

# Validación de un método para la determinación de glifosato, AMPA y glufosinato en suelos por CLAR con derivatización pre-columna

Martínez Paz Karen Edith<sup>1</sup>, López-Santiago Norma Ruth<sup>1\*</sup>, Gutiérrez-Ruiz Margarita<sup>1</sup> y Morales-Zamudio Enrique<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química, Laboratorio de Biogeoquímica Ambiental. Av. Universidad 3000, Coyoacán, Ciudad de México. C.P. 04510. México.

<sup>2</sup>LEACSA. Alfonso Esparza Oteo 63, Guadalupe Inn, Álvaro Obregón, Ciudad de México. C.P 01020. México.

\*Autor para correspondencia: nruthls@yahoo.com

## Recibido:

17/junio/2017

## Aceptado:

25/octubre/2017

## Palabras clave

Glifosato, glufosinato, CLAR.

## Keywords

Glyphosate, glufosinate, HPLC

## RESUMEN

Se desarrolló y validó una metodología que permitió llevar a cabo la determinación de glifosato, AMPA y glufosinato en muestras de suelo. Los resultados muestran que el método desarrollado es adecuado para los fines previstos ya que cumplen con los criterios de aceptación establecidos. El análisis de estos plaguicidas se realizó por CLAR detector UV, previa derivatización con FMOC-Cl (cloruro de 9-fluoroenilmetil cloroformato) en buffer boratos, se modificó el procedimiento de derivatización con la finalidad de optimizar la metodología. El análisis en suelo se realizó previa extracción sólido-líquido asistida con ultrasonido. Durante el análisis cromatográfico no se detectaron interferencias provenientes de la matriz. Al aplicar el método a muestras ambientales se encontró evidencia de la presencia de glufosinato. No se detectó glifosato sin embargo se detectó el ácido aminometil fosfónico (AMPA) que es uno de los productos de degradación del glifosato en concentraciones de hasta 108.26 mg/Kg.

## ABSTRACT

It developed and validated a methodology that allowed to carry out the determination of glyphosate, AMPA and glufosinate in soil samples. The results show that the developed method is suitable for the intended purposes as they meet the established acceptance criteria. The analysis of these pesticides was carried out by HPLC detection UV, previous derivatization with FMOC-Cl (Fluorenylmethyloxycarbonyl chloride) in buffer borates, modified the procedure of derivatization in order to optimize the methodology. The soil analysis was performed prior to solid-liquid extraction assisted with ultrasound. No interference from the matrix was detected during the chromatographic analysis. When applying the method to environmental samples, evidence was found of the presence of glufosinate. Glyphosate was not detected however aminometilfosfónico acid (AMPA) was detected which is one of the degradation products of glyphosate in concentrations of up to 108.26 mg/kg.

## Introducción

En la actualidad, la población del mundo supera los 7000 millones de personas, debido a esto se ha incrementado la necesidad de producir mayor cantidad de alimentos en plazos más cortos, por lo que los productores se han visto en la necesidad de buscar opciones que aumenten el rendimiento de su producción y permitan evitar pérdidas. Actualmente para satisfacer la demanda de producción, los agricultores requieren implementar métodos de prevención y emergencia contra plagas que pudiesen afectar su rendimiento, una de estas técnicas es el uso de plaguicidas (Salazar López y Aldana Madrid, 2011). Un plaguicida es cualquier sustancia o mezcla de sustancias que se destina a controlar cualquier plaga, incluidos los vectores que transmiten las enfermedades humanas y de animales, las especies no deseadas que causen perjuicio o que interfieran con la producción agropecuaria y forestal, así como las sustancias defoliantes y las desecantes (H. Congreso de la Unión, 2003).

El uso y manejo incorrecto de los plaguicidas ha demostrado ser riesgoso para el hombre, este riesgo se manifiesta por intoxicación de grado diverso y por efectos que pueden presentarse a mediano o largo plazo, tales como carcinogénesis, teratogénesis, esterilidad, muta génesis y otros (COFEPRIS, 2016).

La peligrosidad de los plaguicidas pueden atribuirse a la alta disponibilidad de estos productos, la falta de información sobre sus peligros, las políticas gubernamentales y el mercadeo agresivo por parte de la industria, así como la pobreza y el analfabetismo de los agricultores asegurando que los plaguicidas sean una seria amenaza para la seguridad alimentaria, de salud y del medio ambiente (COFEPRIS, 2016).

El glifosato [N- (fosfonometil) glicina], es un herbicida de amplio espectro, sistémico de acción foliar, post-emergente, no selectivo, es utilizado para la destrucción de malezas de los cultivos de maíz, frijol, trigo, cítricos, tomate, vid, sorgo y papa, entre otros (COFEPRIS, 2016), en contacto con el suelo se asocia fuertemente a las partículas, haciéndolo no biodisponible para la vegetación, tiene una vida media de 4,2 días en agua corriente y la degradación lenta está asociada con la presencia de microorganismos en fase acuosa (Vera et al., 2001). El glifosato tiene la capacidad de translocarse de la raíz hacia el suelo, su persistencia de dos a seis veces mayor en los suelos en los que pudiesen existir restos de plantas a los que previamente se aplicó el herbicida (Doublet et al., 2009). La principal vía de degradación de glifosato es a ácido aminometilfosfónico (AMPA), que es más persistente en el suelo que el glifosato (vida media que oscila entre 23 y 958 días) (Islas et al., 2017).

En el marco regulatorio mexicano la COFEPRIS considera al glifosato como un herbicida de la clasificación fosfonometilglicina grado de toxicidad IV, es decir está clasificado como producto que normalmente no ofrece peligro (COFEPRIS, 2016). Sin embargo, existe evidencia de que el glifosato tiene un impacto negativo en los seres vivos, medio ambiente y organismos acuáticos. En ecosistemas acuáticos tiene afecciones que incluyen retardo en el crecimiento de organismos como algas y peces, inhibición de la eclosión en erizos (Jiraungkoorskul et al., 2002; Lajmanovich et al., 2011)

Glufosinato es un herbicida de amplio espectro, para el control de hojas anchas anuales y perennes, se aplica por vía foliar para el control de la vegetación (Stalikas y Konidar, 2001), actúa inhibiendo la enzima glutamina sintetasa que es la que cataliza la conversión del amoníaco y el ácido glutámico en glutamina provocando así una acumulación rápida de amoníaco en la planta y provocándole fitotoxicidad, es similar al glifosato (Stalikas y Konidar, 2001).

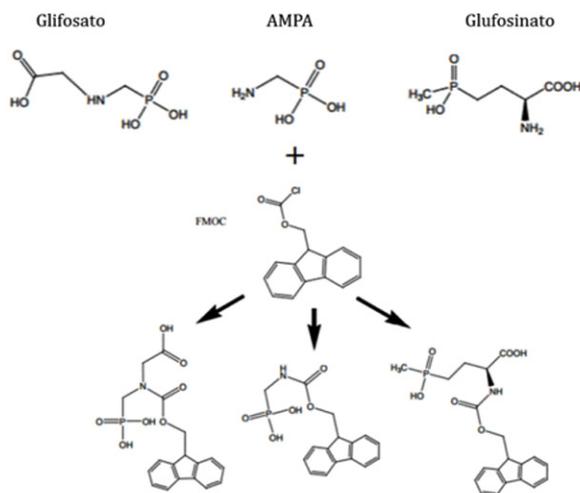
Para la determinación de estos herbicidas por cromatografía de gases o de líquidos, dada su alta polaridad es necesaria su derivatización, ya sea para favorecer su volatilización o para mejorar la capacidad de detección (Hiroyuki et al., 1996; Stalikas y Konidar, 2001). La cromatografía líquida de alto rendimiento (CLAR) es la técnica analítica de elección para los compuestos polares, existen varios métodos de CLAR utilizando derivatización pre o post columna con detección ultravioleta o de fluorescencia (Peruzzo et al., 2008; Lupi, et al., 2015). En la mayoría de los casos, se utiliza la derivatización pre-columna seguida de la detección de UV. El reactivo de derivatización más comúnmente utilizado para este propósito es el 9-fluorenilmetilcloroformato (FMOC-Cl) (Sancho et al., 1996; Beaz et al., 2014) (Baez, Fuentes, Espina, & Espinoza, 2014). En la figura 1 se presentan las estructuras químicas del glifosato, ácido aminometilfosfónico, glufosinato, y sus compuestos derivatizados con 9-fluorenilmetil-cloroformato que reacciona con grupos amina primaria y secundaria para producir derivados estables altamente fluorescentes (Hanke et al., 2008; Lupi et al., 2015)

## Metodología

### Reactivos

Se utilizó acetronitrilo (ACN) grado CLAR,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{KHPO}_4$ , FMOC-Cl PUREZA  $\geq 99.0\%$  marca SIGMA-ALDRICH, Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> anhidro, estándares de alta pureza de glifosato PUREZA 98.0% CHEM SERVICE, AMPA pureza 99.5% CHEM SERVICE y glufosinato de amonio pureza 99.5%

CHEM SERVICE, éter etílico anhidro, agua nanopura (Tipo I).



**Figura 1.** Estructura química del glifosato, ácido aminometilfosfónico (AMPA), glufosinato, y sus compuestos derivatizados con 9-fluorenilmetil-cloroformato, modificado de (Meyer et al., 2009).

### Instrumentos

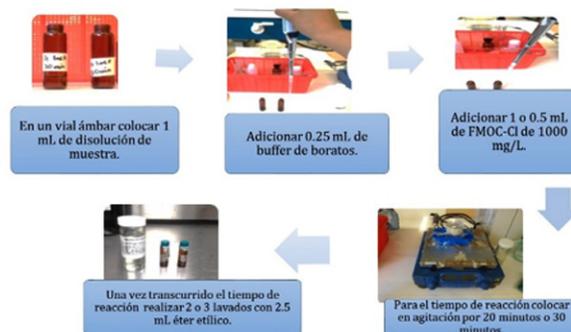
Los reactivos fueron pesados en una balanza analítica Sartorius Research, para la separación cromatográfica se utilizó una Columna Waters Carbamate Analysis 3.9 x 150 mm un sistema de bombeo Waters 510 HPLC Pump Modelo 510 Solvent Delivery System acoplado a un detector de Ultravioleta-Visible, Spectra Focus Forward Optical Scanning. Un Espectrofotómetro UV-VIS CARY3E, que fue empleado obtener las características espectrofotométricas del glifosato, AMPA, y glufosinato. En el proceso de extracción de la muestra se utilizó un baño o ultrasonico Bransonic y una centrifuga Damon/IEC Division.

### Desarrollo del método de separación

La longitud de onda de trabajo de los herbicidas se determinó a partir de un barrido entre 200 y 800 nm para obtener el espectro de absorción para cada herbicida, esto se realizó con un estándar de 20 mg/L. Se trazó el gráfico  $\log k'w = f(\%ACN)$ , realizando cinco mediciones variando la composición de la fase móvil (ACN) de 35 a 55%, completando al 100% con la fase acuosa (a pH 5.5 buffer de fosfatos 0.05 M). Flujo 0.8 mL/min. Se detectó a una longitud de onda de 220 nm. Se inyectó un volumen de 20  $\mu$ L, el tiempo de corrida que se utilizó fue de 35 minutos, esto con la finalidad de poder identificar la señal correspondiente a cada plaguicida.

### Optimización de la derivatización

El método de derivatización empleado se adaptó y optimizó a partir de antecedentes bibliográficos (Sancho et al., 1996; Ibáñez et al., 2005). Se optimizaron la cantidad de FMOC-Cl, tiempo de reacción y el número de extracciones con éter etílico anhidro, con el procedimiento ilustrado en la figura 2.



**Figura 2.** Procedimientos de derivatización.

Las condiciones para la separación cromatográfica utilizadas fueron las siguientes: se utilizó una Columna Waters Carbamate Analysis 3.9 x 150 mm un sistema de bombeo Waters 510 HPLC Pump Modelo 510 Solvent Delivery System acoplado a un detector de Ultravioleta-Visible, Spectra Focus Forward Optical Scanning. La fase móvil fue ACN: Agua (a pH 5.5 buffer de fosfatos 0.05 M) en una proporción de 45:55. Flujo 0.8 mL/min. Se detectó a una longitud de onda de 220 nm. Se inyectó un volumen de 20  $\mu$ L de extracto de la derivatización.

### Validación del método

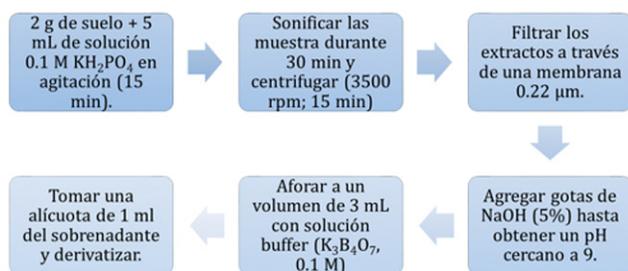
Para el caso de la validación de este método se realizó una validación parcial, esta consta de los siguientes parámetros: recuperación, límite de detección, límite de cuantificación, intervalo lineal y de trabajo, reproducibilidad, repetibilidad y recobro. El plan de validación del método se muestra en la Tabla 1.

### Optimización del procedimiento de Extracción Sólido Líquido (ESL)

En la figura 3 se muestra el procedimiento de extracción final empleado, el cual se adaptó y optimizó a partir de antecedentes bibliográficos (Sancho et al., 1996; Peruzzo et al., 2008; Lupi et al., 2015). Con ajustes en el volumen de extractante, la masa de suelo y el tipo y tamaño de membrana, se mantuvieron los tiempos de agitación, de extracción asistida por ultrasonido y las condiciones de centrifugación.

**Tabla 1.** Plan de validación.

Parámetro	Analizar	Obtener	Criterio
Intervalo lineal	Preparar disoluciones para una curva de calibración a partir de un estándar. Se incluye un blanco y 5-8 niveles de concentración	Coefficiente de regresión ( $r^2$ )	$r^2=0.98$
Sensibilidad analítica	Realizar el ensayo por triplicado. Leer el blanco. Leer las disoluciones estándar. Realizar el ajuste de la curva por mínimos cuadrados de la respuesta del equipo en función de la concentración del analito	Pendiente (m)	El intervalo de confianza de la pendiente no debe incluir al cero
Límite de detección (LD) y Límite de cuantificación (LC)	Para cada plaguicida se realizarán 6 medidas replicadas de la muestra con plaguicida con la concentración más baja de la curva de calibración	$LD = 3s$ $LC = 6s$ S es la desviación estándar de la medición instrumental del analito	LC debe ser menor la concentración más baja del intervalo lineal y el LD más bajo que el LC
Exactitud como % Recobro	Se prepararon y analizaron 6 disoluciones independientes del nivel de concentración intermedio del intervalo lineal	$\%R = \left(\frac{C_{obtenida}}{C_{esperada}}\right) \times 100$	98-102 % con un DER = 2%
Repetibilidad	Se prepararon y analizaron 6 disoluciones independientes del nivel de concentración intermedio del intervalo lineal En periodos de tiempo diferentes	Desviación estándar relativa	DER = 2%
Reproducibilidad	Se prepararon y analizaron 6 disoluciones independientes del nivel de concentración al punto medio de la curva de calibración. En periodos de tiempo diferentes		



**Figura 3.** Procedimiento de extracción utilizado.

### Aplicación a muestras ambientales

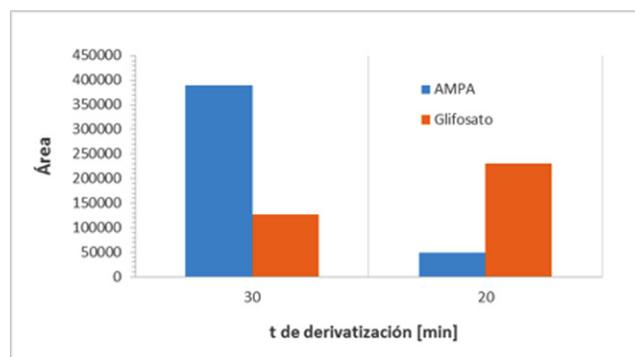
Concluida la validación del método analítico, éste se aplicó a muestras ambientales. Para lo cual se realizó un muestreo en el mes de octubre del 2016 en Molango de Escamilla, Hidalgo (Hidalgo, 2016), las muestras se mantuvieron en refrigeración (4 °C) hasta su análisis para evitar la volatilización de analitos.

Para la extracción y análisis se agruparon en lotes de 8 muestras, cuando fue posible se analizaron de forma duplicada y adicionada, cada lote llevó como control de calidad un blanco y un blanco adicionado. En el caso del blanco el procedimiento de extracción se aplicó, pero sin muestra de suelo al igual que al blanco fortificado.

### Resultados y discusión

#### Optimización de la derivatización de glifosato, y AMPA con FMOC-Cl

El primer parámetro que se optimizó fue el tiempo de derivatización, en la literatura estos van desde pocos minutos a horas (Sancho et al., 1996; Baez et al., 2014), o incluso durante toda la noche (Ibañez et al., 2005; Chamkasem y Harmon, 2016). En este estudio, se evaluaron dos tiempos: 20 y 30 min, los resultados se presentan en la Figura 4, en la gráfica presentada se observa que hay un mejor rendimiento de derivatización para glifosato (visto como una mayor área de pico cromatográfico) a un tiempo de 20 minutos, y para AMPA en 30 minutos. Como el glifosato es el herbicida de interés se seleccionó el tiempo de 20 minutos.



**Figura 4.** Gráfico de barras: Tiempo de derivatización.

Una vez fijado el tiempo de derivatización, el siguiente parámetro que se optimizó fue la variación de número de extracciones realizadas con éter etílico anhidro, estas extracciones se realizaron con el fin de eliminar el exceso de FMOC-Cl. En la literatura se encuentran reportados volúmenes y número de extracciones variables entre 1-5 mL (Druart et al., 2001; Stalikas y Konidar, 2001). Se realizaron pruebas con 2 y 3 extracciones líquido-líquido. La fase acuosa se recuperó y se analizó mediante el sistema de CLAR. En Figura 5 se muestran los resultados obtenidos. En la gráfica de barras se puede ver que se obtienen mayores áreas de pico cromatográfico tanto para AMPA como para glifosato cuando se realizan solo dos extracciones de 2.5 mL.

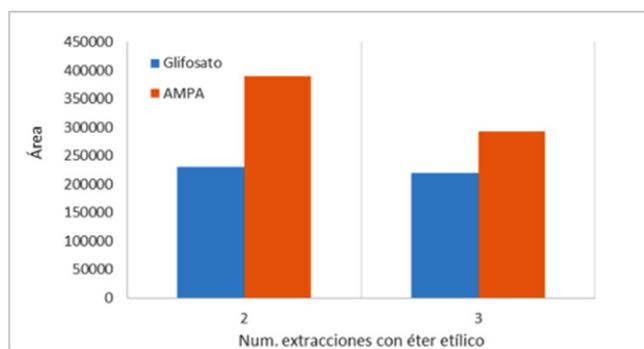


Figura 5. Gráfico de barras: Extracciones con éter etílico.

El último parámetro que se optimizó fue la variación de mL de FMOC-Cl adicionados, ya que al igual que con los otros parámetros la cantidad a adicionar es muy variable en la literatura (Sancho et al., 1996; Lupi et al., 2015). Se realizaron experimentos variando los mL de FMOC-Cl de 0.5 a 1 mL. Se puede observar en la Figura 6, que cuando se adicionan solo 0.5 mL de FMOC-Cl el área de los picos cromatográficos es mucho menor que cuando se adiciona 1 mL de FMOC-Cl.

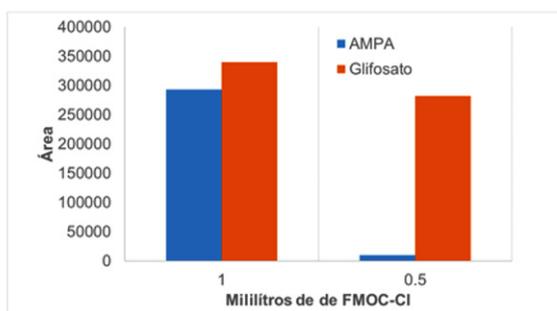


Figura 6. Gráfico de barras: Cantidad de derivatizante.

Con los resultados presentados anteriormente se estableció el procedimiento de derivatización con el que se trabajará para validar el método analítico.

### Optimización de la separación

Los espectros de los herbicidas se obtuvieron con el espectrofotómetro UV-VIS Varian, modelo CARY3E, en los cuales se confirmó la longitud de onda para efectuar la cuantificación por CLAR de glifosato, AMPA y glufosinato a 220 nm.

Para la establecer las condiciones de la separación cromatográfica se obtuvieron los parámetros de retención, y se trazó la curva  $\log k'w = f(0\%ACN)$ , Figura 7. Se seleccionó la proporción de la fase móvil ACN: Agua (a pH 5.5 buffer de fosfatos 0.05 M), en una proporción de 45:55 v/v, debido a que con esta proporción el tiempo

de retención de cada analito es satisfactorio, el análisis es tan prolongado en comparación a otras proporciones.

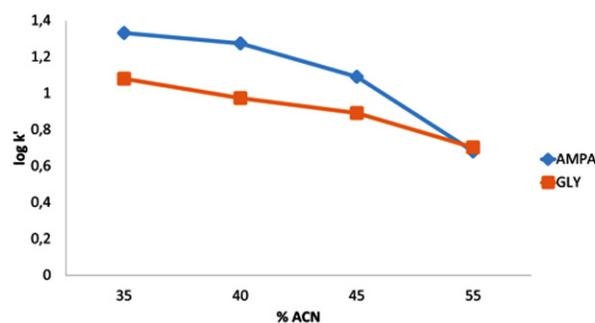


Figura 7. Curva de  $\log k' = f(\%ACN)$  en la fase móvil (Buffer de fosfatos 0.05 M: ACN).

### Validación del método analítico

Para validar el método se obtuvieron los siguientes parámetros de desempeño: intervalo lineal, sensibilidad analítica, precisión (repetibilidad y reproducibilidad), exactitud (como recobro), límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC). En las Tabla 5, 6 y 7 se presentan los parámetros de desempeño obtenidos de la validación para glifosato, AMPA y glufosinato, respectivamente.

De manera general con los parámetros de desempeño obtenidos de acuerdo a lo descrito en la sección experimental para glifosato, AMPA y glufosinato mostrados en las tablas anteriores, se concluye que el método empleado para la detección y cuantificación de estos plaguicidas es confiable debido a que tienen valores que cumplen con los criterios de aceptación. En la Tabla 2, se presentan los parámetros de validación obtenidos.

Tabla 2. Resultados de los parámetros de desempeño los compuestos de estudio.

Parámetro	Glifosato	AMPA	Glufosinato
$\lambda$ (nm)	220		
IL (mg/L)	2-9	2-10	2-11
Sensibilidad analítica	10635	6698	8544
$r^2$	0.9961	0.9975	0.9957
LD (mg/L)	0.08	0.09	0.07
LC (mg/L)	0.15	0.19	0.14
% Recobro	102.2	96	106.3
Rep. DER (%)	1.85	1.83	1.93
Reprod. DER (%)	1.95	1.91	1.8

### Optimización del Proceso de extracción

Para efectuar la optimización del procedimiento de extracción se fortificó una muestra de suelo con una disolución de una mezcla de glifosato, AMPA y glufosinato, a 3 niveles de concentración: 4, 11 y 22 mg de cada plaguicida por kg de suelo, respectivamente, a las cuales se les aplico el método de extracción descrito en la sección experimental. Los análisis se llevaron a cabo por CLAR y se determinaron las concentraciones correspondientes, para obtener el porcentaje de recobro y la precisión asociada, y así evaluar el procedimiento de extracción para la cuantificación de los analitos. Se establecieron los siguientes criterios de aceptación: Recobro  $100 \pm 20\%$  con una DER  $\leq 20\%$ . Para confirmar el método en la matriz se trazó la curva Cantidad adicionada vs Cantidad recuperada Figuras 7, 8 y 9. En la tabla 3 se presentan los estadísticos de , los criterios de aceptación establecidos fueron de  $r^2 > 0.98$ , y que el intervalo de confianza de la pendiente incluya la unidad.

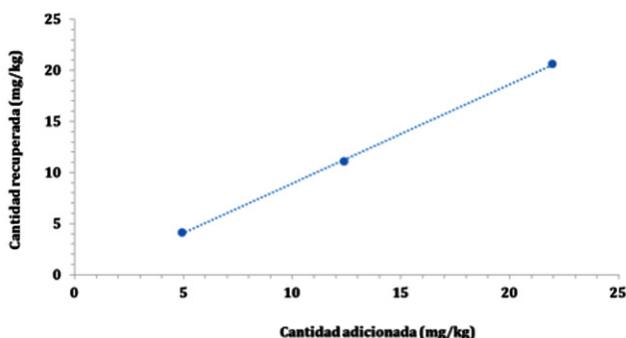


Figura 7. Curva Cantidad adicionada vs Cantidad recuperada, glifosato.

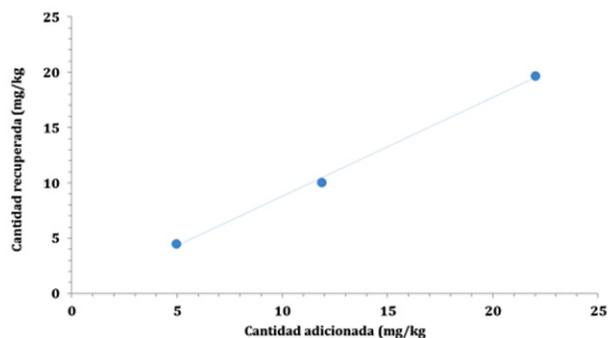


Figura 8. Curva Cantidad adicionada vs Cantidad recuperada, AMPA.

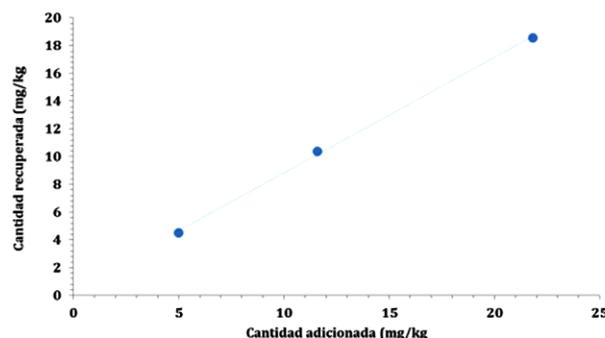


Figura 9. Curva Cantidad adicionada vs Cantidad recuperada, glufosinato.

Tabla 3. Estadísticos de Cantidad adicionada vs Cantidad recuperada.

Parámetro	Glifosato		AMPA		Glufosinato	
Intervalo de concentraciones (mg/kg)	4-21					
Coefficiente de correlación r	0.9996		0.9990		0.9995	
Coefficiente de determinación r <sup>2</sup>	0.9688		0.9981		0.9991	
Pendiente	0.98		0.90		0.83	
Intervalo de confianza al 95 % de la pendiente	Inferior	Superior	Inferior	Superior	Inferior	Superior
	0.51	1.44	0.40	1.39	0.53	1.13

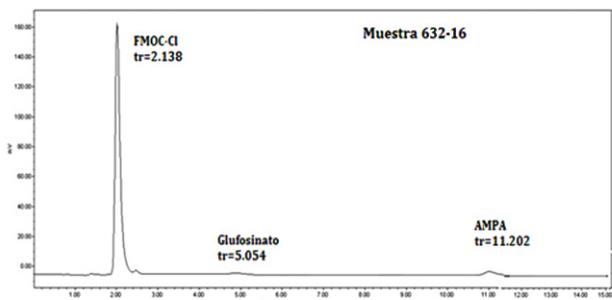
A partir de los resultados anteriores se puede concluir que el método de extracción empleado es sensible para la detección de glifosato, AMPA y glufosinato cuya concentración se encuentre entre 5 y 22 mg/kg, el criterio de aceptación cumple para ambos casos al ser  $>0.98$  siendo 0.9996 para glifosato, 1 para AMPA y 0.9991 para glufosinato.

### Aplicación a muestras ambientales

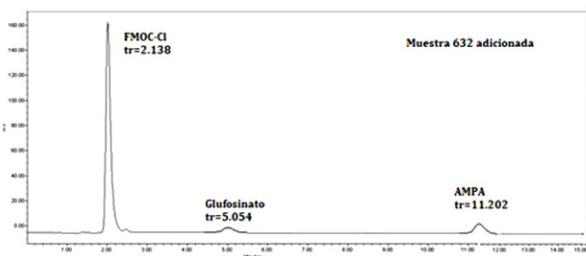
Se analizaron muestras de suelo de la región de Molango donde se sospecha la aplicación reciente de los herbicidas de estudio. En la Tabla 4 se presentan los resultados de la aplicación del método propuesto a las muestras, como se puede observar en las muestras analizadas solo se encontró en las muestras de suelo la presencia de AMPA y de glufosinato. No se detectó glifosato esto debido a que es un herbicida no residual que se degradan fácilmente del suelo, con semividas estimadas que van de 4,2 días en agua corriente y la degradación lenta está asociada con la presencia de microorganismos en fase acuosa (Vera et al., 2001). Sin embargo, se detectó ácido aminometilfosfónico (AMPA), el metabolito principal de glifosato (Sancho et al., 1996).

**Tabla 4.** Concentración de los analitos en las muestras de suelo.

Clave	Glifosato mg/kg	AMPA mg/kg	Glufosinato mg/kg
628-16	ND	ND	3.59
629-16	ND	ND	ND
630-16	ND	ND	ND
631-16	ND	ND	2.4
632-16	ND	10.9	4.61
633-16	ND	40.86	ND
634-16	ND	4.18	3.94
635-16	ND	ND	ND
636-16	ND	ND	ND
637-16	ND	50.09	26.91
638-16	ND	108.26	29.02
639-16	ND	35.12	24.47



**Figura 10.** Cromatograma de la inyección de la Muestra ambiental 632-16.



**Figura 11.** Cromatograma de la inyección de la Muestra ambiental 632-16 adicionada.

## Conclusiones

Los parámetros de desempeño obtenidos en la validación del método de análisis utilizado en la determinación de plaguicidas en matrices ambientales, garantizan que éste es apto para el fin propuesto debido a que los parámetros se encuentran entre los valores recomendados para un método analítico.

Una vez validado el método analítico se trabajó con muestras de suelo que fueron tomadas en varias poblaciones de Molango Hidalgo, esto con la finalidad de determinar las concentraciones de glifosato, AMPA y glufosinato.

En las muestras analizadas se encontraron concentraciones de AMPA en un intervalo de (4.18-108.26) mg/kg. El AMPA es el metabolito principal de glifosato.

En las muestras analizadas se encontraron concentraciones de glufosinato en un intervalo de (2.40-29.02) mg/kg.

## Agradecimientos

A la minera Autlán por las facilidades para llevar a cabo este trabajo.

## Referencias

Báez M.E., Fuentes E., Espina M.J., Espinoza J. (2014). Determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in aqueous soil matrices: A critical analysis of the 9-fluorenylmethyl chloroformate derivatization reaction and application to adsorption studies. *J. Sep. Sci.*, 3125-3132

Chamkasem N., Harmon T. (2016). Direct determination of glyphosate, glufosinate, and AMPA in soybean and corn by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.*

COFEPRIS. (2016). Catálogo oficial de plaguicidas. Recuperado el 15 de junio del 2017 de <http://www.cofepris.gob.mx/AZ/Paginas/Plaguicidas%20y%20Fertilizantes/CatalogoPlaguicidas.aspx>

Doublet J., et al. (2009). Delayed degradation in soil of foliar herbicides glyphosate and sulcotrione previously absorbed by plants: Consequences on herbicide fate and risk assessment. *Chemosphere*, 582-589.

Druart C., Delhomme O., de Vauflery A., Ntcho E., Millet M. (2011). Optimization of extraction procedure and

chromatographic separation of glyphosate, glufosinate and aminomethylphosphonic acid in soil. *Anal Bioanal Chem*, 1725–1732.

Hanke I, Singer H, Hollender J. (2008). Ultratrace-level determination of glyphosate, aminomethylphosphonic acid and glufosinate in natural waters by solid-phase extraction followed by liquid chromatography–tandem mass spectrometry: performance tuning of derivatization, enrichment and detection. *Anal Bioanal Chem*, 2265–2266.

Hidalgo G. D. (2016). Enciclopedia de los Municipios Molango de Escamilla. Recuperado el 15 de 06 de 2017, de <http://siieh.hidalgo.gob.mx/files/molango.pdf>

Hiroyuki K., Sunhi R., Norihisa S. Masami M. (1996). Simple and rapid determination of the herbicides glyphosate and glufosinate in river water, soil and carrot samples by gas chromatography with flame photometric detection. *Journal of Chromatography A*, 253–258.

Ibáñez M.O., Pozo J.J., Sancho V. F., López J., Hernández F. (2005). Residue determination of glyphosate, glufosinate and aminomethylphosphonic acid in water and soil samples by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, Volume 1081, 145–155.

Islas G., Rodríguez J.A., Mendoza-Huizar L.H., Pérez-Moreno F., Carrillo G. (2014). Determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in soils by HPLC with pre-column derivatization using, 2-naphthoquinone-4-sulfonate. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 37, 1298–1309.

H. Congreso de la Unión LGS. (2003). Ley General de Salud. Recuperado el 15 de junio del 2017 de [http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/legis/lgs/LEY\\_GENERAL\\_DE\\_SALUD.pdf](http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/legis/lgs/LEY_GENERAL_DE_SALUD.pdf)

Lupi, L., Miglioranza S.B., Aparicio V.C., Marino D., Bedmar F., Wunderlin D.A. (2015). Occurrence of glyphosate and AMPA in an agricultural watershed from the southeastern region of Argentina. *Science of the Total Environment* 536, 687–694.

Meyer M.T., Loftin K.A., Lee E.A., Hinshaw G.H., Dietze J.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, Reston, Virginia, 1–44.

Morillas P.P. y colaboradores. (2016). Guía Eurachem: La adecuación al uso de los métodos analíticos – Una Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados. Madrid: Eurolab España.

Peruzzo P., Porta A. A., Ronco A.E. (2008). Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina. *Environmental Pollution* 156, 61–66.

Sancho J.V., Hernández F.F., López J. E., hogendoorn E.A., Dijkman E. (1996). Rapid determination of glufosinate, glyphosate and aminomethylphosphonic acid in environmental water samples using precolumn fluorogenic labeling and coupled-column liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 75–83.

Stalikas C. D., Konidar, C. (2001). Analytical methods to determine phosphonic and amino acidgroup-containing pesticides. *J. Chromatogr. A* 907, 1–19.

Vera M., Lagomarirsino, L., Sylvester M., Pérez G., Rodríguez P., Mugni, H., y otros. (2001). New evidences of Roundup® (glyphosate formulation) impact on the periphyton community and the water. *Ecotoxicology* (2010) 19:710–721.