y 60 minutos.

4.3.1.3 Validación del método cromatográfico.

Una vez establecido el método cromatográfico, se realizó la validación teniendo como base la guía de la Eurachem [69]. Los parámetros evaluados fueron linealidad, exactitud, precisión, límite de detección y límite de cuantificación.

Para la validación del método se utilizaron soluciones preparadas en fase móvil y adicionadas con líquido iónico, a partir de los derivados de glifosato y AMPA en un rango de concentración de 22 a 360 $\mu\text{g/L}$.

4.3.1.3.1 Linealidad. Para evaluar la linealidad se construyó una curva de calibración por estándar externo utilizando 5 niveles de concentración de los derivados de glifosato y AMPA (22.5, 45, 90, 180 y 360 µg/L), los cuales fueron preparados por triplicado. Con los resultados obtenidos se realizó un análisis de regresión lineal, obteniendo la ecuación de la recta. También se calcularon los factores de respuesta (FR) (Ecuación 1) y se obtuvo el porcentaje de desviación estándar relativa (% DER) de los mismos (Ecuación 2). Por último, se evaluaron el coeficiente de correlación y de determinación. El análisis de los datos se realizó con el programa Microsoft Excel 2010.

$$\text{Ecuación 1} \quad FR = \frac{\text{Área de la señal}}{\text{Concentración del estándar}}$$

$$\text{Ecuación 2} \quad \% DER = \frac{s}{\bar{x}} \times 100$$

Donde s es la desviación estándar y \bar{x} la media de los datos.

4.3.1.3.2 Exactitud. Se evaluó a través de un análisis de correlación entre la concentración calculada para los estándares de calibración y su concentración real. Con estos datos se realizó el análisis de regresión y se evaluaron el valor de la pendiente de la recta, el coeficiente de correlación y el coeficiente de determinación. Para obtener la concentración calculada se utilizó la ecuación de la recta obtenida para la curva de calibración.

4.3.1.3.3 Precisión. Se estableció analizando soluciones de los derivados de glifosato y AMPA a tres niveles de concentración (22.5, 90 y 360 $\mu\text{g/L}$). Cada solución fue analizada por triplicado con el método establecido y se calculó el porcentaje de desviación estándar relativa para cada nivel de concentración utilizando la ecuación 2.

4.3.1.3.4 Límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ). Los límites de detección y de cuantificación del método cromatográfico, se calcularon utilizando la pendiente de la recta (m) obtenida para la curva de calibración y la desviación estándar (s) de la señal del blanco de reactivos, (Ecuaciones 3 y 4).

Ecuación 3
$$LOD = \frac{3.3s}{m}$$

Ecuación 4
$$LOQ = \frac{10s}{m}$$

4.3.2 Selección del líquido iónico

Los LIs estudiados en este trabajo fueron:

- bis(trifluorometilsulfonyl)imida de trietilsulfonio
- hexafluorofosfato de 1-hexil-3-metilimidazolio
- tetrafluoroborato de 1-decil-3-metilimidazolio
- triflato de 1-hexil-3-metilimidazolio.

Para realizar la selección del LI se probaron dos tipos de calentamiento:

1. Calentamiento de la mezcla de la fase acuosa-LI en incubadora.
2. Calentamiento de la fase acuosa en baño de agua y posterior inyección del LI.

La selección se realizó considerando la miscibilidad con el agua, la temperatura de miscibilización, la formación de nube de dispersión en frío y el volumen de LI recuperado.

4.3.2.1 Método con calentamiento de la mezcla de fase acuosa-LI

Cinco mililitros de agua desionizada se colocaron en tubos cónicos y se añadieron 75 μ L del LI. Los tubos se colocaron en una plataforma de agitación y se calentaron en incubadora por 20 minutos. Después de ese tiempo se evaluó la miscibilidad de las fases. Posteriormente, los tubos se enfriaron en baño de

hielo por 15 minutos y se analizó la formación de la nube de dispersión. Finalmente, los tubos fueron centrifugados a 3500 rpm por 15 minutos a 25°C y el LI fue recuperado. Las temperaturas de calentamiento evaluadas fueron 40, 50 y 60°C.

4.3.2.2 Método con calentamiento de la fase acuosa

Tubos cónicos conteniendo 5 mL de agua desionizada se calentaron en baño de agua por 20 minutos. Después del periodo de calentamiento, se agregaron 75 µL de LI y se evaluó la miscibilidad de las fases. Posteriormente, los tubos con la mezcla se enfriaron en baño de hielo por 15 minutos y se analizó la formación de la nube de dispersión. Los tubos se centrifugaron por 15 minutos a 25°C a 3500 rpm y se recuperó el LI. Las temperaturas de calentamiento evaluadas fueron 40, 50 y 60°C.

4.3.3 Optimización de la microextracción líquido-líquido dispersiva con líquidos iónicos asistida por temperatura

Una vez seleccionado el LI y la temperatura de miscibilización, se optimizaron las condiciones para llevar a cabo la TC-IL-DLLME, las variables incluidas fueron:

- tiempo de calentamiento.
- tiempo de enfriamiento.
- volumen de LI.
- tiempo de centrifugación.

Para la optimización de cada variable, los experimentos fueron realizados por triplicado; las áreas obtenidas para cada derivado mediante el análisis por HPLC, se emplearon para realizar el ANOVA de un solo factor utilizando el programa Microsoft Excel 2010, además se obtuvo el porcentaje de desviación estándar relativa (% DER) de acuerdo a la ecuación 2.

4.3.3.1 Optimización de la TC-IL-DLLME con calentamiento de la mezcla de fase acuosa-LI

En tubos cónicos se colocaron 5 mL de una solución de los derivados de glifosato y AMPA a una concentración de 60 µg/L. Se agregó el LI, los tubos se colocaron en una placa de agitación y se calentaron por 20 minutos en la

incubadora para miscibilizar ambas fases. Posteriormente la mezcla se enfrió en baño de hielo y se observó la formación de la nube de dispersión. Por último se centrifugó la mezcla a 3500 rpm y a 25°C para recuperar el LI.

Los tiempos de calentamiento evaluados fueron 10, 15 y 20 minutos, mientras que los tiempos de enfriamiento fueron 5, 10 y 15 minutos. Para encontrar el volumen de LI óptimo se probaron 55, 65 y 75 μL . Por último, para seleccionar el tiempo de centrifugación, se utilizaron 10, 20 y 30 minutos.

4.3.3.2 Optimización de la TC-IL-DLLME con calentamiento de la fase acuosa

Cinco mililitros de una solución de los derivados de glifosato y AMPA a una concentración de 60 $\mu\text{g/L}$ se colocaron en tubos cónicos. Estos tubos se calentaron por 20 minutos en baño de agua. Después de ese periodo el LI se inyectó. La mezcla se enfrió en baño de hielo y se observó la formación de la nube de dispersión. Por último se centrifugó la mezcla a 3500 rpm y a 25°C para recuperar el LI.

Los tiempos de calentamiento evaluados fueron 10, 15 y 20 min, mientras que los tiempos de enfriamiento fueron 5, 10 y 15 min. Para evaluar el volumen de LI se probaron 55, 65 y 75 μL . Por último, para seleccionar el tiempo de centrifugación, se utilizaron 10, 20 y 30 minutos.

4.3.4 Evaluación de la TC-IL-DLLME

Los procedimientos de TC-IL-DLLME desarrollados se evaluaron calculando exactitud, precisión y factor de enriquecimiento. Para la evaluación se utilizaron soluciones de los derivados FMOC-glifosato y FMOC-AMPA a una concentración de 25.9 y 26.4 µg/L respectivamente, preparadas en agua desionizada, se realizó la extracción y se cuantificó la concentración de los analitos extraídos.

El factor de enriquecimiento (FE) se calculó mediante la Ecuación 5, en donde C_{LI} corresponde a la concentración del analito obtenida en el LI recuperado y C_0 a la concentración inicial del analito.

Ecuación 5
$$FE = \frac{C_{LI}}{C_0}$$

La exactitud se evaluó a través del porcentaje de recuperación ($\% R$) utilizando la ecuación 6, comparando la cantidad de analito en la fase extractante y la cantidad del mismo en la muestra inicial.

Ecuación 6
$$\% R = \left(\frac{\text{Cantidad de analito en la fase extractante}}{\text{Cantidad de analito en la muestra inicial}} \right) \times 100$$

Para evaluar la precisión de los métodos de TC-IL-DLLME desarrollados se realizaron las extracciones de los derivados de glifosato y AMPA por triplicado.

Con la concentración de los analitos extraídos se calculó el porcentaje de desviación estándar relativa (% DER) utilizando la ecuación 2.

Además se construyó una curva de calibración de la extracción, mediante el análisis por triplicado de soluciones estándar de los derivados de glifosato y AMPA a cinco niveles de concentración, dichas concentraciones fueron 0.84, 1.68, 3.36, 6.72 y 13.44 $\mu\text{g/L}$, los cuales fueron sometidos al procedimiento de extracción. Con los datos obtenidos se calculó el % DER de los factores de respuesta y se realizó el análisis de regresión utilizando el programa Microsoft Excel 2010.

Empleando el valor de la pendiente de la curva de calibración, se calculó el límite de detección y el límite de cuantificación de la extracción, de acuerdo a las ecuaciones 3 y 4 respectivamente.

4.3.5 Aplicación de la TC-IL-DLLME a muestras de agua

Para evaluar la aplicabilidad del método desarrollado al análisis de muestras de agua, se analizaron una muestra de agua de grifo y una muestra de agua de pozo utilizada para riego de cultivos. A estas muestras se les determinó la conductividad y el pH, realizado por el Servicio Analítico LASEQA.

Las muestras fueron analizadas sin adicionar y adicionadas con un estándar de glifosato y AMPA a una concentración de 32 $\mu\text{g/L}$ empleando el método propuesto. Todas las muestras, fueron filtradas por gravedad con papel

Whatman # 2 y con filtros de jeringa de nylon como parte del pretratamiento de la muestra.

Para contrarrestar el efecto de matriz que produce la clorinación del agua, así como la presencia de metales, fue necesario incluir una etapa más de pretratamiento. Se probaron dos procedimientos, uno de ellos consistió en acidificar la muestra por una hora con ácido clorhídrico 6 N, posteriormente se neutralizó con hidróxido de sodio 6 N e inmediatamente se realizó la derivatización [70]. El otro procedimiento incluyó además de la acidificación de la muestra por una hora, la adición de EDTA y posteriormente se realizó la derivatización [16].

Una vez que se establecieron las etapas incluidas en el pretratamiento de la muestra, se realizó la extracción de las dos muestras por la TC-IL-DLLME desarrollada y se llevó al análisis por HPLC. Con las concentraciones obtenidas se calcularon el % R y el % DER para glifosato y AMPA.

CAPÍTULO 5

RESULTADOS

5.1 Implementación del método cromatográfico

En esta etapa se optimizaron las condiciones de separación y de derivatización y el método desarrollado fue validado.

5.1.1 Optimización de las condiciones de separación cromatográfica

En las figuras 5 y 6 se presentan los cromatogramas obtenidos para los derivados FMOC-Glifosato y FMOC-AMPA utilizando una columna de fase inversa C₈ con las condiciones presentadas en la tabla VI.

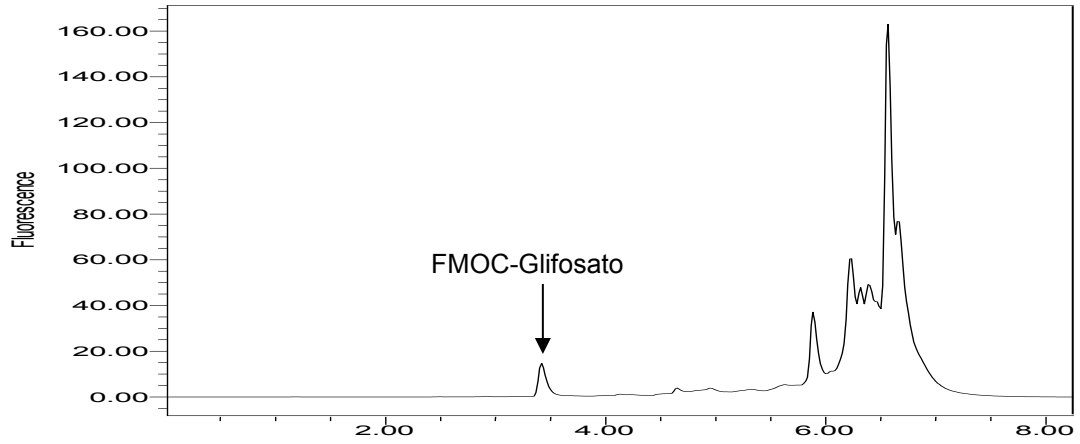


Figura 5. Cromatograma obtenido para FMOC-Glifosato (500 $\mu\text{g/L}$) con una columna C_8 . Fase móvil acetato de amonio (5 mM, pH 9)–acetonitrilo, en gradiente, 0.5 mL/min, 35°C.

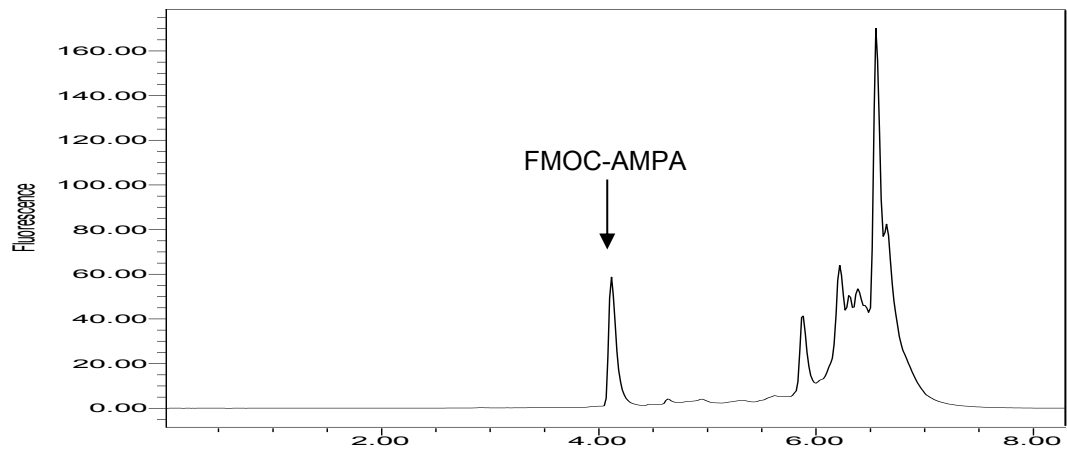


Figura 6. Cromatograma obtenido para FMOC-AMPA (500 $\mu\text{g/L}$) con una columna C_8 . Fase móvil acetato de amonio (5 mM, pH 9)–acetonitrilo, en gradiente, 0.5 mL/min. 35°C.

Para la columna HILIC, se optimizaron el pH de la fase acuosa, así como la fuerza iónica, el porcentaje de fase acuosa y la temperatura de la columna.

Los cromatogramas obtenidos con las condiciones de partida descritas en la tabla VII, se muestran en la figura 7 para el derivado FMOC-Glifosato y FMOC-AMPA.

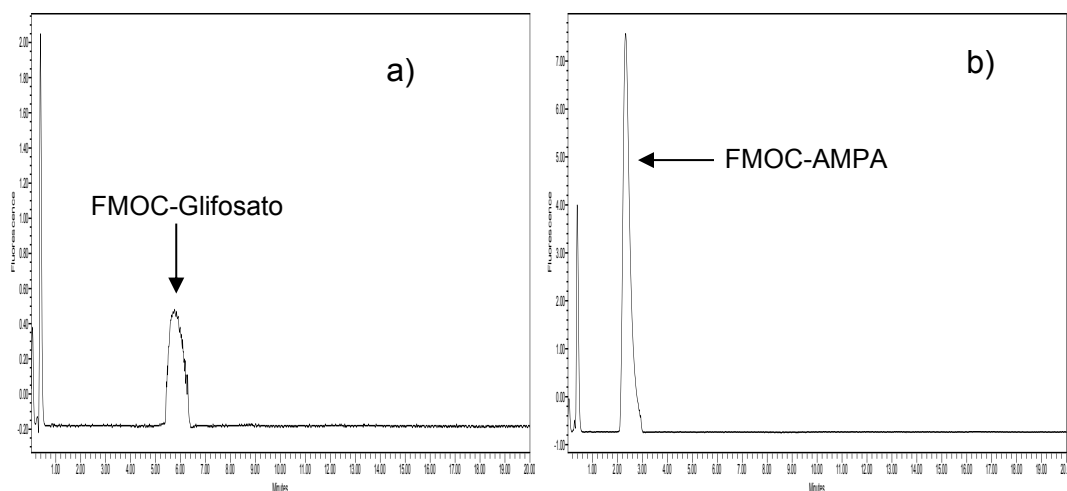


Figura 7. Cromatogramas obtenidos con las condiciones iniciales en modo HILIC para a) FMOC-Glifosato y b) FMOC-AMPA a 500 $\mu\text{g/L}$. Columna Kinetex HILIC, fase móvil acetato de amonio (100 mM, pH 7)-acetonitrilo 15:85, 1 mL/min, 40°C.

Otra variable estudiada fue la inclusión de un formador de par iónico a la fase acuosa, CTAB, el cromatograma obtenido para el derivado FMOC-glifosato se muestra en la figura 8.

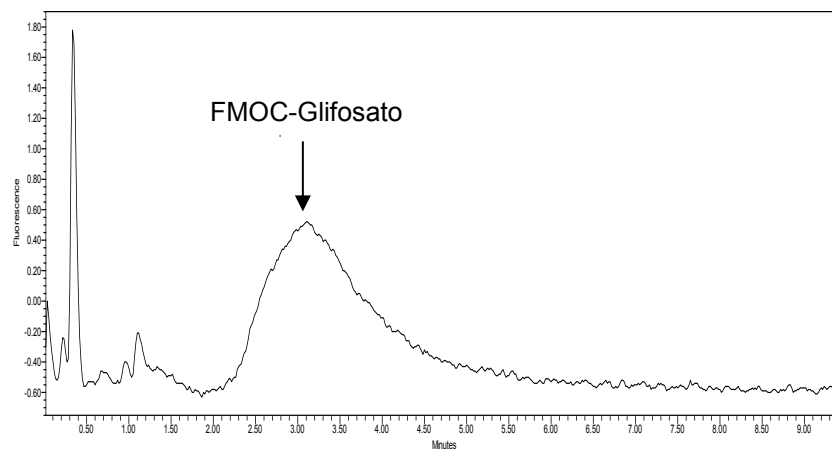


Figura 8. Cromatograma de FMOG-Glifosato (500 $\mu\text{g/L}$) con formación de par iónico en HILIC. Columna Kinetex HILIC, fase móvil acetato de amonio (100 mM, pH 7) con CTAB 10 mM-Acetonitrilo 15:85, 1 mL/min, 40°C.

En la tabla IX se presentan las condiciones óptimas de separación establecidas para el modo HILIC y en las figuras 9 y 10 los cromatogramas obtenidos para los derivados de glifosato y AMPA en estas condiciones.

Tabla IX. Condiciones óptimas de separación en modo HILIC.

Columna	Kinetex HILIC (4.6x50 mm, 2.6 μm)
Fase móvil	Acetonitrilo-acetato de amonio (250 mM, pH 7) 85:15
Flujo	1.2 mL/min
Volumen de inyección	5 μL
Temperatura de columna	40°C
Detección por Fluorescencia	λ_{exc} : 260 nm λ_{em} : 310 nm

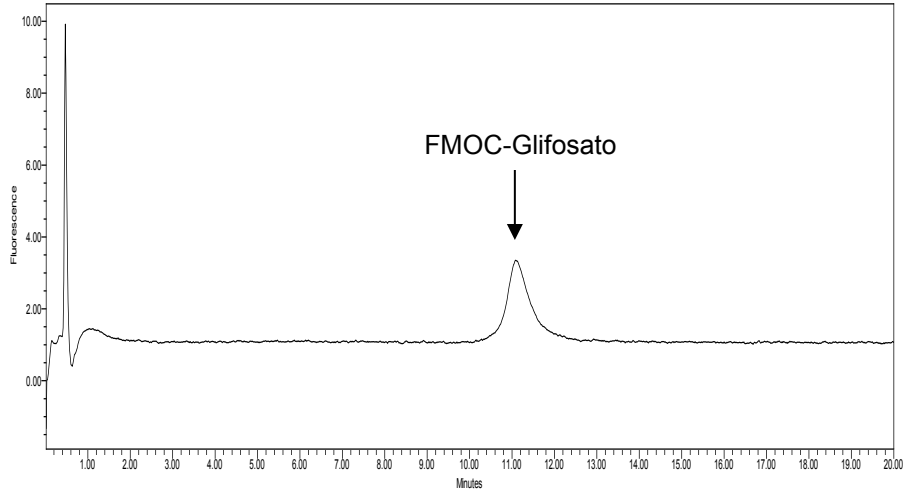


Figura 9. Cromatograma obtenido para FMOG-Glifosato (500 µg/L) bajo las condiciones óptimas de separación en modo HILIC (Tabla IX).

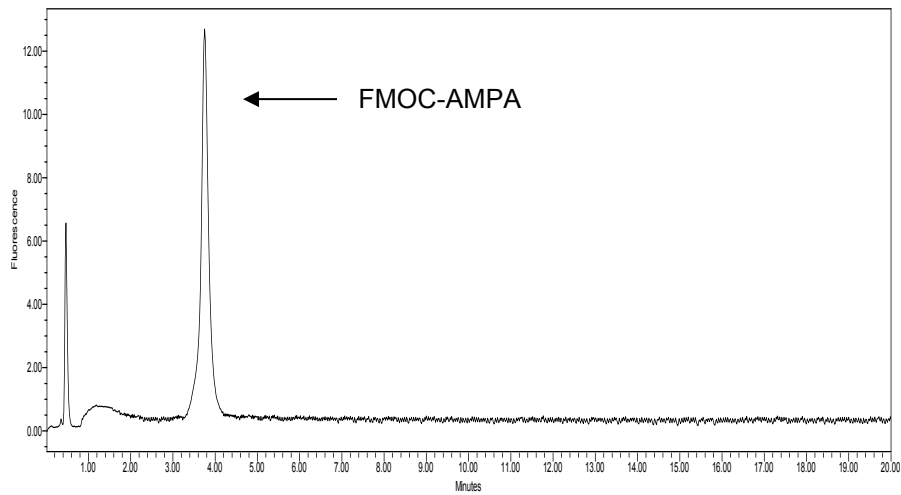


Figura 10. Cromatograma obtenido para FMOG-AMPA (500 µg/L) bajo las condiciones óptimas de separación en modo HILIC (Tabla IX).

En la figura 11 se muestra el cromatograma obtenido con el método HILIC para el derivado Fmoc-Glifosato, después de un poco número de inyecciones.

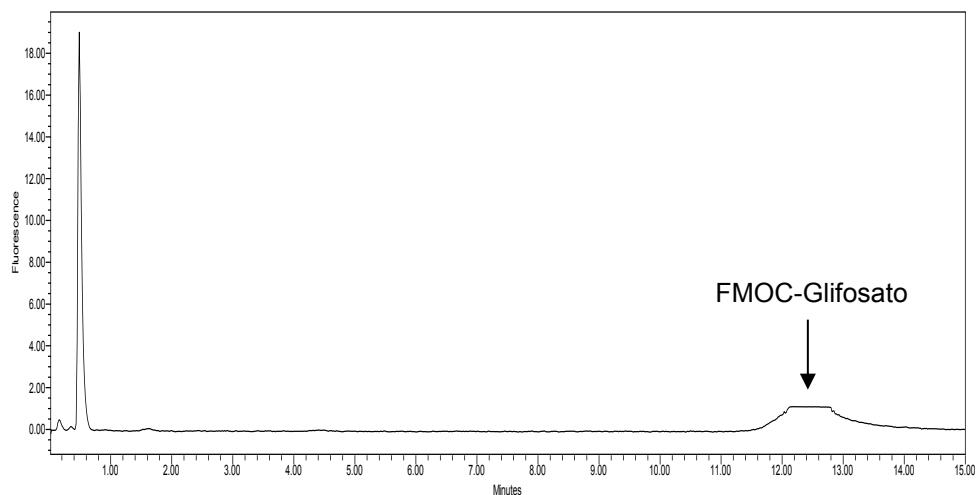


Figura 11. Cromatograma obtenido en modo HILIC para el Fmoc-Glifosato después de 10 inyecciones. Columna Kinetex HILIC, fase móvil acetato de amonio (250 mM, pH 7)-acetonitrilo 15:85, 1.2 mL/min, 40°C.

Por último, en la figura 12 se presentan los cromatogramas obtenidos con una columna Atlantis dC₁₈ en las condiciones mostradas en la tabla VIII.

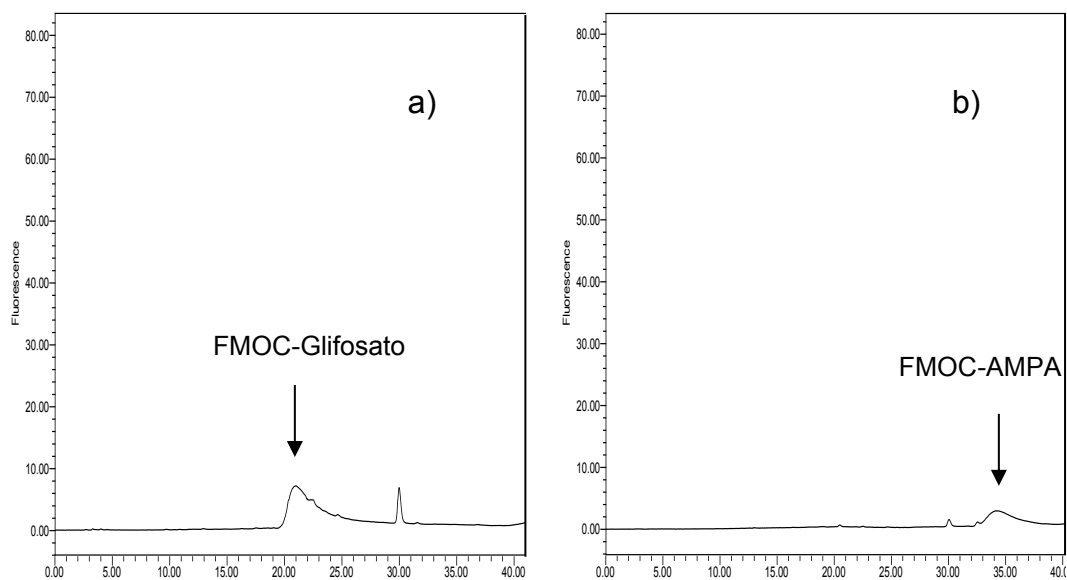


Figura 12. Cromatogramas de a) Fmoc-Glifosato y b) Fmoc-AMPA obtenidos con una columna Atlantis dC₁₈. Fase móvil formiato de amonio (5 mM, pH 3)-acetonitrilo, en gradiente, 0.3 mL/min, 40°C.

Las condiciones finales de separación para la columna Atlantis dC₁₈ se muestran en la tabla X y el cromatograma correspondiente en la figura 13.

Tabla X. Condiciones finales de separación utilizando una columna de fase inversa Atlantis dC₁₈.

Columna	Atlatis dC ₁₈ (4.6x150 mm, 3 μm)	
Fase móvil	A: Formiato de amonio (5 mM pH 3) B: Acetonitrilo	
Flujo	0.3 mL/min	
Gradiente	Tiempo (min)	%ACN
	0	30
	5.8	38
	13.8	38
	13.9	100
	24	100
	25	30
	45	30
Temperatura de columna	45°C	
Volumen de Líquido Iónico	20 μL	
Detección por Fluorescencia	λ _{exc} : 260 nm λ _{em} : 310 nm	

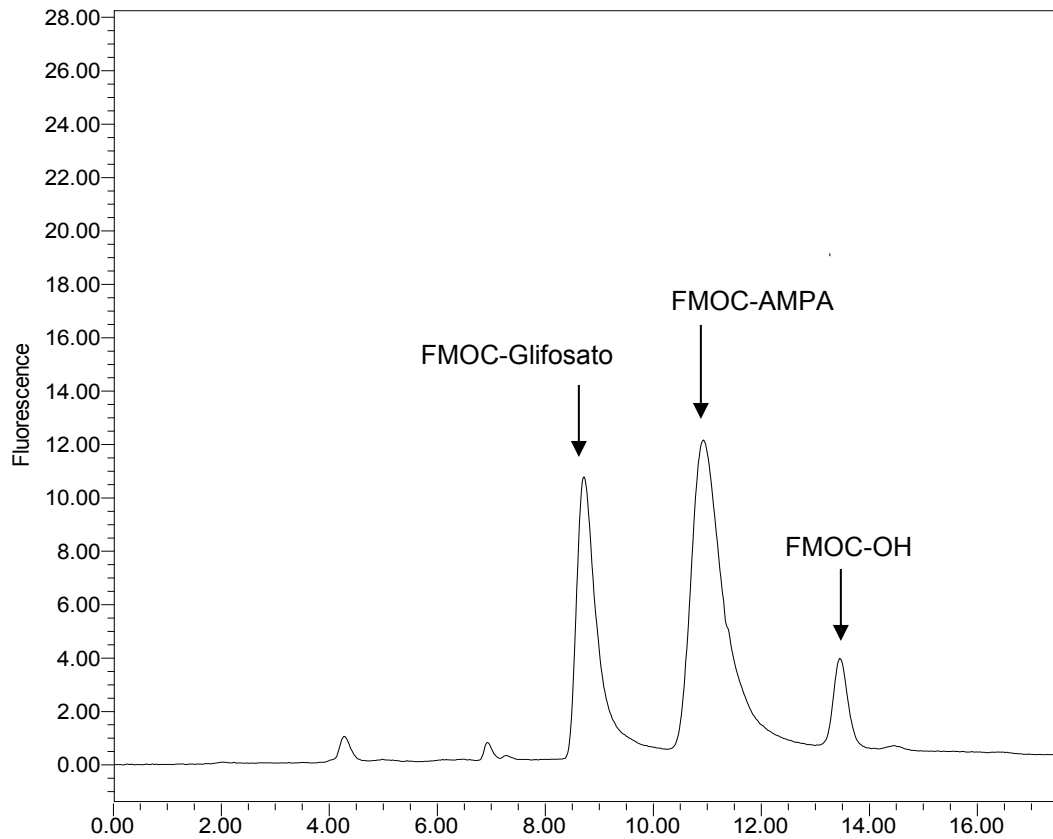


Figura 13. Cromatograma de Fmoc-Glifosato y Fmoc-AMPA adicionados con 20 μL de DMIM- BF_4 , bajo las condiciones finales de separación en columna de fase inversa Atlantis dC_{18} . Fase móvil formiato de amonio (5 mM, pH 3)-acetonitrilo, elución en gradiente, 0.3 mL/min, 45°C.

Este método cromatográfico fue seleccionado para el análisis de glifosato y AMPA en presencia de líquidos iónicos.

5.1.2 Optimización de la derivatización con 9-fluoroenilmetil cloroformato.

Como primer paso, se optimizó el porcentaje de acetonitrilo necesario para solubilizar al reactivo derivatizante (FMOC-Cl). En la tabla XI se muestran los resultados obtenidos para los diferentes porcentajes de acetonitrilo empleados y sometidos a diferente proceso de solubilización.

Tabla XI. Resultados de la solubilización de FMOC-Cl.

% Acetonitrilo	Solubilización
10	X
20	X
30	✓

✓ Soluble, X Insoluble.
n=3

De acuerdo a los resultados, se continuó el trabajo con un 30 % de acetonitrilo. Posteriormente se evaluó el efecto del calentamiento y la agitación en ultrasonido durante el proceso de derivatización en la respuesta de los analitos y en la figura 14 se presentan los resultados.

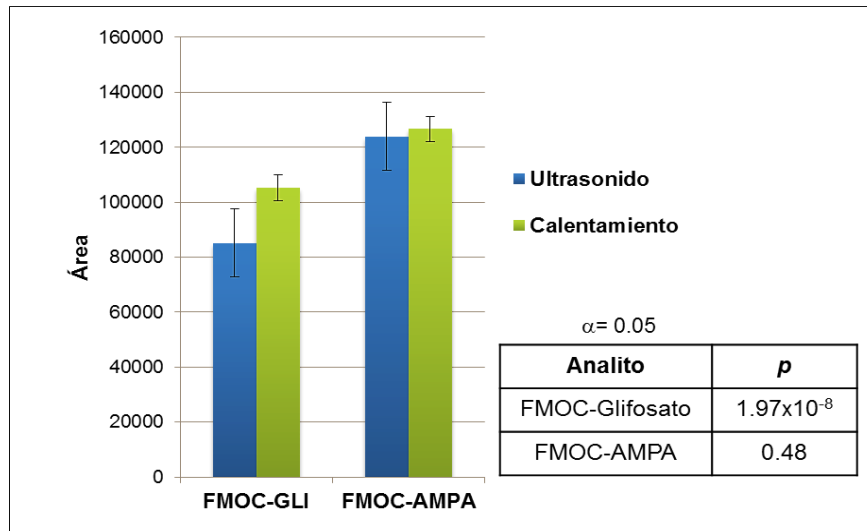


Figura 14. Efecto del calentamiento y la agitación en ultrasonido sobre la eficiencia de la derivatización de glifosato y AMPA (n=3).

La siguiente variable optimizada fue el efecto de la temperatura de reacción en la respuesta, los resultados se muestran en la figura 15.

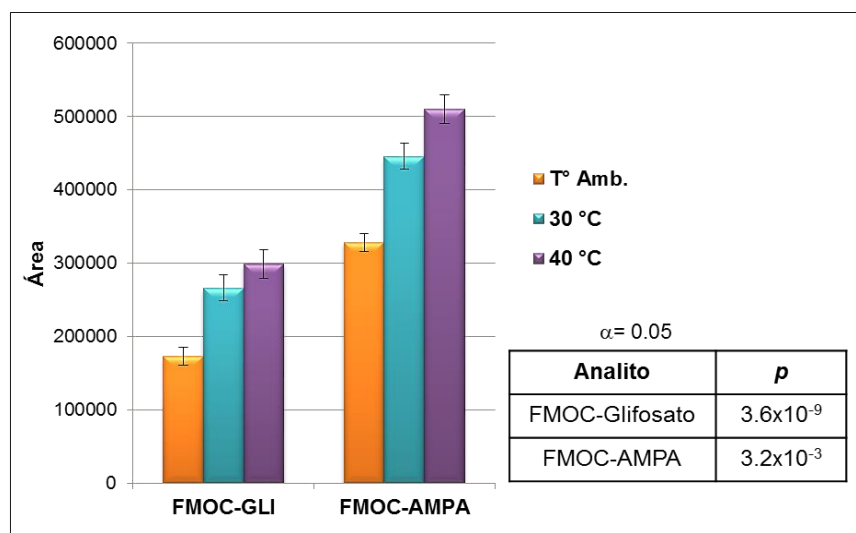


Figura 15. Efecto de la temperatura de reacción sobre la eficiencia de la derivatización de glifosato y AMPA (n=3).

Por último, en la figura 16 se muestra el efecto del tiempo de reacción en la respuesta.

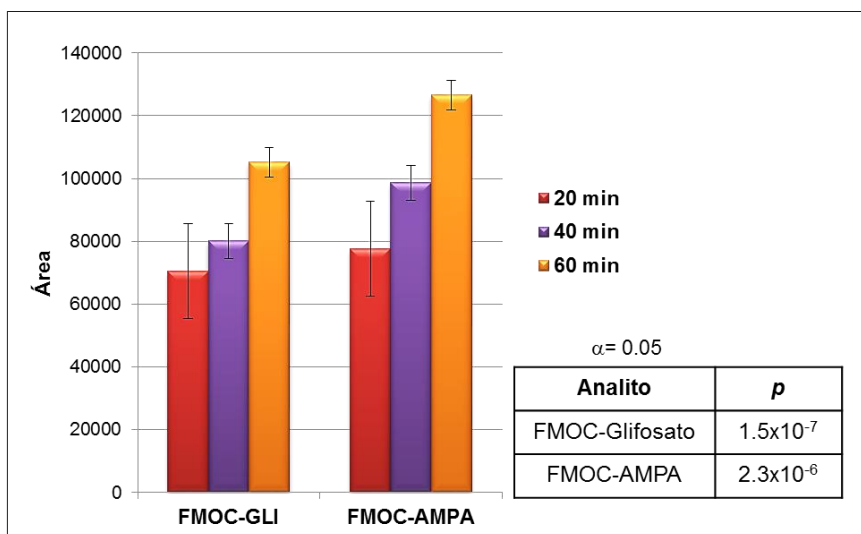


Figura 16. Efecto del tiempo de reacción sobre la eficiencia de la derivatización de glifosato y AMPA (n=3).

En la tabla XII se resumen las condiciones óptimas para la reacción de derivatización de glifosato y AMPA.

Tabla XII. Condiciones óptimas para la derivatización de glifosato y AMPA con FMOC-Cl.

Variable	Valor óptimo
Porcentaje de acetonitrilo	30%
Tiempo de reacción	60 minutos
Temperatura de reacción	40°C

5.1.3 Validación del método cromatográfico

Teniendo establecido el método cromatográfico (Tabla X), así como las condiciones de derivatización que proporcionaron una mayor señal cromatográfica, se realizó la validación del método cromatográfico.

5.1.3.1 Linealidad.

En las figuras 17 y 18 se presentan las curvas de calibración construidas a 5 niveles de concentración (22.5, 45, 90, 180 y 360 µg/L) para FMOC-Glifosato y FMOC-AMPA.

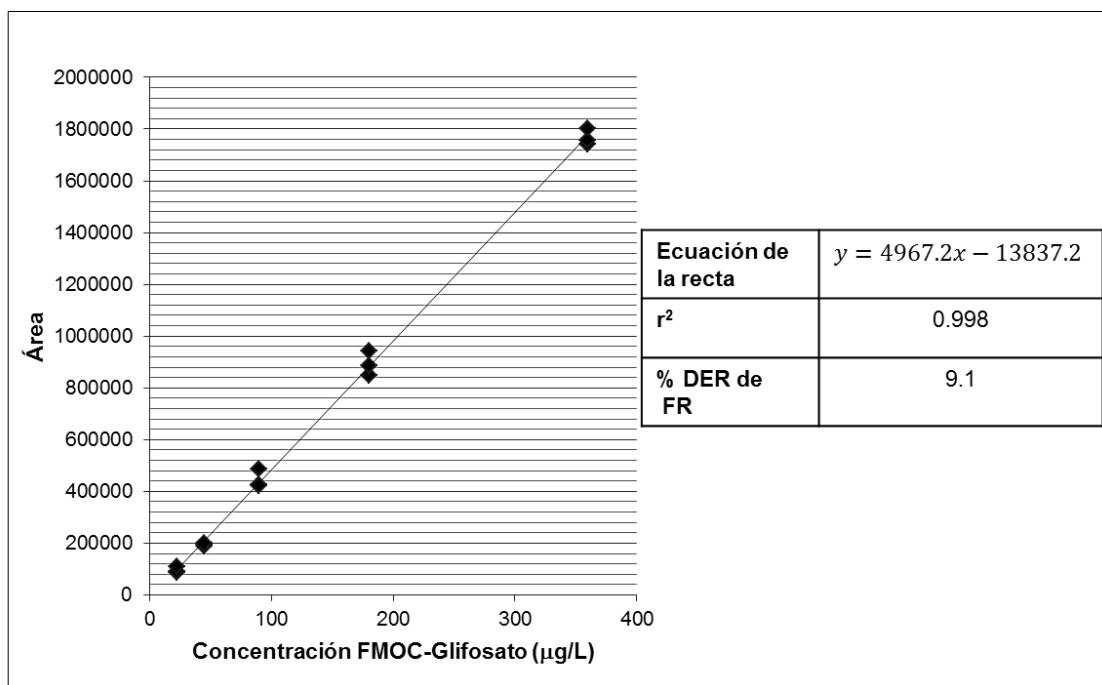


Figura 17. Curva de calibración obtenida para FMOC-Glifosato.

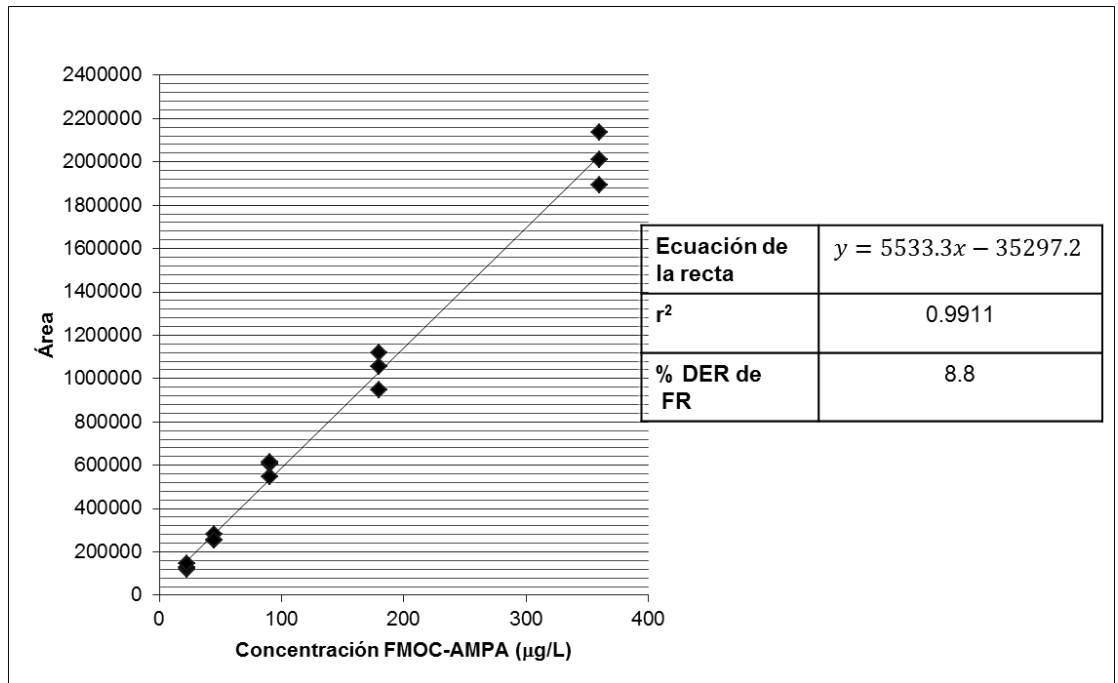


Figura 18. Curva de calibración obtenida para FMOC-AMPA.

5.1.3.2 Exactitud.

En las figuras 19 y 20 se presentan las gráficas obtenidas en la evaluación de la correlación entre la concentración calculada y la concentración real para FMOC-Glifosato y FMOC-AMPA.

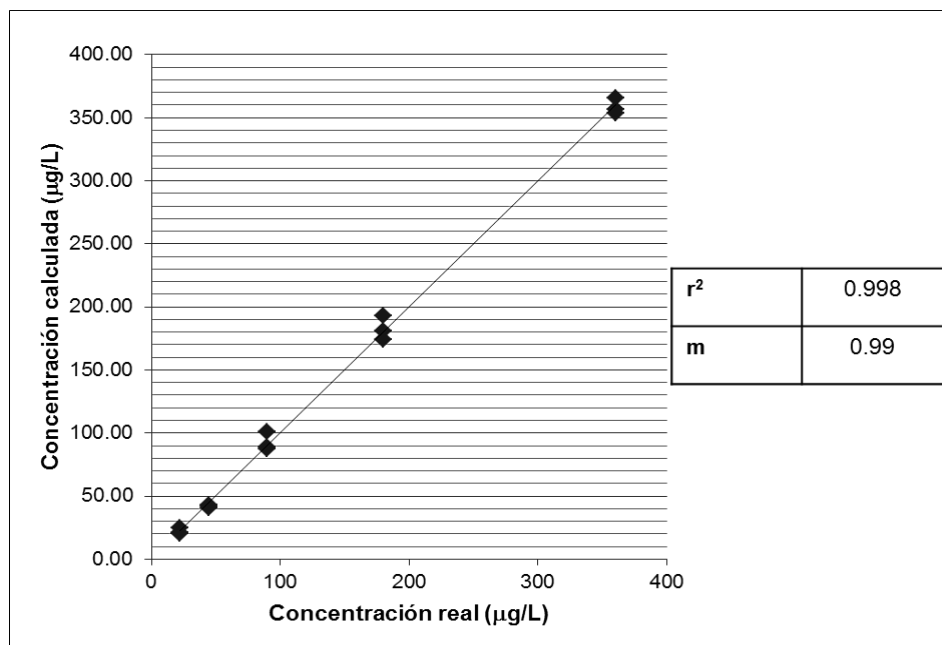


Figura 19. Gráfica de la concentración calculada en función de la concentración real de Fmoc-Glifosato.

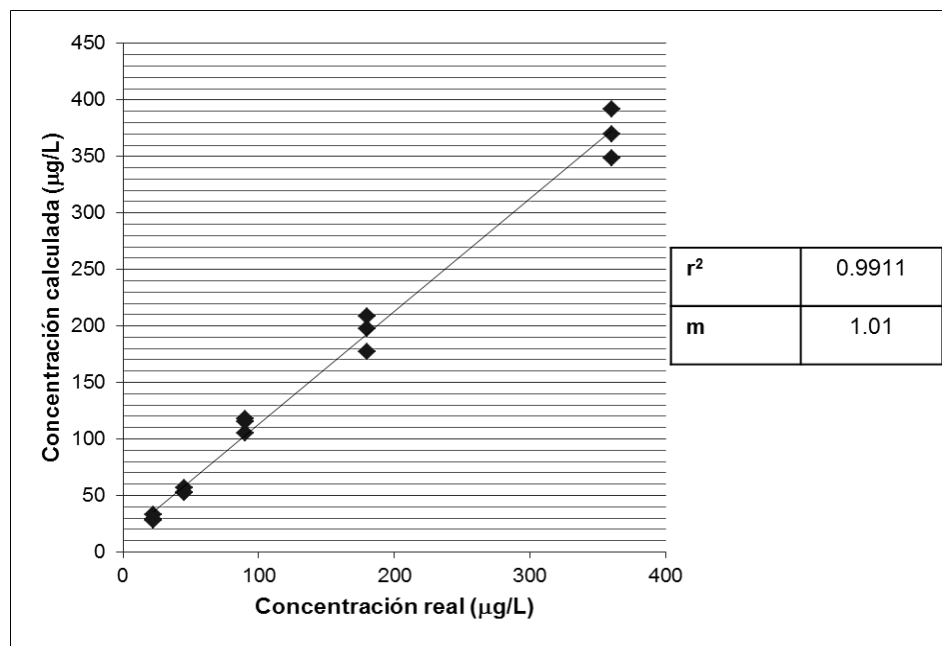


Figura 20. Gráfica de la concentración calculada en función de la concentración real de Fmoc-AMPA.

5.1.3.3 Precisión

En la tabla XIII se presentan los porcentajes de desviación estándar relativa (% DER) para estándares derivatizados de glifosato y AMPA, evaluados a tres niveles de concentración.

Tabla XIII. % DER de la concentración de los derivados de glifosato y AMPA.

Analito	Nivel	% DER
FMOC-Glifosato	Bajo: 22 µg/L	11.6
	Medio: 90 µg/L	8.3
	Alto: 360 µg/L	1.8
FMOC-AMPA	Bajo: 22 µg/L	11.8
	Medio: 90 µg/L	6.5
	Alto: 360 µg/L	6

n=3

5.1.3.4 Límites de detección y cuantificación.

En la tabla XIV se presentan los valores de los límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ) obtenidos para FMOC-glifosato y FMOC-AMPA.

Tabla XIV. Límites de detección y cuantificación del método cromatográfico para el análisis de glifosato y AMPA.

Analito	LOD ($\mu\text{g/L}$)	LOQ ($\mu\text{g/L}$)
FMOC-Glifosato	3.2	9.6
FMOC-AMPA	2.8	8.6

5.2 Selección del líquido iónico

En las tablas XV y XVI se presentan los resultados obtenidos para la selección del líquido iónico para la TC-IL-DLLME con el método de calentamiento de la mezcla de fase acuosa-LI y con el método de calentamiento de la fase acuosa.

Tabla XV. Selección del líquido iónico por el método de calentamiento de la mezcla de fase acuosa-LI.

Temperatura (°C)	Líquido iónico	Miscible	Nube de dispersión	Recuperación de LI (μL)
40	DMIM-BF ₄	Si	+++	50
	HMIM-otf	No	-	55
	Set ₃ -Ntf	Parcialmente	++	10
	HMIM-PF ₆	Parcialmente	+	55
50	DMIM-BF ₄	Si	+++	50
	HMIM-otf	No	-	50
	Set ₃ -Ntf	Parcialmente	++	20
	HMIM-PF ₆	Parcialmente	+	50
60	DMIM-BF ₄	Si	+++	50
	HMIM-otf	No	-	45
	Set ₃ -Ntf	Parcialmente	++	20
	HMIM-PF ₆	Parcialmente	++	40

n=3

- No forma nube de dispersión
- + Nube de dispersión ligera
- ++ Nube de dispersión moderada
- +++ Nube de dispersión abundante

Tabla XVI. Selección de líquido iónico por el método de calentamiento de la fase acuosa.

Temperatura (°C)	Líquido iónico	Miscible	Nube de dispersión	Recuperación de LI (μL)
40	DMIM-BF ₄	No	++	50
	HMIM-otf	No	-	57
	Set ₃ -Ntf	Parcialmente	++	40
	HMIM-PF ₆	No	+	70
50	DMIM-BF ₄	Parcialmente	+++	50
	HMIM-otf	No	-	50
	Set ₃ -Ntf	Si	+++	40
	HMIM-PF ₆	No	+	70
60	DMIM-BF ₄	Parcialmente	+++	50
	HMIM-otf	No	-	40
	Set ₃ -Ntf	Si	+++	40
	HMIM-PF ₆	No	++	70

n=3

- No forma nube de dispersión
- + Nube de dispersión ligera
- ++ Nube de dispersión moderada
- +++ Nube de dispersión abundante

5.3 Optimización de la TC-IL-DLLME

La optimización de la TC-IL-DLLME se realizó para los dos modos de calentamiento de la fase acuosa. A continuación se presentan los resultados de las variables optimizadas: volumen de LI, tiempo de calentamiento, tiempo de enfriamiento y tiempo de centrifugación.

5.3.1 Efecto del volumen de líquido iónico

En la figura 21 se presentan los resultados de la optimización de esta variable en la TC-IL-DLLME empleando el calentamiento de la mezcla de fase acuosa-LI. Mientras que los resultados para la TC-IL-DLLME con calentamiento de la fase acuosa se muestran en la figura 22.

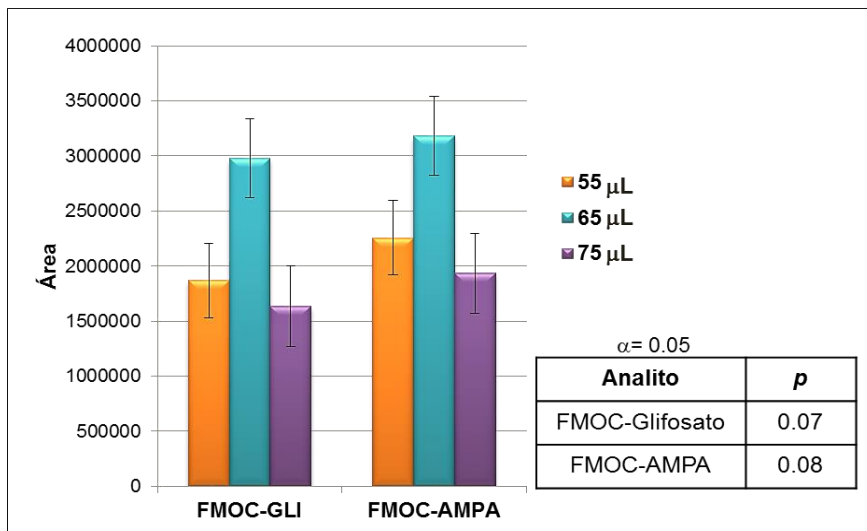


Figura 21. Efecto del volumen de líquido iónico en la TC-IL-DLLME empleando calentamiento de la mezcla de fase acuosa-LI (n=3).

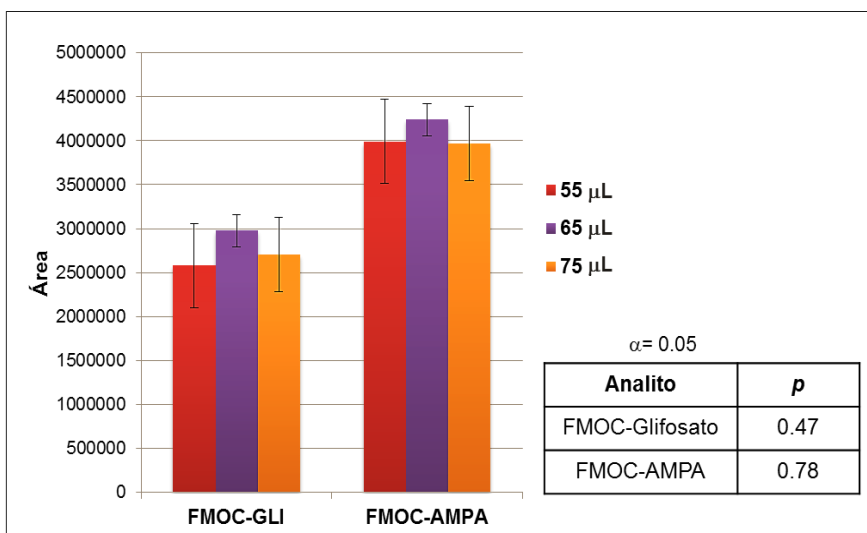


Figura 22. Efecto del volumen de líquido iónico en la TC-IL-DLLME empleando calentamiento de la fase acuosa (n=3).

5.3.2 Efecto del tiempo de calentamiento

Para la TC-IL-DLLME con calentamiento de la mezcla de fase acuosa-LI los resultados del efecto del tiempo de calentamiento se muestran en la figura 23 y los resultados para la TC-IL-DLLME con calentamiento de la fase acuosa en la figura 24.

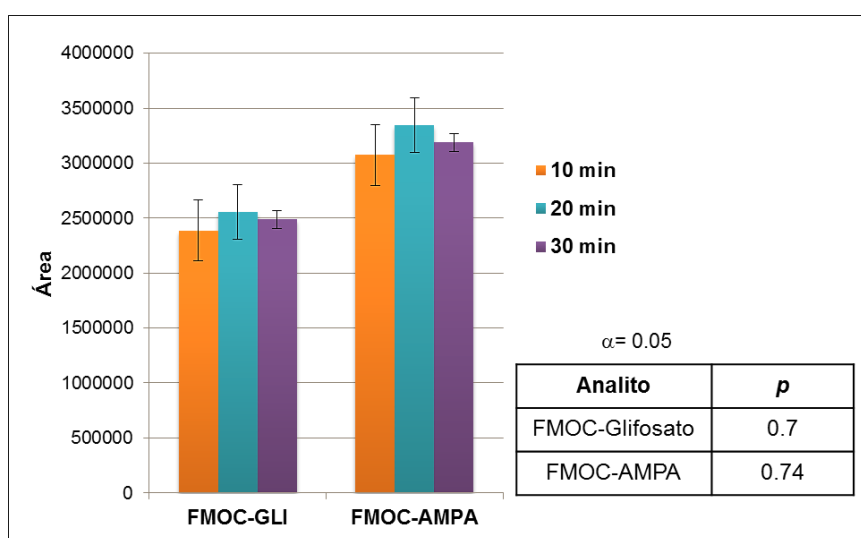


Figura 23. Efecto del tiempo de calentamiento en la TC-IL-DLLME empleando calentamiento de la mezcla de fase acuosa-LI (n=3).

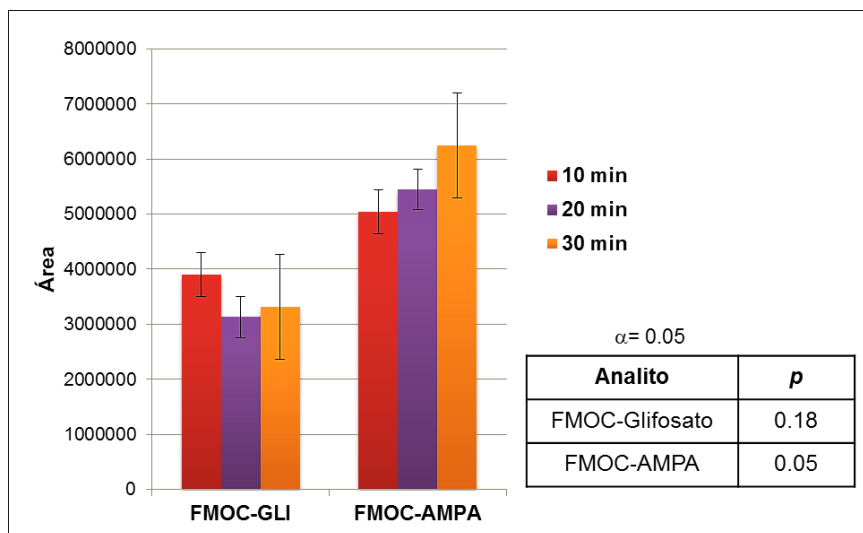


Figura 24. Efecto del tiempo de calentamiento en la TC-IL-DLLME empleando calentamiento de la fase acuosa (n=3).

5. 3. 3 Efecto del tiempo de enfriamiento

En la figura 25 se muestran los resultados del efecto del tiempo de enfriamiento para la TC-IL-DLLME empleando el calentamiento de la mezcla de fase acuosa-LI. Los resultados del efecto de esta variable en la TC-IL-DLLME con calentamiento de la fase acuosa se presentan en la figura 26.

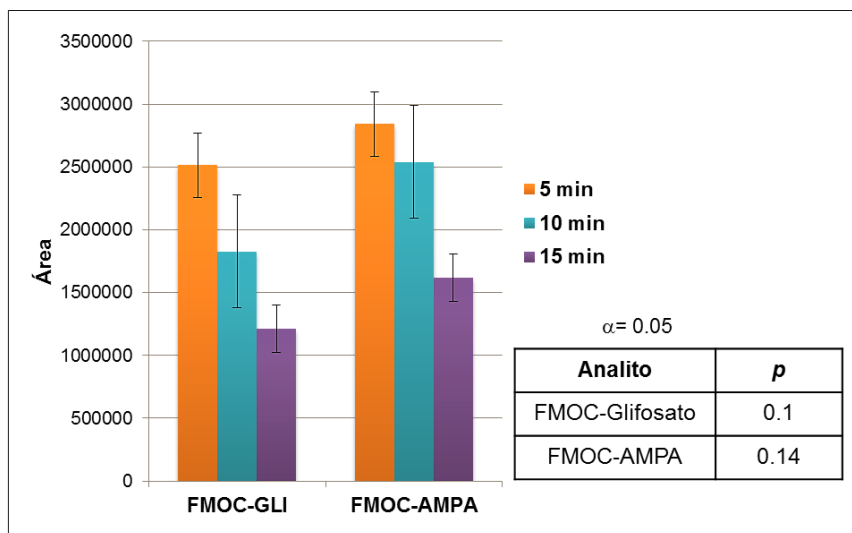


Figura 25. Efecto del tiempo de enfriamiento en la TC-IL-DLLME empleando calentamiento de la mezcla de fase acuosa-LI (n=3).

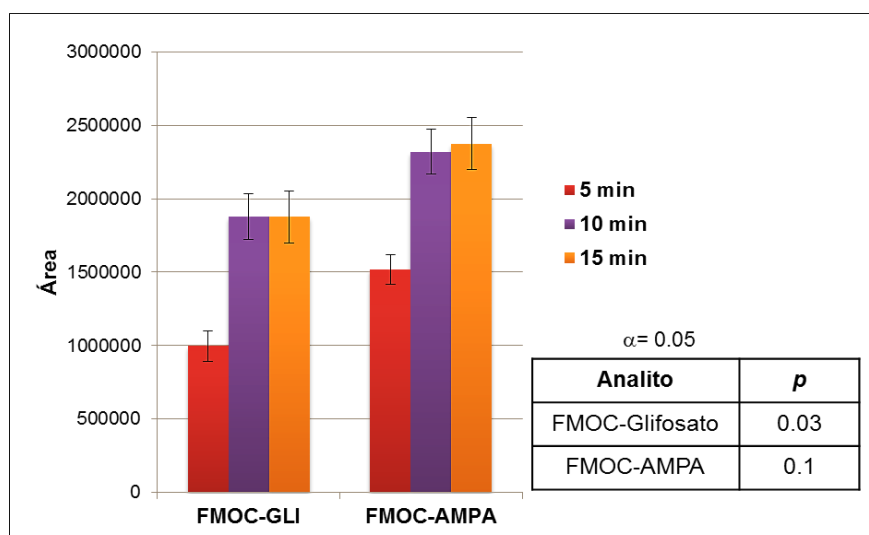


Figura 26. Efecto del tiempo de enfriamiento en la TC-IL-DLLME empleando calentamiento de la fase acuosa (n=3).

5.3.4 Efecto del tiempo de centrifugación

Los resultados de la optimización del tiempo de centrifugación para la TC-IL-DLLME calentando la mezcla de fase acuosa-LI y para la modalidad calentando la fase acuosa, se presentan en las figuras 27 y 28, respectivamente.

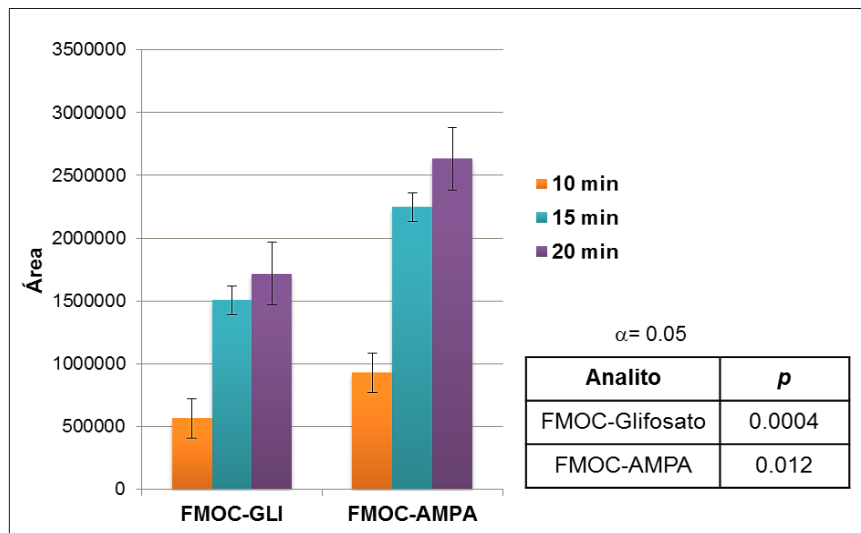


Figura 27. Efecto del tiempo de centrifugación en la TC-IL-DLLME empleando calentamiento de la mezcla de fase acuosa-LI (n=3).

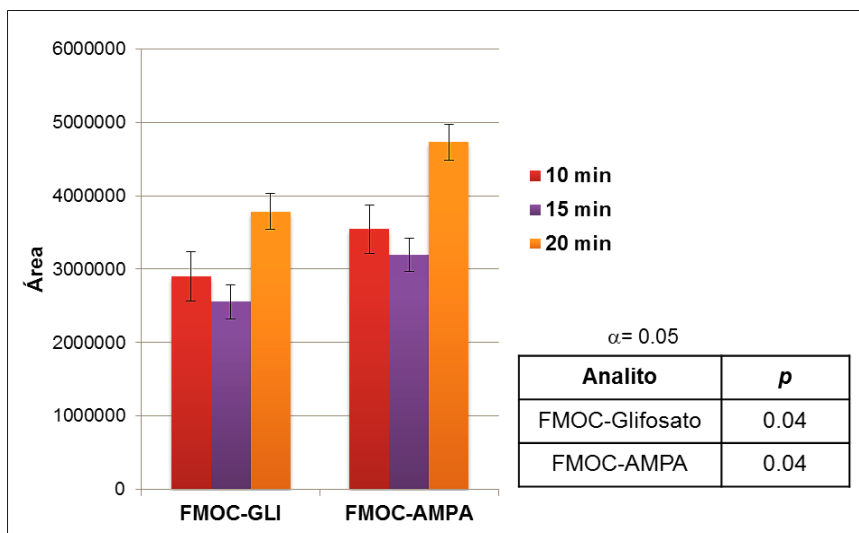


Figura 28. Efecto del tiempo de centrifugación en la TC-IL-DLLME empleando calentamiento de la fase acuosa (n=3).

En la tabla XVII se presenta un resumen de las condiciones establecidas para la TC-IL-DLLME en la modalidad de calentamiento de la mezcla de la fase acuosa-LI. El método desarrollado por TC-IL-DLLME con la modalidad de calentamiento de la fase acuosa se presenta en la tabla XVIII:

Tabla XVII. Condiciones óptimas de la TC-IL-DLLME empleando el método de calentamiento de la mezcla de la fase acuosa-LI.

Variable	Condición final
Líquido iónico	DMIM-BF ₄
Volumen de LI	65 μL
Temperatura	40°C
Tiempo de calentamiento	20 minutos
Tiempo de enfriamiento	5 minutos
Tiempo de centrifugación	20 minutos

Tabla XVIII. Condiciones óptimas de la TC-IL-DLLME con calentamiento de la fase acuosa.

Variable	Condición final
Líquido iónico	DMIM-BF ₄
Volumen de LI	65 μL
Temperatura	50°C
Tiempo de calentamiento	10 minutos
Tiempo de enfriamiento	10 minutos
Tiempo de centrifugación	20 minutos

5.4 Evaluación de la TC-IL-DLLME

En la tabla XIX se presentan los resultados obtenidos para el análisis de una solución de estándar con los métodos de TC-IL-DLLME desarrollados.

Tabla XIX. Resultados del análisis de una solución de estándares con los métodos de TC-IL-DLLME desarrollados.

Método de calentamiento	Analito	Concentración Real (µg/L)	Concentración Calculada (µg/L)	Volumen de LI recuperado (µL)	% R	% DER	FE
Mezcla Fase acuosa + LI	FMOC-Glifosato	25.9	141.7	42	92	7.1	5.5
	FMOC-AMPA	26.4	147.5		94	1.7	5.6
Fase acuosa	FMOC-Glifosato	25.9	131.1	48	97.3	1.7	5.1
	FMOC-AMPA	26.4	136.5		99.4	3.9	5.2

n=3

Considerando los resultados obtenidos en el análisis de estándares, se decidió continuar el trabajo con el método TC-IL-DLLME con calentamiento de la fase acuosa. En las figuras 29 y 30 se presentas las curvas de calibración obtenidas para estándares de los derivados de glifosato y AMPA a cinco concentraciones (0.84, 1.68, 3.36, 6.72 y 13.44 · g/L) analizados por el método de TC-IL-DLLME seleccionado.

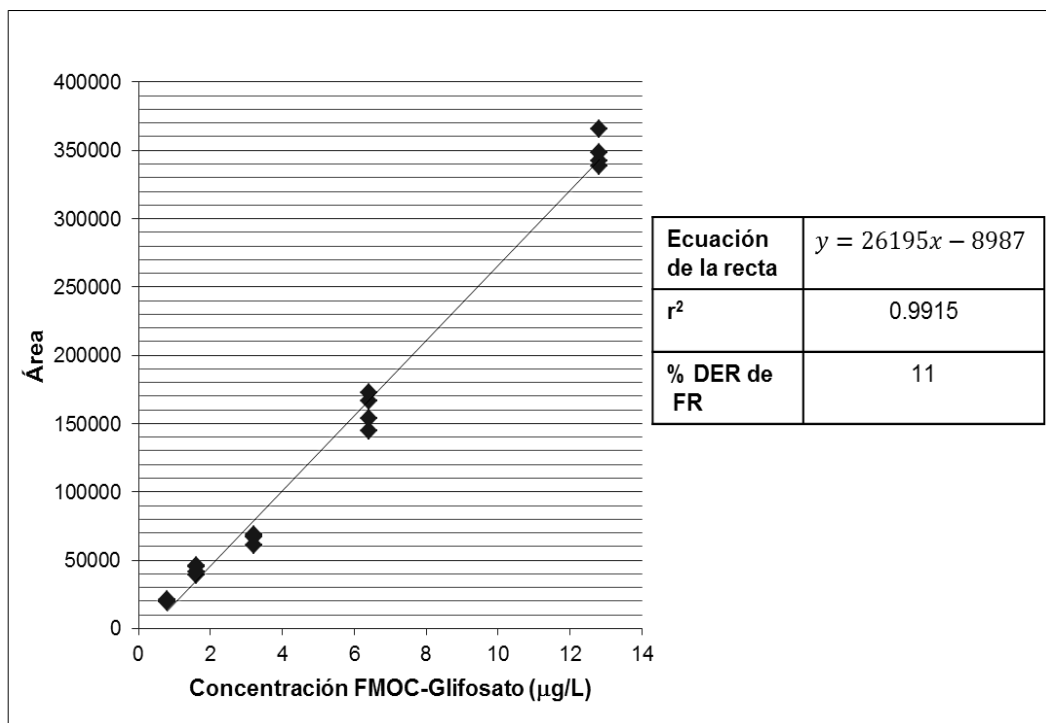


Figura 29. Curva de calibración obtenida para estándares de Fmoc-Glifosato analizados por el método TC-IL-DLLME seleccionado (n=3).

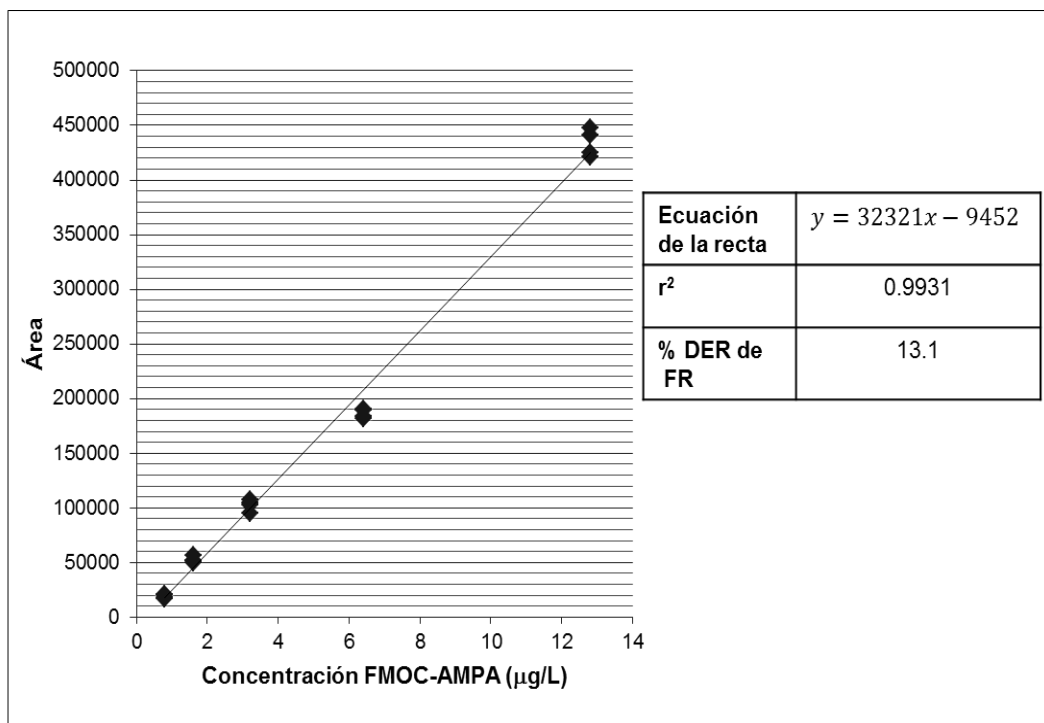


Figura 30. Curva de calibración obtenida para estándares de FMOC-AMPA analizados por el método de TC-IL-DLLME seleccionado (n=3).

En la tabla XX se presentan los límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ) obtenidos para el método seleccionado.

Tabla XX. Límites de detección y de cuantificación del método de TC-IL-DLLME seleccionado.

Analito	LOD (µg/L)	LOQ (µg/L)
FMOC-Glifosato	0.27	0.82
FMOC-AMPA	0.22	0.67

5.5 Evaluación de la aplicabilidad de la TC-IL-DLLME a muestras de agua

En la tabla XXI se muestran la información de las muestras incluidas en este estudio.

Tabla XXI. Muestras de agua analizadas.

Muestra	Origen	pH	Conductividad*
Agua de grifo	Facultad de Medicina UANL	7.22	78 mS/m
Agua de pozo	Huerta "La Noria" Montemorelos, Nuevo León	7.22	33 mS/m

En la figura 31 se presentan los cromatogramas obtenidos para las muestras de agua extraídas con el método desarrollado y sin ningún pretratamiento.

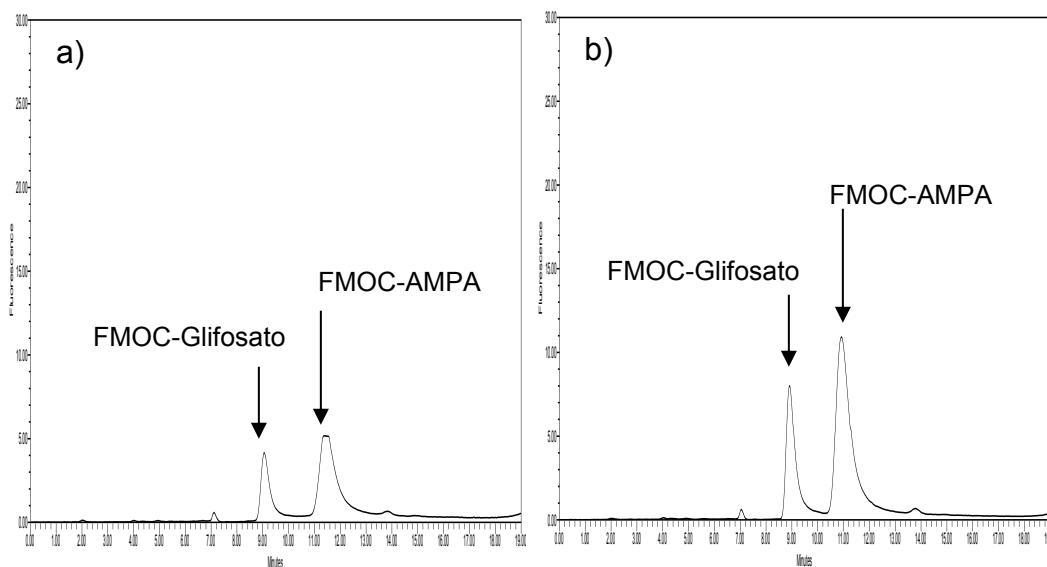


Figura 31. Cromatogramas obtenidos para las muestras de agua adicionadas a 32 $\mu\text{g/L}$ con Glifosato y AMPA extraídas con el método de TC-IL-DLLME propuesto. a) Agua de grifo y b) Agua de pozo. Columna Atlantis dC₁₈, fase móvil formiato de amonio (5 mM, pH 3)-acetonitrilo, elución en gradiente, 0.3 mL/min, 45°C.

En la figura 32 se presentan los cromatogramas obtenidos para las muestras de agua de grifo y agua de pozo acidificadas. En la figura 33 se muestran los cromatogramas obtenidos para las muestras incluidas en el estudio acidificadas y adicionadas con EDTA.

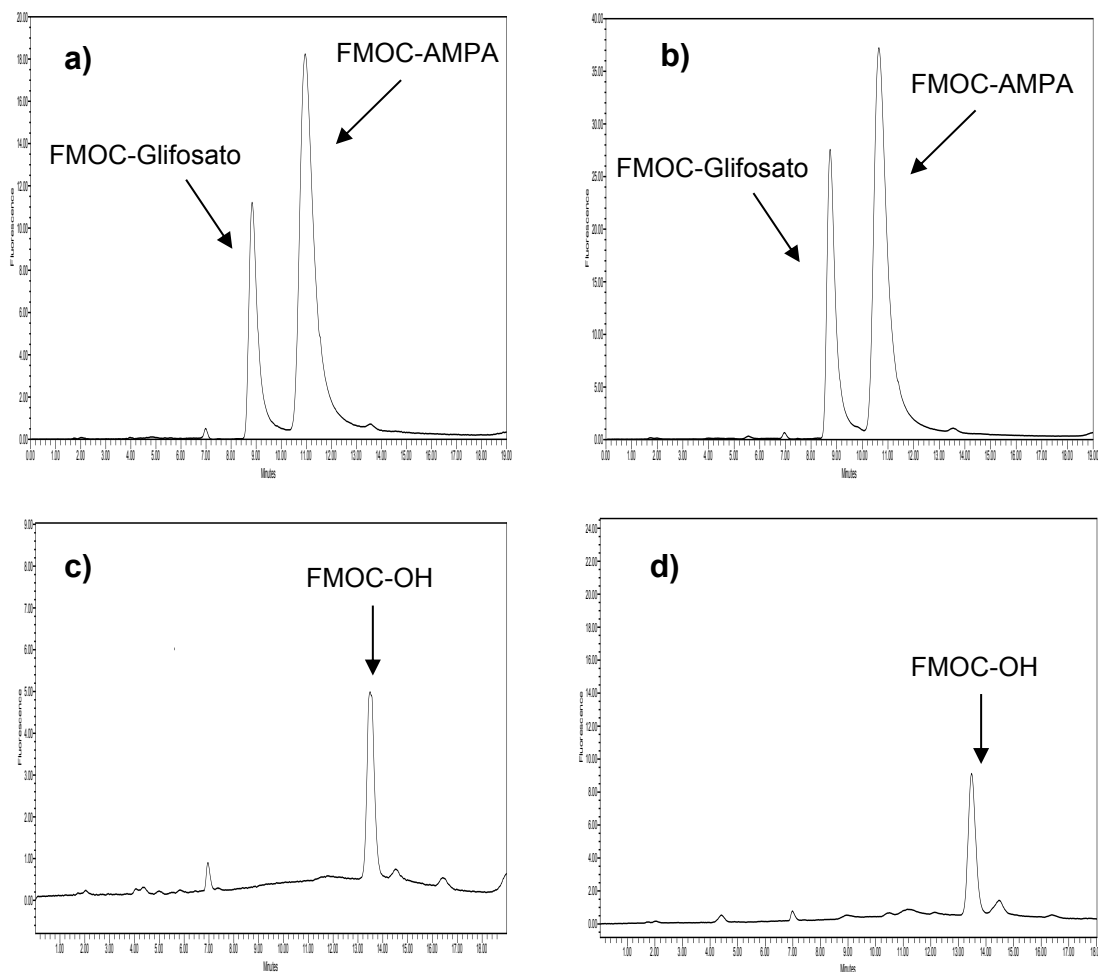


Figura 32. Cromatogramas de la extracción de las muestras acidificadas.

Adicionadas con glifosato y AMPA a 32 $\mu\text{g/L}$ a) agua de grifo y b) agua de pozo.

Sin adicionar; c) agua de grifo y d) agua de pozo. Columna Atlantis dC₁₈, fase

móvil formiato de amonio (5 mM, pH 3)-acetonitrilo, elución en gradiente, 0.3

mL/min, 45°C.

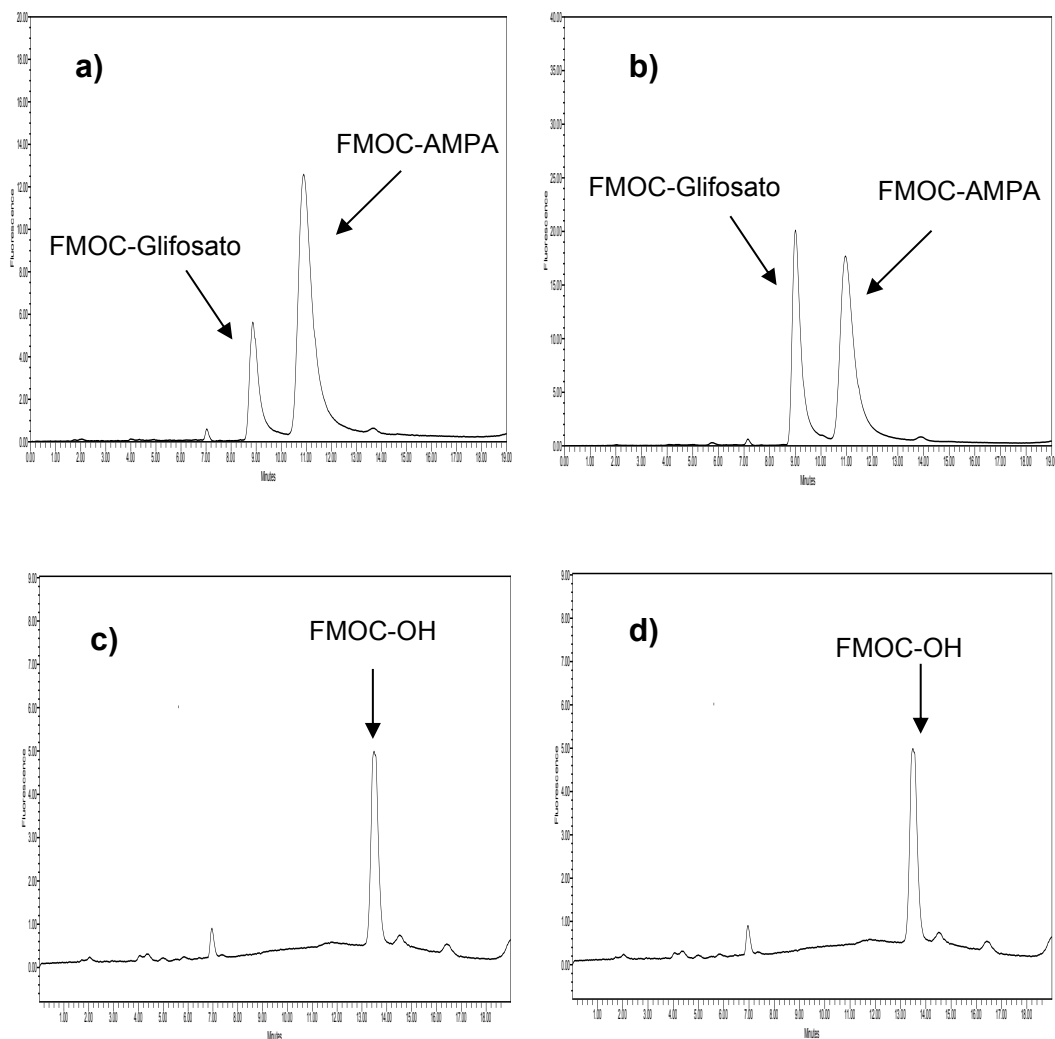


Figura 33. Cromatogramas de la extracción de las muestras acidificadas y agregando EDTA. Adicionadas con glifosato y AMPA a 32 $\mu\text{g/L}$ a) agua de grifo y b) agua de pozo. Sin adicionar; c) agua de grifo y d) agua de pozo. Columna Atlantis dC₁₈, fase móvil formiato de amonio (5 mM, pH 3)-acetonitrilo, elución en gradiente, 0.3 mL/min, 45°C.

En la tabla XXII se presentan los resultados obtenidos en la extracción de las muestras con y sin pretratamiento.

Tabla XXII. Resultados del análisis de las muestras de agua con y sin pretratamiento.

Analito	Muestra	Tratamiento	%R	FE	%DER
FMOG-Glifosato	Agua de grifo	Sin pretratamiento	25	1.3	40.3
		Acidificación + EDTA	26	1.2	1.1
		Acidificación	53	2.7	2.5
	Agua de pozo	Sin Pretratamiento	63.3	3.3	9
		Acidificación + EDTA	51	3	10.7
		Acidificación	95.8	5	1.6
FMOG-AMPA	Agua de grifo	Sin Pretratamiento	21.5	1.1	11.3
		Acidificación + EDTA	26.6	1.2	4
		Acidificación	98.8	5	1.2
	Agua de pozo	Sin Pretratamiento	68.8	3.6	5
		Acidificación + EDTA	54.3	3.2	9.8
		Acidificación	83	4.2	1.5

n=3

En la tabla XXIII se presenta el método completo desarrollado en este trabajo para el análisis de glifosato y AMPA en agua.

Tabla XXIII. Método desarrollado para el análisis de Glifosato y AMPA en agua.

Pretratamiento	1. Filtración 2. Acidificación de la muestra
Derivatización	Porcentaje de acetonitrilo: 30 % Temperatura de reacción: 40°C Tiempo de reacción: 60 minutos
Extracción TC-IL-DLLME	Líquido iónico: DMIM-BF ₄ Volumen de líquido iónico: 65 µL Método de calentamiento: Calentamiento de fase acuosa Temperatura de calentamiento: 50°C Tiempo de calentamiento: 10 minutos Tiempo de enfriamiento: 10 minutos Tiempo de centrifugación: 20 minutos a 3500 rpm, 25°C
Análisis HPLC-FD	Columna: Atlantis dC ₁₈ Fase móvil: A- Formiato de amonio (5 mM pH 3) B- Acetonitrilo Flujo: 0.3 mL/min Temperatura de columna: 45°C Volumen de LI: 20 µL Detección: Fluorescencia. λ_{exc} : 260 nm, λ_{em} : 310 nm

CAPÍTULO 6

DISCUSIÓN

6.1 Implementación del método cromatográfico

Como parte del desarrollo de la microextracción líquido-líquido dispersiva asistida por temperatura utilizando líquidos iónicos como solventes de extracción, fue necesario implementar un método cromatográfico que se adecuara a la presencia del líquido iónico al momento de realizar el análisis. Teniendo en cuenta este requerimiento fue necesario considerar durante la optimización de la separación cromatográfica contar con un sistema que fuera compatible con el líquido iónico empleado para la extracción del analito.

6.1.1 Optimización de la separación cromatográfica

De acuerdo a la información recabada durante la revisión bibliográfica realizada, se comenzó trabajando con una columna de fase inversa C_8 ya que esta fase estacionaria es de las más utilizadas. Las condiciones de partida que se emplearon, mostradas en la tabla VI, fueron las establecidas por el Servicio Geológico de los Estados Unidos [34]. Como el glifosato y el AMPA son compuestos muy hidrofílicos, es de esperarse que estos analitos eluyan con un alto contenido de agua en la fase móvil, tal como puede observarse en los cromatogramas presentados en las figuras 5 y 6. Considerando que el líquido iónico seleccionado (DMIM- BF_4) no es miscible en agua, solo en mezcla 50:50 con acetonitrilo, este método cromatográfico no resultó adecuado el análisis de glifosato y de AMPA, debido a que ambos analitos eluyen con un porcentaje de agua cercano al 90% en la composición de la fase móvil.

Por lo mencionado anteriormente, se evaluó el uso de la cromatografía de interacciones hidrofílicas (HILIC), ya que es una alternativa para el análisis de compuestos altamente hidrofílicos que emplea una proporción alta de solvente orgánico en la fase móvil, tal como lo requiere el líquido iónico al momento de introducirlo en el sistema cromatográfico.

En este tipo de cromatografía, es recomendable comenzar utilizando un porcentaje alto de solvente aprótico, de al menos 60 % en la fase móvil, ya que en HILIC, la fase móvil debe formar una capa rica en agua en la superficie de la

fase estacionaria polar, de manera que el analito se distribuye entre estas dos capas [71-72]. En nuestro caso, se comenzó trabajando con las condiciones de partida (Tabla VII), con un alto contenido de solvente orgánico en la fase móvil, lo que beneficiaba la introducción del líquido iónico en el sistema cromatográfico. Además de optimizar el porcentaje de fase acuosa, en HILIC es necesario optimizar la fuerza iónica y el pH de la fase acuosa.

En esta modalidad de cromatografía una molécula que se encuentra cargada es más hidrofílica que una molécula neutra, por lo tanto su retención se ve favorecida [71]. El glifosato presenta los valores de pKa de 0.8, 2.3, 6 y 11, por lo que se evaluó el uso de fases acuosas (acetato de amonio) a valores de pH de 3, 5, 6 y 7. Utilizando un pH de 7 se obtuvo una mejor retención y una mejor forma de la señal cromatográfica para ambos analitos.

Como se mencionó anteriormente, otra variable importante a optimizar en HILIC es la fuerza iónica. En este tipo de cromatografía, al utilizar una mayor concentración del buffer se mejora la forma de la señal cromatográfica, debido a que la presencia de una sal en la fase acuosa reduce las interacciones electrostáticas entre el analito cargado y la fase estacionaria [71-72]. En la figura 7, se presentan los cromatogramas obtenidos utilizando como fase acuosa acetato de amonio 100 mM, en el caso del glifosato es muy evidente como la forma de la señal cromatográfica no es favorecida utilizando esa concentración a consecuencia de interacciones secundarias que el analito presentaba con la fase estacionaria.

Qian proponen el uso de un reactivo formador de pares iónicos para mejorar las señales del glifosato [20]. Por lo que se evaluó el uso del bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB). A la fase móvil de acetato de amonio 100 mM se adicionó el CTAB a una concentración de 10 mM, sin embargo, a pesar de que se consiguió una pequeña mejora en la forma del pico (Figura 8) y se incrementó la retención del glifosato, la señal era muy ancha. Por lo anterior se decidió incrementar la concentración del acetato de amonio a 250 mM y hasta 500 mM, sin aditivos. Utilizando el buffer a una concentración de 250 mM se obtuvo una notable mejoría en la forma de la señal cromatográfica (Figura 9), al igual que con 500 mM, sin embargo, no se observó un cambio significativo en la forma de las señales cromatográficas entre estas dos concentraciones, por lo que se decidió trabajar con acetato de amonio a una concentración de 250 mM.

Con el método indicado en la tabla IX, se obtuvieron buenos resultados para los derivados de glifosato y AMPA, como se observa en los cromatogramas de las figuras 9 y 10. Sin embargo, fue necesario buscar otra alternativa para el análisis de glifosato y AMPA debido a que después de un bajo número de inyecciones, la señal cromatográfica del FMOC-Glifosato se deformaba (Figura 11). Este problema se atribuyó a una rápida saturación de la columna con la muestra inyectada, ya que se trabajó con una columna de núcleo sólido que cuenta con una cubierta de fase estacionaria muy delgada. Para evitar este problema, se evaluó disminuir el volumen de inyección pero, aunque la señal cromatográfica no se deformaba, la señal de los analitos fue muy baja.

Como se mencionó anteriormente, un aspecto prioritario en el desarrollo de la separación cromatográfica fue la compatibilidad con el líquido iónico, por lo que se decidió evaluar el uso de una columna de fase inversa con tecnología Aqua, ya que este tipo de fases estacionarias favorecen la retención de los compuestos hidrofílicos.

Se utilizó una columna Atlantis dC₁₈ y se evaluó inicialmente con las condiciones propuestas por Krueve [24], mismas que se presentan en la tabla VIII. Como puede verse en los cromatogramas de la figura 12, en estas condiciones ambos analitos presentaron una retención muy alta, por lo que fue necesario realizar ajustes en la composición de la fase móvil incrementando el porcentaje de solvente orgánico. Utilizando un 38 % de acetonitrilo fue posible lograr una buena retención y resolución de los analitos.

La adición de volúmenes de entre 10 y 20 μL de líquido iónico a la solución de los derivados de glifosato y AMPA inyectada, produjo una notable mejoría en la forma de los picos. Sin embargo, al incrementar el volumen de LI a 25 μL se observó una pérdida en la resolución. Se decidió seguir inyectando los derivados de glifosato y AMPA con 20 μL del líquido iónico DMIM-BF₄. En la tabla X se presenta el método de separación final para el análisis de glifosato y AMPA, que fue utilizado en el desarrollo del resto del trabajo y en la figura 13, se presenta el cromatograma obtenido con este método.

6.1.2 Optimización del procedimiento de derivatización

Como se mencionó anteriormente, debido a la ausencia de grupos cromóforos en las moléculas de glifosato y AMPA, es necesario realizar una derivatización previa de los analitos. En este trabajo se utilizó el FMOC-Cl como reactivo derivatizante, con el cual se producen derivados fluorescentes.

En este estudio, se tomó como método de partida el procedimiento propuesto por Hanke [16]. Brevemente, una alícuota de los estándares de glifosato y AMPA fue llevada a pH de al menos 9 adicionando buffer de boratos (50 mM, pH 9.5); posteriormente se añadió el reactivo derivatizante FMOC-Cl (1 mg/mL) y se dejó reaccionar por 120 minutos a temperatura ambiente.

La primera etapa de la optimización del procedimiento de derivatización, consistió en establecer el contenido de acetonitrilo en el medio de reacción para garantizar la solubilización del FMOC-Cl, ya que es insoluble en agua y es soluble en solventes orgánicos como acetonitrilo o acetona. En la literatura se ha reportado el uso de hasta un 50% de acetonitrilo [16, 23]. En este trabajo, se evaluaron 10, 20 y 30 % de acetonitrilo; los resultados se presentan en la tabla XI. Como puede observarse, solamente con 30 % de acetonitrilo fue posible solubilizar completamente al reactivo derivatizante y fue el contenido utilizado el resto del trabajo. Debe cuidarse el contenido de acetonitrilo empleado, ya que éste puede actuar como co-solvente en la extracción, por lo tanto se busca

emplear el mínimo contenido de acetonitrilo con el que el FMOC-Cl pueda solubilizarse.

Para favorecer el proceso de solubilización, se evaluó el uso de agitación en baño de ultrasonidos (20 min) y de calentamiento (40°C). Para ello se realizaron pruebas derivatizando estándares de glifosato y AMPA a una concentración de 500 µg/L que contenían un 30% de acetonitrilo. Una vez adicionado el reactivo derivatizante, estas soluciones se agitaron en baño de ultrasonidos durante 20 minutos o se calentaron en incubadora a 40°C, para después continuar con el proceso de derivatización. Como puede verse en la figura 14, con el uso de la agitación en ultrasonido, la respuesta del glifosato fue menor con respecto a la obtenida con calentamiento en baño de agua. En caso del AMPA, se observó una respuesta ligeramente mayor con agitación en ultrasonido. Dado que la respuesta obtenida para el glifosato era menor que la del AMPA, se decidió emplear un 30 % de acetonitrilo en la reacción de derivatización del glifosato con FMOC-Cl con calentamiento a 40°C.

En cuanto a la temperatura de reacción, los reportes de la literatura van desde temperatura ambiente, 40°C, hasta 80°C [16, 23 y 34]. Aunque Druart y colaboradores, encontraron una disminución en el rendimiento de la reacción con el incremento de la temperatura cuando ésta es mayor a los 30°C [23]. En este trabajo las temperaturas evaluadas fueron: la temperatura ambiente, 30 y 40°C. Como puede verse en la figura 15, a temperatura ambiente se obtuvo una menor respuesta y ésta aumenta para ambos analitos conforme se incrementa la temperatura de reacción.

Por último, en cuanto al tiempo de reacción, se han reportado periodos que van desde los 30 minutos hasta las 24 horas [16, 23 y 34]. En un estudio previo, encontramos que, con tiempos de reacción mayores a los 60 minutos, la respuesta de los analitos disminuía. Por lo tanto se decidió evaluar 20, 40 y 60 minutos de reacción. La figura 16 presenta los resultados obtenidos y se puede observar que la mejor respuesta se obtiene cuando la reacción se lleva a cabo por 60 minutos. En la tabla XII se presentan las condiciones de derivatización establecidas en este trabajo.

6.1.3 Validación del método cromatográfico

Una vez establecido el método de análisis, se realizó la validación del mismo. Se comenzó evaluando linealidad, para lo cual se construyeron curvas de calibración con soluciones de los derivados de glifosato y AMPA a concentraciones de 22 a 360 $\mu\text{g/L}$. En las figuras 17 y 18 se presentan las curvas obtenidas. El método demostró ser lineal en este intervalo de concentración, con un coeficiente de determinación mayor a 0.99 para ambos analitos y un % DER para los factores de respuesta de 9.1 % para glifosato y de 8.8 % para AMPA.

Para la evaluación de la exactitud, se calcularon las concentraciones de los estándares de calibración empleando la ecuación de la recta. En las figuras 19

y 20 se presentan las gráficas de la concentración calculada en función de la concentración real, y se realizó un análisis de regresión lineal. Para ambos analitos, se obtuvieron coeficientes de determinación mayores a 0.99 así como pendientes cercanas a 1, lo que indica que existe una buena correlación y puede considerarse que el método es exacto.

Para evaluar la precisión del método, se obtuvo el % DER para los estándares a tres niveles de concentración, los resultados se presentan en la tabla XIII. Tal como se observa, para ambos analitos la variación fue menor al 12 % en los tres niveles de concentración evaluados.

Por último, los límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ) del método cromatográfico se calcularon con las ecuaciones 3 y 4 respectivamente, utilizando la desviación estándar de la respuesta del blanco de reactivos y la pendiente de la curva de calibración de cada analito. Los valores obtenidos se muestran en la tabla XIV, siendo de 3.2 y de 2.8 $\mu\text{g/L}$ los LODs para glifosato y AMPA respectivamente, mientras que los LOQs obtenidos fueron de 9.6 y 8.6 $\mu\text{g/L}$ para glifosato y AMPA, respectivamente.

6.2 Selección del líquido iónico

En este trabajo se incluyeron 4 LIs, el DMIM-BF₄, HMIM-PF₆, HMIM-otf y Set₃-Ntf que fueron seleccionados considerando los coeficientes de partición líquido iónico-agua establecidos por Garza Tapia [27] para fármacos hidrofílicos.

Estos cuatro LIs se evaluaron para determinar cuáles cumplían con los requisitos de la TC-IL-DLLME, es decir, si eran miscibles con agua en caliente y formaran la nube de dispersión en frío. Como criterio adicional para la selección del LI se estableció la recuperación de al menos 40 µL, el manejo de cantidades muy pequeñas genera un margen de error mayor.

La selección del LI se realizó empleando dos variantes para la etapa de calentamiento, una de las modalidades consistió en calentar la mezcla fase acuosa-LI y la otra variante en calentar solamente la fase acuosa para posteriormente inyectar el LI. En ambos casos, una vez realizado el calentamiento para miscibilizar las fases (40, 50 y 60°C), la solución se enfrió en baño de hielo para formar la nube de dispersión y posteriormente los tubos fueron centrifugados (3500 rpm, 25°C) para recuperar el LI.

Los resultados obtenidos para la modalidad de calentamiento de la mezcla fase acuosa-LI se presentan en la tabla XV. Como puede observarse, el HMIM-otf no fue miscible a ninguna de las temperaturas empleadas, mientras que el HMIM-PF₆ y el Set₃-Ntf fueron parcialmente miscibles a las tres temperaturas probadas, solamente el DMIM-BF₄ fue miscible desde los 40°C. Este LI fue

también el que presentó la mejor nube de dispersión. En lo que respecta a la recuperación, con todos los LIs fue posible recuperar un volumen de al menos 40 μL , a excepción del $\text{Set}_3\text{-Ntf}$ que dio como máximo una recuperación de 20 μL . Considerando estos resultados, se decidió continuar el trabajo con DMIM-BF_4 a 40°C para la modalidad de calentamiento de la mezcla fase acuosa-LI.

Para la variante de calentamiento de la fase acuosa y posterior inyección del LI, los resultados obtenidos se muestran en la tabla XVI. Para esta modalidad de calentamiento, solamente el $\text{Set}_3\text{-Ntf}$ resultó parcialmente miscible a 40°C. Cuando se aumentó la temperatura a 50°C, además del $\text{Set}_3\text{-Ntf}$, el DMIM-BF_4 también resultó miscible. Ni el HMIM-PF_6 ni el HMIM-otf fueron miscibles a ninguna de las temperaturas probadas.

Por otro lado, tanto el $\text{Set}_3\text{-Ntf}$ como el DMIM-BF_4 formaron una buena nube de dispersión. Sin embargo, a pesar de que el $\text{Set}_3\text{-Ntf}$ puede usarse como solvente de extracción trabajando a 40°C, se decidió no utilizarlo debido a la incompatibilidad con la fase móvil del método cromatográfico ya que no es miscible en esta. Por ello, para la modalidad de calentamiento de la fase acuosa el DMIM-BF_4 fue seleccionado como solvente de extracción.

De acuerdo con la bibliografía consultada, para la microextracción líquido-líquido dispersiva asistida por temperatura, entre los LIs más utilizados se encuentran aquellos en los que está presente el anión hexafluorofosfato [55-67], destacando el HMIM-PF_6 , aunque generalmente éste es utilizado con temperaturas que van desde los 60 a los 80°C [55-63]. En nuestro caso, utilizar una temperatura mayor a los 60°C no resultó viable, debido a que los derivados

FMOC-Glifosato y FMOC-AMPA son termolábiles, por lo tanto, una de las prioridades en la selección del LI, además de lo anteriormente mencionado, fue que la temperatura para miscibilizar al LI no fuera mayor a los 60°C.

6.3 Optimización de la TC-IL-DLLME

Para las dos modalidades de calentamiento mencionadas anteriormente, se optimizaron además, otras variables que afectan la eficiencia de la extracción como el tiempo de calentamiento, tiempo de enfriamiento, tiempo de centrifugación y volumen de LI.

6.3.1 Efecto del volumen de líquido iónico

Una vez seleccionado el LI, se estableció el volumen del LI empleado. Esto se define de acuerdo a la recuperación que se quiere obtener del LI, por lo tanto este parámetro debe ajustarse teniendo en cuenta lo anterior. En el caso del calentamiento de la mezcla fase acuosa-LI, cuando se utiliza un volumen muy grande de LI, no se logra miscibilizar el total de LI, quedando un exceso que puede pegarse en las paredes del tubo y por lo tanto los analitos pueden migrar

hacia ese LI, que al centrifugar, no forma parte del sedimento que es llevado al análisis, observándose una disminución en la eficiencia de la extracción [60]. Si se utiliza un volumen muy pequeño, se corre el riesgo de recuperar una muy pequeña cantidad del LI para realizar el análisis, afectando la eficiencia de la extracción, ya que al recuperar poca cantidad del solvente de extracción conlleva a disminuir la recuperación de los analitos.

Se evaluaron 55, 65 y 75 μL de LI. Las figuras 21 y 22, muestran los resultados obtenidos para la modalidad de calentamiento de la mezcla fase acuosa-LI y para la modalidad de calentamiento de la fase acuosa, respectivamente. Como puede verse, cuando se utilizaron 55 μL de DMIM- BF_4 , se obtuvo la menor respuesta, la cual aumentó con 65 μL y posteriormente disminuyó con 75 μL del LI. Estos resultados coinciden con lo descrito por Zhou [61], que reporta que un mayor volumen de LI, resulta en una menor miscibilidad, con lo que el área de contacto entre el analito y la fase extractante disminuye afectando la migración de los analitos al LI y por lo tanto la eficiencia de la microextracción.

Este comportamiento se observó con las dos modalidades de calentamiento evaluadas, por lo que 65 μL fue el volumen de LI seleccionado.

6.3.2 Efecto del tiempo de calentamiento

La temperatura es un factor que juega un papel importante en el proceso de extracción, ya que puede afectar la transferencia de masa de los analitos e incrementar el área de contacto entre el LI y la fase acuosa [62, 64]. Por ello, el tiempo de calentamiento fue optimizado probando 10, 20 y 30 minutos para las dos modalidades de calentamiento.

Para la TC-IL-DLLME calentando la mezcla de la fase acuosa-LI, los resultados se presentan en la figura 23. Como puede observarse, calentando por 20 minutos se obtuvo la respuesta más alta para ambos analitos así como la menor desviación estándar en la respuesta.

Para la modalidad de calentamiento de la fase acuosa, se observó un comportamiento diferente. Como puede verse en la figura 24, para el glifosato con un calentamiento de 10 minutos se obtuvo la mejor respuesta, mientras que para el AMPA el máximo se obtuvo a los 30 minutos. Aunque con este periodo la variación en la respuesta es mayor para ambos analitos. Dado que el glifosato fue el analito que presentó la menor respuesta, se decidió continuar el trabajo con un tiempo de calentamiento de 10 minutos.

Esta diferencia en el tiempo requerido para el calentamiento es atribuido a que, cuando se trabaja con una mezcla, se ocupa más tiempo para alcanzar la temperatura necesaria para miscibilizar las fases, mientras que, cuando se trabaja con la fase acuosa precalentada, el líquido iónico se miscibiliza

rápidamente con la fase acuosa debido a que ésta ya cuenta con la temperatura adecuada.

6.3.3. Efecto del tiempo de enfriamiento

En la TC-IL-DLLME, el tiempo de enfriamiento es uno de los pasos más importantes en el proceso, ya que durante este periodo se forma la nube de dispersión, lo cual incrementa la transferencia de los analitos desde la fase acuosa hacia el LI, siendo considerado como tiempo de extracción el periodo comprendido entre el inicio del enfriamiento en el baño de hielo y el inicio de la centrifugación [61, 65].

En este trabajo se evaluaron 5, 10 y 15 minutos de enfriamiento. Para la modalidad de la TC-IL-DLLME con calentamiento de la mezcla fase acuosa-LI se encontró que al ir incrementando el tiempo de extracción, disminuye la eficiencia tanto para el glifosato como para el AMPA. Como puede observarse en la figura 25 un tiempo de enfriamiento de 5 minutos produjo la mejor respuesta. Los resultados para la TC-IL-DLLME con calentamiento de la fase acuosa se muestran en la figura 26; como puede verse, la mayor respuesta se alcanzó con un tiempo de enfriamiento de 10 minutos. La diferencia en los tiempos de enfriamiento con las dos modalidades de calentamiento se debe a que, cada una de las modalidades se trabajó con diferente temperatura, siendo

mayor cuando se trabajó con el calentamiento de la fase acuosa (50°C) que cuando se trabajó con el calentamiento de la mezcla fase acuosa-LI (40°C).

En general, los métodos de TC-IL-DLLME reportados emplean tiempos de extracción cortos que no sobrepasan los 30 minutos [58, 60, 61, 65], debido a que tiempos muy prolongados de enfriamiento pueden incrementar la viscosidad del LI, lo que dificulta su separación de la fase acuosa y como consecuencia disminuye la eficiencia de la extracción [63].

6.3.4 Efecto del tiempo de centrifugación

En la TC-IL-DLLME, el tiempo de centrifugación debe optimizarse debido a que, es necesario que sedimenten todas las microgotas del LI formadas en la nube de dispersión, evitando un calentamiento de la solución por una centrifugación excesiva y una consecuciente miscibilización del LI [61].

Como se observa en la figura 27, para la TC-IL-DLLME calentando la mezcla de la fase acuosa-LI, al utilizar un tiempo de centrifugación de 10 minutos se obtiene la menor respuesta para ambos analitos y al ir incrementando el tiempo de centrifugación hasta llegar a los 20 minutos aumenta la respuesta de los analitos. Del mismo modo, en el caso de la TC-IL-DLLME calentando la fase acuosa, la figura 28, muestra que la respuesta de los analitos con 20 minutos de centrifugación.

De acuerdo a lo reportado en la literatura, generalmente se utiliza como tiempo de centrifugación de 15 a 20 minutos, ya que utilizando tiempos menores no se logra la sedimentación del líquido iónico, mientras que utilizar tiempos mayores a los 20 minutos, disminuye la eficiencia de la extracción [57, 61, 62, 65].

Las condiciones finales para la TC-IL-DLLME calentando la mezcla de fase acuosa-LI se presentan en la tabla XVII. Las condiciones finales de la TC-IL-DLLME calentando la fase acuosa se presentan en la tabla XVIII. Las diferencias entre ambas modalidades de calentamiento fueron en la temperatura y tiempo de calentamiento así como en el tiempo de enfriamiento.

6.4 Evaluación de la TC-IL-DLLME

Los métodos desarrollados fueron evaluados analizando una solución de estándares de los derivados de glifosato (25.9 $\mu\text{g/L}$) y AMPA (26.4 $\mu\text{g/L}$).

Los resultados se presentan en la tabla XIX. Como puede verse, ambos métodos tienen un buen desempeño con factores de enriquecimiento (FE) cercanos a 5 y porcentajes de recuperación (% R) mayores al 90 %. Además el % DER para ambos métodos resultó menor al 7.5 %.

El método de TC-IL-DLLME con la modalidad de calentamiento de la fase acuosa mostró un porcentaje de recuperación ligeramente mayor así como una

desviación estándar menor. Considerando estos resultados, se decidió utilizar la TC-IL-DLLME calentando la fase acuosa y posteriormente inyectando el LI.

De acuerdo con la literatura consultada, existe una modalidad de la DLLME llamada microextracción líquido-líquido dispersiva con líquidos iónicos y agregación inducida por frío (IL-CIA-DLLME) en la que también se utiliza el precalentamiento de la fase acuosa, solo que a diferencia de la TC-IL-DLLME con calentamiento de la fase acuosa que se desarrolló en este trabajo, es que en la IL-CIA-DLLME se hace uso de un solvente dispersante [73-76]. Al momento, no existen reportes del uso de precalentamiento de la fase acuosa en la TC-IL-DLLME sin el uso de solvente dispersante.

La linealidad y los LOD y LOQ se establecieron para el método seleccionado. Para construir la curva de calibración, se analizaron soluciones de los derivados de glifosato y AMPA en un rango de concentraciones de 0.8 a 13.44 $\mu\text{g/L}$. La figura 29 muestra la curva de calibración obtenida para los estándares derivatizados y extraídos de glifosato y la figura 30, la curva correspondiente a los derivados de AMPA. El método demostró ser lineal con coeficientes de determinación mayores de 0.99 para ambos analitos.

Utilizando la pendiente de la curva de calibración realizada y la respuesta de la señal del blanco se calcularon tanto el límite de detección como el límite de cuantificación. Los valores de LOD y LOQ se presentan en la tabla XX, siendo de 0.27 y 0.82 $\mu\text{g/L}$ el LOD y LOQ respectivamente para el FMOC-Glifosato.

Mientras que para el FMOC-AMPA el LOD fue de 0.22 $\mu\text{g/L}$ y el LOQ de 0.67 $\mu\text{g/L}$.

Los límites de detección para glifosato y AMPA alcanzados con el método desarrollado en este estudio, fueron mayores a los requerimientos establecidos por la Comisión Europea (0.1 $\mu\text{g/L}$ la concentración máxima para plaguicidas individuales en agua para beber [14]), pero menores a los requeridos por la EPA en los Estados Unidos (0.7 mg/L [8]). Además éstos se encuentran dentro del rango de algunos LODs encontrados en reportes de la literatura. Por ejemplo, Küsters utilizando extracción con resinas de intercambio iónico y la cromatografía de líquidos con detección por fluorescencia para el análisis de glifosato y de AMPA en muestras de agua reportan un límite de detección de 0.012 $\mu\text{g/L}$ para el glifosato y de 0.014 $\mu\text{g/L}$ para el AMPA [18]. Por su parte Druart utilizando un método por cromatografía de líquidos con detección de fluorescencia y extracción con barra de agitación magnética en muestras de suelos, obtuvieron un límite de detección de 9.5 $\mu\text{g/L}$ para el glifosato y de 1.5 $\mu\text{g/L}$ para el AMPA [23].

6.5 Aplicabilidad de la TC-IL-DLLME desarrollada a muestras de agua

La aplicabilidad del método desarrollado a muestras reales se evaluó analizando dos muestras de agua, una de agua de grifo y una de agua de pozo. Para ambas muestras se determinó la conductividad y el pH, estos resultados se presentan en la tabla XXI. Como puede observarse, el pH de las muestras de agua fue similar (7.22), pero la muestra de agua de pozo presentó una conductividad menor.

Las muestras se analizaron con y sin adición de los analitos. Los resultados mostraron una disminución en la respuesta de glifosato y de AMPA (Figura 31), en comparación con soluciones de glifosato y de AMPA preparadas en agua desionizada a la misma concentración. En la tabla XXII se muestran los valores de los FE, los % R así como el % de DER.

La disminución en la respuesta es atribuida a la presencia de sales y metales en las muestras reales de agua, que pueden interaccionar y formar complejos tanto con el glifosato como con el AMPA [70, 77]. Para disminuir este efecto de matriz, en la literatura se proponen dos tipos de pretratamiento de la muestra para evitar la interacción de estas interferencias con los analitos. El reportado por Ibañez consiste en romper los complejos que puede llegar a formar el glifosato con los metales presentes en la muestra ajustando el pH de la muestra a un valor cercano a 1 [70]. Mientras que el propuesto por Hanke, consiste en la acidificación de la muestra y la posterior adición de EDTA, también con la

finalidad de romper los complejos que pudieran interferir en la derivatización del glifosato [16].

En las figuras 32 y 33, se presentan los cromatogramas de las muestras de agua adicionadas y sin adicionar, tratadas con los procedimientos descritos. Puede observarse que tanto para el agua de grifo como para el agua de pozo, la acidificación de la muestra previo a la derivatización, es el pretratamiento con el que se obtiene una mejor respuesta, mientras que, utilizando la acidificación y la adición de EDTA, no se logra ninguna mejora en la respuesta.

La efectividad de los dos tipos de pretratamiento puede verse de forma más clara en la tabla XXII, donde se presentan los % DER, los FE y los % R. En el caso del glifosato en la muestra de agua de grifo, la acidificación de la muestra incrementa el % R de 25 % a un 53 %. En el caso del agua de pozo, con la acidificación de la muestra logró alcanzarse una recuperación de hasta un 95.8 %. En lo que respecta a la adición de EDTA podemos observar que aunque mejora la recuperación de la muestra, se logra una mejor recuperación cuando solo se acidifica la muestra.

Para el AMPA, puede observarse un comportamiento similar al del glifosato. Cuando la muestra de agua de grifo se acidifica se logra un % R del 98.8 % mientras que con la adición de EDTA solamente se obtiene un % R del 26.6 %. Para la muestra de agua de pozo, de igual manera, se observa un incremento en el % R con un 83% mientras que con la adición del EDTA el % R obtenido fue del 54.3%.

Considerando estos resultados se decidió realizar la acidificación de la muestra previa a la derivatización. En la tabla XXIII se presenta el método final establecido para el análisis de glifosato y AMPA en agua incluyendo las etapas de pretratamiento de la muestra, extracción y análisis.

Los resultados obtenidos concuerdan por lo reportado por Hanke y colaboradores quienes a pesar de realizar el pretratamiento de una muestra de agua de grifo, no pudieron mejorar la recuperación [16]. Esto se atribuyó a la hipercloración del agua potable. Hanke [16], y Küsters [18] mencionan que las muestras de agua profunda, presentan una menor interferencia de la matriz y por lo tanto la recuperación de los analitos se ve menos afectada.

CAPÍTULO 7

CONCLUSIONES

En este trabajo se desarrolló un método por HPLC para la determinación de Glifosato y AMPA en presencia del DMIM-BF₄.

El método propuesto, basado en el uso de una columna de fase inversa y detección de Fluorescencia, demostró ser lineal, preciso y exacto entre 22 y 360 mg/L, con límites de detección de 3.2 y 2.8 mg/L para Glifosato y AMPA respectivamente y de cuantificación de 9.6 mg/L para Glifosato y 8.6 mg/L para AMPA.

El método de IL-TC-DLLME con calentamiento de la fase acuosa desarrollado para el análisis de glifosato y AMPA en agua, presentó un buen desempeño además de preconcentrar a los analitos, lo cual resulta importante considerando las bajas concentraciones de los analitos en las muestras reales.

Aunque se observó una influencia importante de la matriz en las recuperaciones fue posible superar este problema incluyendo una etapa de pretratamiento de la muestra.

El método de microextracción propuesto es simple y eficiente en el análisis de muestras. Teniendo como límite de detección para el glifosato de 0.27 $\mu\text{g/L}$ y para el AMPA de 0.22 $\mu\text{g/L}$. El límite de cuantificación fue de 0.82 $\mu\text{g/L}$ para el glifosato y de 0.67 $\mu\text{g/L}$ para el AMPA. Este método demostró ser lineal y preciso en un rango de concentración de 0.84 a 13.44 $\mu\text{g/L}$.

Al momento, no se cuenta con reportes del uso del precalentamiento de la fase acuosa en la TC-IL-DLLME sin el uso de un solvente dispersante, por lo que éste trabajo representa una importante contribución para el desarrollo de técnicas de microextracción evitando el uso de un mayor número de solventes involucrados en el proceso.

Se demostró que los líquidos iónicos pueden desempeñarse como solventes de extracción para glifosato y AMPA en métodos de TC-DLLME por lo que pueden considerarse como una buena alternativa a los solventes convencionales.

CAPÍTULO 8

BIBLIOGRAFÍA

1. Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas. (2004). Catálogo de Plaguicidas 2004. Revisado en marzo de 2013 de <http://www.cofepris.gob.mx/AZ/Paginas/Plaguicidas%20y%20Fertilizantes/CatalogoPlaguicidas.aspx>
2. Salazar N. y Aldana M. (2011). Herbicida glifosato: usos, toxicidad y regulación. Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad de Sonora, 13(2), 23-28
3. Herrera M. (2011). Implementación de una metodología para la determinación de glifosato en muestras de agua. Tesis de licenciatura. Universidad Industrial de Santander.

4. Helander M., Saloniemi I. y Saikkonen K. (2012). Glyphosate in Northern ecosystems. *Trends in Plant Science*, 17, 569-574.

5. European Commission. (2001). Commission working document 6511/VI/99-Final. Revisado en marzo de 2013, de: http://ec.europa.eu/food/plant/protection/evaluation/existactive/list1_glyphosate_end.pdf.

6. World Health Organization. (2009). The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification 2009. Revisado en marzo de 2013 de http://www.inchem.org/documents/pds/pdsother/class_2009.pdf.

7. Mzukisi L. (2010). Optimisation of HPLC-based methods for the separation and detection of herbicide glyphosate and its major metabolite in water. Tesis de maestria. Durban University of Technology.

8. U.S. Environmental Protection Agency. (2009). Technical Factsheet on: Glyphosate. National Primary Drinking Water Regulations. EPA 816-F-09-004. Revisado en marzo de 2013, de <http://www.epa.gov/ogwdw/pdfs/factsheets/soc/tech/glyphosa.pdf>

9. Thongprakaisang S., Thiantanawat A., Rangkalidok N., Suriyo T. y Satayavivad J. (2013). Glyphosate induce human breast cancer cells growth via estrogen receptors. *Food and Chemical Toxicology*, 59, 129-136.
10. George J., Prasad S., Mahmood Z. y Shukla Y. (2010). Studies on glyphosate-induced carcinogenicity in mouse skin: A proteomic approach. *Journal of Proteomics*, 73, 951-964.
11. Koller V., Fürhaker M., Nerseyan A., Misik M., Eisenbauer M. y Knasmueller S. (2012). Cytotoxic and DNA-damaging properties of glyphosate and Roundup in human-derived buccal epithelial cells. *Archives of Toxicology*, 86, 805-813.
12. Gasnier C., Dumont C., Benachour N., Clair E., Chagnon M. y Séralini G. (2009). Glyphosate-based herbicides are toxic and endocrine disruptors in human cell lines. *Toxicology*, 262, 184-191.
13. World Health Organization. (2005). Glyphosate and AMPA in drinking water. (WHO/SDE/WSH/03.04/97). Revisado en marzo de 2013, de http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/glyphosateampa290605.pdf
14. Council of the European Union. (1998). European Union Council Directive 98/83/EC on the quality of water intended for human consumption. *Official Journal of the European Communities*, L330, 32-54.

15. Pesticides Industry Sales and Usage. 2006 and 2007 Market Estimates. (2011). Biological and Economic Analysis Division Office of Pesticide Programs. U.S. Environmental Protection Agency.
16. Hanke I., Singer H. y Hollender J. (2008). Ultratrace-level determination of glyphosate, aminomethylphosphonic acid and glufosinate in natural waters by solid-phase extraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: performance tuning of derivatization, enrichment and detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391, 2265-2276.
17. Piriyaipittaya M., Jayanta S., Mitra S. y Leepipatpiboon N. (2008). Micro-scale membrane extraction of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in water followed by high-performance liquid chromatography and post-column derivatization with fluorescence detector. *Journal of Chromatography A*, 1189, 483-492.
18. Küsters M. y Gerhartz M. (2010). Enrichment and low-level determination of glyphosate, aminomethylphosphonic acid and glufosinate in drinking water after cleanup by cation exchange resin. *Journal of Separation Science*, 33, 1139-1146.

19. Ghanem A., Bados P., Kerhoas L., Dubraca J. y Einhorn J. (2007). Glyphosate and AMPA analysis in sewage sludge by LC-ESI-MS/MS after FMOOC derivatization on strong anion-exchange resin as solid support. *Analytical Chemistry*, 79 (10), 3794-3801.
20. Qian K., Tang T., Shi T., Wang F., Li J. y Cao Y. (2009). Residue determination of glyphosate in environmental water samples with high-performance liquid chromatography and UV detection after derivatization with 4-chloro-3,5-dinitrobenzotrifluoride. *Analytica Chimica Acta*, 635, 222-226.
21. Cikalo M., Goodall D. y Matthews W. (1996). Analysis of glyphosate using capillary electrophoresis with indirect detection. *Journal of Chromatography A*, 745, 189-200.
22. Cao L., Xiaofang T., Jianxin M. y Siliu L. (2012). Capillary electrophoresis analysis for glyphosate, glufosinate and aminomethylphosphonic acid with laser-induced fluorescence detection. *Chinese Journal of Chromatography*, 30, 1295-1300.
23. Druart C., Delhomme O., De Vauleury A., Ntcho E. y Millet M. (2011). Optimization of extraction procedure and chromatographic separation of glyphosate, glufosinate and aminomethylphosphonic acid in soil. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 399, 1725-1732.

24. Kruve A., Auling R., Herodes K. y Leito I. (2011). Study of liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry matrix effect on the example of glyphosate analysis from cereals. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 25, 3252-3258.
25. Botero-Coy A., Ibañez M., Sancho J. y Hernández F. (2013). Direct liquid chromatography-tandem mass spectrometry determination of underivatized glyphosate in rice, maize and soybean. *Journal of Chromatography A*, 1313, 157-165.
26. Yoshioka N., Asano M., Kuse A., Mitsuhashi T., Nagasaki Y. 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. *Journal of Chromatography A*, 1218, 3675-3680.
27. Garza M. (2013). Evaluación del desempeño de líquidos iónicos como solventes para fármacos hidrofílicos y su aplicación en procesos de microextracción en fase líquida. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Nuevo León.
28. Suh J., Kim J., Jung J., Kim K., Lee S., Cho H., Jung Y. y Han S. (2013). Determination of thiamine in pharmaceutical preparations by reversed phase liquid chromatography without use of organic solvent. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 34 (6), 1745-1750.

29. Lindholm P., Knuutinen J., Ahkola H. y Herve S. (2014). Analysis of trace pharmaceuticals and related compounds in municipals wastewaters by preconcentration, chromatography, derivatization and separation methods. *Bioresources*, 9 (2), 3688-3732.
30. Portillo O. (2012). Evaluación del uso de líquidos iónicos en la extracción micelar de compuestos hidrofílicos. Tesis de maestría. Universidad Autónoma de Nuevo León.
31. Vargas A. (2012). Desarrollo de un método analítico para acrilamida en tortillas tostadas empleando microextracción en gota y líquidos iónicos (IL-SDME). Tesis de maestría. Universidad Autónoma de Nuevo León.
32. U.S. Environmental Protection Agency. (1990). Method 547: Determination of glyphosate in drinking water by direct-aqueous-injection HPLC, post-column derivatization, and fluorescence detection.
33. AOAC. (1998). Official Method 991.08. Glyphosate and Aminomethylphosphonic Acid (AMPA) in Environmental Water by Liquid Chromatographic Method. *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 16th Edition, 4th Revision, Volume I.

34. Meyer M., Loftin K., Lee E., Hinshaw G., Dietze J. y Scribner E. (2009). Determination of glyphosate, its degradation product aminomethylphosphonic acid, and glufosinate, in water by isotope dilution and online solid-phase extraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. U.S. Geological Survey Techniques and Methods, book 5, chap. A10, 32p.
35. Romero A. (2008). Líquidos iónicos a temperature ambiente: un Nuevo medio para las reacciones químicas. Revista de la Real Academia de las Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, 102, 79-90.
36. García E., De los Ríos A., Hernández F., Larrosa A., Ginestá A., Sánchez S., Lozano L. y Godínez C. (2011). Aplicaciones de los líquidos iónicos en la industria química. Jornadas de Introducción a la Investigación de la UPTC, 4, 66-68.
37. Ruiz L., Sanz M. y Ramos L. (2013). Use of ionic liquids in analytical sample preparation of organic compounds from food and environmental samples. Trends in Analytical Chemistry, 43, 121-145.
38. Escudero L., Castro A., Martinis E. y Wuilloud R. (2013). Bioanalytical separation and preconcentration using ionic liquids. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 405, 7597-7613.

39. Sarafraz A. y Amiri A. (2010). Liquid-phase microextraction. Trends in Analytical Chemistry, 29, 1-14.
40. Yan H. y Wang H. (2013). Recent development and applications of dispersive liquid-liquid microextraction. Journal of Chromatography A, 1295, 1-15.
41. Saraji M. y Khalili M. (2014). Multiple functional ionic liquids based dispersive liquid-liquid microextraction combined with high performance chromatography for the determination of phenolic compounds in water samples. Talanta, 125, 329-335.
42. Spietelun A., Marcinkowski L., De la Guardia M. y Namiesnik J. (2014). Green aspects, development and perspectives of liquid phase microextraction techniques. Talanta, 119, 34-45.
43. Rezaee M., Yamini Y. y Faraji M. (2010) Evolution of dispersive liquid-liquid microextraction method. Journal of Chromatography A, 1217, 2342-2357.
44. Ramos L., Ravelo L., González M y Hernández J. (2011). Liquid phase microextraction applications in food analysis. Journal of Chromatography A, 1218, 7415-7437.

45. Herrera A., Ramos M., Hernández J. y Rodríguez M. (2010). Dispersive liquid-liquid microextraction for determination of organic analytes. *Trends in Analytical Chemistry*, 29 (7), 728-751.
46. Vickackaite V. y Padarauskas A. (2012) Ionic liquids in microextraction techniques. *Central European Journal of Chemistry*, 10, 652-674.
47. Poole C. y Poole S. (2010). Extraction of organic compounds with room temperature ionic liquids. *Journal of Chromatography A*, 1217, 2268-2286.
48. Trujillo M., Rocío P., Pino V. y Afonso A. (2013). Ionic liquids in dispersive liquid-liquid microextraction. *Trends in Analytical Chemistry*, 51, 87-106.
49. Abdolmohammad H. y Sadeghi G. (2009). A novel microextraction technique based on 1-hexylpyridinium hexafluorophosphate ionic liquid for the preconcentration of zinc in water and milk samples. *Analytica Chimica Acta*, 649, 211-217.
50. Cruz M., Lucena R., Cárdenas S. y Valcárcel M. (2009). One-step in-syringe ionic liquid-based dispersive liquid-liquid microextraction. *Journal of Chromatography A*, 1216, 6459-6465.

51. Zhao R., Wang X., Sun J., Hu C. y Wang X. (2011). Determination of triclosan and triclocarban in environmental water samples with ionic liquid/ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction prior to HPLC-ESI-MS/MS. *Microchimica Acta*, 174, 145-151.
52. He L., Luo X., Xie H., Wang C., Jiang X. y Lu K. (2009). Ionic liquid-based dispersive liquid-liquid microextraction followed high-performance liquid chromatography for the determination of organophosphorus pesticides in water samples. *Analytica Chimica Acta*, 655, 52-59.
53. Zhou C., Tong S., Chang Y., Jia Q. y Zhou W. (2012). Ionic liquid-based microextraction with back-extraction coupled with capillary electrophoresis to determine phenolic compounds. *Electrophoresis* 33, 1331-1338.
54. Pena M., Casais M., Mejuto M. y Cela R. (2009). Development of an ionic liquid based dispersive liquid-liquid microextraction method for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples. *Journal of Chromatography A*, 1216, 6356-6364.

55. Zhang J., Gao H., Peng B., Li S. y Zhou Z. (2011). Comparison of the performance of conventional, temperature controlled, and ultrasound-assisted ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction combined with high-performance liquid chromatography in analyzing pyrethroid pesticides in honey samples. *Journal of Chromatography A*, 1218, 6621-6629.
56. Zhang H. y Shi Y. (2010). Temperature-assisted ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction combined with high performance liquid chromatography for the determination of anthraquinones in Radix et Rhizoma Rhei samples. *Talanta*, 82, 1010-1016.
57. Bai H., Zhou Q., Xie G y Xiao J. (2009). Enrichment and sensitive determination of dichlorodiphenyltrichloroethane and its metabolites with temperature controlled ionic liquid dispersive liquid phase microextraction prior to HPLC. *Analytica Chimica Acta*, 651, 64-68.
58. Zhou Q., Bai H., Xie G. y Xiao J. (2008). Trace determination of organophosphorus pesticides in environmental samples by temperature-controlled ionic liquid dispersive liquid-phase microextraction. *Journal of Chromatography A*, 1188, 148-153.

59. Zeeb M., Jamil P., Berenjian A., Ganjali M. y Olyai M. (2013). Quantitative analysis of pyroxicam using temperature-controlled ionic liquid dispersive liquid phase microextraction followed by stopped-flow injection spectrofluorometry. *DARV Journal of Pharmaceutical Sciences*, 21, 63-70.
60. Zhou Q., Bai H., Xie G. y Xiao J. (2008). Temperature-controlled ionic liquid dispersive liquid phase microextraction. *Journal of Chromatography A*, 1177, 43-49.
61. Zhou Q. y Gao Y. (2014) Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples by temperature-controlled ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction combined with HPLC. *Analytical Methods*, 6, 2553-2559.
62. Zhou Q., Pang L. y Xiao J. (2011). Ultratrace determination of carbamate pesticides in water samples by temperature controlled ionic liquid dispersive liquid phase microextraction with HPLC. *Microchimica Acta*, 173, 477-483.
63. Sun J., Shi Y. y Chen J. (2013). Simultaneous determination of plasticizer di(2-ethylhexyl)phthalate and its metabolite in human urine by temperature controlled ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction

combined with high performance liquid chromatography. *Analytical Methods*, 5, 1427-1434.

64. Zhao A., Wang X., Ma M., Wang W., Sun H., Yan Z., Xu Z. y Wang H. (2012). Temperature-assisted ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction combined with HPLC for the determination of PCBs and PBDEs in water and urine samples. *Microchimica Acta*, 177, 229-236.
65. Zhou Q. (2012). Preconcentration and determination of aromatic amines with temperature-controlled ionic liquid dispersive liquid phase microextraction in combination with HPLC. *Journal of AOAC International*, 95, 1534-1540.
66. Zhou Q., Zhang X. y Xie G. (2011). Simultaneous analysis of phthalate esters and pyrethroid insecticides in water samples by temperature-controlled ionic liquid dispersive liquid-phase microextraction combined with HPLC. *Analytical Methods*, 3, 1815-1820.
67. Kamarei F., Ebrahimzadeh H. y Yamini Y. (2010). Optimization of temperature-controlled ionic liquid dispersive liquid phase microextraction combined with HPLC for analysis of chlorobenzenes in water samples. *Talanta*, 83, 36-41.

68. Zhang Y. y Lee H. (2013). Determination of ultraviolet filters in environmental water samples by temperature-controlled ionic liquid dispersive liquid-phase microextraction. *Journal of Chromatography A*, 1271, 56-61.
69. EURACHEM. (1998). *The Fitness for Purpose of Analytical Methods. Guide Eurachem.*
70. Ibañez M., Pozo O., Sancho J., López F. y Hernández F. (2006). Re-evaluation of glyphosate determination in water by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1134, 51-55.
71. Gou H. y Gaiki S. (2011). Retention and selectivity of stationary phases for hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1218, 5920-5938.
72. Guillarme D. (2013). What you need to know about HILIC. *LCGC North America*, 31 (7), 560-563.
73. Zhang H., Chen X. y Jiang X. (2011). Determination of phthalate esters in water samples by ionic liquid cold-induced aggregation dispersive liquid-liquid microextraction coupled with high-performance liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 689, 137-142.

74. Zhang H., Cheng M. y Jiang X. (2010). Determination of benzoic acid in water samples by ionic liquid cold-induced aggregation dispersive LLME coupling with LC. *Chromatographia*, 72, 1195-1199.
75. Jiang X., Zhang H. y Chen X. (2011). Determination of phenolic compounds in water samples by HPLC following ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction and cold-induced aggregation. *Microchimica Acta*, 175, 341-346.
76. Zeeb M., Ganjali M. y Norouzi P. (2011). Modified ionic liquid cold-induced aggregation dispersive liquid-liquid microextraction combined with spectrofluorometry for trace determination of ofloxacin in pharmaceutical and biological samples. *DARU*, 19, 446-454.
77. Freuze I., Jadas_Hecart A., Royer A. y Pierre-Yves Communal. (2007). Influence of complexation phenomena with multivalent cations on the analysis of glyphosate and aminomethyl phosphonic acid in wáter. *Journal of Chromatography A*, 1175, 197-206.