



COLEGIO DE POSTGRADUADOS
INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE EDAFOLOGÍA

**PROPUESTA Y VALIDACIÓN DE UNA TÉCNICA DE EXTRACCIÓN
DE IMAZAPYR® APLICADO AL SUELO PARA SU DETERMINACIÓN
POR HPLC Y ESPECTROSCOPIA NIR**

MILTON CARLOS SOTO BARAJAS

T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2010

La presente tesis titulada: **PROPUESTA Y VALIDACIÓN DE UNA TÉCNICA DE EXTRACCIÓN DE IMAZAPYR® APLICADO AL SUELO Y SU DETERMINACIÓN POR HPLC Y ESPECTROSCOPIA NIR**; realizada por el alumno: **MILTON CARLOS SOTO BARAJAS**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN

EDAFOLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



DR. JORGE ETCHEVERS BARRA

ASESORA



DRA. BLANCA PRADO PANO

ASESORA



DRA. CLAUDIA HIDALGO MORENO

ASESORA



DRA. INMACULADA GONZALEZ MARTIN

Montecillo estado de México, noviembre, 2010

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología que me otorgó el apoyo económico para realizar mis estudios de maestría.

Al personal del Colegio de Postgraduados que directa e indirectamente han contribuido a mi formación profesional, especialmente a Lourdes de Bauer, Carmen Gutiérrez Castorena, Benjamín Figueroa y Edmundo García Moya.

A los integrantes de mi consejo: Dr. Jorge Etchevers, por el tiempo que le dedicó a este trabajo, a la Dra. Claudia Hidalgo, por su disposición y apoyo; a la Dra. Inmaculada González por su apertura e integración; y sobre todo, a la Dra. Blanca Prado por todo su apoyo en este proyecto y por contagiarme un poco del gran entusiasmo que le pone a su trabajo.

A todo el personal del Laboratorio de Edafología, a la M. C. Juliana Padilla y con gratitud en especial a Lourdes Morales, por su importante participación en los momentos más críticos.

A la Dra. Lucy Mora Palomino del Laboratorio de Edafología Ambiental del Instituto de Geología de la UNAM, por su disposición a atender mis dudas y permitirme usar las instalaciones del laboratorio a su cargo. En particular a Lidia Fernández por auxiliarme en las actividades de que se llevaron a cabo en el Laboratorio de Química Analítica, Bromatología y Nutrición de la Universidad de Salamanca y en general a todo el personal de ese laboratorio.

Elías Raymundo, José Miguel Hernández Hierro y Mariela Fuentes Ponce que pusieron a mi disposición parte de sus conocimientos e investigaciones para utilizarlos en esta memoria.

A la Familia Baeza-Lobos: Iris, Pablo y Matteo por su cálida hospitalidad durante mi estancia en Salamanca.

A todos mis amigos que me apoyaron en todos los sentidos para culminar con éxito mis estudios de maestría.

DEDICATORIA

Para:

Luz y Miguel

Juan y Mere

Carmen y Miguel

Violeta y Miguel

CONTENIDO

RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
1 INTRODUCCIÓN.....	3
2 REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1 CARACTERÍSTICAS DEL IMAZAPYR®.....	4
2.1.1 FORMULACIONES COMERCIALES	5
2.1.2 Usos	6
2.1.3 MODO DE ACCIÓN.....	6
2.1.4 DEGRADACIÓN.....	7
2.1.5 EFECTOS NOCIVOS.....	8
2.1.6 COMPORTAMIENTO DEL IMAZAPYR® EN EL SUELO	9
2.1.6.1 Sorción.....	9
2.1.6.2 Movimiento en el perfil	9
2.1.6.3 Persistencia.....	10
2.2 EXTRACCIÓN, IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN.....	11
2.2.1 CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS	13
2.2.2 ESPECTROSCOPÍA NIR.....	13
3 OBJETIVOS	15
4 HIPÓTESIS	15
5 MATERIALES Y MÉTODOS	16
5.1 MÉTODO DE EXTRACCIÓN.....	16
5.1.1 EXPERIMENTOS PRELIMINARES.....	16
5.1.2 VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN	19
5.1.2.1 Selectividad Cualitativa	20
5.1.2.2 Recuperación	20
5.1.2.3 Repetibilidad	21
5.1.2.4 Robustez.....	22
5.2 ANÁLISIS CUALITATIVO Y CUANTITATIVO DEL IMAZAPYR® EN EL SUELO POR NIRS.	22
5.2.1 ANÁLISIS CUALITATIVO	23
5.2.1.1 Soluciones de trabajo.....	23
5.2.1.2 Suelos y Tratamientos	23
5.2.1.3 Registro de los espectros.....	25

5.2.1.4 Análisis discriminante.....	26
5.2.2 CUANTIFICACIÓN	29
5.2.2.1 Suelos utilizados para la cuantificación.....	30
5.2.2.2 Preparación de las muestras.....	30
5.2.2.3 Registro de los espectros.....	32
5.2.2.4 Análisis de referencia: Determinación de Imazapyr® por (HPLC).....	32
5.2.2.5 Desarrollo del modelo de cuantificación.....	33
6 RESULTADOS	38
6.1 MÉTODO DE EXTRACCIÓN.....	38
6.1.1 VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN GENERADO	40
6.1.1.1 Selectividad Cualitativa	40
6.1.1.2 Recuperación	41
6.1.1.3 Repetibilidad	43
6.1.1.4 Robustez.....	44
6.2 ANÁLISIS CUALITATIVO Y CUANTITATIVO DEL IMAZAPYR® EN EL SUELO POR NIRS	45
6.2.1 ANÁLISIS CUALITATIVO	46
6.2.2 CUANTIFICACIÓN.....	50
7 CONCLUSIONES	56
8 LITERATURA CITADA	57

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Características químicas selectas del Imazapyr® (Modificado de Kah y Brown 2006)	4
Cuadro 2. Propiedades físicas y químicas de los suelos utilizados en el desarrollo y la validación del método de extracción de Imazapyr®.....	16
Cuadro 3. Lista de los parámetros de desempeño que se deben evaluar en la validación de métodos analíticos.....	19
Cuadro 4. Nivel de aceptación en la recuperación en función del contenido de impureza o ingrediente activo en la matriz.	21
Cuadro 5. Muestras utilizadas en el procedimiento para obtener la ecuación de discriminación de Imazapyr® en suelo por NIRS	25
Cuadro 6. Cantidad y distribución de muestras por tratamiento para el Desarrollo del Modelo, la Validación Interna y la Validación externa.....	29
Cuadro 7. Concentración de Imazapyr® en las soluciones de trabajo y en el suelo	31
Cuadro 8. Secuencia de registro de los espectros y extracción de Imazapyr® de las muestras de suelo dopadas.....	31
Cuadro 9. Efecto del procedimiento de extracción en la recuperación de Imazapyr® de un andosol.....	38
Cuadro 10. Evaluación de la repetibilidad del método de extracción de Imazapyr® en un andosol dopado con $1.0 \mu\text{g g}^{-1}$	43
Cuadro 11. Recuperación de Imazapyr® en función del tipo de suelo	45
Cuadro 12. Parámetros estadísticos obtenidos del modelo de discriminación de Imazapyr® en el suelo	47
Cuadro 13. Porcentaje y cantidad de muestras clasificadas en el grupo al cual pertenecen utilizando la ecuación de discriminación para la detección de Imazapyr® en el suelo.....	48
Cuadro 14. Resultados del análisis de componentes principales (PCA) entre los espectros de suelos dopados con Imazapyr®.....	52
Cuadro 15. Parámetros estadísticos obtenidos del modelo de cuantificación de Imazapyr® en el suelo.	53
Cuadro 16. Rango de concentración de las muestras utilizadas en la Validación Externa del modelo de cuantificación de Imazapyr® en el suelo por NIRS	55
Cuadro 17. Validación externa. Cuantificación de Imazapyr® en el suelo	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química del Imazapyr® (Silva-Trejo 2005)	4
Figura 2. Comportamiento del Imazapyr® con relación al pH del sustrato en que se encuentre (Gennari et al. 1998).....	5
Figura 3. Colocación de la sonda de fibra óptica sobre una muestra de suelo para el registro de su espectro por NIRS	26
Figura 4. Esquema de las etapas de trabajo en estudios cualitativos usando NIRS (Hernández-Hierro, 2008)	27
Figura 5. Esquema de las etapas de trabajo para estudios cuantitativos por espectroscopía NIR (Hernández-Hierro, 2008).....	30
Figura 6. Espectros de 10 muestras de suelo dopadas con Imazapyr® y sus correcciones por diferentes métodos.....	34
Figura 7. Ejemplo de la corrección por derivadas y suavizados de los espectros en muestras de un inceptisol con Imazapyr®	35
Figura 8. Representación esquemática del Método propuesto para extraer Imazapyr® de suelo.	40
Figura 9. Diferencias entre los cromatogramas de las muestras de andosol sin Imazapyr® (a) y una muestra dopada (b)	41
Figura 10. Porcentaje de recuperación de Imazapyr® en un andosol dopado (0.2, 0.4, 0.8, 1.0, 1.4 $\mu\text{g g}^{-1}$).....	42
Figura 11. Diferencias espectrales de un conjunto de 10 muestras de suelo clasificadas según su preparación en originales, testigos, rehidratadas o dopadas.....	46
Figura 12 Diferencia entre los espectros originales, testigos, rehidratados y dopados en cuatro muestras de suelo.	47
Figura 13. Agrupación de las muestras por categorías en: testigos, rehidratadas y dopadas con Imazapyr®, al usar la ecuación de discriminación generada por DPLS y NIRS.....	49
Figura 14. Espectros de los seis suelos utilizados en la creación de la ecuación para cuantificar de Imazapyr® en suelo por NIRS.....	50
Figura 15. Comparación entre los espectros generados por un histisol sin el herbicida y al doparlo con el suelo al doparlo con 0.8, 0.12, 0.16, 0.20 ó 0.40 μg de imazapyr® por gramo de suelo.....	51
Figura 16. Comparación de los valores de referencia con los valores predichos por el modelo MPLS en NIR para la determinación de Imazapyr® en el suelo. Validación interna ...	54

PROPUESTA Y VALIDACIÓN DE UNA TÉCNICA DE EXTRACCIÓN DE IMAZAPYR® APLICADO AL SUELO PARA SU DETERMINACIÓN POR HPLC Y ESPECTROSCOPIA NIR

RESUMEN

Se propone un método que utiliza agua desionizada para la extracción de Imazapyr® del suelo. La identificación y cuantificación del herbicida se realizó por cromatografía de líquidos de alta precisión (HPLC). La validación del procedimiento de extracción se hizo considerando el desempeño de los siguientes parámetros: selectividad, recuperación, repetibilidad y robustez, de acuerdo a las definiciones del Centro Nacional de Metrología de México. La recuperación del herbicida fue de 98% en promedio con el método propuesto, lo cual permite que se le considere como procedimiento de rutina en las investigaciones sobre disipación de este plaguicida.

Alternativamente a la cuantificación del herbicida por cromatografía de líquidos de alta precisión (HPLC), se evaluó el uso de Espectroscopia en el Infrarrojo Cercano (NIRS) y la quimiometría, para la detección y cuantificación del Imazapyr® en el suelo. Se generó una ecuación de discriminación que permite identificar entre suelos con Imazapyr® y aquellos que no contienen el plaguicida. Para este procedimiento se utilizó suelo con distintos sistemas de labranza, con rotación de cultivos o monocultivos de maíz y/o trigo y adición o no de residuos. Con la ecuación de discriminación quimiométrica se obtuvo una certeza de clasificación de 98.5% en la validación interna y de 97.0% en la validación externa. Por otra parte, para la cuantificación con NIRS, en los ensayos se consideraron seis suelos de uso agrícola, se generó un modelo cuyo RSQ fue de 0.811 y mostró una capacidad de predicción (RPD) de 2.4. De acuerdo con estos resultados, el uso de espectroscopia NIR puede ser una alternativa a los métodos convencionales, para la identificación y cuantificación del herbicida en suelo.

Palabras clave: extracción de Imazapyr®, validación de métodos, detección de Imazapyr®, HPLC, NIRS

VALIDATION OF A NEW METHOD TO EXTRACT IMAZAPYR® APPLIED TO SOIL AND ITS DETECTION BY HPLC AND NIR SPECTROSCOPY

ABSTRACT

It is presented a method in which uses deionized water to extract Imazapyr™ from soil. The identification and quantification of the herbicide was by high performance liquid chromatography (HPLC). The validation of the extraction procedure was done considering the following parameters: selectivity, recovery, repeatability and robustness, according to the definitions of the National Center of Metrology of Mexico (CENAM). The recovery of herbicide, using the proposed method, was of 98% in average, which allows it to be considered as a routine procedure en research about dissipation of this pesticide.

Alternatively of the quantification of the herbicide by high performance liquid chromatography (HPLC), Near Infrared Spectroscopy (NIRS) and chemometrics were evaluated to detection and quantification of Imazapyr™ in soil. A discrimination equation was generated, with this it is possible to identify between soil with and without Imazapyr™. For this procedure soil from different tillage systems, cultures with corn or wheat or mixed and with addition or not of residues were used. With the discrimination quimometric equation accuracy of 98.5% in an intern validation and of 97% in an external validation was obtained. On other hands, six agricultural soils for quantification using NIRS were used, a model with RSQ of 0.811 and Ratio Performance Deviation (RPD) of 2.4, was obtained According of these results, the use of NIRS can be an alternative to conventional methods for identification and quantification of Imazapyr™ in soil.

Key words: Imazapyr™ extraction, validation of methods, Imazapyr™ detection, HPLC, NIRS

1 INTRODUCCIÓN

El Imazapyr® es un herbicida de reciente introducción en el mercado mexicano (CICOPLAFEST 2004), es de amplio espectro, no selectivo, que puede ser utilizado en ambientes acuáticos o agrícolas (EPA 2006), cuya intensidad de uso se prevé aumente a corto plazo. A este herbicida se le debe considerar como un compuesto peligroso debido a su alta vida residual y su fácil movilidad en el suelo (Cox 1996), lo que en determinadas condiciones podría provocar contaminación de cuerpos de agua, la forma cómo este herbicida se difunde en los suelos para llegar hasta estos cuerpos de agua no ha sido estudiada en este país. Por esas razones es fundamental disponer de técnicas para su evaluación que permitan conocer su comportamiento e impacto ambiental.

Para la determinación y la extracción de Imazapyr®, particularmente del suelo, los métodos reportados en la literatura (EPA 1998, Börjesson *et al.* 2004, Wang *et al.* 2005, 2006, Lao y Gan 2006, y Ramezani *et al.* 2009) son tediosos y requieren de inversiones altas, al utilizarse cartuchos de intercambio de fase sólida y/o solventes orgánicos. Quizás el punto más importante en esta búsqueda de nuevos procedimientos sea la necesidad por reducir la cantidad de solventes orgánicos utilizados, el tiempo destinado al análisis, el costo de los materiales y a aumentar la recuperación. Por ello algunos autores (Liu *et al.*, 1992; D'Ascenzo *et al.*, 1998) han buscado técnicas diferentes, o la adaptación de los métodos convencionales a condiciones específicas para lograr esos objetivos.

Con la finalidad de contribuir a generar conocimiento para el monitoreo de los herbicidas en el ambiente utilizando tecnologías más eficientes. EL objetivo de esta investigación fue obtener un método de extracción de Imazapyr® en el suelo y su cuantificación por cromatografía de líquidos que sea práctico, de bajo costo de operación y amplio rango de aplicación; y empleando espectroscopia en el infrarrojo cercano, por su sencillez y facilidad para preparar las muestras. Ambas técnicas podrían ser utilizadas en investigaciones relacionadas con el transporte, adsorción y monitoreo de Imazapyr® en el suelo.

2 REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Características del Imazapyr®

El Imazapyr®, ácido (RS)-2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il) nicotínico, es un herbicida de la familia de las imidazolinonas, un tipo de herbicidas desarrolladas por la compañía norteamericana *American Cyanamid*. Su estructura química es un centro conformado por el anillo de las imidazolinonas unido covalentemente a una estructura aromática conjunta a un residuo de ácido carboxílico (D'Ascenzo *et al.* 1998) (Figura 1).

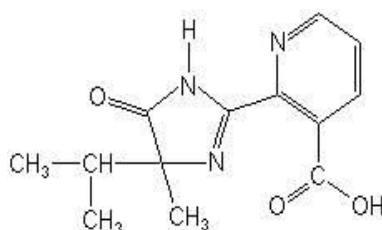


Figura 1. Estructura química del Imazapyr® (Silva-Trejo 2005)

La solubilidad del Imazapyr® en medios acuosos varía de acuerdo a la formulación del producto (Cox 1996), incrementándose con la temperatura; por ejemplo, se ha reportado en 9,740, 11,272 y 13,470 mgL⁻¹ a 15, 25 y 35 °C, respectivamente (EPA 2006) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Características químicas selectas del Imazapyr® (Modificado de Kah y Brown 2006)

Parámetro	Valor
Peso molecular (uma)	261.3
Presión de Vapor (mPa) (60 °C)	0.013
pK _{a1}	1.9
pK _{a2}	3.6
pK _{a3}	11.0
K _{oc} (mL g ⁻¹)	4-170
DT ₅₀ (días)	30-150
Solubilidad (en agua, gL ⁻¹)	9.74-11.27
Punto de fusión (°C)	169-173

uma: unidad de masa atómica

pK_a : Constante de disociación

K_{oc} : Coeficiente de distribución en suelos normalizados por el contenido de carbón orgánico

DT_{50} : Vida media en el suelo; tiempo requerido para que el 50% de la dosis inicial sea degradado.

Firmino *et al.* (2008a) explican que debido a la presencia de dos grupos funcionales en la molécula de Imazapyr®, el ácido carboxílico y el de las piridinas, éste compuesto presente tres valores de pK_a (Cuadro 1): 1.9; 3.6 y 11.4, dependiendo del pH del ambiente en el cual se encuentre y puede hallarse en forma neutra (II), en forma deprotonada (III) del carboxilo o de la imidazolinona nitrogenada o en forma protonada (I). (Figura 2).

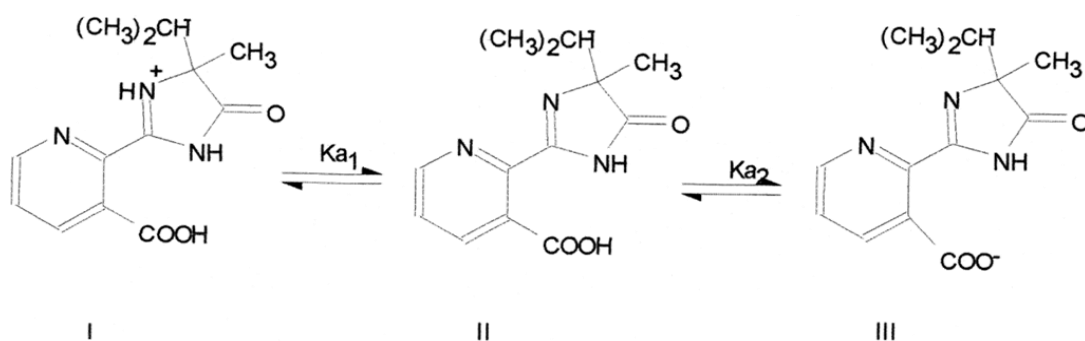


Figura 2. Comportamiento del Imazapyr® con relación al pH del sustrato en que se encuentre (Gennari *et al.* 1998)

Según Hurley y Shanaman (2007), el Imazapyr® está principalmente en forma aniónica, 61% ionizado, a pH 4; 94% ionizado a pH 5; más del 99% ionizado cuando el pH es superior a 6.

2.1.1 Formulaciones comerciales

The American Cyanamid Company registró al Imazapyr® en 1984 con formula comercial de sal isopropilamina con el nombre de Arsenal®; más tarde en 1993, en forma de ácido débil como Chopper®, (Cox 1996). Actualmente se produce tanto en forma de ácido débil y de sal isopropilamina con nombres comerciales de: Arsenal®, Chopper®, Stalker®, Assault®, Contain® (Jenkins *et al.* 2000) y en septiembre del 2003 al Imazapyr® se le concedió su registro para uso en sistemas acuáticos con el nombre de Habitat® (USDA 2004) y también en praderas. El primer registro de su uso autorizado en maíz para consumo humano fue en abril de 1997 (EPA 2006).

2.1.2 Usos

La aplicación de Imazapyr® en los Estados Unidos está permitida para usos terrestres (vías de ferrocarril, autopistas, hábitat de vida silvestre y bosques), y acuáticos (lagos reserva, canales, esteros, ríos y sistemas de drenaje), áreas no cultivadas y para maíz, informan Hurley y Shanaman (2007); en otros países como Nueva Zelanda, es un herbicida ampliamente utilizado según McDowell *et al.* (1997); en Malasia se aplica en huertos de hule, palmas aceiteras y plantaciones de cacao, en jardines además de terrenos no cultivados, para el control de la mayoría de pastos anuales y maleza de hoja ancha, indican Ismail y Ahmad (1994); Jenkins *et al.* (2000) añaden que la aplicación se extiende a árboles caducifolios, vid y en plantaciones forestales de pino, otras aplicaciones según Kaichouh *et al.* (2004) son en cereales, caña de azúcar y caucho; en los estudios realizados por Ulbrich *et al.* (2005) reporta su uso en legumbres de grano, girasol y cereales; Curran *et al.* (1992) mencionan la aplicación en palma de aceite y en cultivos tolerantes a las imidizolinonas denominados Clearfield® según Cox (1996).

Las dosis de aplicación recomendadas varían dependiendo de la región y el cultivo. Reportando, Ramezani *et al.* (2009) de 100 a 200 g de ingrediente activo (i. a.) por ha⁻¹, 34 -1,400 g ha⁻¹ (Maldaner *et al.* 2008) y de 500 a 2500 g ha⁻¹ (WSSA 1994). Las formas de aplicación del Imazapyr® al suelo son también diversas en función de su presentación, Hurley y Shanaman (2007) reportan formulaciones acuosas, granular dispersable en agua, en concentrados, como gránulos o tabletas.

2.1.3 Modo de acción

El Imazapyr® funciona como un herbicida sistémico no selectivo, el cual es adsorbido por el follaje y las raíces y distribuido al xilema y al floema, la mayor acumulación se presenta en los tejidos meristemáticos (Tucker *et al.* 1994) (Silva-Trejo 2005) (CETOS 2009); actúa inhibiendo la síntesis de la enzima acetohidroxiácidosintasa (AHAS) o acetolactatosintasa (ALS) (Jenkins *et al.* 2000), la cual cataliza la producción de aminoácidos aromáticos de cadena ramificada: valina, leucina e isoleucina, que controlan la síntesis de las proteínas, el DNA y participan en el crecimiento celular (Cox 1996), al inhibirlos esos compuestos se manifiesta un

estancamiento del crecimiento durante los primeras veinticuatro horas después de la aplicación (Silva-Trejo 2005) inicialmente de las raíces y continúa a la zona superficial, el resultado de es la muerte de las hojas nuevas (CETOS 2009). La muerte de la planta completa sucede según Cox (1996), aproximadamente un mes después del tratamiento dependiendo de las condiciones ambientales.

2.1.4 Degradación

Cox (1996), reporta como la principal forma de degradación del Imazapyr® en el suelo al metabolismo microbiano, que se incrementa con: (1) temperaturas más cálidas, (2) suelos más arenosos coincidiendo en éste punto con Ismail y Ahmad (1994), (3) condiciones aeróbicas del suelo, (4) aumento en la humedad del suelo, (5) aumento del pH, (6) bajo contenido de materia orgánica. Wang *et al.* (2005), encontraron que por transformación microbiana se degrada entre 62 y 78% del herbicida aplicado a suelos no esterilizados, y que otras formas de degradación fueron muy limitadas, afirmaciones acordes con los resultados de los estudios de laboratorio conducidos por la Agencia Norteamericana de Protección Ambiental (*US Environmental Protection Agency*, EPA 2006) que mostraron que el Imazapyr® fue esencialmente estable a la degradación aeróbica y anaeróbica. En contraste Mallipudi *et al.* (1985) encontraron que el Imazapyr® es susceptible a la fotólisis en soluciones acuosas, con vida media de 2.0, 2.5 a 5.3 días (Cox 1996), 9.1 días en agua destilada según Ramezani *et al.* (2008) que observaron además, que la fotólisis decreció al incrementarse el pH de la solución.

En cuanto a la hidrólisis, Quivet *et al.* (2004) y Ramezani *et al.* (2008), mostraron que no participó con un papel relevante en la degradación del plaguicida en el suelo; afirmando, éstos últimos autores, que la degradación abiótica en la superficie del suelo ocurre solamente en presencia de luz, siendo estable en la oscuridad, igualmente en los resultados experimentales de Silva-Trejo (2005) se encontró que el herbicida se mantuvo estable en una solución acuosa en la oscuridad por 9.6 meses.

2.1.5 Efectos nocivos

El Imazapyr® es considerado por la EPA (2006) como un compuesto químico no tóxico, por tener una dosis letal media (LD₅₀) superior a 5,000 mg kg⁻¹ de peso corporal en consumo oral para pruebas toxicológicas en mamíferos. Las intoxicaciones por ingestión de más 100 mL del herbicida concentrado, revisadas por Lee *et al.* (1999) se observaron síntomas de hipotensión, pérdida de la conciencia, disfunción pulmonar, acidosis metabólica, disfunción renal, leucocitosis y fiebre. Cox (1996) indica que el herbicida en grado técnico, es corrosivo al contacto con los ojos y puede causar daño oftálmico irreversible. Sin embargo, Schwarcz *et al.* (1983) mencionaron que algunos de sus metabolitos parasen ser más agresivos que el mismo herbicida. El Centro de investigación para la Ética en la producción de Sustancias Tóxicas (*Center for Ethics and Toxics*, CETOS 2009) reconoce como peligrosos a dos de sus metabolitos: el ácido quinolínico, neurotoxina, irritante de ojos, el sistema respiratorio y la piel y al ácido nicotínico (llamado también Vitamina B3) que en dosis altas se ha identificado también como neurotoxina.

Entre los efectos adversos encontrados en animales de laboratorio después de exposición crónica al Imazapyr®, Cox (1996) destaca la acumulación de fluidos en los riñones en ratones hembras, quistes en los pulmones, cáncer en tiroides en ratas macho e incremento en el número de tumores y de cáncer en las glándulas adrenales en ratas hembras.

En medios acuáticos, Patten (2003) indica que el Imazapyr® tiene una vida media que no resulta tóxico para los peces e invertebrados. Solamente las microfotas parecen más sensibles a concentraciones altas de acuerdo con el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (*US Department of Agriculture*, USDA 2004) y a Maldaner *et al.* (2008).

Ramezani *et al.* (2009) dicen que el impacto directo del Imazapyr® sobre el medio ambiente está influenciado por muchos factores, como la matriz en cual se aplica, y la relación de la concentración de plaguicida/matriz. Osajima *et al.* (2008) comprobaron que el pH del ambiente determinará la estructura química del herbicida, lo cual establecerá su persistencia y movilidad. Miller *et al.* (1997) y Wang *et al.* (2006),

mencionan que en el suelo y los sedimentos el Imazapyr® es sorbido débilmente, y puede ser potencialmente lavado hasta aguas subterráneas a causa de su alta solubilidad.

Estudios hechos por Agostinetto *et al.* (2001), Kaichouh *et al.* (2004) y Osajima *et al.* (2008) indican que los residuos de Imazapyr® dañan a las plantas a concentraciones muy bajas. Ramezani *et al.* (2008) describieron que la sintomatología se puede observar como plantas débiles, acortamiento entre los nudos y reducción del rendimiento aún a 1/50 de la dosis típicamente aplicada. En cultivos de papa de alta calidad (US # 1) se disminuyó la producción en 99% por malformaciones y agrietamientos (Cox 1996). La elevada actividad residual del Imazapyr® según Firmino *et al.* (2008b), puede impedir temporalmente la siembra de cultivos de interés agronómico en las áreas tratadas con el herbicida y existe evidencia en los reportes de Ulbrich *et al.* (2005) de que el herbicida podría persistir y afectar el desarrollo de los cultivos subsecuentes después de su aplicación, o limitar su utilización en sistemas de producción en los cuales se practica rotación de cultivos, de igual forma Bovey y Senseman (1998), indicaron que después de 12 meses de exposición en la mayoría de los suelos, el Imazapyr® sigue siendo tóxico para todos los cultivos probados por los autores en al menos en una de las dosis aplicadas.

2.1.6 Comportamiento del Imazapyr® en el suelo

2.1.6.1 Sorción

La relación de adsorción entre el Imazapyr® y los componentes del suelo según Gennari *et al.* (1998) y Nègre *et al.* (2001) está influenciada por la materia orgánica (carbón orgánico, ácidos húmicos), los óxidos e hidróxidos de hierro de cristalización pobre y el pH. De acuerdo a Pusino *et al.* (1997) el Imazapyr® tiene mayor afinidad por la materia orgánica y/o los óxidos de hierro que por las arcillas y la adsorción se incrementa cuando decrece el pH del suelo.

2.1.6.2 Movimiento en el perfil

Investigaciones de Wehtje *et al.* (1987), en suelos de Alabama concluyeron en que el Imazapyr® fue más móvil que la atrazina, plaguicida ampliamente encontrado en

el agua subterránea en Estados Unidos, adicionalmente en estudios de la EPA (2006) se encontró que el Imazapyr® tiene potencial de adsorción moderado pero alto potencial de desorción. Vizantinopoulos y Lolos (1994) encontraron que entre el 40 y 70% del Imazapyr® aplicado se lixiviaba a 45 cm, aunque más tarde Cox (1996) reportó que el Imazapyr® se lixivia a profundidades entre 1.5 y 3.0 m influyendo en su movimiento la cantidad del herbicida aplicado, la textura, el tipo de arcilla, la humedad, la materia orgánica y el pH del suelo; pero en general, según Souza *et al.* (2000) y Firmino *et al.* (2008 a), en suelos con pH y humedad bajos o ricos en arcilla y materia orgánica o la combinación de ambos, se presentó mayor sorción y persistencia del herbicida y menor lixiviación y degradación.

2.1.6.3 Persistencia

El tiempo que un herbicida permanece activo en el suelo se denomina “persistencia en el suelo” o “vida residual en el suelo” (Hager y Refsell 2008). Curran *et al.* (1992) afirma que dentro de las familias de herbicidas que tienen mayor persistencia en el suelo se encuentran las imidazolinonas, a la cual pertenece el Imazapyr®. Su persistencia en el suelo se ve afectada por agentes clasificados en tres categorías por Curran *et al.* (1992) y Hager y Refsell (2008) que son: los factores edáficos, las condiciones climáticas, y las propiedades del herbicida.

Ha sido reportado por Wang *et al.* (2006) que el Imazapyr® es más persistente en el ambiente edáfico que otros plaguicidas no selectivos y puede contralar la aparición de maleza hasta por 5 meses. Lo cierto es que los informes relativos a su persistencia son variados, mencionándose intervalos de días, entre 25 y 142 (WSSA 1994), 26 y 44 (Ismail y Ahmad 1994), de 25 hasta 58 (El Azzouzi *et al.* 1998), 25-141 (Cox 1996), 81-133 días (Wang *et al.* 2006), 69-155 (McDowell *et al.* 1997); más de un año por Peoples (1984), Vizantinopoulos y Lolos (1994), Kaichouh *et al.* (2004), Osajima *et al.* (2008); entre 6 meses y 2 años en climas templados por Mallipudi *et al.* (1985), 1.2 años, 1.4 años y 5.9 años en condiciones anaeróbicas según Hurley y Shanaman (2007).

2.2 Extracción, identificación y cuantificación

Entender el comportamiento de un plaguicida en el suelo es fundamental para su evaluación, por razones ambientales y agronómicas (Wang *et al.*, 2005). Aún cuando los plaguicidas son aplicados al follaje de las plantas, cierta cantidad de ellos llega al suelo, actuando éste como reservorio y es el sitio en donde se lleva a cabo la mayor parte de su degradación potencial (D'Ascenzo *et al.*, 1998).

Para determinar la presencia de cualquier plaguicida en el suelo se requieren principalmente procedimientos acordes a su naturaleza y a las condiciones edáficas (Ramezani *et al.* 2009), optimizar las técnicas de extracción es un paso clave para alcanzar dicho objetivo (D'Ascenzo *et al.* 1998); siendo entonces, el procedimiento de extracción del plaguicida del suelo el paso que requiere de más atención en el análisis (Ramezani *et al.* 2009), el objetivo final de cualquier procedimiento de extracción es obtener una muestra que permita determinar la concentración y evadir la degradación del plaguicida durante su manipulación en el laboratorio. Algunos procedimientos de extracción son percibidos como cuellos de botella en un procedimiento analítico. Laganà *et al.* (2000) dicen que los métodos de preparación de muestras actuales para la mayoría de los plaguicidas son tanto consumidores de tiempo como de reactivos.

De los procedimientos existentes en la literatura científica para extraer y cuantificar Imazapyr® del suelo (ver Liu *et al.* 1992, D'Ascenzo *et al.* 1998, Börjesson *et al.* 2004, Wang *et al.* 2005, 2006, Lao y Gan 2006, y Ramezani *et al.* 2009, entre otros) es posible identificar dos etapas principales:

- a) *La extracción de Imazapyr® del suelo*, que tiene la finalidad de poner al herbicida en solución acuosa, libre de suelo.
- b) *El tratamiento del extracto*, que se refiere al proceso de preparación para la identificación y cuantificación del herbicida.

En la primera etapa, esto es, la extracción del herbicida desde la fase sólida del suelo, se identifican cuatro fases comunes: (1) aplicación de la solución extractante; (2) agitación; (3) centrifugación y (4) separación del extracto. Las variaciones entre los métodos consultados fueron: en la composición de la solución utilizada como extractante, en los tiempos de agitación y en el tiempo y la velocidad de centrifugación,

además en el método de D'Ascenzo *et al.* (1998) se efectúa una sonicación a la suspensión. Liu *et al.* (1992) y Wang *et al.* (2005, 2006) coincidieron en usar una solución extractante compuesta por metanol y agua, pero en proporciones (v/v) de 60:40 y 70:30 respectivamente. D'Ascenzo *et al.* (1998), ensayaron la solución extractante propuesta por Liu *et al.* (1992), pero al compararla, mencionan que el NaCl 0.1M es mejor además concluyeron en recomendar KCl 0.1M por resultar más eficiente que las otras dos soluciones probadas; también se han empleado soluciones con NaOH 0.5M por Börjesson *et al.* (2004) y Lao y Gan (2006).

La segunda etapa, que comprende el tratamiento del herbicida extraído para su evaluación, ha sido realizada directamente o después de concentrar el extracto. Liu *et al.*, (1992) y D'Ascenzo *et al.* (1998) hicieron lecturas por cromatografía directamente. En otros procedimientos mencionados por Wang *et al.* (2005, 2006) se implementaron 3 lavados con diclorometano, deshidratación del extracto con sulfato de sodio anhidro, reducción de volumen de éste con rotavapor, transferencia a tubos de ensayo mezclándolo con hidróxido de aluminio, enjuagado con solución metanol/acetato de etilo, evaporación a sequedad en un rotavapor y redisolución con metanol; Lao y Gan (2006), trataron el extracto con HCl 6M hasta un pH de 2.8, centrifugaron a 9000 rpm por 20 min, lo decantaron, realizaron 3 lavados con diclorometano, eliminaron el diclorometano de la solución con sulfato de sodio anhidro, concentraron el sobrenadante en un rotavapor casi a sequedad y redisolvieron el extracto con 2-propanol; Börjesson *et al.* (2004) reportan la separación del herbicida del resto de la solución empleando dos tipos de cartuchos de extracción de fase sólida (C₁₈ y SCX) y su redisolución con agua; y Ramezani *et al.* (2009) utilizaron también extracción de fase sólida.

La identificación y/o cuantificación del Imazapyr® puede llevarse a cabo por diversos métodos analíticos: utilizando ¹⁴C, cromatografía de capa delgada (Bluhorst 1996), cromatografía de gases, electroforesis capilar, inmunoensayos, fluimetría y cromatografía de líquidos de alta precisión) (Akbal *et al.*, 2000) (Lao y Gan 2006), aunque las técnicas mencionadas tienen en común que para poder llevarlas a cabo se requiere gran cantidad de recursos económicos, de tiempo y de reactivos químicos. Por

lo que para este proyecto se eligió trabajar con cromatografía de líquidos de alta precisión (HPLC) y con espectroscopía en el infrarrojo cercano (NIRS).

2.2.1 Cromatografía de líquidos

La cromatografía de líquidos de alta presión, resolución o rendimiento (*High performance liquid chromatography*, HPLC), se ha convertido en una de las técnicas más poderosas en el campo de la separación e identificación de compuestos (Silva-Cajas, 2004); se fundamenta en el equilibrio continuo y selectivo de los componentes de una mezcla entre una fase estacionaria y una fase móvil. La mezcla es introducida en la fase móvil que pasa a través de la fase estacionaria contenida dentro de una columna, los componentes de la mezcla se separan debido a su diferente afinidad por la fase estacionaria, la cual provoca que se transporten a diferentes velocidades en la fase móvil. A la salida de la columna, los componentes separados son identificados por medio de un dispositivo llamado Detector que registra los cambios en la composición de la fase móvil, tradicionalmente se utiliza un detector de luz visible y ultravioleta. El sistema de medición entrega una respuesta en forma de diferencia en el voltaje activada por el detector, que varía en función de la concentración del componente, observable en forma de picos que en conjunto se le llama cromatograma, la cuantificación se realiza cuando se comparan las respuestas de componentes con concentración conocida con los componentes en la muestra desconocida, ya sea en forma directa o por medio de una curva de calibración (CENAM 2004).

Aunque existen muchos tipos de HPLC, el método más utilizado en el análisis residual de plaguicidas es HPLC de fase inversa definida por Ng (1994), como una técnica cromatográfica de unión, en la cual se utiliza como base agua y un solvente orgánico. La separación se fundamenta en la fuerza del solvente y la selectividad del mismo, que podría verse afectada por la temperatura de la columna y el pH de la fase móvil.

2.2.2 Espectroscopía NIR

Por otro lado, la Espectroscopía de Reflectancia en el Infrarrojo Cercano (*Near Infrared Spectroscopy*, NIRS) es una técnica analítica que se basa en las interacciones

entre la luz incidente y la superficie de un material, para predecir propiedades particulares de una muestra (Batten 1998). Normalmente, los espectros NIR son utilizados para establecer, utilizando la quimiometría, modelos de regresión en los cuales la información significativa contenida en los espectros está concentrada en algunas variables, que se optimizan para producir la mejor correlación con las propiedades de interés. Zornoza *et al.* (2008) mencionan que para asegurar la fiabilidad de esta técnica, es necesario incluir gran número de muestras con amplio rango en los valores de las propiedades que desean determinar.

Las razones por las que está siendo adoptada la espectroscopía NIR como método analítico preferido en muchos laboratorios, según Batten (1998), está relacionado con que la muestra requiere de mínima preparación, su análisis es rápido, pueden ser analizados varios constituyentes simultáneamente, la muestra no se destruye y no se requiere del uso de productos químicos. Quezada (2008), menciona que se obtienen resultados precisos con costos bajos y se consume poco tiempo en el análisis.

Aunque la espectroscopia en el infrarrojo medio (MIR) es conocida para el control de calidad de agroquímicos, estando disponibles métodos para la determinación de Artesinin®, Buprofezin®, Chlorsulfuron®, Cyromazine®, Fenoxycarba®, Fenvalerate® y Metalaxyl®, Moros *et al.* (2005) mencionan que solamente existe un procedimiento en el que se utiliza espectroscopía de infrarrojos cercanos (NIR) para el control de calidad en plaguicidas, solamente para Diuron® después de extraerlo con acetonitrilo. Brunet *et al.* (2009), reportaron la adecuada predicción sobre la sorción de plaguicidas en el suelo utilizando espectroscopia NIR y MIR por Bengtson *et al.* en Lindano® y Linuron® en suelos de Suecia. No se encontró ninguna referencia en la cual se indique el uso de NIRS con sonda de fibra óptica de reflectancia remota para la determinación de la concentración de algún plaguicida directamente en muestras de suelo.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo General: Generar metodologías para cuantificar Imazapyr® presente en el suelo, empleando cromatografía de líquidos y espectroscopia de infrarrojo cercano.

3.2 Objetivos particulares:

- Desarrollar y validar un procedimiento analítico para extraer Imazapyr® del suelo, y para su cuantificación por cromatografía líquida (HPLC).
- Conjuntar el uso espectroscopia NIR y quimiometría para poder identificar la presencia de Imazapyr en el suelo.
- Generar un modelo utilizando espectroscopia NIR que permita determinar la concentración de Imazapyr® en el suelo.

4 HIPÓTESIS

- La extracción de Imazapyr® del suelo con agua permite obtener una recuperación del plaguicida semejante a otros procedimientos validados para su cuantificación por cromatografía líquida (HPLC).
- La espectroscopía en el infrarrojo cercano (NIRS) en combinación con quimiometría permite discriminar entre muestras de suelo con Imazapyr® y aquellas que no contienen éste plaguicida.
- La estimación de Imazapyr® con espectroscopía NIRS es comparable a la cuantificación de este plaguicida con cromatografía líquida (HPLC).

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Método de extracción

En esta etapa experimental las muestras utilizadas fueron suelos con diferentes propiedades físico-químicas: andosol, vertisol, acrisol, inceptisol (WRB 2006) y un suelo patrón interno del Laboratorio de Fertilidad de Suelo y Química Ambiental del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo (Cuadro 2).

Cuadro 2. Propiedades físicas y químicas de los suelos utilizados en el desarrollo y la validación del método de extracción de Imazapyr®.

Tipo de suelo	Profundidad de muestreo (cm)	Textura			pH (1:2, H ₂ O)	Carbón orgánico (%)	
		Clase	Arena	Limo (%)			Arcilla
Andosol	15-20	Franco arenoso	45	50	5	6.1	5.3
Vertisol	25-40	Arcilla	32	26	42	8.2	1.4
Acrisol	0-10	Arcillo limoso	3	40	57	5.6	2.0
Inceptisol	0-10	Arcilla	30	54	16	5.7	2.0
Patrón	0-15	Arcilla	23	30	47	7.0	0.9

Se utilizó Imazapyr® grado analítico con 99% de pureza (Chem Service, West Chester, 19381 PA) y metanol grado HPLC (J. T. Baker Company).

Para preparar la solución madre se disolvió 10 mg de Imazapyr® en 100 mL de solución metanol/agua 1:1 (v/v), con lo cual se obtuvo una solución de Imazapyr® cuya concentración fue de 100 mgL⁻¹. Ésta solución se usó para preparar la curva de calibración y las soluciones de trabajo: 2.0 mgL⁻¹, 5.0 mgL⁻¹, 6.0 mgL⁻¹ y 12 mgL⁻¹. En ambos casos se utilizó agua desionizada ultrapura tipo Milli-Q (Millipore).

5.1.1 Experimentos preliminares

La finalidad de los experimentos preliminares fue seleccionar los parámetros del método propuesto para extraer Imazapyr® del suelo, que permitieran obtener la mayor recuperación del plaguicida. Se tomó como base los procedimientos descritos por Liu

et al. (1992) y D'Ascenzo *et al.* (1998). Para definir la solución extractante se decidió probar soluciones acuosas debido a la naturaleza polar y la alta solubilidad en agua del Imazapyr® (Laganà *et al.* 2000). También se consideró otras ventajas de las soluciones acuosas; el agua como extractante tiene bajo costo, nula toxicidad, alta disponibilidad y se acerca al empleo real de la aplicación del Imazapyr® en campo.

Se diseñaron tres experimentos en los que se usó el andosol. En ellos se probó el efecto de: el uso de la sonicación, el contenido de humedad de suelo y la composición de la solución extractante, en la recuperación del Imazapyr®.

Experimento Preliminar I: Efecto del uso de sonicación. Se prepararon dos muestras con el andosol. Para preparar cada una se pesó el equivalente a 5 g de andosol seco a 105 °C en matraces Erlenmeyer de 50 mL. El suelo fue dopado al adicionar 2.5 mL de una solución acuosa de Imazapyr® de 2 mgL⁻¹ para obtener 5 µg del plaguicida en el suelo, que corresponde a una concentración de 1.0 µg del reactivo por gramo de suelo. Estas muestras se dejaron equilibrar por 60 minutos en la oscuridad y luego se le adicionó la solución extractante (metanol/agua en una relación 3:2 v/v). La proporción de la solución extractante (SE) con respecto al suelo fue aproximadamente 3:1 (v/p), tomando en cuenta que el suelo contenía algo de humedad residual. Las muestras en los matraces se agitaron por 30 min en un agitador horizontal y luego se sometieron a sonicación por 10 min. Las muestras de suelo en los matraces se dejaron en reposo por 6 horas para lograr la separación de las fases. Transcurrido el tiempo, se tomaron alícuotas de 5 mL del sobrenadante que se colocaron en tubos de ensayo. Los tubos se introdujeron en un horno a 60 °C hasta alcanzar un volumen aproximado de 2 mL. Los concentrados, se filtraron utilizando acrodiscos (filtros de Nylon) con diámetro de poros de 0.22 µm, y el líquido filtrado se colectó en viales de 2 mL que se utilizan en cromatografía de líquidos de alta precisión (HPLC). Los viales se conservaron en la oscuridad a -4 °C hasta el momento de su análisis por HPLC.

Experimento Preliminar II: Efecto del contenido de humedad del suelo. En este experimento se dispuso de ocho muestras del andosol, cada una de 6 g. Cuatro de ellas con humedad de campo y otras cuatro secas al horno a 105° C por 24 h. Las muestras se colocaron en tubos de ensayo de vidrio de 20 cm de longitud, 2.0 cm de

diámetro y con tapa de rosca. A dos de las cuatro muestras con humedad de campo, se les adicionó Imazapyr®, 1.0 mL de solución de 6.0 mgL^{-1} de Imazapyr® en agua que corresponde a $1.0 \text{ } \mu\text{g}$ del herbicida por cada gramo de suelo seco. A las otras dos muestras restantes se les añadió 1.0 mL de solución de 12 mgL^{-1} de Imazapyr® en agua que corresponde a $2.0 \text{ } \mu\text{g}$ del herbicida por cada gramo de suelo seco. Se procedió de igual forma con las cuatro muestras de suelo seco al horno, dos fueron dopadas a nivel de $1.0 \text{ } \mu\text{g}$ del herbicida por cada gramo de suelo seco y las otras dos a nivel de $2.0 \text{ } \mu\text{g}$ del herbicida por cada gramo de suelo de suelo seco.

Los tubos con el suelo y el herbicida se dejaron en reposo en la oscuridad por una hora, entonces se les adicionó la solución extractante (SE) de metanol/agua (relación 3:2 v/v) en proporción 4:1 (SE/suelo v/p). En esta relación se consideró el contenido de agua de aquellas muestras que se pesaron con humedad de campo. Las muestras en los tubos de ensayo se agitaron 30 min en agitador horizontal, después se centrifugaron a 2500 rpm entre 12 y 15 min. Los sobrenadantes se filtraron con papel Whatman No. 42, se colectaron en vasos de precipitado y se conservaron en la oscuridad. Se realizó una segunda extracción, se utilizó el mismo procedimiento de adición de la solución extractante, agitación, centrifugación y filtrado. Los dos sobrenadantes obtenidos para cada muestra se mezclaron en un vaso de precipitado y se dejaron evaporar hasta sequedad en un horno a $60 \text{ } ^\circ\text{C}$ por máximo 14 horas. La redisolución del herbicida se realizó al agregar 2 mL de solución metanol/agua (1:1, v/v) en el vaso de precipitado, se agitó vigorosamente con la mano durante 30 segundos y con una jeringa de poliestireno, se hizo pasar la solución con el Imazapyr® por acrodiscos de $0.22 \text{ } \mu\text{m}$ de diámetro de poro, para colectar las redisoluciones en viales de 2 mL que se almacenaron a $-4 \text{ } ^\circ\text{C}$ hasta su determinación por HPLC como se define más adelante.

Experimento Preliminar III: Efecto de la composición de solución extractante. En este experimento se evaluó la variación de la relación metanol/agua a proporciones (v/v) 1:0, 3:1, 1:3 y 0:1 de la solución extractante (SE). La proporción metanol/agua de 1:0 no fue lograda debido a que el suelo siempre mantiene cierto contenido de agua; sin embargo, ésta fue muy pequeña en relación a la cantidad de metanol utilizado. Se

utilizó suelo proveniente del andosol seleccionado y cada muestra se analizó por duplicado. Se pesó 6.5 g de suelo con humedad de campo que equivalentes a 5 g del andosol seco. Al suelo se adicionó 2.0 mL de solución de 5.0 mgL⁻¹ del herbicida en agua, obteniéndose una concentración de 2.0 µg de Imazapyr® por cada gramo de suelo seco. El resto de las condiciones fueron semejantes a las ya descritas en el segundo experimento de extracción (Experimento Preliminar II). La determinación de Imazapyr® se realizó por HPLC en las condiciones que se definen más adelante.

Procedimiento para determinar concentración de Imazapyr® por cromatografía de líquidos de alta precisión (HPLC). Este procedimiento se usó para evaluar el herbicida en los tres experimentos realizados. Se utilizó un modulo de separación Waters® 2695, equipado con un detector de absorción UV-Visible Waters® 4789 ajustado a 240 nm, una columna Symmetry® C₁₈ (3.9 mm x 150 mm, 5 µm de tamaño de partícula). Las condiciones cromatográficas de medición fueron: sistema de bombeo isocrático de 6 minutos con flujo de 1 mLmin⁻¹, volumen de inyección 30 µL, fase móvil de ácido fórmico 1%/metanol (70:30, v/v), temperatura de columna 37 °C, el tiempo de retención del Imazapyr® fue de 4.5 minutos.

5.1.2 Validación del método de extracción

Validación de un método analítico, según el Centro Nacional de Metrología (CENAM, 2004), es el proceso mediante el cual se establecen las características de desempeño del método y se identifican influencias que pueden modificarlas y el grado en que se afectan, para establecer limitaciones al método aplicado a un tipo específico de muestras. Las características de desempeño a evaluar en el desarrollo de nuevos métodos analíticos han sido definidas por el Centro Nacional de Metrología (2005) y se mencionan en el **Cuadro 3**:

Cuadro 3. Lista de los parámetros de desempeño que se deben evaluar en la validación de métodos analíticos.

• Selectividad	• Limite de detección	• Robustez
• Recuperación	• Limite de cuantificación	• Sesgo
• Intervalo de trabajo	• Repetibilidad	• Incertidumbre
• Sensibilidad	• Reproducibilidad	• Exactitud

La recomendación del CENAM en relación a la validación de un método, es que pueden restringirse los parámetros a evaluar en consideración al tiempo y los costos, tomando en cuenta la experiencia existente sobre el método. También menciona que a menudo una serie específica de experimentos proporcionará información sobre varios parámetros, así que, con una planeación cuidadosa puede minimizarse el esfuerzo requerido para obtener la información necesaria. Con estos antecedentes en la validación del método de extracción de Imazapyr® del suelo se evaluaron aquellos parámetros cuya influencia se consideró directa, siguiendo las recomendaciones, las definiciones y las indicaciones para calcularlos descritas en el documento CNM-MRD-PT-030 del Centro Nacional de Metrología (2005):

5.1.2.1 Selectividad Cualitativa

Para el procedimiento de extracción de Imazapyr® se evaluó la Selectividad Cualitativa, que define el efecto de interferencias en el procedimiento propuesto para determinar el analito. Para comprobar la identidad del herbicida se compararon los cromatogramas obtenidos de un mismo tipo de suelo sin plaguicida y al doparlo con concentraciones conocidas de Imazapyr®.

5.1.2.2 Recuperación

Se refiere a la fracción del analito extraída, de una muestra fortificada previa al análisis, por acción del método. En este caso se prepararon muestras de andosol por triplicado con concentraciones de 0.2, 0.4, 0.8, 1.0, 1.4 µg de imazapyr por gramo de suelo. Al agregar a 5 g de suelo 2 mL de soluciones del herbicida en agua de 0.5, 1.0, 2.0, 2.5 ó 3.5 mgL⁻¹.

El porcentaje de recuperación (%R) se calculó como sigue:

$$\%R = \frac{CF - CU}{CA} \times 100 \dots \dots \dots (1)$$

donde *CF* es la concentración del Imazapyr® medida en la muestra de suelo dopada; *CU* es la concentración de Imazapyr® medida en la muestra de suelo sin dopar; *CA* es la concentración de Imazapyr® adicionado en la muestra de suelo para fortificarla.

La *Australian Pesticides & Veterinary Medicines Authority* (APVMA 2004) indica que el porcentaje de recuperación promedio debe estar entre intervalos del Cuadro 4:

Cuadro 4. Nivel de aceptación en la recuperación en función del contenido de impureza o ingrediente activo en la matriz.

Ingrediente activo/residuo en la matriz	Recuperación promedio aceptable
%	
≥ 10	98 – 102
≥ 1	90 – 110
0.1 – 1.0	80 – 120
< 0.1	75 – 125

5.1.2.3 Repetibilidad

Este parámetro de validación refleja la precisión al seguir la metodología propuesta. Se determinó el herbicida bajo las mismas condiciones: se uso un andosol, el mismo laboratorio, con los mismos equipos y reactivos y durante una misma sesión de trabajo. La recuperación se determinó en ocho muestras de 5 g a las que se les añadió 2 mL de solución de 2.5 mgL⁻¹ del herbicida en agua obteniéndose una concentración de 1.0 µgg⁻¹ suelo. A los resultados obtenidos, se les calculó la desviación estándar (s_r), el coeficiente de variación (CV), y el límite de repetibilidad (lr) el cual permite decidir si es significativa la diferencia entre las muestras analizadas.

$$lr = t_{\infty} \cdot \sqrt{2} \cdot s_r \dots \dots \dots (2)$$

t_{∞} es el valor de *Student* en dos sentidos para $\nu = \infty$ a una confianza dada (el nivel de confianza normal establecido fue 95%, $t = 1.96$), y s_r representa la desviación estándar entre las muestras analizadas.

5.1.2.4 Robustez

Es la capacidad que tiene el procedimiento de análisis para proporcionar resultados válidos en presencia de pequeños cambios en la matriz respecto de condiciones originalmente evaluadas en el método (Silva-Cajas, 2004). Se realizó análisis de variancia de los resultados de recuperación de Imazapyr® utilizando el método propuesto en cinco suelos (ver Cuadro 2) dopados con la misma concentración del herbicida para definir si existieron diferencias significativas ($\alpha = 0.05$) entre ellos.

5.2 Análisis cualitativo y cuantitativo del Imazapyr® en el suelo por NIRS.

El fundamento de la espectroscopia en el infrarrojo cercano (NIRS) es que la información contenida en los espectros NIR que se obtiene de un conjunto de muestras, puede correlacionarse con magnitudes físicas o química, por medio de ecuaciones o modelos de calibración. El propósito de la calibración es establecer una relación entre la señal instrumental y la propiedad a determinar, y posteriormente predecir esta propiedad en muestras desconocidas. Sin embargo la señal que se obtiene mediante la NIRS contiene información de la composición y de otras propiedades de la muestra, sin ser éstas señales debido a una especie única. Por ejemplo, el espectro de una muestra será la suma de la contribución a la absorbancia o reflectancia de cada uno de los componentes que la conforman a cada longitud de onda. Además, la elevada cantidad de información contenida en los espectros NIR requiere del uso de herramientas matemáticas para el tratamiento de datos. En este sentido la quimiometría permite extraer la información presente en los espectros de un conjunto de muestras, ya sea de forma cualitativa como cuantitativa (Blanco *et al.* 2008).

En esta memoria se presentan el desarrollo de dos procedimientos de detección de Imazapyr® en el suelo mediante quimiometría y NIRS: (1) una ecuación de discriminación obtenida por medio de análisis cualitativo que permite identificar la presencia o la ausencia del herbicida en el suelo, y (2) en los casos que se requiriese conocer la concentración del analito se generó una ecuación de cuantificación. Ambos procedimientos se realizaron en el Laboratorio de Química Analítica, Bromatología y Nutrición de la Universidad de Salamanca en España.

Para el registro de los espectros de la suelos se utilizó un equipo Foss NIRSystem 5000 con sonda de 1.5 metros de fibra óptica de reflectancia remota tipo Bundle (haz) regular 210/7210 con una ventana de cuarzo de 5 x 5 cm, como referencia se utilizó una placa de cerámica. Cada uno de los espectros de los suelos registrados se almacenó a intervalos de 2 nm en el rango de 1100 a 2000 nm. El registro resultante fue la media de 32 lecturas tanto en la muestra de suelo como de la referencia. Todas las muestras fueron analizadas por triplicado para disminuir el error de muestreo y fueron guardados como el logaritmo recíproco de la reflectancia ($\text{Log } 1/R$, $R = \text{Reflectancia}$). El programa utilizado para el almacenamiento, el procesamiento de los datos y el análisis quimiométrico fue WinISI versión 1.50. Información más detallada sobre el manejo del equipo y las bases teóricas en la metodología para determinaciones cualitativas y cuantitativas utilizando NIRS se puede consultar en Hernández-Hierro (2008).

5.2.1 Análisis cualitativo

Este procedimiento se realizó con la finalidad de obtener una ecuación que permita identificar entre muestras de suelo con Imazapyr® y muestras sin el herbicida.

5.2.1.1 Soluciones de trabajo

Se prepararon soluciones de trabajo de 2.5, 5.0, 10.0 y 12.5 mgL^{-1} a partir de una solución madre de Imazapyr® en metanol/agua (1:1, v/v) de 100 mgL^{-1} que se diluyó con agua bidestilada.

5.2.1.2 Suelos y Tratamientos

Para desarrollar la ecuación de discriminación de Imazapyr® en el suelo, se emplearon muestras provenientes de la estación experimental El Batán del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT), ubicado en Texcoco estado de México. El suelo, clasificado como Cumulic Faeozem (WRB, 2006) provenía de experimentos de larga duración con distintos sistemas labranza, rotación de cultivos o monocultivos de maíz y/o trigo y la adición o no de residuos (Cuadro 5).

Para desarrollar la ecuación de discriminación se consideraron tres grupos: (1) Suelo testigo, (2) Suelo rehidratado, y (3) Suelo dopado.

Suelo testigo: En este grupo se incluyeron las muestras de suelo del CIMMYT con distintos sistemas labranza (cero o convencional), rotación de cultivos o monocultivos de maíz y/o trigo y la adición o no de residuos. Las muestras se secaron al aire y a la sombra, se pasaron por un tamiz malla No. 40 (0.5 mm). Con estas muestras se obtuvo el espectro NIR del suelo original, tal como provienen del terreno.

Suelo rehidratado: A 5 g de suelo seco al aire, a la sombra y tamizado en malla No. 40 (0.5 mm), y colocados en un vaso de precipitados de 250 mL, se les agregó 2 mL de agua bidestilada y se dejaron equilibrar 30 minutos. Posteriormente los vasos se colocaron en un horno a 100 °C por 12 horas. Para evitar interferencia por el exceso de humedad en la obtención del espectro NIR; al cumplirse las 12 horas se colocaron en una campana de extracción hasta el registro de sus espectros, lo cual ocurrió 2 días después de haberlos añadido el agua. El incluir estas muestras en el estudio fue para evitar errores en la clasificación, debido a que se observó que cuando se preparaban las muestras para el registro de su espectro (aún sin la adición de Imazapyr®), la matriz del suelo presentaba modificaciones, dando lugar a espectros que eran diferentes a los obtenidos de los suelos Originales y a los de los suelos Dopados.

Suelo dopado: Con objeto de obtener distintas concentraciones de Imazapyr® en el suelo, ya que el original no contenía este plaguicida fue necesario dopar con cantidades variables de éste al suelo. El procedimiento para ello fue similar al descrito para preparar las muestras de suelo rehidratado, sustituyendo los 2 mL de agua bidestilada por 2 mL de las soluciones de trabajo de Imazapyr® en agua, cuyas concentraciones fueron: 2.5, 5.0, 10.0, ó 12.5 mgL⁻¹, obteniéndose concentración de 1.0, 2.0, 4.0, ó 5.0 µgg⁻¹ del plaguicida en el suelo. Y se siguió el mismo procedimiento de eliminación del exceso de humedad que para el suelo rehidratado.

Se prepararon en total 202 muestras, aunque en la literatura no se menciona un número específico de muestras a usarse en análisis cualitativos utilizando NIRS, se buscó que las muestras usadas en el desarrollo del modelo de discriminación fueran representativas de la variabilidad que pudiera darse durante el proceso, con la finalidad de obtener un procedimiento analítico robusto. La aplicación de los tratamientos entre las muestras fue como se señala en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Muestras utilizadas en el procedimiento para obtener la ecuación de discriminación de Imazapyr® en suelo por NIRS

Manejo del suelo	Tratamiento					
	Testigo	Rehidratadas		Dopados		
	Concentración de Imazapyr® ($\mu\text{g g}^{-1}$ de suelo)					
	0.0	0.0	0.1	0.2	0.4	0.5
Cantidad de muestras						
LCMm+r	6	3	1	2	0	2
LCMm-r	6	2	1	0	4	0
LCMt+r	7	4	2	3	0	2
LCMt-r	6	2	3	0	0	2
LCRm+r	5	2	0	0	2	1
LCRm-r	6	6	0	3	1	2
LCRt+r	7	2	3	0	2	1
LCRt-r	5	0	2	1	1	2
LZMm+r	1	2	0	1	1	1
LZMm-r	5	0	0	2	1	0
LZMt+r	5	4	1	2	2	0
LZMt-r	4	0	1	1	1	2
LZRm+r	4	3	2	1	0	1
LZRm-r	6	2	2	1	1	2
LZRt+r	7	4	0	1	3	2
LZRt-r	5	1	2	2	1	0
TOTAL:	85	37	20	20	20	20

LC = Labranza convencional; LZ = labranza cero; M = monocultivo; R = rotación; M = monocultivo; m = maíz; t = trigo; con residuos (+r); sin residuos (-r)

5.2.1.3 Registro de los espectros

El suelo de los vasos de precipitados se removió con una espátula de metal, se homogeneizó con un mortero de vidrio, se esparció sobre una lámina de plástico en una mesa de trabajo y se registró colocando la sonda de fibra óptica encima de cada muestra (Figura 3).

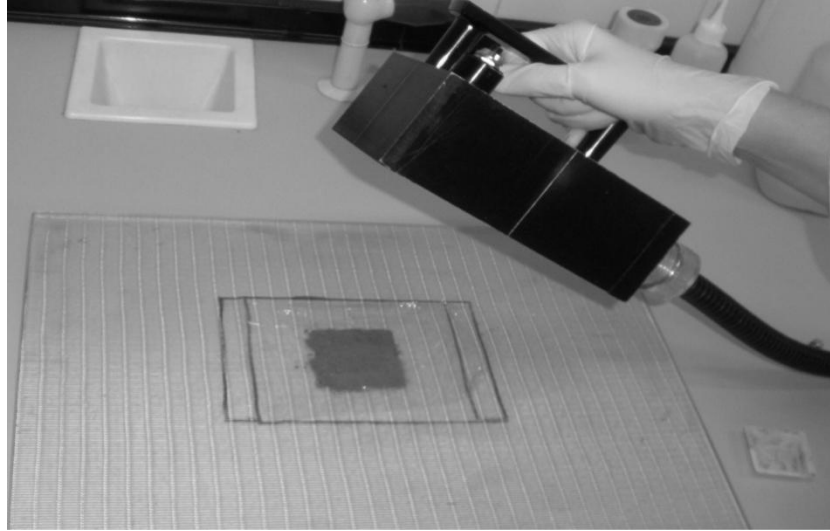


Figura 3. Colocación de la sonda de fibra óptica sobre una muestra de suelo para el registro de su espectro por NIRS

5.2.1.4 Análisis discriminante

El modelo de discriminación se generó por un Método de Reconocimiento de Pautas Prefijadas o Supervisadas, es decir que ya se conocía la pertenencia de cada muestra a un determinado grupo. En los modelos de pautas prefijadas, el análisis discriminatorio está basado en el concepto de que se encuentran fronteras explícitas entre las clases y de ésta forma el espacio es dividido en regiones para cada clase (González-Martín y Hernández-Hierro 2008). Para obtener la ecuación de discriminación se utilizó un algoritmo discriminante basado en mínimos cuadrados parciales (*Discriminant Partial Least Squares, DPLS*) que es un método de regresión, que permite la agrupación por clases (o variables categóricas denominadas *dummy*). La información espectral NIR obtenida de las muestras del Cuadro 5 y su pertenencia a una determinada clase (Testigo, Hidratadas o Dopadas) se utilizó para generar esta parte del procedimiento.

En la Figura 4 se señala con líneas continuas la secuencia que se siguió para llegar la ecuación de discriminación.

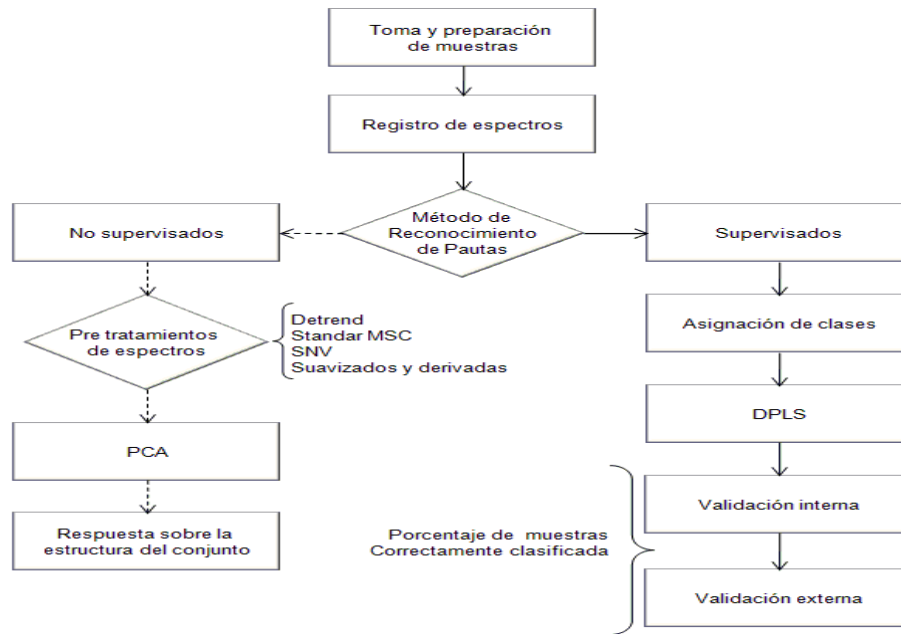


Figura 4. Esquema de las etapas de trabajo en estudios cualitativos usando NIRS (Hernández-Hierro, 2008)

Hernández-Hierro (2008) explica que en el desarrollo del modelo DPLS se conoce *a priori* el grupo al cual pertenecen las muestras, éstas se organizan en archivos con los espectros de todas las muestras pertenecientes a una misma clase. Automáticamente se genera una matriz temporal con las muestras en las clases definidas y las nuevas variables *dummy* para cada clase. Se indica para cada parámetro a evaluar la pertenencia o no de la muestra a un determinado grupo mediante unos o ceros respectivamente, realizando una regresión PLS1 (cuando se tiene solamente un analito o dato de referencia, variable o características a evaluar) o PLS 2 (para varios analitos o datos de referencia, etc.) con la matriz de estas nuevas variables *dummy* y los datos espectrales de las muestras. Una vez obtenido el modelo se utilizan las muestras con las que se desarrollo para predecir de nuevo el valor de cada variable *dummy* para cada muestra, realizando un cambio en los nuevos valores predichos al sumarles una unidad, por tanto si se obtiene un valor de 2 la muestra estará perfectamente clasificada en el grupo de la variable *dummy* con ese valor, por el contrario, muestras con valores inferiores a 1.5 no se podrían clasificar en la clase cuya variable *dummy* tiene ese valor; siendo el valor 1.5 el punto de corte de pertenencia o no a una determinada clase.

La calidad del modelo de discriminación generado se observa a través del coeficiente de correlación múltiple (RSQ: *R-squared*), el error estándar de calibración (SEC: *Standard Error of Calibration*,) y el error de validación cruzada (SECV: *Standard Error of Cross Validation*) que son parámetros estadísticos que se obtienen al realizar una validación cruzada de la ecuación obtenida y se describen a continuación:

- **RSQ:** Coeficiente de correlación múltiple; se utiliza para medir el grado con que los datos predichos se ajustan a los datos reales.

$$RSQ = 1 - \left(\frac{\sum_{i=1}^N (y_{cal_i} - \hat{y}_{teo_i})^2}{\sum_{i=1}^N (\hat{y}_{teo_i} - \bar{y})^2} \right) \dots\dots\dots (3)$$

- **SEC:** Error estándar de calibración:

$$SEC = \left(\frac{\sum_{i=1}^N (y_{cal_i} - \hat{y}_{teo_i})^2}{N - p - 1} \right) \dots\dots\dots (4)$$

- **BIAS:** se define como la media de los residuales, siendo éstos la diferencia entre el valor del laboratorio (y_{cal_i}) y el valor predicho (\hat{y}_{teo_i})

$$residual, f_{ij} = (y_{cal_i} - \hat{y}_{teo_i}) \dots\dots\dots (5)$$

$$BIAS = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (y_{cal_i} - \hat{y}_{teo_i}) \dots\dots\dots (6)$$

- **SECV:** error estándar de validación cruzada

$$SECV = \left[\frac{\sum_{i=1}^N (y_{cal_i} - \hat{y}_{teo_i} - BIAS)^2}{N - 1} \right]^{\frac{1}{2}} \dots\dots\dots (7)$$

en estas ecuaciones y_{cal_i} y \hat{y}_{teo_i} son respectivamente, los datos calculados y teóricos para cada una de las i –muestras, \bar{y} es el valor medio de los datos calculados, N es el número de muestras utilizadas en el calibrado, y p es el número de factores de la regresión.

Además de los parámetros anteriores, la eficiencia del modelo, se calcula a través del porcentaje de muestras que correctamente clasifica en el grupo a cual pertenecen. Si la predicción se hace en muestras que se usaron para desarrollar el modelo se refiere a una *Validación Interna*; por el contrario si las muestras en que se aplica son distintas a las usadas en la obtención del modelo entonces es una *Validación Externa*. Del total de 202 muestras que se prepararon (Cuadro 5) se usaron 165 para el desarrollo del modelo de discriminación y de éstas se seleccionaron al azar 128 muestras para una *Validación Interna*; y con 36 muestras, que no se usaron para crear el modelo de discriminación, se hizo una *Validación Externa* como se presenta en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Cantidad y distribución de muestras por tratamiento para el Desarrollo del Modelo, la Validación Interna y la Validación externa.

Tipo de Muestras	Uso de la muestras		
	Desarrollo del Modelo	Validación Interna	Validación Externa
Originales	37	64	21
Rehidratadas	64	0	0
Dopadas	64	64	16
Total:	165	128	37

5.2.2 Cuantificación

El método de cuantificación de imazapyr en el suelo por NIRS se desarrolló para generar un procedimiento más rápido y con resultados equiparables a los obtenidos mediante HPLC, pero sin el procedimiento de extracción y sin la destrucción de las muestras.

La mecánica general para cuantificación de algún analito, compuesto o propiedad por NIRS considera seis etapas: (1) toma/preparación de las muestras, (2) registro de los espectros NIR, (3) obtención de los valores de referencia, (4) pretratamiento de los espectros, (5) desarrollo del modelo, (6) validación interna y externa del modelo obtenido (Figura 5).

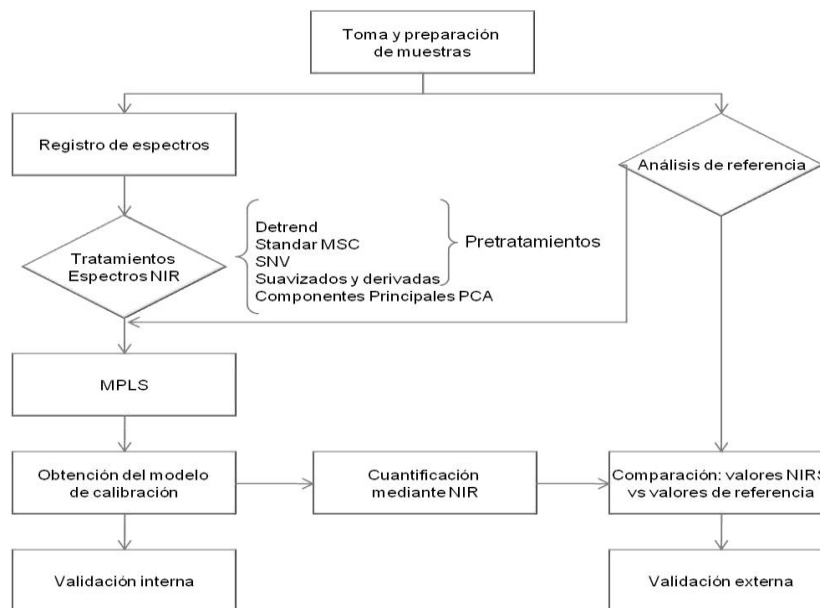


Figura 5. Esquema de las etapas de trabajo para estudios cuantitativos por espectroscopía NIR (Hernández-Hierro, 2008)

5.2.2.1 Suelos utilizados para la cuantificación.

Para cuantificar Imazapyr® por NIRS se usaron seis suelos, los ya descrito en el (Cuadro 2) andosol, vertisol, acrisol, inceptisol (WRB 2006), un suelo patrón del Laboratorio de Fertilidad de Suelo y Química Ambiental del Colegio de Postgraduados, y además un faeozem, franco arcilloso con pH 7 y con contenido de carbón orgánico de 2.6%. Este último suelo fue empleado para robustecer el grupo e introducir variación de la clase textural y el contenido de carbón orgánico.

5.2.2.2 Preparación de las muestras

En frascos de vidrio de 10 mL de capacidad se pesó 5 g de suelo y se agregó 2 mL de una solución de Imazapyr® en agua cuya concentración varió entre 0.20 a 1.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, de tal forma que para cada muestra se obtuvieran concentraciones de 0.08, 0.12, 0.16, 0.20 y 0.40 $\mu\text{g g}^{-1}$ de suelo, tal como se indican en el Cuadro 7.

Cuadro 7. Concentración de Imazapyr® en las soluciones de trabajo y en el suelo

Concentración de Imazapyr®	
Solución de trabajo ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Suelo ($\mu\text{g g}^{-1}$)
0.20	0.08
0.30	0.12
0.40	0.16
0.50	0.20
1.0	0.40

Se realizaron 10 repeticiones de cada uno de los seis suelos con cada una de las concentraciones de Imazapyr® reportadas en el Cuadro 7. De lo anterior, resultaron un total de 300 muestras que fueron preparadas el mismo día. Posteriormente las muestras de suelo dopadas en los viales de vidrio, se homogeneizaron en un agitador rotatorio por 2 horas. Después de la homogeneización se introdujeron en un horno a 100 °C por 12 horas y se colocaron en una campana de extracción hasta la noche anterior al registro de los espectros del suelo en NIRS y de la extracción del Imazapyr® por cromatografía (HPLC), Las muestras se colocaron nuevamente en el horno a 100 °C por 12 horas para eliminar los residuos de humedad y evitar su interferencia en los espectros NIR del suelo. El registro y la extracción se hicieron en dos de las 10 replicas de cada concentración, para cada tipo de suelo, a cada uno de los tiempos indicados en el Cuadro 8. Se tomó la decisión de extraer dos muestras por cada turno de registro y de extracción, para reservar el resto, y observar si se producía alguna interferencia en la correcta cuantificación de Imazapyr® por NIRS con el transcurso del tiempo.

Cuadro 8. Secuencia de registro de los espectros y extracción de Imazapyr® de las muestras de suelo dopadas.

Repeticón	Día de extracción [¶]
1, 2	2
3,4	7
5,6	14
7,8	28
9,10	35

[¶]Días contados a partir de la fecha de dopado.

5.2.2.3 Registro de los espectros

Transcurrido el tiempo indicado en Cuadro 8, el suelo en los frascos de vidrio se removió, se extrajo con una espátula de metal de los frascos, se molió en un mortero de vidrio y se homogeneizó inmediatamente después se registró su espectro de forma semejante a lo explicado en la Sección 5.2.1.3.

5.2.2.4 Análisis de referencia: Determinación de Imazapyr® por (HPLC)

De acuerdo a la literatura la técnica de referencia para determinar el Imazapyr® es la cromatografía líquida (HPLC), por la que se realizó esta evaluación en los suelos a los que se les registraron los espectros en NIRS. Después de haber registrado los espectros, se usó la misma muestra para el análisis por HPLC. Para ello, cada muestra de suelo a la que se registró su espectro por NIRS, se transfirió totalmente a tubos de vidrio para centrifuga de 50 mL de capacidad. Se agregó 20 mL de agua bidestilada a cada tubo y se colocaron en un agitador rotatorio por 30 minutos. Posteriormente se centrifugaron 15 minutos a 2000 rpm y el sobrenadante se filtró usando papel Whatman No. 42 y se colectó en vasos de precipitado de 250 mL. Este procedimiento, de adición de agua, agitación, centrifugación, y filtración se realizó tres ocasiones para cada muestra. El sobrenadante, colectado en los vasos de precipitado se colocó en un horno a 100 °C por 12 horas hasta sequedad. Después de este tiempo, los vasos se dejaron enfriar 30 minutos. Una vez que se enfriaron los vasos se agregó 2 mL de solución metanol/agua (1:1, v/v), se agitó vigorosamente con la mano durante 30 segundos y con una jeringa de poliestireno, se hizo pasar la redisolución con el Imazapyr® por acrodiscos de 0.22 µm de diámetro de poro, para colectarla en viales de 2 mL que se almacenaron a -4 °C hasta su análisis en HPLC. El equipo usado para esa actividad está compuesto de un Modulo de separación Water Alliance ® 2795, con detector Water ® 2996 UV-Vis ajustado a 240 nm acoplado con un espectrómetro de masas ZQ ® 4000. Se usó una columna X-Brige ® (C₁₈ 35 µm, 2.1 mm x 100 mm). Las condiciones cromatográficas fueron: sistema de bombeo isocrático de 9 minutos, fase móvil ácido fórmico 0.1%/metanol (80:20 v/v), temperatura de columna 37 °C y un flujo de inyección de 0.2 mL min⁻¹. El tiempo de retención del Imazapyr® fue de 7.5 minutos.

5.2.2.5 Desarrollo del modelo de cuantificación

El modelo de cuantificación se realizó siguiendo el procedimiento descrito en González-Martín y Hernández-Hierro (2008). Se usó regresión por mínimos cuadrados parciales modificados (MPLS: *Modified Partial Least Squares Regression*) que se basa en la reducción de variables. Estas nuevas variables, denominadas variables latentes, factores o componentes, son una combinación lineal de las variables originales. Se emplea la información espectral y los datos del análisis cromatográfico de referencia correspondientes a los suelos dopados a la concentración de Imazapyr® de los tratamientos descritos en el Cuadro 7 y el Cuadro 8.

Previamente con los datos espectrales y con la concentración obtenida del análisis de referencia (HPLC) de las muestras, se realizó un análisis de componentes principales (PCA: *Principal Component Analysis*) que es un método habitual en el análisis multivariable, cuyo objeto es reducir el número de variables contenidos en los espectros, sin perder información relevante, que permite entre otros objetivos, reducir la correlación espectral y englobar las muestras analizadas en función de la variabilidad que contienen (Massar *et al.* 1997). A los espectros obtenidos se les aplicaron diferentes pretratamientos matemáticos: promedio de espectros; corrección del efecto multiplicativo de la dispersión (MSC: *Multiplicative Scatter Correction*); tipificación de la absorbancia (SNV: *Standar Normal Variate*); corrección de la tendencia (DT: *DeTrend*), (Figura 6), que son correcciones de los espectros para aumentar la calidad de la señal instrumental, reduciendo al máximo la información no asociada a la propiedad estudiada, como el desplazamiento de la línea base, el ruido espectral (componentes no relacionado con ninguna propiedad física o química de las muestras como el ruido instrumental o la iluminación, además de otras fuentes de variación como la temperatura y humedad que pueden aportar interferencias a la señal analítica).

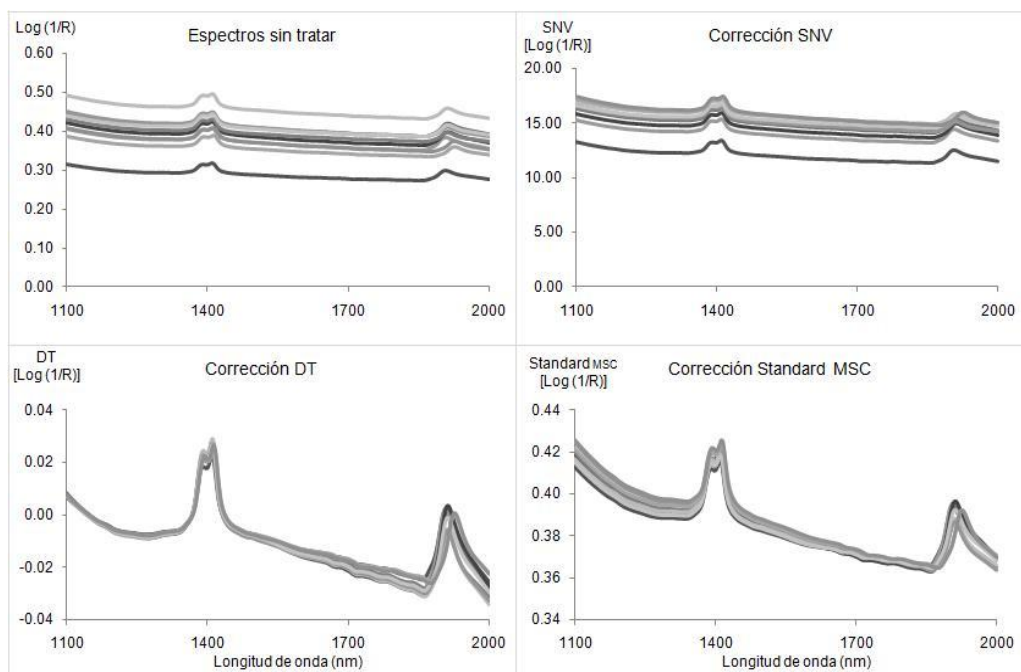


Figura 6. Espectros de 10 muestras de suelo dopadas con Imazapyr® y sus correcciones por diferentes métodos.

Los pretratamientos se acompañaron también de derivadas de diferentes órdenes con diferentes *gaps* y suavizados. En la Figura 7 se presentan los espectros de las muestra después de haber aplicado las derivadas y suavizados para corregir el efecto difuso. En la notación utilizada en los gráficos (*a*, *b*, *c*, *d*), el primer dígito indica el orden de la derivada, el segundo el número de puntos en los cuales se realiza la derivada, el tercero es el número de puntos en los cuales se realiza el primer suavizado y el cuarto es el número de puntos en los cuales se realiza el segundo suavizado (Barnes *et al.* 1989, Shenk *et al.* 1995). La combinación de los pretratamientos: *Standard MSC*, *SNV* y *DT* con los suavizados y derivadas son las herramientas para intentar eliminar o reducir los efectos que enmascaran la señal apropiada para el propósito analítico (Dhanoa *et al.* 1995), estas combinaciones de los pretratamientos matemáticos con las derivadas proporcionaron 20 archivos.

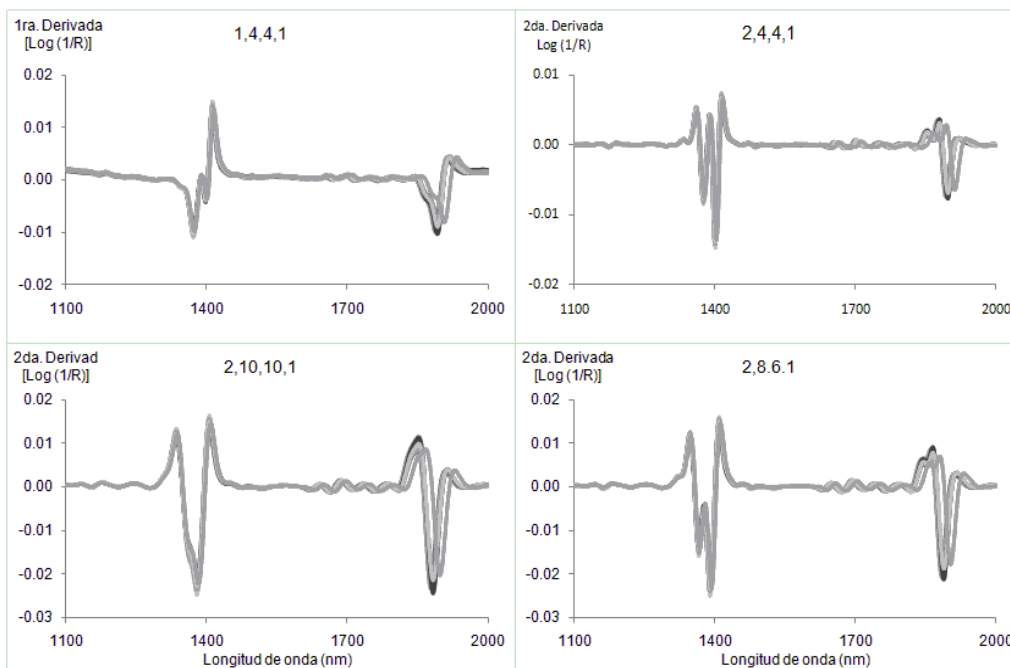


Figura 7. Ejemplo de la corrección por derivadas y suavizados de los espectros en muestras de un inceptisol con Imazapyr®

Parte del proceso también fue la elección del número de componentes principales, construcción del nuevo espacio espectral, detección de *outliers* utilizando la distancia de Mahalanobis (H) definida a partir de la diferencia espectral de una muestra respecto a la media espectral del conjunto, se desechan aquellas muestras cuyos espectros están fuera de los espectros promedios de la población con la que se desarrolló o calibró la ecuación. También son detectadas muestras con altos residuales (Ecuación 5); se utiliza el criterio T o criterio químico de forma que aquellas muestras cuyo residual dividido entre el SECV (Ecuación 8) supere el valor de 2.5 serán eliminadas. Esta depuración se repite dos veces antes de obtener el modelo final (Fuentes *et al.* 2009).

$$T = \frac{\text{residual}}{\text{SECV}} \dots \dots \dots (8)$$

Posteriormente a los 20 archivos obtenidos del PCA se les realizaron 20 pretratamientos diferentes sobre los datos espectrales de cada archivo, obteniendo 400 modelos diferentes de los cuales se eligió como modelo final aquel que mejores parámetros estadísticos mostró considerando el RSQ: coeficiente de correlación múltiple (Ecuación 3) y el SEC: error estándar de calibración (Ecuación 4). También se realizó una validación cruzada de la cual se obtuvieron: el SECV: error estándar de validación cruzada (Ecuación 7), el SEP: error estándar de predicción (*Standard Error of Prediction*):

$$SEP = \left[\frac{\sum_{i=1}^N (y_{cal_i} - \hat{y}_{teo_i})^2}{N} \right]^{\frac{1}{2}} \dots\dots\dots (9)$$

el SEP(c): el error estándar de predicción corregido por el BIAS (Ecuación 6):

$$SEP(c) = \left[\frac{\sum_{i=1}^N (y_{cal_i} - \hat{y}_{teo_i} - BIAS)^2}{N - 1} \right]^{\frac{1}{2}} \dots\dots\dots (10)$$

y la capacidad de predicción del modelo (RPD: *Ratio Performance*).

$$RPD = \frac{SD_{ref}}{SEP} \dots\dots\dots (11)$$

donde SD_{ref} . se refiera a la desviación estándar de los resultados del método de referencia.

Para comprobar la robustez del modelo de calibración se realizó una validación externa, aplicando la ecuación a muestras que no pertenecieron al grupo de calibración, se realizó una prueba *t* de *Student* para comprobar si las concentraciones obtenidas por ambos métodos (HPLC y NIRS) proporcionan valores significativamente iguales o no. Con los resultados de la concentración de Imazapyr® de esas muestras se le calculó también: el error cuadrático medio (RMSE: *Root Mean Standard Error*), similar al SEC (Ecuación 4) pero para muestras que no se integraron en el conjunto de calibración:

$$RMSE = \left[\frac{\sum_{i=1}^N (y_{cal_i} - \hat{y}_{teo_i})^2}{N} \right]^{\frac{1}{2}} \dots\dots\dots (12)$$

el promedio de los residuales (Ecuación 6) y el porcentaje de error respecto al valor de referencia. Siendo en estos casos y_{cal_i} y \hat{y}_{teo_i} los datos calculados y teóricos para cada una de las *i* –muestras respectivamente, *N* es el número de muestras utilizadas para realizar la validación externa.

6 RESULTADOS

6.1 Método de extracción

En este apartado se reportan los resultados de los tres experimentos preliminares descritos en el capítulo de materiales y métodos (5.1.1), Se evaluó el efecto del empleo de sonicación, el contenido de humedad del suelo y la composición de la solución extractante. Los resultados obtenidos en estos experimentos permitieron definir el método de extracción con el cual se obtuviera la mayor recuperación de Imazapyr® del suelo. Se consideró la recuperación promedio lograda de dos repeticiones del mismo procedimiento (Cuadro 9). El porcentaje de recuperación de Imazapyr® se calculó aplicando la Ecuación 1.

Cuadro 9. Efecto del procedimiento de extracción en la recuperación de Imazapyr® de un andosol.

Experimento Preliminar	Concentración Imazapyr®/suelo ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Relación Suelo/SE (p/v)	Solución Extractora: metanol/agua, (v/v)	Recuperación (%)
I	1.0	1:3	3:2	25.5 §
II SHC	1.0	1:4	3:2	62.2 §
II SSH	1.0	1:4	3:2	44.1 ¶
II SHC	2.0	1:4	3:2	48.0 §
II SSH	2.0	1:4	3:2	34.8 ¶
III	2.0	1:4	0:1	110.5 §
III	2.0	1:4	1:3	93.9 §
III	2.0	1:4	3:1	58.7 §
III	2.0	1:4	1:0	24.5 §

SHC: suelos con humedad de campo

SSH: suelos seco al horno

§Muestra en que se utilizó suelo con humedad de campo;

¶Muestra en que se utilizó suelo secado al horno (105 °C, 48 horas);

La recuperación de Imazapyr®, para el primer experimento de extracción, con sonicación y una relación suelo/SE 1:3, fue de 25.5%. Esta recuperación se consideró no satisfactoria por ser inferior las metodologías consultadas en que se reportan porcentajes de recuperación de 82 a 87% por Liu *et al.* (1992) y entre 89 y 95% por D'Ascenzo *et al.* (1998).

En el Experimento Preliminar II, los porcentajes de recuperación obtenidos indican que el método es sensible al contenido de humedad del suelo. La recuperación de Imazapyr® fue mayor (18 y 13 %) en el suelo con humedad de campo que en el suelo seco al horno, para ambas dosis de concentración de Imazapyr® (1.0 μgg^{-1} y 2.0 μgg^{-1}). La disminución de la recuperación de Imazapyr® en el suelo seco puede explicarse por un incremento de la fuerza de las uniones que se desarrollan entre el suelo y el herbicida como resultado de la remoción del agua (Curran *et al.* 1992).

Con las modificaciones realizadas al segundo experimento de extracción, se logró la separación de fases por acción de la centrifugación, eliminando el tiempo destinado a la sedimentación; además, se incrementó la recuperación del herbicida con respecto a los resultados del Experimento Preliminar I, pero aún sin alcanzar los porcentajes conseguidos por los autores antes mencionados.

Los resultados obtenidos para el Experimento Preliminar III indicaron que recuperación fue 24.5, 58.7, 93.9 y 110.5% respectivamente para las relaciones metanol/agua (v/v) de 1:0, 3:1, 1:3 y 0:1, usadas para preparar la solución extractante. Estos resultados indican que al incrementar el contenido de agua y al disminuir la cantidad de metanol en la solución extractante se incrementó la recuperación del Imazapyr®. La mayor recuperación se obtuvo al utilizar 100% de agua como extractante.

Los resultados obtenidos en los experimentos preliminares I, II y III permitieron definir las condiciones a usar en el Método de Extracción que se propone (Figura 8). Se tomó como base el Experimento Preliminar II, al que se modificó la velocidad de centrifugación de 2500 a 1500 rpm para evitar la ruptura de los tubos de vidrio que contenían a las muestras. Para aumentar la reproducibilidad de los resultados se realizaron tres procesos de extracción a cada muestra. Dado que se requería

aumentar la concentración del plaguicida, fue necesario llevar a cabo una concentración de los extractos, para optimizar este proceso se aumentó la temperatura de la estufa a 70 °C y el tiempo de concentración se fijó en 14 horas. La solución extractante que se usó fue agua desionizada con la que se obtuvo mayor de recuperación (Experimento Preliminar III).

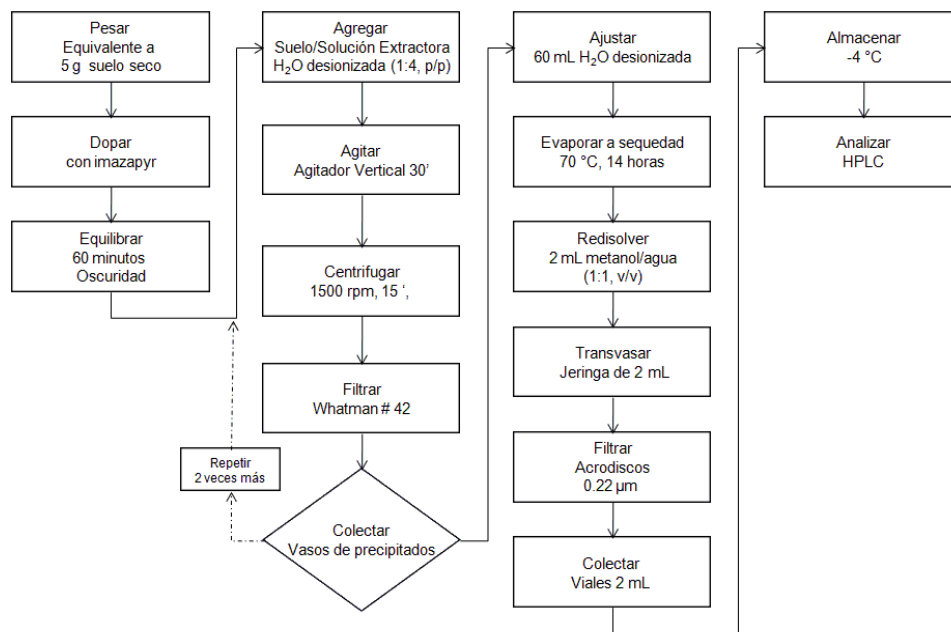


Figura 8. Representación esquemática del Método propuesto para extraer Imazapyr® de suelo.

6.1.1 Validación del método de extracción generado

En la validación del método propuesto para extraer el Imazapyr® del suelo (Figura 8) a través de las características de desempeño no se identificaron limitaciones en su funcionamiento.

6.1.1.1 Selectividad Cualitativa

La identificación del herbicida se realizó con cromatografía líquida (HPLC) empleando el extracto metanol/agua (1:1 v/v) obtenido con el procedimiento propuesto (Figura 8). En la Figura 9 se observan los cromatogramas correspondiente a una

muestra de un andosol dopada con 0.2 μg de imazapyr por gramo de suelo (Figura 9b) y una muestras sin el herbicida (Figura 9a). Las diferencias en los cromatogramas del andosol con y sin el herbicida indican que la técnica usada presenta selectividad para su detección.

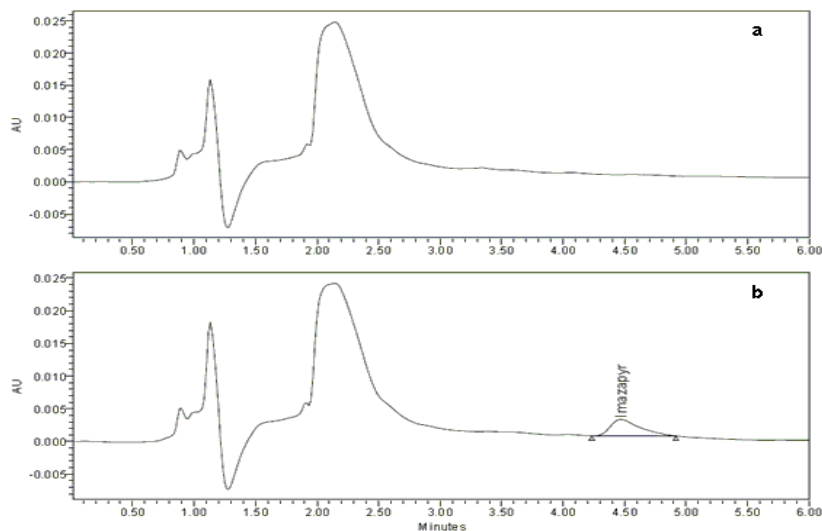


Figura 9. Diferencias entre los cromatogramas de las muestras de andosol sin Imazapyr® (a) y una muestra dopada (b)

En el cromatograma de la Figura 9b, el pico de este herbicida es bien definido y sobre la línea base, lo que muestra que no existen interferencias, aún cuando, en el extracto empleado para la determinación cromatográfica, se tienen otros elementos solubles del suelo.

6.1.1.2 Recuperación

La recuperación de Imazapyr® se evaluó en un andosol enriquecido con 0.2, 0.4, 0.8, 1.0, 1.4 μg de Imazapyr® por gramo de suelo seco. Se utilizó la metodología de extracción propuesta (Figura 8) y la recuperación se calculó con la Ecuación 1. Los resultados obtenidos indican que la recuperación del herbicida fue superior al 90% para las cinco concentraciones analizadas (Figura 10). La menor recuperación fue de 93%

para el andosol con 0.2 μg de herbicida por gramo de suelo. La mayor recuperación fue de 103% con 0.80 μg de herbicida por gramo de suelo, muy similar a la obtenida para el nivel de dopado más alto (1.4 $\mu\text{g}\text{g}^{-1}$).

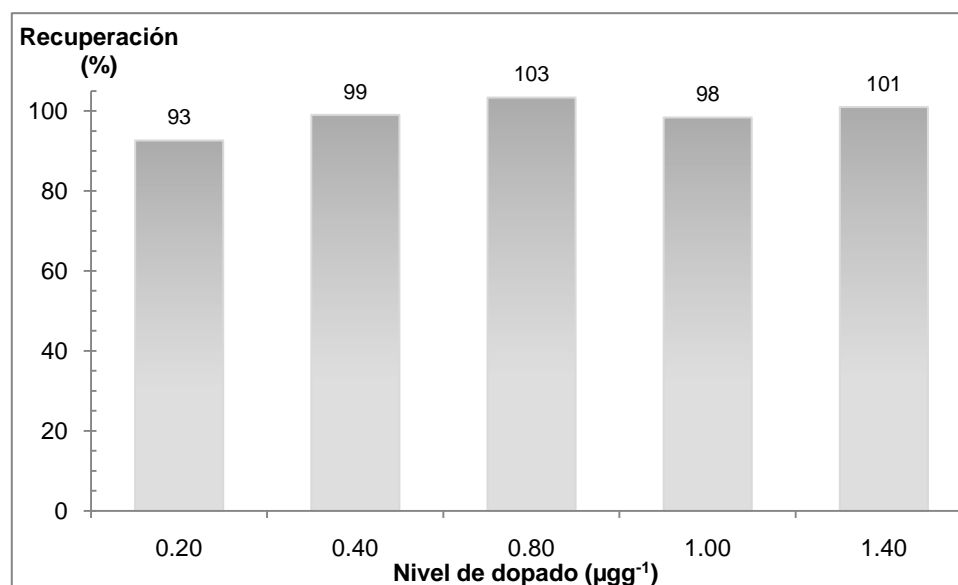


Figura 10. Porcentaje de recuperación de Imazapyr® en un andosol dopado (0.2, 0.4, 0.8, 1.0, 1.4 $\mu\text{g}\text{g}^{-1}$).

Los valores de recuperación obtenidos (93% - 103%) (Figura 10) al utilizar el Método de Extracción (Figura 8) se encuentran dentro del rango señalado en la guía de la APVMA (*Australian Pesticides & Veterinary Medicines Authority* 2004). En esta guía se indica que para que un método de extracción y detección se considere como confiable deben ubicarse entre 75% y 125% de recuperación del plaguicida cuando la relación plaguicida/matriz sea inferior al 0.1%. También se pueden aceptar valores de recuperación entre 70% y 120% de los niveles de dopado para los métodos en que se evalúa la recuperación de residuos (Bluhorst 1996). Aunque el promedio de la recuperación de Imazapyr® fue de 99%, el CENAM (2005) indica que altas recuperaciones pueden corresponder a impresiones irreales de la extracción. Lo anterior debido a que el enriquecimiento obtenido al adicionar un analito a una matriz dada, no logra la misma adhesión del analito en cuestión, como se tendría en

condiciones naturales. De tal modo que éste no queda tan fuertemente ligado. Aún cuando lo anterior pudiera ser considerado como real, la adición del analito a una matriz para evaluar su recuperación es el procedimiento más comúnmente usado y aceptado en la literatura.

6.1.1.3 Repetibilidad

Para evaluar la repetibilidad del procedimiento de extracción de Imazapyr® del suelo se consideraron ocho muestras de andosol, las cuales se doparon con Imazapyr® para obtener 1.0 µg del pesticida por gramo de suelo. La determinación del herbicida se realizó en el mismo laboratorio, durante una misma sesión de trabajo, empleando los mismos equipos y reactivos. Los resultados de la recuperación para cada nivel de dopado se presentan en el Cuadro 10. Para cada valor se calculó: la desviación estándar ($s=0.07 \mu\text{g g}^{-1}$), el coeficiente de variación ($C.V. = 7.2 \%$) y el límite de repetibilidad ($lr=0.19$).

Cuadro 10. Evaluación de la repetibilidad del método de extracción de Imazapyr® en un andosol dopado con $1.0 \mu\text{g g}^{-1}$.

Repetición	Imazapyr® recuperado	
	$\mu\text{g g}^{-1}$	%
1	0.91	92.6
2	0.96	98.0
3	1.04	105.3
4	0.93	94.5
5	1.04	105.9
6	0.88	89.6
7	0.99	100.9
8	1.08	110.2
Promedio (\bar{x})	0.98	99.6
Desviación estándar (s)	0.07	
Coeficiente de Variación (CV)	7.24	
Límite de repetibilidad (lr)	0.19	

Los resultados del Cuadro 10 indican que el coeficiente de variación obtenido entre las muestras analizadas fue de 7.2%. Este valor fue menor al reportado por Brodi *et al.*, (2005) que de acuerdo a el *Group of Analyst of Residues of Pesticides* (GARP), se considera que para que un método de extracción sea aceptable el coeficiente de variación en la medición de la repetibilidad debe ser inferior al 15%. La Agencia Americana para la Protección Ambiental y la Organización para la Prevención de Plaguicidas y sustancias Tóxicas (EPA, 2006) no acepta aquellos métodos en los que el coeficiente de variación entre muestras preparadas en las mismas condiciones sea superior al 30%. Lo anterior indica que el método de extracción propuesto cumple con la condición de repetibilidad requerida para que el procedimiento analítico pueda considerarse confiable.

6.1.1.4 Robustez

Para definir la robustez del procedimiento propuesto (Figura 8), se evaluó la sensibilidad del método de extracción de Imazapyr® en cinco suelos con diferencias en el pH, la textura y el contenido de CO (Cuadro 2). Los suelos fueron enriquecidos con 0.2 µg de Imazapyr® por gramo de suelo seco y se determinó el porcentaje de recuperación. El análisis de variancia permitió concluir que no existieron diferencias significativas ($P = 0.05$) en la cuantificación de Imazapyr® por el efecto del tipo de suelo, a pesar del 16% de sobreestimación en la recuperación obtenida para el vertisol (Cuadro 11).

Cuadro 11. Recuperación de Imazapyr® en función del tipo de suelo

Tipo de suelo	Recuperación de Imazapyr®	
	$\mu\text{g g}^{-1}$	%
Andosol	0.185 (4)	92.6
Acrisol	0.172 (3)	85.8
Vertisol	0.232 (3)	116.0
Inceptisol	0.186 (3)	93.1
Patrón	0.207 (4)	103.7
Promedio (\bar{x})	0.196	98.2
Desviación estándar (s)	0.033	
Coeficiente de variación (C V)	16.6	

() El número entre paréntesis indica la cantidad de repeticiones consideradas.

La desviación estándar en la recuperación de Imazapyr® entre los suelos utilizados fue $\pm 0.033 \mu\text{g}$ (Cuadro 11). El coeficiente de variación fue de 16.6%, valor muy por encima del ± 3.71 reportado por Wang *et al.*, (2006), y 10% mayor al obtenido por Liu *et al.*, (1992) y D'Ascenzo *et al.* (1998); pero fueron muy similares al ± 18.1 reportado por Börjesson *et al.* (2004). Sin embargo, la cantidad de suelos en que se evaluó el método de extracción propuesto (Figura 8) y el promedio de recuperación (98.2%) fueron mayores que los obtenidos por los autores antes citados.

6.2 Análisis cualitativo y cuantitativo del Imazapyr® en el suelo por NIRS

A continuación se presentan los resultados de los procedimientos desarrollados para la detección de Imazapyr® en el suelo de forma cualitativa y cuantitativa utilizando espectroscopía NIRS y generados por quimiometría.

6.2.1 Análisis cualitativo

Para desarrollar la ecuación de discriminación de Imazapyr® en el suelo, se usaron muestras tomadas aleatoriamente de un Faeozem que sostuvo experimentos de larga duración consistentes en: labranza cero o convencional, con rotación de cultivos o monocultivos de maíz y/o trigo y la adición o no de residuos (ver tratamientos en Cuadro 5). Esas muestras se dividieron en tres tratamientos de laboratorio, suelo testigo, rehidratado y dopado. Inicialmente se había considerado usar como testigos espectros, de los mismos suelos, registrados en el año 2007 (denominados ahora como los Espectros originales). Sin embargo, se observó que estos espectros registrados en el 2007 no correspondían íntegramente a los obtenidos en este estudio, por lo que fue necesario obtener un nuevo registro de estos suelos, denominando a estos nuevos espectros Testigos. El tratamiento rehidratado indica que se añadió agua, y el dopado con adición de Imazapyr®. Los espectros que se presentan en la Figura 11 corresponden por tanto a las cuatro condiciones definidas: originales, testigos, hidratados y dopados.

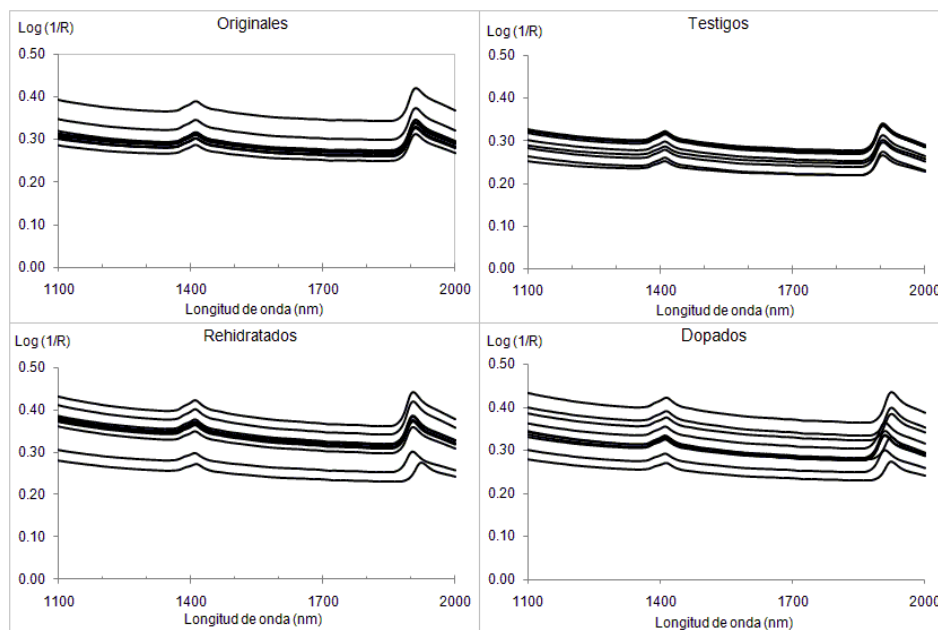


Figura 11. Diferencias espectrales de un conjunto de 10 muestras de suelo clasificadas según su preparación en originales, testigos, rehidratadas o dopadas.

Al comparar los espectros NIR de muestras individuales, para cada tratamiento (Figura 12), La presencia de Imazapyr® desplaza el espectro a la zona próxima a 1900 nm, comportamiento que hace posible usar un análisis discriminante para diferenciar si existe o no la presencia del plaguicida en el suelo.

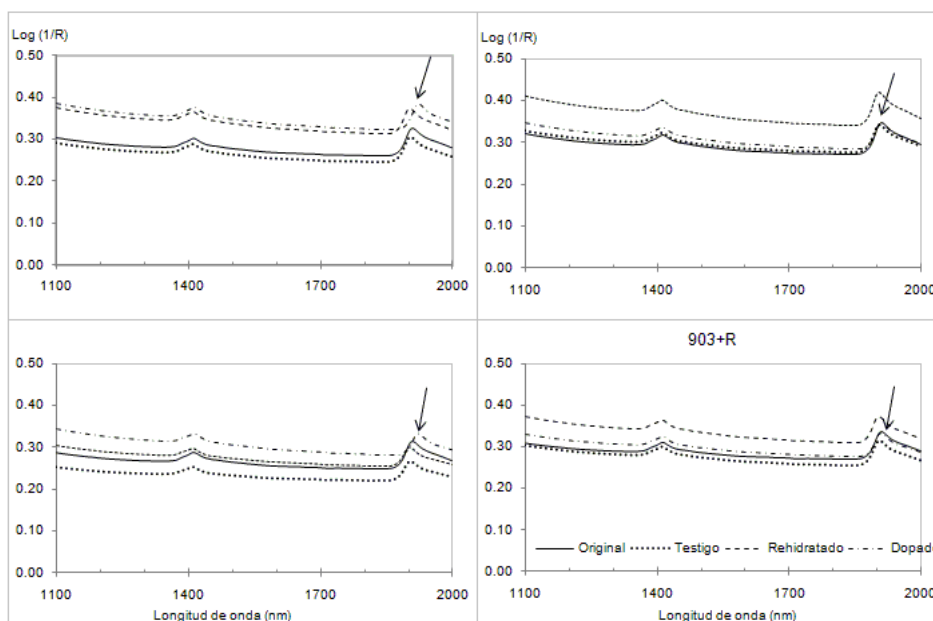


Figura 12 Diferencia entre los espectros originales, testigos, rehidratados y dopados en cuatro muestras de suelo.

Para la obtención del modelo discriminante por mínimos cuadrados parciales (DPLS) se utilizaron 165 muestras de suelo (Cuadro 6) se usó su información espectral registrada y la agrupación a la que pertenecían (testigos, hidratadas o dopadas) (Cuadro 5). Los descriptores estadísticos del modelo de discriminación obtenido se presentan en el Cuadro 12.

Cuadro 12. Parámetros estadísticos obtenidos del modelo de discriminación de Imazapyr® en el suelo

N	SD	RSQ	SEC	SECV	Grupos de validación cruzada.	Número de factores PLS
165	0.45	0.87	0.16	0.17	6	9

N: Número de muestras utilizadas para el desarrollo del modelo de discriminación
SD: Desviación estándar de la solución de dopado (mg L^{-1}) entre muestras
RSQ: Coeficiente de correlación múltiple (*R-Squared*,)
SEC: Error estándar de calibración (*Standard Error of Calibration*,)
SECV: Error estándar de validación cruzada (*Standard Error of Cross Validation*,)

El RSQ (Ecuación 3) es el coeficiente de correlación múltiple e indica el grado con el que los resultados de la predicción se ajusta a los datos reales.

La elección del número de factores PLS se realizó en este caso mediante la validación cruzada, procedimiento por el que el conjunto original de muestras se divide en varios grupos (en este caso 6) de forma que se utiliza un grupo para comprobar los resultados (validar) y el resto para construir el modelo, de forma que cada vez se deja un grupo fuera; el proceso se repite tantas veces como subgrupos se formen. Los componentes principales se pueden describir geoméricamente con un cambio de ejes, representándose los datos de esas muestras en un sistema de coordenadas con un número inferior de ejes al utilizado inicialmente. El número factores PLS se ha de seleccionar de forma que contenga información relativa a las muestras y no contengan información relativa al ruido.

En el Cuadro 13 se presentan los resultados de la *Validación Interna* y de la *Validación Externa* del modelo. Para ello se consideraron los porcentajes de muestras de suelo correctamente clasificadas al utilizar la ecuación de discriminación de Imazapyr® en el suelo por NIRS.

Cuadro 13. Porcentaje y cantidad de muestras clasificadas en el grupo al cual pertenecen utilizando la ecuación de discriminación para la detección de Imazapyr® en el suelo.

	Validación Interna		Validación Externa	
	<i>Presencia</i>	<i>Ausencia</i>	<i>Presencia</i>	<i>Ausencia</i>
Muestras clasificadas correctamente/Total muestras evaluadas	64/64	62/64	16/16	20/21
Clasificación correcta (%)	100	97	100	95

Considerando los resultados del Cuadro 13, el 100% de muestras con Imazapyr®; y el 97% en la Validación Interna y 95% en la validación Externa de muestras de suelo sin herbicida fueron correctamente clasificadas mediante la ecuación de discriminación. Las muestra que no fueron clasificadas adecuadamente

fueron tres, dos en la validación interna y una en la validación externa, se consideraron muestras pérdidas, es decir que el modelo de discriminación no les asignó ninguna clase, en los tres casos fueron muestras sin Imazapyr®. Entre las muestras pérdidas no se observó alguna tendencia asociada al nivel de dopado o por efecto del tipo de cultivo y/o la labranza del suelo o la aplicación o no de residuos.

En la Figura 13 mediante la ecuación de discriminación se agrupan las 165 muestras usadas para generar el modelo de discriminación.

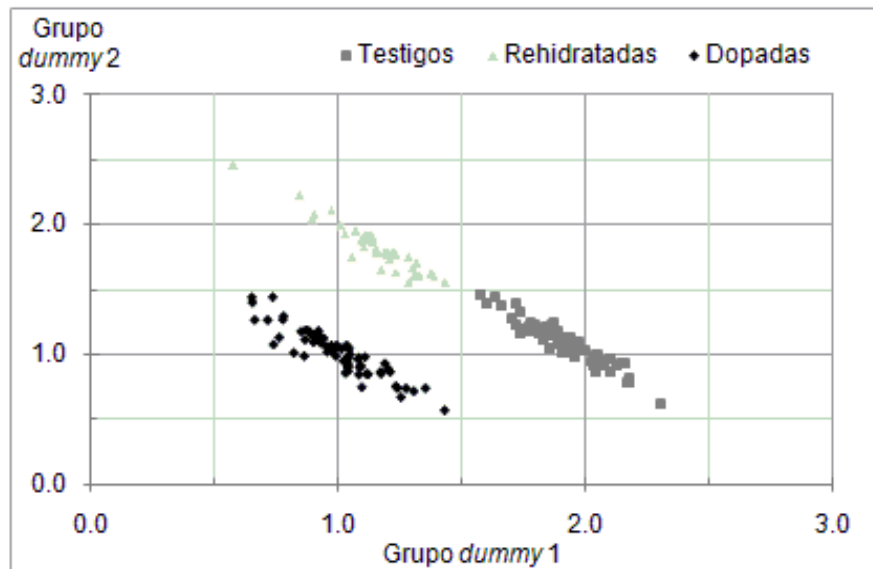


Figura 13. Agrupación de las muestras por categorías en: testigos, rehidratadas y dopadas con Imazapyr®, al usar la ecuación de discriminación generada por DPLS y NIRS.

Los resultados presentados en el Cuadro 12, el Cuadro 13 y la Figura 13 permiten concluir que utilizando la ecuación de discriminación generada por NIRS es posible separar con alto grado de certeza entre muestras de suelo con presencia o ausencia de Imazapyr®.

Una vez que el Imazapyr® es detectado en el suelo, se puede determinar su concentración usando modelos cuantitativos desarrollados para tal efecto pues la discriminación por NIRS al ser un método no destructivo permite destinar las muestras a otros procesos.

6.2.2 Cuantificación

Para el análisis cuantitativo de Imazapyr® en el suelos por espectroscopía NIR se utilizaron seis suelos: andosol, vertisol, acrisol, faoezem, histisol y un suelo patrón estándar del Laboratorio de Fertilidad de Suelo y Química Ambiental del Colegio de Postgraduados (Cuadro 2), sus espectros originales, es decir sin plaguicida, se presentan en la Figura 14.

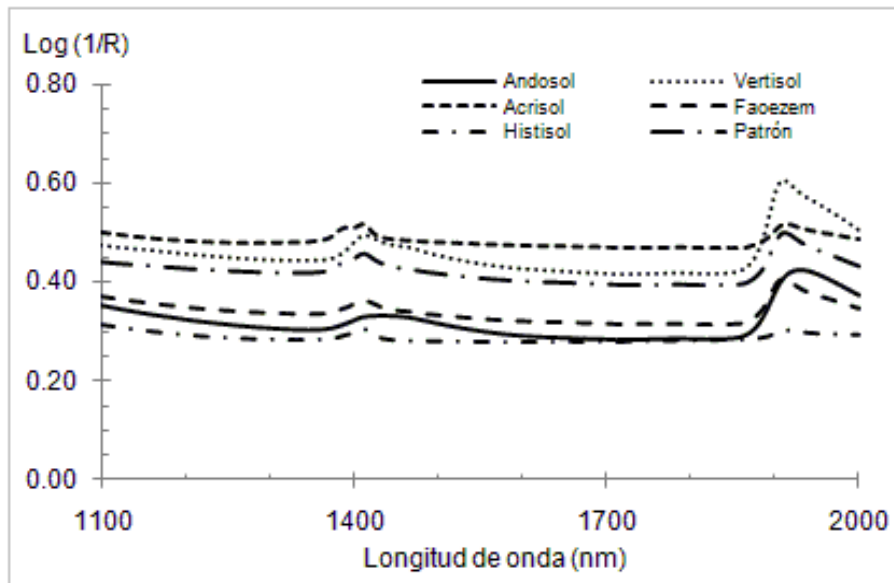


Figura 14. Espectros de los seis suelos utilizados en la creación de la ecuación para cuantificar de Imazapyr® en suelo por NIRS.

Las variaciones de la respuesta espectral obtenida para cada uno de los suelos, como se observa en la Figura 14, se atribuye a las diferencias físicas y químicas intrínsecas de los distintos suelos.

En los espectros de las muestras dopadas con Imazapyr® para ninguno de los suelos se detectó alguna tendencia a simple vista en la variación de los espectros por efecto de la concentración del plaguicida (Cuadro 7), o de la fecha de registro (Cuadro 8), como ejemplo de lo anterior se puede ver la Figura 15, en la cual se comparan los espectros NIR generados por un histisol dopado con Imazapyr® (0.8, 0.12, 0.16, 0.20 y 0.40 $\mu\text{g g}^{-1}$) y el espectro de este mismo suelo sin el plaguicida, todos pertenecientes a la misma fecha de registro.

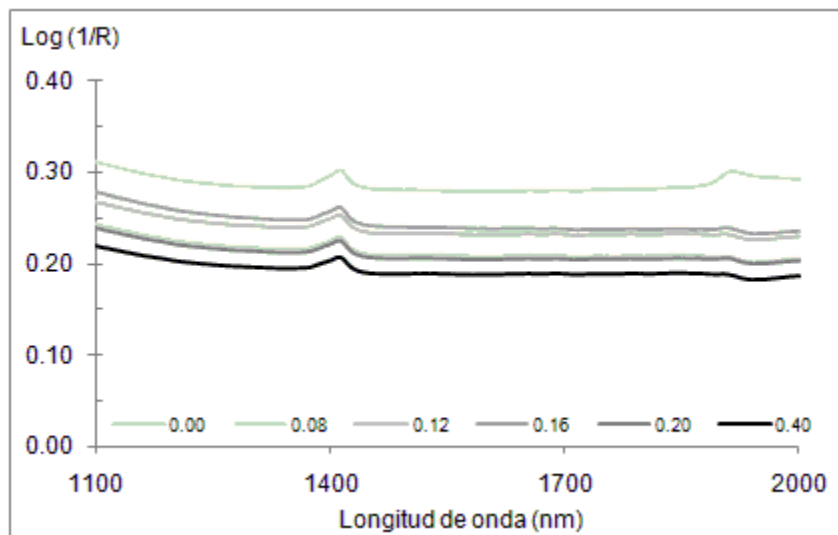


Figura 15. Comparación entre los espectros generados por un histisol sin el herbicida y al doparlo con el suelo al doparlo con 0.8, 0.12, 0.16, 0.20 ó 0.40 µg de imazapyr® por gramo de suelo.

Para cuantificar Imazapyr® del suelo por HPLC (considerado como el método de referencia) se usaron 300 muestras, las cuales corresponden a los seis suelos dopados a las cinco concentraciones de Imazapyr® mencionadas en el Cuadro 7 y diez repeticiones para cada concentración. De este total, se seleccionaron 144 muestras, que se ordenaron por pares correspondientes al mismo tipo de suelo, con el mismo nivel de dopado, la misma fecha de registro y el mismo día de extracción (Cuadro 8) entonces de cada par de muestras se obtuvo un espectro NIR promedio así como la media de la concentración del plaguicida. Al final se obtuvo 72 espectros NIR y su concentración correspondiente del herbicida. Se usaron 65 muestras de suelo dopado (con su espectro y concentración) para generar el modelo de cuantificación y se reservaron 7 muestras de suelo para realizar una *Validación Externa* de la ecuación de cuantificación. Las concentraciones de Imazapyr® en las extractos de las muestras seleccionadas oscilaron entre 0.005 – 0.554 mg L⁻¹, lo que corresponde a 0.002 – 0.222 µg g⁻¹ del herbicida en el suelo.

El análisis de componentes principales *PCA* para obtener el modelo de calibración se presenta en el Cuadro 14, en donde se señala: el pretratamiento espectral seleccionado SNV: *Standard Normal Variate* (2, 4, 4, 1) que corresponde a la corrección de los espectros por tipificación de la absorbancia que intenta minimizar la dispersión debido principalmente a factores físicos como puede ser el tamaño de partícula. Se requirieron 7 componentes principales para poder abarcar el 99.81% de la variabilidad entre los espectros de las muestras usadas en la ecuación de calibrado. Los componentes principales se pueden describir geoméricamente como un cambio de ejes, representándose los datos de las muestras en un sistema de coordenadas con un número inferior de ejes al utilizado inicialmente. Estos nuevos ejes corresponden al nuevo conjunto de variables establecido como un nuevo sistema de coordenadas en las direcciones que expliquen la máxima variabilidad en las muestras. El primer componente principal está en la dirección que explica la máxima variabilidad espectral del conjunto de muestras, el segundo es (ortogonal al primero) y explica la máxima variabilidad de las muestras una vez restada la explicada por el primero y así sucesivamente. Se eliminaron cuatro muestras al aplicar el criterio *H*, distancia de Mahalanobis, definida a partir de la diferencia espectral de una muestra respecto a la media espectral del conjunto de muestras utilizado para originar la ecuación de calibrado.

Cuadro 14. Resultados del análisis de componentes principales (PCA) entre los espectros de suelos dopados con Imazapyr®

	Pretratamiento		Número de componentes principales	Variabilidad explicada (%)
Concentración de Imazapyr®	SNV	2, 4, 4, 1	7	99.81

Los parámetros estadísticos del modelo *MPLS* considerados como los óptimos para obtener el modelo de cuantificación del Imazapyr® en el suelo por NIRS se presentan en el Cuadro 15. Estos corresponden a la cantidad de muestras que finalmente se utilizaron para generar el modelo (*N*); el número de grupos de validación cruzada y el número de factores PLS.

Cuadro 15. Parámetros estadísticos obtenidos del modelo de cuantificación de Imazapyr® en el suelo.

Parámetro Estadístico	Valor
N	56
Pre-tratamiento	<i>DeTrend</i> (2, 4, 4, 1)
SD (μg)	0.026
Rango ($\mu\text{g g}^{-1}$)	0.003 – 0.121
RSQ	0.811
SEC ($\mu\text{g g}^{-1}$)	0.014
SECV ($\mu\text{g g}^{-1}$)	0.023
Numero de factores PLS	7
Grupos de validación cruzada	6

La elección del número de factores o variables latentes se realizó en este caso mediante la validación cruzada, procedimiento por el que el conjunto original se divide en varios grupos (en este caso 6) de forma que se utiliza un grupo para comprobar los resultados (validar) y el resto para construir el modelo, de forma que cada vez se deje un grupo fuera, el proceso se repite tantas veces como subgrupos se formen y se continúa de igual forma como se obtuvo el número de factores principales. También se incluye, el valor obtenido para RSQ, o coeficiente de correlación múltiple (0.811) que indica el grado con el que los valores predichos se ajusta a los datos reales; el rango de aplicabilidad de la ecuación ($0.003 - 0.121 \mu\text{g g}^{-1}$), que es el intervalo de los valores de concentración de Imazapyr® en el suelo que pueden calcularse con certeza utilizando la ecuación generada; la desviación estándar de la concentración de Imazapyr® entre muestras ($0.026 \mu\text{g}$), el SEC error estándar de calibración ($0.014 \mu\text{g g}^{-1}$), el SECV; el error estándar de validación cruzada ($0.023 \mu\text{g g}^{-1}$) y el pre-tratamiento utilizado: *DeTrend* (2, 4, 4, 1) corrección de la tendencia: este tratamiento se aplica de forma individual a cada espectro e intenta minimizar la curvatura de la línea base que surge como consecuencia del diferente tamaño de partícula y del distinto grado de compactación en su empaquetamiento. Además, se indica la cantidad de muestras

que finalmente formaron el modelo ($N = 56$), una vez eliminadas aquellas que no cumplieron con el criterio H , ni el el criterio T (Ecuación 8, denominado criterio químico y son los *outliers* que presentan altos residuales, cuando T fue superior a 2.5, las muestras eliminadas por éste último criterio fueron cinco.

La incertidumbre en las predicciones futuras del modelo se evaluó través de un proceso de *validación interna* de donde se obtuvieron los parámetros de predicción, el SEP: Error Estándar de Predicción (Ecuación 9), y el SEP(c): Error estándar de predicción corregido por el *BIAS* (Ecuación 10). Al representar los valores de referencia frente a los predichos por NIR se obtuvo la gráfica de *Validación Interna* para el Imazapyr® (Figura 16). Los resultados indican que es posible la cuantificación de Imazapyr® en el suelo con errores de predicción (SEP) de $\pm 0.011 \mu\text{g}$ de Imazapyr® al utilizando la ecuación generada por NIRS.

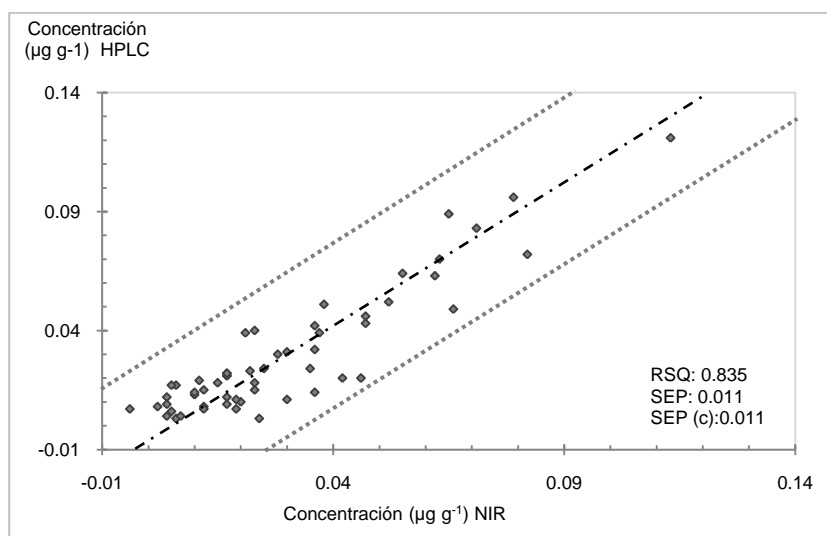


Figura 16. Comparación de los valores de referencia con los valores predichos por el modelo MPLS en NIR para la determinación de Imazapyr® en el suelo. Validación interna

La RPD: capacidad de predicción del modelo se evalúa usando la Ecuación 11, resultando con un valor de 2.4. Algunos autores consideran un $RPD > 3.0$ adecuado en el análisis NIRS para productos agrícolas (Fearn, 2002). Sin embargo, otros autores (Chang *et al.* 2001; Brown *et al.* 2005) aceptan $RPD > 2.0$. De acuerdo a éste último criterio, el modelo obtenido podría ser aplicado a muestras de suelo con Imazapyr® para su cuantificación con resultados confiables.

En la *Validación Externa* se usaron seis muestras de suelo (Cuadro 16) debido a que 1 de las 7 que se tenían destinadas para este fin estuvo fuera del rango de aplicación del modelo de cuantificación generado (Cuadro 15). Del conjunto de esas muestras se conocían los valores de referencia pero no se incluyeron en el conjunto de calibración para generar la ecuación de cuantificación.

Cuadro 16. Rango de concentración de las muestras utilizadas en la Validación Externa del modelo de cuantificación de Imazapyr® en el suelo por NIRS

	N	Mínimo	Máximo	Media	SD
		(µg g ⁻¹)			
Concentración de Imazapyr®	6	0.004	0.056	0.018	0.019

N: Cantidad de muestras

SD: Desviación estándar entre muestras

Los resultados proporcionados por la metodología NIR y los obtenidos por HPLC de las muestras dopadas con Imazapyr® del Cuadro 16 se compararon utilizando la Prueba *t* de *Student* para valores pareados. El nivel de confianza alcanzado aplicando dicha prueba fue de 0.08 (Cuadro 17), mayor a 0.05 (elegido como el mínimo); aceptándose la hipótesis nula, lo que implica que no existió diferencia significativa entre los resultados obtenidos por ambos métodos; también se incluyen el RMSE: el error cuadrático medio (Ecuación 12) y la media de los residuales que son indicadores del error que se pudo cometer al predecir la concentración en estas muestras desconocidas.

Cuadro 17. Validación externa. Cuantificación de Imazapyr® en el suelo

	P	Promedio de residuales	RMSE (SEP)
	Nivel de confianza	(µg g ⁻¹)	
Concentración de Imazapyr®	0.08	0.017	0.018

Considerando lo expuesto en el Cuadro 14 y el Cuadro 17, se confirma que el modelo de cuantificación obtenido puede utilizarse para predecir la concentración de Imazapyr® en el suelo en un rango entre 0.003 y 0.121 µg g⁻¹, con resultados similares a los obtenidos por HPLC.

7 CONCLUSIONES

Se generó una metodología de extracción de Imazapyr® del suelo para su cuantificación por HPLC. En este procedimiento de extracción se utiliza agua desionizada como extractante, con una relación suelo/SE 1:4, se realiza agitación mecánica por 30 min, centrifugado a 1500 rpm por 15 minutos y filtrado, la agitación hasta el filtrado se realizan en tres ocasiones en esa secuencia, los tres extractos se mezclan entre sí, se concentran en una estufa a 70 °C por 14 horas hasta sequedad, el imazapyr se redissuelve con solución metanol/agua (1:1, v/v). Se puede considerar que el método de extracción generado es un procedimiento que aportará resultados confiables así lo demostraron los parámetros de desempeño evaluados de acuerdo al CENAM: en la prueba de selectividad, se observó que no existieron interferencias en la determinación de Imazapyr®; se obtuvo una recuperación del herbicida de 98%, cantidad por encima del rango de 89-96% que reportaron Liu *et al.* (1992) y D'Ascenzo *et al.* (1998) al usar sus propias metodologías de extracción; se logró la repetibilidad requerida para métodos de extracción de residuos; a través de una prueba de robustez, se obtuvieron resultados de recuperación similares en los cinco diferentes suelos en que se ensayó el método de extracción.

Con el uso de la espectroscopía NIR y la quimiometría se generó una ecuación de discriminación con el cual fue posible la clasificación de muestras de suelo que contenían imazapyr y muestras sin plaguicida, con certeza de clasificación del 100 y 98% respectivamente.

Las concentraciones de Imazapyr® en los extractos del suelo proporcionados por HPLC fueron equivalentes a las obtenidas a través de un modelo de cuantificación generado por espectroscopía NIR.

8 LITERATURA CITADA

- Agosstinetto, D., Lamego, F. P., & Pinto, J. J. (2001). Ação Residual do Herbicida imazapyr Aplicado em Canal de Irrigação sobre a Cultivado do Arroz. *Rev. Bras. de Agrociência* 7 (3), 181-188.
- Akbal, F. Ö., Akdemir, N., & Onar, A. N. (2000). FT-IR spectroscopic detection of pesticide after sorption onto modified pumice. *Talanta* 53, 131-135.
- APVMA. (2004). Guidelines for the validation of analytical methods for active constituent, agricultural and veterinary chemical products. Australian Pesticides & Veterinary Medicines Authority. Kingston, Australia.
- Batten, G. D. (1998). Plant analysis using near infrared reflectance spectroscopy the potencial and the limitations. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 38, 697-706.
- Blanco M., Bautista M. y Alcalà. (2008). Pharmaceutical analysis by NIR spectroscopy. *Journal Pharmaceutical Sciences* 97 (3) 1236-1245.
- Bluhorst, M. R. (1996). Experimental Parameter Used to Study Pesticide Degradation in Soil. *Weed Technology* , 10 (1), 169-173.
- Börjesson L, Torstensson L. y J. Stenström. (2004). The fate of imazapyr in a Swedish railway. *Pest Management Science*, 60:544-549
- Bovey, R. W., & Senseman, S. A. (1998). Response of Food and Forage Crops to Soil-Applied imazapyr . *Weed Science* , 46 (5), 614-617.
- Brodi, S. H., Rodrigues da Silva, J. C., & Lancas, F. M. (2005). Development and Validation of a Methodology for the Determination of Pesticides in Water by SPME-LC/DAD. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* , 28 (18), 2909-2919.
- Brown, J. D.; Brickley, R. S. y Miller, P. R. (2005). Validation requirements for diffuse reflectance soil characterization models with a case study of VNIR soil C prediction in Montana. *Geoderma*, 129: 251 – 267.
- Brunet, D., Woignier, T., Lesueur-Jannoyer, M., Achard, R., Rangon, L., & Barthès, B. G. (2009). Determination of soil content in chlordecone (organochlorine pesticide) using near infrared reflectance spectroscopy (NIRS). *Environmental Pollution* , 157, 3120-3125.
- CENAM. (2004). *Guía técnica sobre trazabilidad e incertidumbre en CG y CLAR*. Centro Nacional de Metrología. Los Cués, Queretaro.
- CENAM. (2005). *Métodos analíticos adecuados a su propósito: Guía de Laboratorio para la Validación de Métodos y Temas Relacionados*. Centro Nacional de Metrología. Los Cués, Queretaro:
- CETOS. (31 de Julio de 2009). *Critical Habitat Projet: imazapyr factsheet*. Center for Ethics and Toxics. Obtenido de www.cetos.org

- Cox, C. (1996). Herbicide factsheet: Imazapyr® . *Journal of pesticide reform* , 16 (3), 16-20. Northwest Coalition for Alternatives to Pesticides (NCAP).
- Curran, W. S., Loux, M. M., Liebl, R. A., & Simmons, F. W. (1992). Photolysis of Imidazolinone Herbicides in Aqueous Solution and on Soil. *Weed Science* , 40 (1), 143-148.
- D'Ascenzo, G., Gentili, A., Marchese, S., Marino, A., & Perret, D. (1998). Rapid and simple method for extraction and determination of imidazolinone herbicides in soil. *Analisis* , 26, 251-255.
- El Azzouzi, M., Dahchour, A., & Bouhaus, A. (1998). Study on the behaviour of imazapyr in two Moroccan soils. *Weed Research* , 38 217-220.
- El Azzouzi, M., Dahchour, A., Baouhaouss, A., & Ferhat, M. (1998). Study on the behaviour of Imazapyr® in two Moroccan soils. *Weed Research* , 38, 217-220.
- EPA (1988). HPLC Method for determination of CL 243,997 (imazapyr) residues in soil. Environmental Protection Agency. Environmental Chemistry Laboratory, American Cyanamid Company, Agricultural Research Division, Princeton, NJ.
- EPA (2006). *Reregistration Eligibility Decision for Imazapyr®* . United States Environmental Protection Agency: Prevention, Pesticides and Toxic Substances. EPA 738-4-R-06-007. 107 pp.
- Fermino, L. E., Tuffi S., L. D., Ferreira, L. R., Ferreira, F. A., & Quirino, A. L. (2008 a). Movimento do herbicida Imazapyr® no perfil de solos tropicais. *Planta Daninha* , 26 (1), 223-230.
- Fermino, L. E., Tuffi, S. L., Ferreira, F. A., Ferreira, L. R., & Tiburcio, R. A. (2008 b). Sorção do Imazapyr® em Solos com Diferentes Texturas. *Planta Daninha* , 26 (2), 395-402.
- Fuentes, M.; González-Martín, I.; Hernández-Hierro, J. M.; Hidalgo, C.; Govaerts, B.; Etchevers, J.; Sayre, K. D.; Dendooven, L. (2009). The natural abundance of ¹³C with different agricultural management by NIRS with fibre optic probe technology. *Talanta*. (79) 32-37.
- Gennari, M., Nègre, M., & Vidrola, D. (1998). Adsorption of the herbicides Imazapyr® , imazethapyr and imazaquin on soils and humic acids. *Journal of Environmental Science and Health* (33), 547-567.
- González-Martín, I.; Hernández-Hierro, J. M. 2008. Detection and quantification of additives (urea, poultry litter, biuret) in alfalfa by NIR spectroscopy with fibre-optic probe. *Talanta*. (76) 1130-1135.
- Hager, A. G., & Refsell, D. (2008). Herbicide Persistence and How to Test for Residues in Soils. En I. A. Handbook. University of Illinois.
- Hernández-Hierro, J. M. (2008). Utilización de la tecnología NIRS con sonda de fibra óptica para el control de calidad de alfalfa. *Tesis doctoral* . Salamanca, Salamanca, España: Universidad de Salamanca.

- Hurley, P., & Shanaman, L. (2007). *Risks of imazapyr Use to the Federally Listed California Red Legged Frog (Rana aurora draytonii)*. Washington, D. C.: Environmental Fate and Effects Division: Office of Pesticide Programs.
- Ismail, B. S., & Ahmad, A. R. (1994). Attenuation of the herbicidal activities of glufosinate-ammonium and Imazapyr® in two soils. *Agriculture, Ecosystems and Environment* , 47 (4), 279-285.
- Jenkins, R. S., Wehtje, G. R., Morgan, J. M., & Bollinger, A. F. (2000). Temperature Effects on Retention of Atrazine and Imazapyr® in Soils. *Water, Air, and Soil Pollution* 118, 169-178.
- Kah, M. & Brown, C. D. (1996). Adsorption of Ionisable Pesticides in Soils. *Rev. Environ. Conm. Toxicol.* 188:149-217.
- Kaichouh, G., Oturan, N., Oturan, M., El Kacemi, K., & El Hourch, A. (2004). Degradation of the herbicide Imazapyr® by Fenton reactions. *Environmental Chemistry Letters* (2), 31-33.
- Laganà, A., Fago, G., Marino, A., & Penazzi, V. M. (2000). Liquid chromatography mass spectrometry tandem for multiresidue determination of selected post-emergence herbicides after soil column extraction. *Analytica Chimica Acta* , 415, 41-56.
- Lao, W., & Gan, J. (2006). High-performance liquid chromatographic separation of imidazolinone herbicide enantiomers and their methyl derivatives on polysaccharide-coated chiral stationary phases. *Journal of Chromatography A* (1117), 184-193.
- Lee, H. L., Chen, K. W., & Wu, M. H. (1999). Acute Poisoning with a Herbicide Containing Imazapyr® (Arsenal): A Report of Six Cases. *Clinical Toxicology* , 37 (1), 83-89.
- Liu, W., Pusino, A., & Gessa, C. (1992). High-performance liquid chromatographic determination of the herbicide imazapyr residues in water and soil. *The Science of the Total Environment* , 123/124 39-45.
- Maldaner, L., Santana, C. C., & Jardim, I. C. (2008). HPLC determination of pesticides in soybeans using matrix solid phase dispersion. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* , 31 (7), 972-983.
- Mallipudi, N. M., Kholi, B. A., Lean, A., & Orloshi, E. J. (1985). Adsorption, translocation and soil dissipation of Imazapyr® under field conditions. *Proc. 38th Southern Weed Sci. Soc. Conf.* (pág. 441). Houston, TX: Southern Weed Science Society.
- Massart D. L., Vandeginste B. G. M, Buydens LMC, De Jong SP, Lew J y S. Smeyers-Verbeke. (1997) In: BGM Vandeginste y S. C. Rutan, Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A, Elsevier pp. 1-20.
- McDowell, R. W., Condon, L. M., Main, B. E., & Dastgheib, F. (1997). Dissipation of Imazapyr® , flumetsulam and thifensulfuron in soil. *Weed Research* (37), 381.
- Miller, J. H., Mitchell, R. J., & Deyou, W. (1997). *The manual of the forestry herbicides*. Peking: Science and Technology press.

- Moros, J., Aramenta, S., Garrigues, S., & de la Guardia, M. (2005). Near infrared determination of Diuron in pesticide formulations. *Anlytica Chimica Acta* , 543, 124-129.
- Nègre, M., Schulten, H. R., Gennari, M., & Vidrola, D. (2001). Interaction of imidazolinone herbicides with the soil humic acids. Experimental results and molecular modeling. *Journal of Environmental. Science Health* , 107-125.
- Ng, L. L. (1994). *Reviewer Guidance: Validation of Chromatographic Methods*. Center for Drug Evaluation (FDA),.
- Osajima, J. A., Ishiki, H. M., & Takashima, K. (2008). The photocatalytic Degradation of Imazapyr® . *Monatshefte für Chemie* (139), 7-11.
- Patten, K. (2003). Persistence and non-target impact of Imazapyr® associated with smooth cordgrass control in an estuary. *J. Aquat. Plant Manage* , 41, 1-6.
- Peoples, T. R. (1984). Arenal herbicide (AC 25,925): a development overview. Proc. South. Weed Science Society. 37:378-387.
- Pusino, A., Peretto, S., & Gessa, C. (1997). Adsorption and desorption of Imazapyr® by soil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 45 (3), 1012-1016.
- Quezada, C. L. (2008). Aplicación de la espectroscopia de reflectancia infrarrojo cercano (NIRS) en el analisis de suelos. *Ciencia...Ahora* , 87-95.
- Quivet, E., Faure, R., Geroges, J., Pâisse, J. O., & Herbretreau, B. (2004). Kinetic studies of Imazapyr® photolysis and characterization of the main photoproducts. *Toxicological & Environmental Chemistry* , 86 (4), 197-206.
- Ramezani, M. D., Oliver, D. P., Kookana, R. S., Gill, G., & Preston, C. (2008). Abiotic degradation (photodegradation and hydrolysis) of imidazolinone herbicides. *Journal of Environmental Science and Health* , 43, 105-112.
- Ramezani, M., Simpson, N., Oliver, D., Kookana, R., Gill, G., & Preston, C. (2009). Improved extraction and clean-up of imidazolinone herbicides from soil solutions using different solid-phase sorbents. *Journal of Chromatography A* , 1216, 5092-5100.
- Schwarcz, R. W., Whetsell, W. O., & Magano, R. M. (1983). Quinolinic acid: an endogenous metabolite that produces axon-sparing lesions in rat brain. *Science* , 219, 316-318.
- Shenk JS, Westerhaus MO. 1995. Analysis of agriculture and food products by near infrared reflectance spectroscopy Monograph NIRSystems Inc, Silver Spring USA.
- Silva-Cajas, G. V. (2004). Validación del Método e Valoración de Glimepiride por el Método de Cromatografía Líquida de Alta Performance HPLC. *Tesis de licenciatura*. Lima, Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos: Facultad de Farmacia y Bioquímica.
- Silva-Trejo, P. (2005). Determinación de residuos de imazapic e imazapyr en arroz (Oriza sativa) por HPLC. *Ingeniería* , 15 (1,2), 15-19.

- Souza, A. P., & et al. (2000). Lixiviação de glyphosate e imazapyr em solos com diferentes texturas e composição química I-Método do Bioençaio. *Planta Daninha* , 18 (1), 5-16.
- Tucker, T. A., Langeland, K. A., & Corbin, F. T. (1994). Absorción and Translocation of ¹⁴C-Imazapyr® and ¹⁴C-Glyphosate in Alligatorweed *Alternanthera philoxeroides*. *Weed Technology* , 8 (1), 32-36.
- Ulbrich, A. V., Souza, J. R., & Shaner, D. (2005). Persistence and Carryover Effect of Imazapic and imazapyr in Brazilian Cropping Systems. *Weed Technology* , 19, 986-991.
- USDA. (2004). *Imazapyr - Human health and ecological risk assessment- final report*. Arlington. United States Department of Agriculture. Forest Service.
- Vizantinopoulos, S., & Lolos, P. (1994). Persistence and leaching of the herbicide imazapyr in soil. *Bull. Environ. Cont. Toxicol.* , 52, 404-410.
- Wang, X., Wang, H., & Fan, D. (2005). Persistence and metabolism of imazapyr in four typical soils of Zhenjiang Province (China). *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* , 85 (2), 99-109.
- Wang, X., Wang, H., & Fan, D. (2006). Degradation and metabolism of imazapyr in soils under aerobic and anaerobic conditions. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* , 541-551.
- Wehtje, G., Dickens, R., Wilcut, J., & Hajek, B. F. (1987). Sorption and Mobility of Sulfometuron and imazapyr in Five Alabama Soils. *Weed Science* , 35 (6), 858-864.
- WRB (2006). *World Reference Base for Soil Resources*. IUSS Working Group. FAO, Rome, Italy.
- WSSA. (1994). En W. H. Ahrens, *Herbicide handbook* (pág. 352) Weed Science Society of America.
- Zornoza, R., Guerrero, C., Mataix-Solera, J., Scow, K. M., Arcenegui, V., & Mataix-Beneyto, J. (2008). Near infrared spectroscopia for determination of various physical, chemical, and biochemical properties in Mediterranean soils. *Soil Biology & Biochemistry* 40, 1923-1930.