

3 C.11 - DETERMINACIÓN DE GLIFOSATO Y SUS METABOLITOS EN PLANTAS MEDIANTE ELECTROFORESIS CAPILAR

A.M. Rojano-Delgado¹, J. Ruiz-Jiménez², M.D. Luque de Castro², R. De Prado¹

¹Departamento de Química Agrícola y Edafología, Universidad de Córdoba, Campus Rabanales, España. E-mail: arakidonis@hotmail.com

²Departamento de Química Analítica, Universidad de Córdoba, Campus Rabanales, España.

Resumen: Se desarrolló un método de electroforesis capilar (CE) que permite la determinación simultánea de glifosato y sus metabolitos [ácido aminometilfosfónico (AMPA), glioxilato, sarcosina y formaldehído] en plantas. Este método se usó en varias muestras de una población de *Lolium multiflorum* tratado con 200 g. ha⁻¹ de m.a. de glifosato y recogidas a las 96 horas después del tratamiento. Tras la etapa de extracción-limpieza y determinación se obtuvieron los siguientes valores: 20.794±0.257 μg/ml (t_m 9.8min), 0.830±0.030 μg/ml (t_m 10.9min), 2.986±0.025 μg/ml (t_m 11.3min), 9.175 ± 0.211 μg/ml (t_m 13.5min) y 0.152 ± 0.014 μg/ml (t_m 17.1min) para glifosato, AMPA, glioxilato, sarcosina y formaldehído, respectivamente. Este método rápido y eficaz nos permitirá estudiar si el metabolismo de glifosato está involucrado en la aparición de malezas resistentes, que es hoy día uno de los grandes problemas que se está encontrando en la agricultura mundial.

Palabras claves: Metabolismo, AMPA, glioxilato, electroforesis capilar

INTRODUCCIÓN

El glifosato es un herbicida no selectivo de acción sistémica, de amplio espectro, y adecuado para el control de muchas especies de malezas, en tratamientos de post emergencia. La eficacia de glifosato como herbicida, ha sido debida a su naturaleza química, alta solubilidad en agua, y capacidad de inhibir la biosíntesis de aminoácidos. Sin embargo, estas propiedades también hacen difícil el análisis de glifosato, AMPA, glioxilato, sarcosina y formaldehído, especialmente cuando están presentes a nivel residual en una variedad de matrices complejas, siendo necesarios largos procesos de extracción y limpieza junto con el uso de técnicas de derivatización (debido a la ausencia de grupos cromóforos) para su determinación (FRANZ JOHN E. et al, 1997). Su reiterado uso en campo ha hecho que aparezcan malezas resistentes a este herbicida, cuya presencia en los cultivos puede reducir el rendimiento y contaminar la cosecha, originándose grandes pérdidas. El objetivo de este trabajo es poder simplificar todo el proceso para la determinación de glifosato y sus metabolitos y poder ser usado para profundizar en el metabolismo del mismo en plantas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Equipos y aparatos

Para realizar el tratamiento con glifosato comercial sobre plantas se utilizó una cámara de tratamiento equipada con un pulverizador Tee Jet 8002 con boquilla de abanico plano y presión 200kP. En la centrifugación de las muestras se ha usado una centrífuga con control de temperatura Beckman Coulter Avanti® J-25 (Fullerton, California) con un rotor nº 20. Los tubos usados para el secado de la

muestra con aire son de poliestireno, estériles, modelo fondo redondo y con faldón (Deltalab, España). El equipo usado para la determinación de glifosato y sus metabolitos (ácido aminometilfosfónico, glioxilato, sarcosina y formaldehído) es un 3D Capillary Electrophoresis Agilent G1600A Instrument (Waldbronn, Germany), equipado con un detector de fotodiodos en fila (en un rango 190-600nm) y termostatado por una unidad Peltier. El capilar utilizado tiene una longitud de 88.5 cm (longitud efectiva 80cm) x 50 μ m i.d. x 375 μ m o.d. (Análisis Vínicos, Ciudad Real, España). El control del equipo y la adquisición y procesado de datos es llevado a cabo por el programa Agilent ChemStation.

Reactivos

Acetona, hidróxido sódico, acetonitrilo, formaldehído, ácido clorhídrico y ftalato potásico de PANREAC (Barcelona, España), CTAB (Bromuro de hexadeciltrimetilamonio) de Fluka (Buchs, Suiza), sarcosina y glioxilato de Sigma-Aldrich (Saint Louis, USA), ácido aminometilfosfónico de Supelco (Bellefonte, USA) y glifosato de Riedel-Haën (Seelze, Alemania). El glifosato comercial usado para tratar las plantas es el Roundup 36% (Monsanto, España). El tampón de desarrollo (BGE) fue 10mM ftalato, pH 7.5, 0.5mM en CTAB y 10% en acetonitrilo. Se usó agua desionizada (18 m Ω) obtenida por un sistema Millipore Milli-Q de purificación de agua. La solución madre de los patrones fue preparada añadiendo 20mg de cada uno de los analitos en 20 ml de tampón de desarrollo. Las soluciones de patrones fueron preparadas por dilución de la anterior en tampón de desarrollo obteniéndose 500, 250, 100, 50, 25, 10, 5 y 0 μ g/ml.

Muestras

Se utilizaron semillas de 3 biotipos diferentes *L. multiflorum*. Las semillas fueron germinadas en placas Petri con papel de filtro ligeramente humedecido con agua destilada. Las plántulas fueron sembradas en macetas (tres plantas por maceta) con un contenido de turba y arena (1/2, v/v) y mantenidas en una cámara de crecimiento a 28/18 °C (día/noche) con un fotoperíodo de 16 h a 350 μ mol m⁻²s⁻¹ y 80% de humedad relativa. Todas las plantas con 6-7 hojas fueron tratadas con glifosato comercial a una dosis de 200 g.de i.a. ha⁻¹ con la cámara de tratamiento y cortadas 96horas después de la aplicación. Posteriormente fueron congeladas y conservadas a -40°C.

Método propuesto

Las muestras congeladas fueron limpiadas con agua para eliminar los restos de glifosato y tierra que pudieran contener. Posteriormente se pulveriza 1.5g del material vegetal, usando un mortero de porcelana y nitrógeno líquido para facilitar la obtención de un fino polvo y evitar las posibles descomposiciones de los metabolitos. El polvo se extrajo tres veces con 8 ml de mezcla acetona-agua 1:1. En el procedimiento de extracción se usa un agitador magnético durante 10 minutos y, a continuación, ultrasonidos durante 5 min, seguida de una centrifugación a 4 ° C y 10000 rpm durante 15 minutos. Los sobrenadantes obtenidos en las tres extracciones se combinaron y evaporaron a sequedad bajo corriente de aire. El extracto se reconstituyó con 2 ml de BGE y filtrado a través de un filtro de nylon antes del análisis en CE. La solución que contiene los analitos fue inyectada a -10 kV durante 5 s en BGE (10 mM de ftalato de potasio, 0,5 mM CTAB y 10% acetonitrilo a pH 7,5). El voltaje de análisis fue -20 kV, y el seguimiento se hizo con una longitud de onda de 220 nm para todos los analitos. A fin de mantener el capilar en óptimas condiciones de trabajo, su superficie se regeneró después de cada inyección mediante una secuencia de lavado con agua (2 min), 0,1 M de hidróxido de sodio (2 min), 1 minuto de espera, y el BGE (10 min). Además, el capilar se activó todos los días por lavado secuencial con agua (1 min), 0,1 M de hidróxido de sodio (10 min), 5 minutos de espera, y agua (1 min).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los electroferogramas obtenidos a partir de las muestras vegetales fortificadas con estándares muestran unas señales bien separadas y que no solapan con otras sustancias interferentes de la matriz vegetal (Figura 1B) pero a diferencia de matrices acuosas, se produce en estos un desplazamiento de las señales de los analitos (Figura 1A).

La calibración realizada sobre los 3 biotipos de *L. multiflorum* sin tratar (Tabla 1) permitió obtener las concentraciones de los metabolitos en muestras tratadas (Tabla 2).

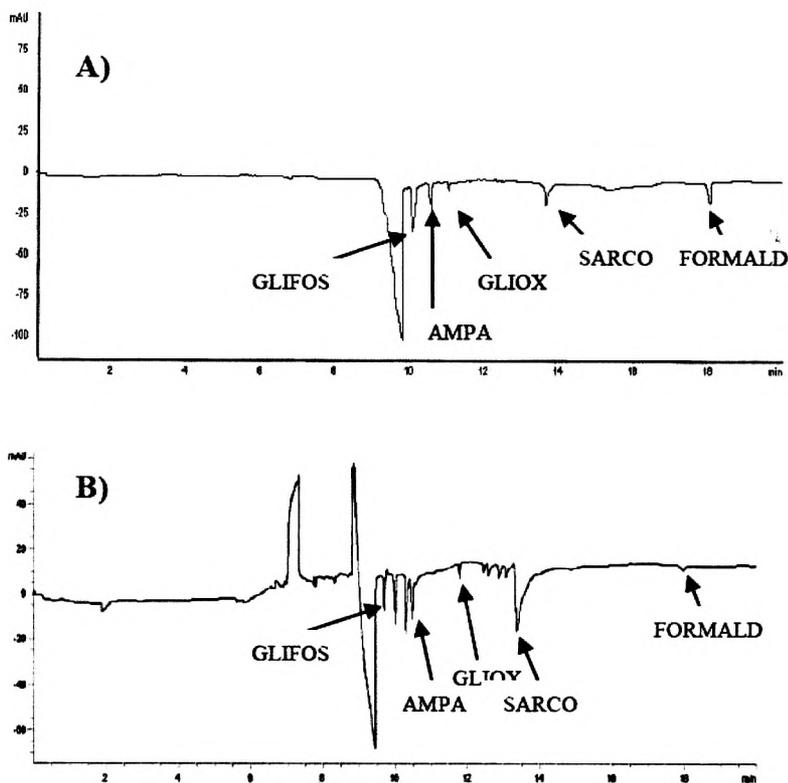


Figura 1. Electroferogramas sin matriz vegetal (A) y con matriz vegetal (B)

Tabla 1. Ecuaciones de calibración para cada uno de los analitos. Y (área de pico) expresado en unidades de absorbancia $\times 10^{-3}$; X (concentración) en $\mu\text{g/ml}$ de extracto vegetal reconstituido (1.5 g de peso fresco en 2 ml de BGE)

glifosato	AMPA	glioxilato	sarcosina	formaldehido
$y=0.4951+0.326x$ $R^2 0.999$	$y=-0.543+0.297x$ $R^2 0.999$	$y=0.641+0.244x$ $R^2 0.998$	$y=0.146+0.111x$ $R^2 0.999$	$y=0.113+0.203x$ $R^2 0.998$

Tabla 2. Datos obtenidos para cada analito en muestras reales 96 h tras el tratamiento

glifosato	AMPA	glioxilato	sarcosina	formaldehido
20.794	0.830	2.986	9.175	0.152
$\pm 0.257\mu\text{g/ml}$	$\pm 0.030\mu\text{g/ml}$	$\pm 0.025\mu\text{g/ml}$	$\pm 0.211\mu\text{g/ml}$	$\pm 0.014\mu\text{g/ml}$

* μg de metabolito por ml de extracto vegetal reconstituido en BGE

Os resultados obtenidos muestran que este método es eficaz para eliminar aquellas interferencias de la matriz vegetal que solapan con la mayoría de los metabolitos y por tanto dificultan su detección, además de permitir su cuantificación en muestras vegetales. Esto último nos hace dirigir nuestra futura investigación en el estudio y conocimiento del metabolismo de glifosato comprobando si existe diferencias en los niveles de metabolitos entre plantas de diferente tolerancia a este herbicida.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido realizado gracias a la subvención obtenida en el proyecto **AGL2007-60771/AGR**.

BIBLIOGRAFÍA

- CIKALO MARIA G.; GOODALL DAVID M.; MATTHEWS W. (1996). Analysis of glyphosate using capillary electrophoresis with indirect detection. *Journal of Chromatography A*, 745, 189-200.
- FRANZ JOHN E.; MAO MICHAEL K.; SIKORSKI JAMES A. (1997). Behavior of Glyphosate in Soil, Hydrosols, and Water-Methods for Glyphosate Analyses. En: *Glyphosate A Unique Global Herbicide. ACS Monograph* 189. 65-101.
- GREEN JERRY M. (2009). Evolution of Glyphosate-Resistant Crop Technology. *Weed Science*, 57, 1087-117.

Summary: Determination of glyphosate and its metabolites in plants by capillary electrophoresis. This was done by the capillary electrophoresis method (CE), which permits the simultaneous determination of glyphosate and its metabolites (aminomethylphosphonic acid (AMPA), glyoxylate, sarcosine and formaldehyde) in plants. This method was used in several samples of *Lolium multiflorum* population treated with 200 g of a.i. ha^{-1} of glyphosate and collected 96 hours after the treatment. After the extraction-cleaning and determination stages, the following values were obtained: $20.794\pm 0.257\mu\text{g/ml}$ (t_m 9.8min), $0.830\pm 0.030\mu\text{g/ml}$ (t_m 10.9min), $2.986\pm 0.025\mu\text{g/ml}$ (t_m 11.3min), $9.175 \pm 0.211\mu\text{g/ml}$ (t_m 13.5min) and $0.152 \pm 0.014\mu\text{g/ml}$ (t_m 17.1min) for glyphosate, AMPA, glyoxylate, sarcosine and formaldehyde, respectively. This rapid, efficient method permits us to study whether the metabolism of the glyphosate is involved in the appearance of resistant weeds, which nowadays is one of the greatest problems being encountered in the agricultural world.

Key words: Metabolism, AMPA, glyoxylate, capillary electrophoresis