

Evaluación de formulaciones basadas en minerales de la arcilla para aumentar la eficacia y reducir la contaminación de aguas superficiales y subterráneas por herbicidas utilizados en el olivar

Evaluación de formulaciones basadas en minerales de la arcilla para aumentar la eficacia y reducir la contaminación de aguas superficiales y subterráneas por herbicidas utilizados en el olivar



Evaluación de formulaciones basadas en minerales de la arcilla para aumentar la eficacia y reducir la contaminación de aguas superficiales y subterráneas por herbicidas utilizados en el olivar.

Memoria que presenta

Carmen Trigo Córdoba
para optar al título de Doctor por la
Universidad de Sevilla.

Sevilla, Junio de 2010

Evaluación de formulaciones basadas en minerales de la arcilla para aumentar la eficacia y reducir la contaminación de aguas superficiales y subterráneas por herbicidas utilizados en el olivar.

Visado en Sevilla, a 14 de Junio de 2010

LOS DIRECTORES

Dr. Juan Cornejo Suero Dr. Rafael Celis García
Profesor de Investigación del C.S.I.C Investigador Científico del C.S.I.C.

EL TUTOR

Dr. Patricia Aparicio Fernández
Profesora Titular de la Universidad de Sevilla

DOCTOR D. LUIS CLEMENTE SALAS, DIRECTOR DEL INSTITUTO DE RECURSOS NATURALES Y AGROBIOLOGÍA DE SEVILLA DEL CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

Certifica: Que la presente Memoria de Investigación titulada "Evaluación de formulaciones basadas en minerales de la arcilla para aumentar la eficacia y reducir la contaminación de aguas superficiales y subterráneas por herbicidas utilizados en el olivar", presentada por Dña. Carmen Trigo Córdoba para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla, ha sido realizada en el Departamento de Agroquímica y Conservación de Suelos en el Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla (I.R.N.A.S.), bajo la dirección del Prof. D. Juan Cornejo Suero y el Dr. D. Rafael Celis García, reuniendo todas las condiciones exigidas a los trabajos de Tesis Doctorales.

En Sevilla, a 14 de Junio de 2010

El presente trabajo se ha realizado en el marco de los Proyectos AGL2005-05063-C02-01 del Ministerio de Educación y Ciencia y AGL2008-04031-C02-01 del Ministerio de Ciencia e Innovación.

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que de alguna u otra forma han hecho posible la realización de este trabajo:

En primer lugar un especial agradecimiento al Profesor de Investigación D. Juan Cornejo Suero y al Investigador Científico D. Rafael Celis García, directores de esta Tesis Doctoral, por haber confiado en mí. Gracias por la infinita paciencia, por los consejos, por cuidar cada detalle de este trabajo que, sin duda, no hubiese sido posible sin vuestro apoyo.

Al Profesor William C. Koskinen de la Universidad de Minnesota, por brindarme la oportunidad de realizar una estancia breve durante el año 2009, gracias por su acogida, hospitalidad y dedicación al trabajo que allí realicé y que corresponde al apartado de estudios de biodisponibilidad de este trabajo. Al Profesor M. J. Sadowsky por haberme proporcionado la bacteria *Pseudomonas* sp. cepa ADP, necesaria para la realización de dichos estudios.

A la Profesora Doctora Patricia Aparicio por haber aceptado la Tutoría de esta tesis.

A la dirección del Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla (I.R.N.A.S.) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (C.S.I.C) por las facilidades prestadas para llevar a cabo este trabajo.

A la Profesora de Investigación Dña. María del Carmen Herмосín Gaviño por su apoyo y sugerencias.

A la Profesora M^a Ángeles Ulibarri del Departamento de Química Inorgánica e Ingeniería Química de la Universidad de Córdoba por las facilidades prestadas para la realización de los análisis térmicos de las muestras.

A mis compañeras de laboratorio: Gracia, muchas gracias por haberme brindado tu amistad desde el primer día que llegué al instituto y por ofrecerme tu ayuda en cada momento; Bea, por alegrarnos el laboratorio con tu canturreo, por escucharme y comprenderme y por haberte convertido en una buena amiga; Marian, gracias por tu compañerismo y apoyo.

A los niños del laboratorio de enfrente, Miguel, Felipe y Nacho, por prestarme su ayuda cada vez que la he necesitado y por esos ratos de risas.

A Lucía, María Jesús y Pili por estar siempre ahí, por hacer que sea tan fácil y agradable la convivencia dentro del grupo.

AGRADECIMIENTOS

A Cristina y Alegría que, aunque por distintos motivos no estáis en el Instituto, no me olvido de vosotras porque siempre me habéis apoyado y ayudado en todo lo que os he pedido. A Chari, Anabel e Isabel, gracias por vuestro compañerismo.

Al grupo de becarios del Instituto (SIBERE), gracias por hacer más llevadero este trabajo.

A mis padres, por haber confiado en mí y haberme apoyado siempre en todas las decisiones que he tomado, aunque no siempre haya sido fácil para vosotros. A mis hermanos Emiliano y María Dolores por preocuparos por mí y porque siempre he podido contar con vosotros. Y a mi familia en general, que desde la distancia sé que os tengo ahí siempre.

Agradezco también al antiguo Ministerio de Educación y Ciencia la concesión de una beca Predoctoral del Plan Nacional de Formación de Personal Investigador dentro del Proyecto AGL2005-05063-C02-01.

Por último, a todas aquellas personas que han sido importantes en mi vida y que han supuesto un estímulo para la realización de este trabajo.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. PROBLEMÁTICA DEL USO DE HERBICIDAS EN EL CULTIVO DEL OLIVAR.	3
1.1.1. EL CONTROL DE MALAS HIERBAS EN EL OLIVAR: HERBICIDAS AUTORIZADOS.....	4
1.1.2. CONTAMINACIÓN DE LAS AGUAS POR HERBICIDAS UTILIZADOS EN EL OLIVAR.....	11
1.1.3. ESTRATEGIAS PARA REDUCIR LA CONTAMINACIÓN POR PLAGUICIDAS: EFECTO DE LAS FORMULACIONES.....	13
1.2. PROCESOS QUE DETERMINAN LA DINÁMICA DE LOS PLAGUICIDAS EN EL SUELO.....	17
1.2.1. PROCESOS DE TRANSPORTE.....	18
1.2.1.1. Adsorción-desorción.....	18
1.2.1.1.1. Factores que influyen en la adsorción-desorción.....	19
1.2.1.1.2. Estudios de adsorción: isothermas de adsorción.....	22
1.2.1.1.3. Reversibilidad de la adsorción.....	25
1.2.1.2. Lixiviación.....	25
1.2.1.2.1. Factores que influyen en la lixiviación.....	25
1.2.1.2.2. Estudio de la lixiviación.....	27
1.2.1.3. Escorrentía.....	28
1.2.1.4. Otros procesos de transporte.....	28
1.2.2. PROCESOS DE TRANSFORMACIÓN.....	29
1.2.2.1. Degradación química.....	29
1.2.2.2. Biodegradación.....	30
1.2.2.3. Fotodegradación.....	32
1.3. FILOSILICATOS INALTERADOS Y MODIFICADOS: PROPIEDADES ADSORBENTES.....	33
1.3.1. CONCEPTO, CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES Y CLASIFICACIÓN DE LOS FILOSILICATOS.....	33
1.3.2. LAS ESMECTITAS COMO ADSORBENTES DE PLAGUICIDAS.....	36
1.3.3. REACCIONES DE MODIFICACIÓN DE LAS ESMECTITAS.....	37

1.3.3.1. Interacciones de plaguicidas con esmectitas modificadas con cationes inorgánicos.....	41
1.3.3.2. Interacciones de plaguicidas con esmectitas modificadas con cationes orgánicos.....	41
1.3.4. MINERALES DE LA ARCILLA INALTERADOS Y MODIFICADOS COMO ADSORBENTES EN FORMULACIONES DE LIBERACIÓN LENTA DE PLAGUICIDAS.....	45
2. OBJETIVOS.....	49
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	53
3.1. MATERIALES.....	55
3.1.1. HERBICIDAS.....	55
3.1.1.1. Diurón.....	55
3.1.1.2. Terbutilazina y atrazina.....	56
3.1.1.3. MCPA	58
3.1.2. SUELOS.....	59
3.1.3. ADSORBENTES.....	60
3.2. MÉTODOS.....	64
3.2.1. MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE LOS HERBICIDAS.....	64
3.2.1.1. Cromatografía líquida de alta resolución.....	64
3.2.1.2. Conteo por centelleo líquido.....	64
3.2.2. CARACTERIZACIÓN DE LAS MONTMORILLONITAS INALTERADAS Y MODIFICADAS.....	65
3.2.3. CARACTERIZACIÓN DE LOS SUELOS.....	65
3.2.4. ESTUDIOS DE ADSORCIÓN-DESORCIÓN.....	66
3.2.5. PREPARACIÓN DE FORMULACIONES ADSORBENTE-HERBICIDA.....	69
3.2.6. CINÉTICAS DE LIBERACIÓN EN AGUA.....	71
3.2.7. EXPERIMENTOS DE INCUBACIÓN DE LOS HERBICIDAS EN LOS SUELOS.....	72
3.2.7.1. Curvas de disipación.....	72

3.2.7.2. Estudio de biodisponibilidad.....	73
3.2.8. EXPERIMENTOS DE LIXIVIACIÓN EN COLUMNAS DE SUELOS.....	73
3.2.9. BIOENSAYOS.....	75
3.2.9.1. Bioensayo general.....	75
3.2.9.2. Bioensayos con simulación de alto riesgo de lixiviación.....	76
3.2.10. EXPERIMENTO DE CAMPO.....	77
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	79
4.1. CARACTERÍSTICAS DE LAS MONTMORILLONITAS MODIFICADAS.....	81
4.1.1. ANÁLISIS ELEMENTAL.....	81
4.1.2. DIFRACCIÓN DE RAYOS X.....	82
4.1.3. ESPECTROSCOPIA INFRARROJA Y ANÁLISIS TÉRMICO DE LAS MUESTRAS TRATADAS CON ESPERMINA, HEXADIMETRINA Y TIRAMINA.....	85
4.1.3.1. Espectroscopía infrarroja.....	85
4.1.3.2. Análisis térmico.....	87
4.2. CARACTERIZACIÓN DE LOS SUELOS.....	89
4.3. ESTUDIOS DE ADSORCIÓN-DESORCIÓN DE LOS HERBICIDAS A LAS MONTMORILLONITAS MODIFICADAS Y SIN MODIFICAR Y A LOS SUELOS.....	92
4.3.1. ESTUDIOS DE ADSORCIÓN-DESORCIÓN A LAS MONTMORILLONITAS.....	92
4.3.1.1. Estudios de adsorción a concentración única.....	92
4.3.1.2. Isotermas de adsorción.....	95
4.3.1.3. Isotermas de desorción.....	98
4.3.2. ESTUDIOS DE ADSORCIÓN-DESORCIÓN A LOS SUELOS.....	101
4.4. PREPARACIÓN DE FORMULACIONES ADSORBENTE-HERBICIDA.....	104
4.5. CINÉTICAS DE LIBERACIÓN EN AGUA.....	107
4.6. EXPERIMENTOS DE INCUBACIÓN DE LOS HERBICIDAS EN LOS SUELOS.....	113
4.6.1. CURVAS DE DISIPACIÓN.....	113

4.6.2. ESTUDIOS DE BIODISPONIBILIDAD.....	117
4.7. EXPERIMENTOS DE LIXIVIACIÓN.....	123
4.8. BIOENSAYOS.....	135
4.8.1. BIOENSAYO GENERAL.....	135
4.8.2. BIOENSAYOS CON SIMULACIÓN DE ALTO RIESGO DE LIXIVIACIÓN.....	139
4.9. EXPERIMENTO DE CAMPO	141
5. CONCLUSIONES.....	147
6. BIBLIOGRAFÍA.....	153
7. PUBLICACIONES.....	173

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Materias activas incluidas en los productos comerciales registrados autorizados como herbicidas en el olivar.....	7
Tabla 2. Herbicidas permitidos en olivar incluidos en el Reglamento Específico de Producción Integrada de Olivar de la Junta de Andalucía.....	9
Tabla 3. Principales modos de acción de los herbicidas y algunos ejemplos dentro de los permitidos en el olivar	11
Tabla 4. Distribución de explotaciones olivareras en Andalucía por pendientes.....	12
Tabla 5. Algunos episodios de contaminación de reservas de agua que ha provocado en los últimos años el uso de herbicidas en el cultivo del olivar.....	13
Tabla 6. Clasificación de los procesos que determinan la dinámica de los plaguicidas en el suelo.....	17
Tabla 7. Principales productos de degradación de algunos de los herbicidas autorizados para el olivar cuyo medio de formación es el suelo.....	30
Tabla 8. Clasificación de los filosilicatos y algunas especies minerales.....	35
Tabla 9. Procedencia, clasificación textural y experimentos en los que fueron usados cada uno de los cuatro suelos.....	60
Tabla 10. Características de las montmorillonitas SWy-2 y SAz-1.....	61
Tabla 11. Nomenclatura de las montmorillonitas modificadas utilizadas como adsorbentes. Cantidad de catión añadida y grado de saturación esperado de la C.I.C. de la arcilla.....	63
Tabla 12. Condiciones de análisis de los herbicidas por HPLC.....	64

Tabla 13. Procedimientos específicos de preparación de formulaciones llevados a cabo con diurón, terbutilazina y MCPA.....	70
Tabla 14. Resultados del análisis elemental de las muestras de montmorillonitas sin modificar y modificadas.....	82
Tabla 15. Valores de espaciado basal (d_{001}) en Å de las montmorillonitas SWy-2 y SAz-1 sin modificar y modificadas.....	83
Tabla 16. Características fisico-químicas de los suelos utilizados. AF: arena fina; AG: arena gruesa; L: limo; A: arcilla; C.O.: carbono orgánico oxidable; M.O.: materia orgánica.....	89
Tabla 17. Porcentaje relativo de filosilicatos presentes en la fracción arcilla de los suelos S1 y S2.....	91
Tabla 18. Coeficientes de Freundlich para la adsorción de diurón, terbutilazina y MCPA a muestras de montmorillonitas sin modificar y modificadas.....	97
Tabla 19. Coeficientes de Freundlich para la desorción de diurón, terbutilazina y MCPA de muestras de montmorillonitas modificadas.....	100
Tabla 20. Coeficientes de Freundlich para la adsorción de diurón, terbutilazina y MCPA a los suelos S1 y S2.....	102
Tabla 21. Coeficientes de Freundlich para la desorción de diurón y terbutilazina en los suelos S1 y S2.....	103
Tabla 22. Montmorillonitas modificadas seleccionadas para la preparación de las formulaciones de liberación controlada de cada herbicida.....	104
Tabla 23. Porcentaje de herbicida en los complejos calculado por métodos indirecto y directo.....	105
Tabla 24. Constantes del ajuste a la ecuación $M_t/M_z = Kt^n + c$ de los datos de liberación de diurón, terbutilazina y MCPA en agua para las formulaciones organoarcilla-herbicida y para formulaciones comerciales convencionales.....	108

Tabla 25. Principales productos de degradación de diurón, terbutilazina y MCPA cuyo medio de formación es el suelo.....	113
Tabla 26. Constantes del ajuste de los datos de disipación de terbutilazina en suelos a una cinética de primer orden (Ec. 2).....	116
Tabla 27. Constantes del ajuste de los datos de disipación de diurón y MCPA en suelos a una cinética de tipo sigmoideal (Ec. 4).....	116
Tabla 28. Porcentaje de diurón lixiviado, extraído de las columnas y no recuperado durante el experimento de lixiviación con los suelos S1 y S2. Concentración máxima de herbicida en los lixiviados y volumen de poro al que apareció dicha concentración máxima ($VP_{m\acute{a}x}$).....	124
Tabla 29. Porcentaje de terbutilazina lixiviada, extraída de las columnas y no recuperada durante el experimento de lixiviación con los suelos S1 y S2. Concentración máxima de herbicida en los lixiviados y volumen de poro al que apareció dicha concentración máxima ($VP_{m\acute{a}x}$).....	131
Tabla 30. Porcentaje de MCPA lixiviado, extraído de las columnas y no recuperado durante el experimento de lixiviación con los suelos S1 y S2. Concentración máxima de herbicida en los lixiviados y volumen de poro al que apareció dicha concentración máxima ($VP_{m\acute{a}x}$).....	132
Tabla 31. Volumen de agua de escorrentía y concentración de diurón encontrada en disolución y en las partículas en suspensión.....	144

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Consumo de plaguicidas en España en relación a la superficie cultivada.....	3
Figura 2. Distribución geográfica del olivar en Andalucía.....	5
Figura 3: Distribución de la superficie cultivada en Andalucía: a) por grupos de cultivos, b) por cultivos individuales.....	6
Figura 4. Secuencia de sucesos desde la entrada en la planta del herbicida hasta la muerte de la planta.....	10
Figura 5. Campo de olivares en una superficie con pendiente.....	12
Figura 6. Procesos que determinan la dinámica de los plaguicidas en el suelo.....	18
Figura 7. Tipos de isotermas de adsorción según la clasificación de Giles et al. (1960)...	23
Figura 8. Cinéticas de la biodegradación de plaguicidas.....	32
Figura 9. Estructura de los filosilicatos 1:1 y 2:1.....	34
Figura 10. Centros activos de un mineral esmectítico en relación con la adsorción de plaguicidas.....	36
Figura 11. Posibles disposiciones de los cationes orgánicos de cadena larga en el espacio interlaminar de las organoarcillas y magnitud de la distancia interlaminar.....	40
Figura 12. Imágenes de una muestra de montmorillonita de Wyoming (SWy-1) saturada con cationes hexadeciltrimetilamonio (HDTMA) tomadas por microscopía electrónica de transmisión de alta resolución.....	40
Figura 13. Organoarcillas a) organofílicas y b) adsortivas.....	42
Figura 14. Algunos cationes orgánicos funcionalizados utilizados para la preparación de organoarcillas.....	43

Figura 15. Porcentaje de herbicida simazina adsorbido por montmorillonita sin tratar (SWy-2) y montmorillonita modificada con diferentes cationes orgánicos.....	44
Figura 16. Efecto del tipo de formulación en las pérdidas por transporte de los plaguicidas aplicados al suelo.....	46
Figura 17. Estructura química de la molécula de diurón.....	56
Figura 18. Estructura química de la molécula de terbutilazina.....	57
Figura 19. Estructura química de la molécula de atrazina.....	58
Figura 20. Estructura química de la molécula de MCPA.....	59
Figura 21. Cationes utilizados para la modificación de las montmorillonitas.....	61
Figura 22. Esquema del proceso de adsorción de los herbicidas en las muestras de suelo.....	68
Figura 23. Cinética de liberación de los herbicidas a partir de diferentes formulaciones.....	72
Figura 24. Cinética de disipación de los herbicidas en forma de diferentes formulaciones.....	72
Figura 25. Columnas de suelo usadas para el experimento de lixiviación.....	74
Figura 26. Preparación de macetas utilizadas para bioensayos.....	76
Figura 27. Macetas durante un bioensayo realizado con Berro (<i>Lepidum sativum</i>).....	76
Figura. 28. Esquema de las microparcels.....	78
Figura 29. Fotografía de una de las microparcels.....	78

Figura 30. Diagramas de difracción de rayos X de los agregados orientados correspondientes a las muestras de SWy-2 modificadas con espermina, hexadimetrina y tiramina secadas a 200°C.....	85
Figura 31. Espectros de infrarrojos con transformada de Fourier de las muestras de montmorillonitas sin modificar (blancos) y modificadas con espermina, hexadimetrina y tiramina.....	86
Figura 32. Análisis termogravimétrico (TG) y análisis térmico diferencial (DTA) de las muestras de SWy-2 modificadas con espermina, hexadimetrina y tiramina.....	88
Figura 33. Distribución de tamaños de poro obtenida por intrusión de mercurio de los suelos S1 y S2.....	90
Figura 34. Difractograma de los agregados orientados de las fracciones arcilla de los suelos S1 y S2 sometidas a diferentes tratamientos.....	91
Figura 35. Porcentaje de diurón, terbutilazina y MCPA adsorbido por las muestras de montmorillonitas modificadas y sin modificar a una concentración inicial de 1 mg l ⁻¹ y una relación sólido:disolución 20 mg:8 ml.....	93
Figura 36. Isotermas de adsorción de diurón, terbutilazina y MCPA en muestras de montmorillonitas modificadas seleccionadas.....	96
Figura 37. Isotermas de adsorción-desorción de diurón en muestras de montmorillonitas modificadas seleccionadas.....	98
Figura 38. Isotermas de adsorción-desorción de terbutilazina en muestras de montmorillonitas modificadas seleccionadas.....	99
Figura 39. Isotermas de adsorción-desorción de MCPA en muestras de montmorillonitas modificadas seleccionadas.....	100
Figura 40. Isotermas de adsorción-desorción de diurón, terbutilazina y MCPA a los suelos S1 y S2.....	101

Figura 41. Terbutilazina extraída del complejo SW-Fe mez (H ₂ O) a diferentes tiempos desde la preparación del complejo.....	106
Figura 42. Cinética de liberación de diurón en agua a partir de diferentes formulaciones de organoarcillas y de la formulación comercial.	109
Figura 43. Cinética de liberación de terbutilazina en agua a partir de diferentes formulaciones de organoarcillas y de la formulación comercial.....	110
Figura 44. Cinética de liberación de MCPA en agua a partir de diferentes formulaciones de organoarcillas y de la formulación comercial.....	111
Figura 45. Curvas de disipación de diurón, terbutilazina y MCPA aplicados a los suelos S1 y S2 como formulaciones de organoarcillas y como formulaciones comerciales convencionales.....	114
Figura 46. Porcentaje de atrazina mineralizada, extraída en fase acuosa y orgánica y no extraíble durante el experimento de biodisponibilidad con el suelo S4.....	119
Figura 47. Porcentaje de atrazina adsorbida por las muestras de montmorillonitas seleccionadas, modificadas y sin modificar, a una concentración inicial de herbicida de 1 mg l ⁻¹ y relación sólido: disolución 20 mg: 8 ml.....	120
Figura 48. Mineralización de atrazina, en forma libre o como formulación de organoarcillas, en el suelo S4 por la bacteria <i>Pseudomonas</i> sp. cepa ADP.....	121
Figura 49. Desorción de atrazina a partir de SW-CAR ₁₀₀ y SA-HDTMA ₁₀₀ por diluciones sucesivas con diferentes extractantes.....	122
Figura 50. Posible mecanismo de descomposición del complejo SW-CAR ₁₀₀ -atrazina a elevados valores de pH.....	122
Figura 51. Curvas de elución relativas (izquierda) y acumuladas (derecha) para diurón aplicado a las columnas de suelo S1 como formulaciones de organoarcillas y como formulación comercial.....	125

Figura 52. Curvas de elución relativas (izquierda) y acumuladas (derecha) para diurón aplicado a las columnas de suelo S2 como formulaciones de organoarcillas y como formulación comercial.....	126
Figura 53. Gráficas de las extracciones de diurón de las columnas de suelo (S1 y S2) al finalizar el experimento de lixiviación.....	127
Figura 54. Curvas de elución relativas (izquierda) y acumuladas (derecha) para terbutilazina aplicada a las columnas de suelo S1 como formulaciones de organoarcillas y como formulación comercial.....	129
Figura 55. Curvas de elución relativas (izquierda) y acumuladas (derecha) para terbutilazina aplicada a las columnas de suelo S2 como formulaciones de organoarcillas y como formulación comercial.....	130
Figura 56. Gráficas de las extracciones de terbutilazina de las columnas de suelo (S1 y S2) al finalizar el experimento de lixiviación.....	131
Figura 57. Curvas de elución relativas (izquierda) y acumuladas (derecha) para MCPA aplicado a las columnas de suelo S1 como formulaciones de organoarcillas y como formulación comercial.....	133
Figura 58. Curvas de elución relativas (izquierda) y acumuladas (derecha) para MCPA aplicado a las columnas de suelo S2 como formulaciones de organoarcillas y como formulación comercial.....	134
Figura 59. Peso herbáceo fresco de las macetas dos semanas después de la aplicación del herbicida.....	135
Figura 60. Resultados de los bioensayos realizados en los suelos S1 y S2 con Berro (<i>Lepidum sativum</i>). Efectos de adición de diurón en forma de producto comercial libre y en forma de complejos con organoarcillas.....	136
Figura 61. Resultados de los bioensayos realizados en los suelos S1 y S2 con Berro (<i>Lepidum sativum</i>). Efectos de adición de terbutilazina en forma de producto comercial libre y en forma de complejos con organoarcillas.....	137

Figura 62. Resultados de los bioensayos realizados, en el suelo S1 en postemergencia y en el S2 en preemergencia, con Berro (<i>Lepidum sativum</i>). Efectos de adición de MCPA en forma de producto comercial libre y en forma de complejos con organoarcillas.....	138
Figura 63. Peso herbáceo fresco de las macetas en el bioensayo con simulación de lluvia abundante tras la aplicación del herbicida MCPA.....	139
Figura 64. Resultados de los bioensayos realizados en los suelos S1 y S2 con Berro (<i>Lepidum sativum</i>) en condiciones de elevado aporte de agua poco después de la aplicación del herbicida MCPA. Efectos de adición de MCPA en forma de producto comercial libre y en forma de complejo con la organoarcilla SA-HDTMA ₁₀₀ ads (200ppm).....	140
Figura 65. Datos de pluviometría y temperatura medidos durante el tiempo que duró el experimento de campo.	142
Figura 66. Concentración de diurón (mg kg ⁻¹) en las parcelas tratadas con la formulación comercial (izquierda) y con la formulación SW-ESPERM ₁₀₀ mez (MeOH) (derecha) a distintas profundidades y a distintos días desde la aplicación del herbicida durante el experimento de campo.....	142
Figura 67. Concentración de DCPMU (mg kg ⁻¹) en las parcelas tratadas con la formulación comercial (izquierda) y con la formulación SW-ESPERM ₁₀₀ mez (MeOH) (derecha) a distintas profundidades y a distintos días desde la aplicación del herbicida durante el experimento de campo.....	143
Figura 68. Parcelas completas (arriba) y ampliación de un cuarto de las mismas (abajo) sin tratar (control) y tratadas con diurón como formulación comercial convencional y como formulación basada en la organoarcilla SW-ESPERM ₁₀₀	145
Figura 69. Peso herbáceo fresco por metro cuadrado en las parcelas al finalizar el experimento de campo.....	146

En el olivar mediterráneo se dan condiciones que favorecen grandes pérdidas por lixiviación y escorrentía de los herbicidas que se aplican para el control de las malas hierbas. Las propiedades de los suelos de olivar, normalmente pobres en materia orgánica, y sus pronunciadas pendientes favorecen dichos procesos de lixiviación y escorrentía. Además, las condiciones climáticas de las regiones mediterráneas, caracterizadas por episodios de cortas pero intensas lluvias, incrementan el riesgo de que los herbicidas sufran grandes pérdidas por transporte, especialmente si dichos episodios de lluvia tienen lugar poco después de la aplicación del producto fitosanitario. Consecuencia de estos procesos de transporte por lixiviación y escorrentía son los episodios de contaminación de reservas de agua que se han venido observando durante los últimos años por herbicidas utilizados en el olivar, que han afectado al abastecimiento de agua potable de numerosos municipios y obligado a la implantación de caras medidas especiales de potabilización. Estos episodios de contaminación han provocado una considerable alarma social en nuestro país, que ha derivado en la prohibición y/o restricciones de uso de materias activas extensamente empleadas como herbicidas en este cultivo.

El hecho de que las formulaciones convencionales de herbicidas contengan la mayor parte de la materia activa en una forma inmediatamente disponible acentúa el riesgo de pérdidas por transporte del producto fitosanitario y, por consiguiente, los problemas medioambientales y de pérdida de eficacia. Una forma de disminuir la incidencia de los procesos que dan lugar a pérdidas por transporte de los herbicidas que se aplican a los suelos de olivar sería, por tanto, actuar sobre las formulaciones o sistemas de aplicación. El presente trabajo tiene como finalidad desarrollar formulaciones de liberación lenta o controlada de algunos de los herbicidas más utilizados en el cultivo del olivar y evaluar mediante experimentos de laboratorio y de campo los beneficios de emplear las formulaciones desarrolladas, como alternativas a las formulaciones convencionales, con el fin de minimizar el impacto ambiental y aumentar la eficacia de dichos herbicidas. Para la preparación de las formulaciones, los herbicidas se han soportado en montmorillonitas modificadas por el tratamiento con cationes inorgánicos u orgánicos, que fueron cuidadosamente elegidos con el fin de incrementar la afinidad del mineral por los herbicidas seleccionados. La principal contribución del trabajo que se presenta en esta Tesis Doctoral estriba en proporcionar una herramienta que pueda ayudar a disminuir las pérdidas por transporte de los herbicidas aplicados a los suelos de olivar, reduciendo el riesgo de contaminación de las aguas y disminuyendo la cantidad de materia activa necesaria para el control de las malas hierbas.

The environmental problems caused by herbicides commonly applied to olive groves are a matter of current concern in Spain and other Mediterranean countries. In olive groves, conditions that favor offsite movement of herbicides predominate. The composition of soils, usually poor in organic matter, and their pronounced slopes favor herbicide leaching and runoff processes. Climatic conditions of Mediterranean areas, characterized by short but heavy rainfall events, exacerbate the risk of herbicide leaching and runoff, particularly if such rainfall events take place shortly after herbicide application. In fact, important cases of contamination of drinking water bodies by herbicides applied to olive groves have occurred in Southern Spain in the past few years, affecting the drinking water supply of many towns, greatly increasing the water purification costs, and leading Spanish authorities to prohibit or restrict the use of several herbicides widely applied for weed control in olive crop.

The fact that conventional herbicide formulations in current use contain most of the active ingredient in an immediately available form that is readily released into the environment exacerbates the risk of herbicide leaching and runoff, and in turn the risk of ground and surface water contamination. In this regard, it has been proposed that the use of herbicide controlled-release formulations can, in many cases, supply the active ingredient at the required rate, thus reducing the amount of chemical needed for the pest control and decreasing the risk to the environment. The objectives of this work were: 1) to develop controlled-release formulations for some of the main herbicides used for weed control in olive groves, and 2) to evaluate, through laboratory and field experiments, the ability of the proposed formulations to reduce herbicide transport losses and improve the efficacy of the agrochemical, as compared to the use of conventional formulations. For the preparation of the new formulations, the herbicides were supported on montmorillonites pre-treated with inorganic and organic cations, which were carefully selected to increase the affinity of the mineral for each herbicide. The results reported in this work are expected to provide users and authorities with a tool that could help reducing the extensive transport losses usually affecting herbicides applied to olive groves, with the benefits of decreasing the risk of water contamination and increasing herbicide efficacy.



1. Introducción



1.1. PROBLEMÁTICA DEL USO DE HERBICIDAS EN EL CULTIVO DEL OLIVAR

Los residuos de plaguicidas que se encuentran en las aguas superficiales y subterráneas aumentan continuamente como resultado del creciente y continuado empleo de estas sustancias en agricultura y otros campos de actividad. Según el Anuario de Estadística Agroalimentaria 2007, publicado por el Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino (MARM, 2007a), en España el mercado de plaguicidas se ha mantenido en la última década relativamente estable, con un volumen de ventas en torno a los 800 millones de euros. Sin embargo, cuando se representa el consumo de plaguicidas en relación con la superficie cultivada (Figura 1), se observa que el uso de estos compuestos ha experimentado un incremento progresivo que rompe con el fuerte descenso iniciado a finales de la década de los ochenta. Esto es debido a que, aunque en un principio la aplicación de las reformas de la Política Agraria Común de 1992 contribuyó parcialmente a una reducción del consumo de plaguicidas, los procesos de intensificación agraria han derivado en una mayor aplicación sobre menos superficie (MARM, 2006). Esta tendencia apunta a un agravamiento de los problemas medioambientales por el uso de plaguicidas en las zonas específicas de aplicación, ya que en dichas zonas se ha intensificado el uso de los mismos.

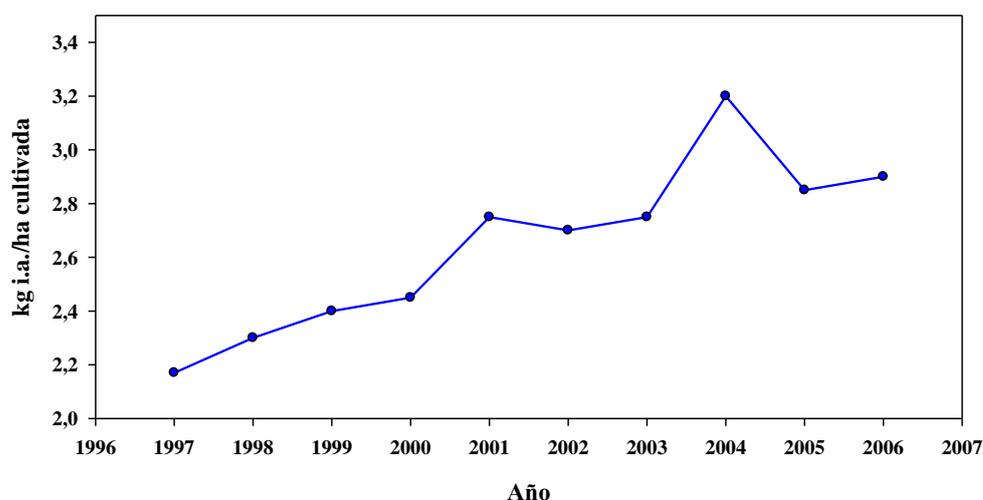


Figura 1. Consumo de plaguicidas en España en relación a la superficie cultivada (Fuente: MARM, 2007b).

Aunque el comportamiento óptimo de los plaguicidas implica su presencia en el lugar y momento apropiado, una vez que llegan al suelo o la planta, estos compuestos experimentan una serie de procesos (arrastre, lixiviado, volatilización...) que por una parte les restan eficacia y por otra originan su presencia en lugares no deseados, con los consiguientes problemas medioambientales. Dos de los efectos secundarios más adversos son el proceso de lixiviación y el de arrastre superficial o escorrentía, por los que los plaguicidas llegan a las aguas subterráneas y superficiales convirtiéndose en fuentes de contaminación difusa, que son las más difíciles de remediar. Por otra parte, cuando estas aguas son utilizadas como aguas potables, la presencia de plaguicidas en ellas tiene una repercusión económica desfavorable en los procesos de potabilización (Anselme et al., 1992), ya que según el Real Decreto 140/2003, basado en la Directiva CE sobre agua potable 80/778/CE y la nueva directiva 98/83/CE, ningún plaguicida debe sobrepasar los 0.1 µg/l y la suma total de plaguicidas no debe sobrepasar los 0.5 µg/l.

La presencia de plaguicidas en aguas superficiales y subterráneas de nuestro país es un hecho que se ha puesto de manifiesto en diversos estudios de monitorización de aguas (Picó et al., 1994; Sánchez-Camazano et al., 1995; Pérez-Ruzafa et al., 2000; Garrido et al., 2000; Carabias-Martínez et al., 2003; Hildebrandt et al., 2008). El riesgo de contaminación de acuíferos se agrava cuando el empleo de plaguicidas es continuado, como ocurre en monocultivos y cultivos arbóreos, y más aún cuando se aplican prácticas agrícolas, como por ejemplo la cultura de mínimo laboreo, que impone un incremento en la utilización de productos fitosanitarios. Un escenario de alto riesgo en nuestro país lo constituye el uso de herbicidas en el cultivo del olivar, que en los últimos años ha dado lugar a numerosos episodios de contaminación de aguas, causando problemas para el medio ambiente y la salud pública.

1.1.1. EL CONTROL DE MALAS HIERBAS EN EL OLIVAR: HERBICIDAS AUTORIZADOS

El cultivo del olivo en el Mediterráneo proviene de tiempos antiguos. Incluso desde la época romana, el cultivo del olivo se extendía por toda la cuenca mediterránea. Este longevo árbol integra e identifica económica, social y culturalmente a los habitantes de esta cuenca y determina su paisaje rural. Para los habitantes del Mediterráneo, el aceite de oliva constituye la fuente principal de nutrición de grasas, su producto de exportación más valioso y es identificado con su cultura. Incluso ahora, el cultivo del olivo tiene una importancia múltiple para el Mediterráneo. El olivo, que crece principalmente en suelos inclinados, de baja fertilización y en terrazas de piedra, ha limitado los requerimientos de riego y sostiene el frágil recurso natural del Mediterráneo. Hoy, el cultivo del olivo en el Mediterráneo es una

fuente de ingreso adicional y mantiene a la población de las áreas rurales durante el período de invierno, las cuales se benefician en verano de la actividad turística en el mar. Aunque es un agro-ecosistema, el olivar se parece a un ecosistema natural Mediterráneo y el abandono lo convierte en un bosque natural Mediterráneo (Loumou y Giourga, 2003).

El olivar en España supone una dedicación de 2.280.000 ha (25% de la mundial) de las cuales un 65% están localizadas en Andalucía (Figura 2), considerándose como monocultivo en provincias como Jaén y parte de Córdoba (Barranco et al., 2001). En Andalucía, el olivar es con diferencia el cultivo que ocupa una mayor superficie. La superficie dedicada al cultivo del olivar llega a duplicar la dedicada al cultivo de cereales en su conjunto (Figura 3).

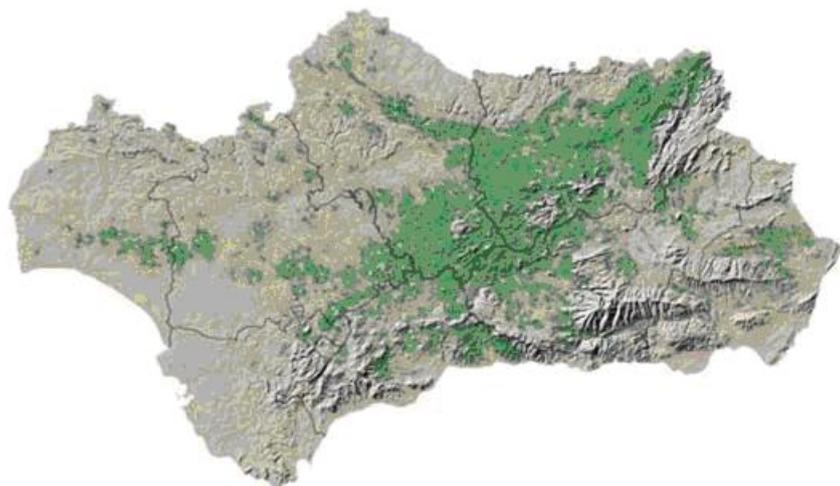


Figura 2. Distribución geográfica del olivar en Andalucía.

El olivo es uno de los cultivos mejor adaptados al clima mediterráneo, el cual se caracteriza por precipitaciones escasas e irregularmente distribuidas a lo largo del año y entre años, junto con temperaturas muy elevadas y prácticamente nula pluviometría en verano. Las malas hierbas del olivar constituyen una flora muy diversa, en su mayor parte de origen mediterráneo y, por tanto, perfectamente adaptadas al medio en el que se cultiva el olivo (Saavedra y Pastor, 1994).

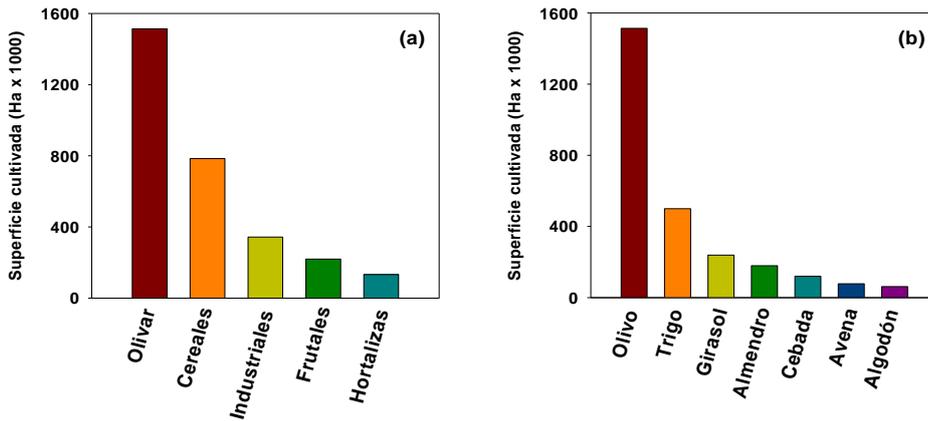


Figura 3: Distribución de la superficie cultivada en Andalucía: a) por grupos de cultivos, b) por cultivos individuales. (Junta de Andalucía, 2006a).

Dos aspectos fundamentales justifican la necesidad de un control adecuado de las malas hierbas en el olivar. Por una parte, el agua es un factor limitante para la producción, y la disponibilidad de agua en primavera y verano es primordial para que la brotación sea buena y para que la floración y cuajado de frutos sean óptimos, asegurando la producción. Por otra parte, los costes de recolección constituyen el capítulo más importante de gastos, y la presencia de malas hierbas la dificulta y encarece en gran medida cuando se produce caída de frutos maduros al suelo. En consecuencia, el control de malas hierbas en el olivar está dirigido fundamentalmente a: 1) limitar la competencia por el agua, sobre todo desde finales de invierno y durante el verano y 2) mantener en invierno el suelo bajo los árboles limpio de malas hierbas durante la recolección (Saavedra y Pastor, 1994).

La gran diversidad de la flora del olivar unida a su adaptación al medio hace que su control mediante el uso de herbicidas requiera en general una combinación bien elegida de materias activas residuales y de absorción foliar aplicadas en el momento oportuno. Los tratamientos suelen consistir en la aplicación de un herbicida residual a finales de invierno más tratamientos de repaso, en caso necesario, con herbicidas de contacto a mediados de la primavera y/o finales del verano, y en la aplicación de un herbicida residual a mediados de otoño más, en su caso, un tratamiento de repaso para facilitar la recolección. La alternancia de materias activas, a ser posible pertenecientes a familias diferentes, resulta fundamental para que no se produzca selección de especies tolerantes o mal controladas por un determinado herbicida (Pastor, 2002).

La Tabla 1 resume las materias activas actualmente autorizadas como herbicidas en el olivar, junto con algunas de sus principales características. La tabla muestra el grado

de absorción y movilidad en la planta, persistencia en el suelo, momento de aplicación (pre- o post emergencia de la planta a controlar) e hierbas que controlan preferentemente.

Tabla 1. Materias activas incluidas en los productos comerciales registrados autorizados como herbicidas en el olivar (Junta de Andalucía, 2006b; MARM, 2010).

<i>Materia Activa</i>	<i>Absorción por la planta</i>	<i>Movilidad en la planta</i>	<i>Persistencia en el suelo</i>	<i>Momento de aplicación</i>	<i>Hierbas que controla preferentemente</i>
Amitrol	H-r	A-D	*	Pre-POST	Anuales y perennes
Diclobenil	H-R	A-d	***	PRE	Anuales y perennes
Diflufenican	H-r	E	**	PRE-post	Anuales Dicotiledóneas
Diurón	R	A	***	PRE-post	Hoja ancha Gramíneas
Flazasulfurón	H-R	A-D	**	PRE-post	Anuales
Fluometurón	R-h	A-D	**	PRE-post	Dicotiledóneas Monocotiledóneas
Fluroxipir	H	D	*	POST	Anuales y perennes Dicotiledóneas
Glifosato	H	A-D	0	POST	Anuales y perennes
Glufosinato amónico	H	A-D	*	POST	Anuales y perennes
MCPA	H-R	D	*	Pre-POST	Anuales y perennes Dicotiledóneas
Oxifluorén	H	E	**	PRE-post	Anuales
Quizalofop-P-etil	H	A-D	*	Pre-POST	Anuales y Perennes
Terbutilazina	h-R	A	**	PRE-post	Anuales
Tribenurón-metil	H	A-D	0	Pre-POST	Dicotiledóneas Anuales

- **Absorción por la planta:** por hojas mucho (H) o poco (h); por raíz mucho (R) o poco (r).
- **Movilidad en la planta:** ascendente (A), descendente (D), ascendente escasa (a), descendente escasa (d), muy escasa o nula (E).
- **Persistencia en el suelo:** nula (0), 0-2 meses (*), 3-4 meses (**), 5-12 meses(***).
- **Momento de aplicación:** preemergencia (PRE y pre); postemergencia (POST y post). En mayúsculas se indica la acción principal, en minúscula la secundaria.

Conviene resaltar que las autorizaciones de materias activas han venido sufriendo modificaciones importantes en los últimos años en cuanto a su inclusión o no en el Anexo I de la directiva europea 91/414/CEE, relativa a la autorización de comercialización de productos fitosanitarios, y también como consecuencia de restricciones estatales y/o autonómicas motivadas por riesgos específicos asociados al uso de determinadas materias

activas. Así, durante la última década, materias activas que venían empleándose en el olivar como simazina, norflurazona, terbutrina o tiazopir han sido retiradas del mercado por su exclusión de la lista de sustancias autorizadas por la Unión Europea (Anexo I de la directiva 91/414/CEE), mientras que otras están en proceso de retirada. Por otra parte, las autorizaciones de algunas materias activas, como la terbutilazina o el diurón, han sufrido, por parte del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, restricciones y suspensiones temporales a nivel nacional en determinados ámbitos territoriales de riesgo por su proximidad a embalses destinados a la producción de aguas de consumo humano. En el caso del diurón, la CE decidió con fecha 13 de junio de 2007 no incluirlo en el Anexo I de la directiva 91/414/CEE, estableciendo un plazo máximo de aplicación del producto hasta diciembre de 2008 (decisión 2007/417/CE). Sin embargo, dicha decisión ha sido revisada recientemente autorizando su uso, aunque a dosis de aplicación inferiores a las que este herbicida venía aplicándose con anterioridad (directiva 2008/91/CE, BOE de 31 de marzo de 2009).

En el caso de explotaciones de olivar acogidas al sistema de Producción Integrada, la Junta de Andalucía limita el uso de herbicidas autorizados únicamente a las materias activas recogidas en la Tabla 2 (BOJA, nº 88 de 24 de abril de 2008). Estas materias activas han sido seleccionadas, entre las autorizadas (Tabla 1), de acuerdo con los criterios de menor impacto ambiental, mayor eficacia, menor clasificación toxicológica, menor problema de residuos, menor efecto sobre la fauna auxiliar y menores riesgos de fenómenos de resistencias (Orden de 15 de abril de 2008, BOJA nº 88 de 24 de abril de 2008). La Producción Integrada, entendida como un modelo de producción intermedio entre la Agricultura Convencional y la Agricultura Ecológica, reduce, controla y limita al máximo el uso de formulados de síntesis, utilizándolos sólo cuando resultan absolutamente imprescindibles.

Tabla 2. Herbicidas permitidos en olivar incluidos en el Reglamento Específico de Producción Integrada de Olivar de la Junta de Andalucía (Orden de 15 de abril de 2008, BOJA nº 88 de 24 de abril de 2008).

Tipo de herbicida	Materia activa	Modo de acción			Persistencia en suelo	Observaciones
		Residual	Contacto	Traslocación		
Preemergencia/ Postemergencia temprana	Diflufenican	xx	xx	o	+++	Aplicaciones en preemergencia: aplicar en suelo limpio de restos vegetales y no remover posteriormente la superficie del terreno, para asegurar su eficacia. Restricciones: (1+4)
		xx	o	xxx	+	Restricciones: (1+2+3+4)
Preemergencia/ Postemergencia temprana	Flazasulfurón	x	o	xxx	+	Actuación también en preemergencia pero con escasa incidencia
	Amitrol	x	o	xxx	+	Exclusivamente contra dicotiledóneas. No emplear con temperaturas inferiores a 6°C. Restricciones: (1+4)
Preemergencia/ Postemergencia temprana	Fluroxipir	o	xxx	xxx	o	Máxima eficacia en perennes en floración. Restricciones: (1+4)
	Glifosato	o	xxx	x	o	Restricciones: (1+4)
Postemergencia	Glufosinato amónico	x	o	xxx	+	Evitar las aplicaciones sobre líneas de riego localizado. No aplicar: -Desde 4-6 semanas antes de la fecha habitual de floración hasta después del cuajado. -Con temperaturas elevadas. -En periodos de sequía.
	MCPA	xx	xx	o	+++	Aplicar en suelo limpio de restos vegetales y no remover posteriormente la superficie del terreno. No aplicar: -Más de dos años consecutivos en zonas con riesgo de erosión. -En proximidades de cursos de agua. Restricciones: (1+4)
Postemergencia	Oxifluorfen	o	o	xxx	o	Mejores resultados si se aplica sobre hierbas jóvenes y en crecimiento activo.
	Tribenurón metil					

MODO DE ACCIÓN: (O) nula; (X) débil; (XX) importante; (XXX) muy importante. **PERSISTENCIA EN SUELO:** (O) nula; (+) semanas; (++) mediana; (+++) pocos meses; (++++) más de 4 meses.

1. No aplicar con fruto caído en el suelo que vaya a ser recolectado. Caso de existir fruto en el suelo deberá ser eliminado (restricción general para todos los herbicidas).
2. No aplicar la misma materia activa más de dos años consecutivos. Si el suelo es ligero no aplicarla en años consecutivos.
3. No aplicar en suelos arenosos. 4. No mojar las partes verdes del árbol.

En cuanto a su modo de acción, una vez que entra en la planta a través de las hojas (absorción foliar) o de la raíz (absorción radicular), el herbicida se trasloca por vía apoplástica (xilema), simpática (floema) o ambas, a menos que sea un herbicida de contacto, no traslocable. El HRAC (Herbicide Resistance Action Committee) realiza una clasificación de los herbicidas basada en su modo de acción. Esta clasificación proporciona información sobre la interacción entre herbicida y planta y consecuentemente expresa el efecto fitotóxico del herbicida (Schmidt, 1997).

La mayoría de los herbicidas son letales para las plantas debido a su acción sobre un sitio primario de importancia biológica. La acción del herbicida consta de dos fases:

- Movimiento del herbicida al sitio de acción.
- Consecuencias metabólicas que resultan de la interacción con este sitio.

La primera fase comienza cuando se aplica el herbicida en la planta (vía foliar o radicular). Con la llegada del herbicida al sitio de acción se producen una serie de pasos tales como la entrada a las células, la difusión en distancias cortas, el transporte a largas distancias, la entrada en orgánulos subcelulares. La interacción del herbicida con el sitio de acción es el primer paso de la segunda fase, que está seguido por una serie de consecuencias tóxicas que producen la muerte de la planta (de Prado y Cruz-Hipólito, 2005) (Figura 4).



Figura 4. Secuencia de sucesos desde la entrada en la planta del herbicida hasta la muerte de la planta.

La Tabla 3 muestra algunos de los principales modos de acción de los herbicidas y algunos ejemplos dentro de los herbicidas actualmente autorizados para el control de malas hierbas en el olivar.

Tabla 3. Principales modos de acción de los herbicidas y algunos ejemplos dentro de los permitidos en el olivar (Pringnitz, 2001).

Modos de acción	Herbicidas permitidos en el olivar
Inhibidores de la síntesis de lípidos	Quizalofop-p-etil
Inhibidores de la síntesis de aminoácidos	Glifosato
	Flazasulfurón
	Tribenurón-metil
Reguladores del crecimiento: auxinas sintéticas	Fluroxipir
	MCPA
Inhibidores de la fotosíntesis	Terbutilazina
	Diurón
	Fluometurón
Inhibidores de pigmentos	Amitrol
	Diflufenican
Disruptores de las membranas celulares	Oxifluorfen
Metabolismo del nitrógeno	Glufosinato
Inhibidores del crecimiento del brote	Diclobenil

1.1.2. CONTAMINACIÓN DE LAS AGUAS POR HERBICIDAS UTILIZADOS EN EL OLIVAR

El uso de herbicidas en el olivar se ha convertido en motivo de una gran preocupación en la actualidad por el impacto que dichos herbicidas pueden tener debido a su alta movilidad en diferentes compartimentos como son el suelo y las aguas superficiales y subterráneas, algunas de las cuales son utilizadas para uso doméstico y otras para riego del propio olivar y de otros cultivos. Por una parte, la naturaleza de muchos de los suelos de olivar, pobres en materia orgánica, favorece que se produzcan procesos de percolación o lixiviación de los agroquímicos, que afectan a las capas freáticas. Además, el olivar en Andalucía se encuentra, en un alto porcentaje, en zonas de considerable pendiente (Tabla 4), como se demuestra en el hecho de que el 74% de la superficie de este cultivo se encuentra en lugares con pendientes por encima del 7% (Junta de Andalucía, 2003) (Figura

5). Esto hace que tras episodios de abundantes lluvias se produzcan unas escorrentías que pueden transportar importantes cantidades de herbicidas, especialmente si las lluvias se producen en un período corto de tiempo tras la aplicación del producto fitosanitario (Saavedra y Pastor, 2002; Albarrán, 2004). El clima mediterráneo se caracteriza por una estación fría y húmeda (otoño e invierno), en la cual se producen el 80% de las precipitaciones, y por una estación cálida y seca (primavera y verano), dándose períodos de breves pero intensas lluvias que pueden provocar grandes pérdidas de suelos y de los agroquímicos aplicados a los mismos (Ramos y Porta, 1994).

Tabla 4. Distribución de explotaciones olivereras en Andalucía por pendientes (Junta de Andalucía, 2003).

<i>Pendiente</i>	<i>Superficie en hectáreas</i>
< 7%	384.570 (26%)
7-15%	566.775 (38%)
15-30%	439.698 (30%)
>30%	87.853 (6%)



Figura 5. Campo de olivares en una superficie con pendiente.

Como consecuencia de estos procesos de transporte por lixiviación y escorrentía y de la intensificación del uso de productos fitosanitarios, en los últimos años se han producido en Andalucía varios casos de contaminación de aguas destinadas al consumo público por herbicidas utilizados en el olivar, que han afectado al abastecimiento de agua potable de numerosos municipios y obligado a la implantación de caras medidas especiales de potabilización (Tabla 5). Así, en Diciembre de 2002, la detección de los herbicidas simazina y terbutilazina en aguas del pantano del Rumblar afectó al abastecimiento de agua potable de 84.000 vecinos de la comarca de Andújar (Jaén) y dos años más tarde, también en Jaén, 30.000 habitantes de la comarca de El Condado sufrieron las mismas consecuencias por la contaminación del pantano del Dañador. En Julio de 2005, fueron 165.000 vecinos de la provincia de Córdoba los afectados por la presencia de los herbicidas terbutilazina y diurón en el pantano de Iznájar y en 2007, el bajo nivel de los pantanos hizo aflorar nuevos casos de contaminación por herbicidas en embalses de la cuenca del Guadalquivir. Estos episodios ponen de manifiesto la magnitud del problema de contaminación por herbicidas utilizados en el cultivo del olivar, lo que, de hecho, ha llevado a las autoridades a prohibir o restringir el uso en el olivar de varias materias activas que venían siendo extensamente empleadas, como la simazina, el diurón o la terbutilazina (Resolución de 8 de Agosto de 2003, MAPA).

Tabla 5. Algunos episodios de contaminación de reservas de agua que ha provocado en los últimos años el uso de herbicidas en el cultivo del olivar.

<i>Embalse</i>	<i>Año</i>	<i>Herbicida</i>	<i>Población afectada</i>
Rumblar (Jaén)	2002	Simazina/ Terbutilazina	84.000
Dañador (Jaén)	2004	Terbutilazina	20.000
Iznájar (Córdoba)	2005	Terbutilazina/ Diurón	200.000
Quebrajano (Jaén)	2007	Terbutilazina	260.000

1.1.3. ESTRATEGIAS PARA REDUCIR LA CONTAMINACIÓN POR PLAGUICIDAS: EFECTO DE LAS FORMULACIONES

Con el fin de reducir la incidencia de los procesos de transporte que dan lugar a pérdidas de eficacia y contaminación de aguas por parte de los plaguicidas utilizados en agricultura se han propuesto diferentes estrategias, tales como el empleo de cubiertas vegetales para reducir el arrastre superficial (Krutz et al., 2005), la adición de enmiendas

orgánicas para aumentar la capacidad de retención de los suelos (Albarrán et al., 2003), o actuar sobre los formulados o formas de aplicación del plaguicida (Lagaly, 2001).

Una de las causas que contribuyen a acentuar los procesos de transporte de los herbicidas que se aplican al suelo está relacionada con la forma en la que dichos herbicidas son aplicados, es decir con las formulaciones. La gran mayoría de las formulaciones de herbicidas comerciales contienen la materia activa en una forma inmediatamente disponible para la planta a combatir y que, por lo tanto, también es susceptible de transportarse rápidamente por procesos de lixiviación y escorrentía (Johnson y Pepperman, 1998; Celis et al., 2002a). Esto hace que puedan producirse grandes pérdidas de plaguicida, especialmente si se producen episodios de abundantes lluvias poco después de la aplicación del producto, antes de que éste tenga tiempo de difundir a través de los agregados del suelo y llegar a los sitios de adsorción de los componentes orgánicos y minerales (Cox et al., 2000). El hecho de que los herbicidas se apliquen a dosis considerablemente superiores a las estrictamente necesarias para el control de las malas hierbas se debe precisamente a las grandes pérdidas de agroquímico que se producen cuando éste se aplica en una forma inmediatamente disponible y estas cantidades añadidas en exceso suponen un incremento del riesgo de contaminación de las aguas superficiales y subterráneas (Gerstl et al., 1998a, b; Lagaly, 2001). En el cultivo del olivar, donde por las características de los suelos, condiciones climáticas y momento de la aplicación, se dan condiciones que favorecen la movilidad de los herbicidas, la aplicación de éstos en una forma inmediatamente disponible acentúa la incidencia de los procesos de lixiviación y escorrentía y aumenta el riesgo de contaminación de aguas superficiales y subterráneas y de pérdida de eficacia del producto fitosanitario.

Una forma de disminuir la incidencia de los procesos que dan lugar a pérdidas de eficacia y contaminación de acuíferos por parte de los herbicidas sería, por tanto, actuar sobre las condiciones o sistemas de aplicación. El ejemplo más representativo lo constituyen probablemente las formulaciones de liberación lenta o controlada, en las que, de forma similar a lo que ocurre con ciertas formulaciones farmacológicas (Carretero, 2002), solamente una parte del ingrediente activo se encuentra en una forma inmediatamente disponible, mientras que la mayor parte está atrapada o adsorbida en un soporte adecuado y se va liberando gradualmente con el tiempo. Al proporcionar la materia activa de forma gradual, disminuyen las pérdidas por transporte de los herbicidas aplicados al suelo, aumentando la eficacia del producto fitosanitario y reduciéndose el riesgo de que éste alcance aguas adyacentes. Las principales desventajas de este tipo de formulaciones respecto a las formulaciones convencionales son su mayor coste y la dificultad que supone el desarrollo de adsorbentes y preparaciones que permitan adecuar la velocidad de liberación del producto fitosanitario a la finalidad requerida. Esto hace que, teniendo como

único objetivo el aumento de la eficacia, estas formulaciones no resulten rentables. Hoy en día, sin embargo, existe la necesidad de reducir las cantidades de plaguicidas incorporadas en el medio ambiente y de prevenir la presencia de plaguicidas en nuestras aguas y, por tanto, existe un interés cada vez mayor en retomar el desarrollo de este tipo de formulaciones (Lagaly, 2001; Cornejo et al., 2004, 2008a). En combinación con otras estrategias, como por ejemplo las encaminadas al control de la erosión, el uso de formulaciones más sostenibles podría contribuir significativamente a reducir el impacto de los plaguicidas aplicados a los suelos agrícolas.

Aunque el objetivo de los primeros estudios sobre el desarrollo de formulaciones de liberación lenta era el proteger al plaguicida de rápidas pérdidas de eficacia producidas por fotodescomposición (Margulies et al., 1987, 1994), los estudios más recientes se han centrado en reducir la movilidad del producto fitosanitario para aumentar su eficacia y reducir el riesgo de contaminación de aguas superficiales y subterráneas (Undabeytia et al., 2000; Nennemann et al., 2001; Celis et al., 2005). Diversos estudios han demostrado que la afinidad de distintos plaguicidas por diversos tipos de materiales puede aprovecharse en la preparación de formulaciones de liberación lenta y que la lixiviación del producto fitosanitario tras la aplicación de éstas al suelo suele reducirse en comparación con la aplicación de formulaciones convencionales con la materia activa en una forma inmediatamente disponible. La mayoría de los trabajos realizados en este sentido se han llevado a cabo en condiciones de laboratorio, aunque diversos estudios también han indicado su validez en condiciones reales de campo (El-Nahhal et al., 1998; El Nahhal, 2003; Celis et al., 2005; Cornejo et al., 2008b).

La finalidad del presente trabajo de Tesis Doctoral ha sido evaluar la posibilidad de emplear formulaciones de liberación lenta o controlada como una vía para reducir la movilidad y, por consiguiente, el impacto ambiental asociado a las pérdidas por transporte (lixiviación y escorrentía) que sufren los herbicidas aplicados a los suelos de olivar. Para ello, se han desarrollado formulaciones de tres de los herbicidas más utilizados en el cultivo del olivar (diurón, terbutilazina y MCPA) mediante su soporte en adsorbentes basados en minerales de la arcilla, y, posteriormente, se han llevado a cabo experimentos de laboratorio y de campo para determinar los beneficios de emplear las formulaciones desarrolladas con el fin de reducir la movilidad y, por consiguiente, las pérdidas por transporte de los herbicidas estudiados, respecto al uso de formulaciones comerciales convencionales de los mismos. Para la preparación de las formulaciones, se han elegido montmorillonitas cuyo ambiente interlaminar se ha modificado por la incorporación de cationes inorgánicos u orgánicos, que fueron cuidadosamente seleccionados para incrementar la afinidad del mineral por los herbicidas estudiados. La elección de montmorillonitas como soportes para los herbicidas se ha realizado sobre la base del bajo coste, carácter natural y elevada

superficie tanto externa como interna de los minerales de la arcilla, que además presentan la posibilidad de modificar su superficie mediante tratamientos muy simples que pueden aumentar considerablemente su afinidad por compuestos orgánicos, como los plaguicidas (Cornejo et al., 2008a).

Antes de pasar a presentar y discutir los resultados del trabajo, se incluye una breve introducción acerca de los procesos que determinan la dinámica de los plaguicidas en el suelo, con especial énfasis en aquellos que han sido objeto de estudio en este trabajo, así como acerca de las características y aplicaciones de los minerales de la arcilla, inalterados y modificados, como adsorbentes para prevenir y remediar la contaminación por plaguicidas.

1.2. PROCESOS QUE DETERMINAN LA DINÁMICA DE LOS PLAGUICIDAS EN EL SUELO

Una vez que los plaguicidas llegan al suelo, bien por su aplicación directa al mismo bien por su deposición al aplicarlos a las partes aéreas de las plantas, estos compuestos se ven sometidos a una serie de procesos, que son los que determinan su dinámica y que pueden agruparse en procesos de transferencia o transporte y procesos de transformación o degradación (Tabla 6). Los procesos de transferencia son aquellos por los que el plaguicida se mueve de una fase a otra del suelo o dentro de una misma fase, sin experimentar transformación química y, por tanto, conservando la “carga contaminante”. Los procesos de transformación son aquellos por los que los plaguicidas se transforman o degradan en otros compuestos que pueden ser de igual, mayor o menor toxicidad.

Tabla 6. Clasificación de los procesos que determinan la dinámica de los plaguicidas en el suelo.

<u>PROCESOS</u>	
<u>Transferencia</u>	<u>Transformación</u>
Adsorción-desorción	Degradación química
Volatilización	Biodegradación
Lixiviación	Fotodegradación
Escorrentía	
Absorción	
Difusión	

La mayor parte de estos procesos actúan de forma simultánea, influyéndose mutuamente (Figura 6), considerándose a menudo el proceso de adsorción como el más importante de todos ellos. Esto es debido a que la adsorción es el proceso que determina la cantidad de plaguicida disponible en la disolución del suelo, siendo esta fracción la más susceptible de sufrir muchos de los demás procesos de transporte y degradación (Zhang et al., 2000).

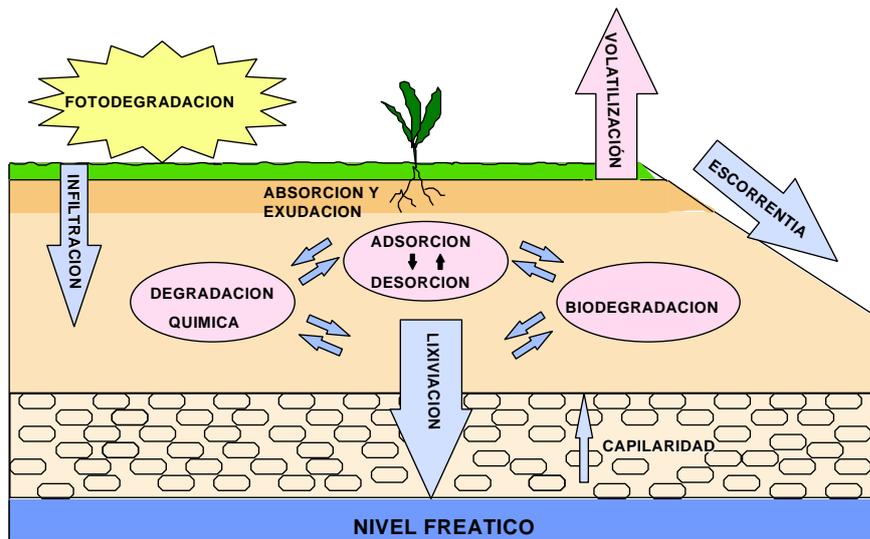


Figura 6. Procesos que determinan la dinámica de los plaguicidas en el suelo.

1.2.1. PROCESOS DE TRANSPORTE

1.2.1.1. Adsorción-desorción

El proceso de adsorción consiste en el paso del plaguicida desde la fase acuosa del suelo (o en casos de extrema aridez desde la fase gaseosa) a la superficie de las partículas sólidas, sin producir cambios en la composición de estas últimas, siendo la desorción el proceso inverso (Calvet, 1989). La adsorción es un proceso esencial en la dinámica del plaguicida, ya que determina la cantidad de plaguicida libre en la disolución del suelo y, por tanto, la cantidad susceptible de moverse y transformarse a través de los demás procesos. La lixiviación, la volatilización y la biodisponibilidad de un plaguicida, por ejemplo, suelen disminuir por los procesos de adsorción. En cuanto a la desorción de las moléculas adsorbidas, ésta puede ser total (Bowman y Sans, 1985; Wauchope y Myers, 1985), en cuyo caso hablamos de adsorción reversible, o puede no serlo en gran medida (Celis y Koskinen, 1999), hablándose en este caso de adsorción irreversible.

1.2.1.1.1. Factores que influyen en la adsorción-desorción

Algunos de los factores más importantes que influyen en el proceso de adsorción-desorción de los plaguicidas en el suelo son los siguientes:

- **Naturaleza química del plaguicida.** Un factor fundamental en la adsorción de los plaguicidas en el suelo es la propia naturaleza química de la molécula del plaguicida. Las características físico-químicas del plaguicida pueden indicarnos su comportamiento en la adsorción. Entre las características más determinantes destacan la estructura, carga y tamaño molecular, además de su solubilidad en agua. Con respecto a la *estructura molecular*, Gramatica y Di Guardo (2002) hacen una aproximación que permite una rápida pre-determinación y monitorización de la distribución medioambiental de los pesticidas conociendo únicamente la estructura molecular de los mismos. Según Bailey y White (1970), los factores estructurales que determinan el carácter químico de los plaguicidas y, por tanto, su influencia en la adsorción son: a) la naturaleza de los grupos funcionales del compuesto orgánico, b) la posición de los grupos sustituyentes respecto al grupo funcional y c) la presencia y la magnitud de insaturaciones en la molécula, que puede afectar al balance hidrofílico-hidrofóbico.

La *carga molecular* del compuesto orgánico y su distribución son factores a tener muy en cuenta en el proceso de adsorción. Los compuestos que existen en disolución como cationes son rápidamente atraídos por las superficies cargadas negativamente de los minerales de la arcilla y sustancias húmicas, al contrario de lo que ocurre con los compuestos aniónicos, que son repelidos por tales superficies y atraídos por las superficies cargadas positivamente de los óxidos metálicos. En ambos casos, pueden establecerse enlaces iónicos y la adsorción será proporcional a la densidad de carga y dependerá del pH del suelo (Weber, 1982; Che et al., 1992; Weber y Swain, 1993). En otros casos, la carga puede ser débil, produciéndose entonces una simple polaridad de la molécula y la interacción con la superficie adsorbente puede darse entre dipolos inducidos o permanentes. En disolución acuosa, los compuestos de baja polaridad quedan retenidos preferentemente por la materia orgánica mediante interacciones hidrofóbicas, ya que las moléculas de agua compiten fuertemente por las superficies polares.

El *tamaño molecular* del plaguicida y su *solubilidad* son propiedades muy relacionadas entre sí, influyendo ambas en la magnitud del proceso de

adsorción. Así, un mayor tamaño molecular disminuye la solubilidad en agua, afectando al grado de adsorción de manera variable, ya que la relación entre la solubilidad de un plaguicida y su grado de adsorción no está muy clara (Nemeth-Konda et al., 2002). Según Chiou y Kile (1994) existe una relación inversa entre la solubilidad en agua de un compuesto orgánico y su adsorción a la materia orgánica del suelo, pero esta relación variará considerablemente según la polaridad del compuesto. En el caso de que se considere la adsorción por los componentes minerales, generalmente más abundantes, esta relación normalmente es la contraria; cuanto más polar y más soluble sea el plaguicida más se adsorberá. Por otra parte, un mayor tamaño de la molécula orgánica puede, por un lado, impedir su acceso a sitios de adsorción en el interior de microporos de óxidos metálicos, minerales de la arcilla y otros componentes de los suelos, pero, por otro lado, puede incrementar las fuerzas de van der Waals de dispersión que suelen ser proporcionales al área de contacto.

- **Composición coloidal del suelo.** De los componentes del suelo, los minerales de la arcilla, los óxidos metálicos y la materia orgánica (componentes coloidales del suelo) aportan gran parte de la superficie involucrada en los procesos de adsorción. La importancia de cada uno de estos componentes depende en gran medida de las características de carga del compuesto a adsorber. Los componentes coloidales del suelo, entendidos como aquellos con un tamaño de partícula inferior a 2 μm , son por su elevada superficie específica y reactividad superficial los principales responsables de las interacciones que tienen lugar entre la fase sólida del suelo y solutos como los plaguicidas. Los componentes coloidales pueden ser orgánicos o inorgánicos.

Componentes orgánicos. Los componentes orgánicos de la fracción coloidal del suelo pueden dividirse en dos grupos: sustancias no húmicas y sustancias húmicas. Las sustancias no húmicas están formadas por glúcidos, proteínas, lípidos, ácidos orgánicos y otros compuestos de bajo peso molecular procedentes de restos animales y vegetales. Son atacados o degradados fácilmente por los microorganismos (Khan, 1980). Las sustancias húmicas se forman a partir de las no húmicas a través de procesos de biodegradación y de síntesis. Son más estables y se caracterizan por tener una estructura química compleja y amorfa, carácter ácido, color oscuro y elevado peso molecular (Aiken et al., 1985). Las sustancias húmicas se dividen en: a) ácidos fúlvicos: solubles en medios ácidos y alcalinos; b) ácidos húmicos: solubles en medio alcalino e

insolubles en medio ácido y c) huminas: insolubles en ambos (Schnitzer y Khan, 1972). Estos tres grupos se diferencian en el peso molecular y en el contenido en grupos funcionales.

Los compuestos orgánicos apolares interaccionan fundamentalmente con las regiones hidrofóbicas de la materia orgánica del suelo de forma que la adsorción es menor al aumentar el contenido en grupos funcionales polares (Rutherford et al., 1992). Por el contrario, las regiones hidrofílicas contribuyen a la retención de solutos polares, más aún teniendo en cuenta que la saturación en agua de la materia orgánica del suelo aumenta todavía más su polaridad y, por tanto, su compatibilidad con los solutos polares (Rutherford et al., 1992; Nègre et al., 2001).

Excepto en el caso de solutos muy polares o suelos con bajos contenidos en materia orgánica, se considera que los coloides orgánicos del suelo juegan un papel prioritario en los procesos de adsorción. Es frecuente obtener una correlación bastante alta adsorción-contenido de materia orgánica (Wolfe et al., 1990; Ferreira et al., 2002), lo que según Chiou et al. (1985) es una consecuencia de la alta afinidad de las moléculas de agua por las superficies minerales, que quedan por tanto excluidas para la adsorción de compuestos orgánicos.

Componentes inorgánicos. La fracción coloidal inorgánica del suelo está compuesta en su mayoría por filosilicatos y por óxidos, hidróxidos y oxihidróxidos metálicos, fundamentalmente de Fe, Al y Si. Tradicionalmente, el término "arcilla" se ha usado para referirse al material inorgánico de tamaño menor de 2 μm , mientras que "mineral de la arcilla" se ha usado para referirse a un tipo específico de minerales que se encuentran en la fracción de tamaño "arcilla" (< 2 μm) de los suelos (Moore y Reynolds, 1987). Estas definiciones han sido objeto de algunas matizaciones, aunque manteniendo estos conceptos fundamentales (Guggenheim y Martin, 1995).

Los *filosilicatos* son silicatos laminares cuya estructura se puede derivar de la unión de unidades tetraédricas Si-O y unidades octaédricas Al-(O, OH) ó Mg-(O, OH). Capas bidimensionales de tetraedros condensan con capas bidimensionales de octaedros dando lugar a láminas tridimensionales cuyo apilamiento origina la estructura global del mineral. Una descripción más detallada del concepto, características estructurales y clasificación de los minerales se aporta en el apartado 1.3.1. Los minerales de la arcilla están caracterizados por su

elevada superficie específica. La montmorillonita y vermiculita (880 m²/g) tienen superficies internas accesibles al agua, electrolitos y algunos compuestos orgánicos como los plaguicidas.

La estructura de los *óxidos metálicos* consiste en un empaquetamiento cúbico ó hexagonal compacto de aniones O²⁻ y/o OH⁻ con los cationes metálicos (Fe³⁺, Al³⁺, Mn⁴⁺, Mn³⁺) ocupando posiciones octaédricas. Los diferentes óxidos metálicos se diferencian en la disposición de las unidades octaédricas y en el grado en el que éstas comparten vértices (un O compartido), aristas (2 O compartidos) o caras (3 O compartidos).

Los óxidos e hidróxidos se caracterizan por tener una alta superficie específica, por lo que son buenos adsorbentes de compuestos orgánicos, fundamentalmente aniónicos (Hingston et al., 1972; Filius et al., 1997; Celis et al., 1999c). Una característica importante de los óxidos metálicos es la variabilidad de la carga superficial en función del pH del medio (Hingston et al., 1972).

- **Características de la disolución del suelo.** El pH del suelo tiene una importancia especial en la adsorción de especies ionizables, ya que determina la carga superficial de los componentes con carga variable del suelo, así como la forma que, según su naturaleza química, presenta la molécula de plaguicida. La composición de la disolución del suelo influye en gran medida en la adsorción de iones orgánicos y además también puede influir en la solubilidad del plaguicida (Clay et al., 1988), afectando por tanto indirectamente a la adsorción. En el caso de moléculas neutras, Calvet et al. (1980) han observado que un incremento de la fuerza iónica por encima de la unidad da lugar a un incremento en la adsorción.
- **Otros factores.** La influencia que otros factores como la humedad del suelo, la temperatura o el tiempo de residencia del plaguicida en el suelo pueden ejercer sobre la adsorción ha quedado bien demostrada en diversos estudios. En general, la adsorción aumenta al disminuir el contenido en agua del suelo, al disminuir la temperatura y al aumentar el tiempo de residencia del plaguicida en el suelo (Calvet, 1989).

1.2.1.1.2. Estudios de adsorción: isotermas de adsorción

La medida de la adsorción de plaguicidas a suelos y sus componentes suele llevarse a cabo mediante la obtención de isotermas de adsorción, que se obtienen experimentalmente en el laboratorio haciendo interaccionar cantidades conocidas de adsorbente con

disoluciones con diferentes concentraciones iniciales del plaguicida a una temperatura determinada. Las isothermas de adsorción resultantes representan la cantidad de plaguicida adsorbido por unidad de masa del adsorbente (C_s) frente a su concentración en la disolución de equilibrio (C_e). Según Giles et al. (1960), las isothermas de adsorción de compuestos orgánicos se pueden clasificar en cuatro clases principales dependiendo de la pendiente del tramo inicial de la curva. Según estos autores, la forma de la isoterma está relacionada con el mecanismo de adsorción, la naturaleza de la molécula a adsorber y la superficie adsorbente. En la Figura 7 se muestran las cuatro clases principales de isothermas de adsorción:

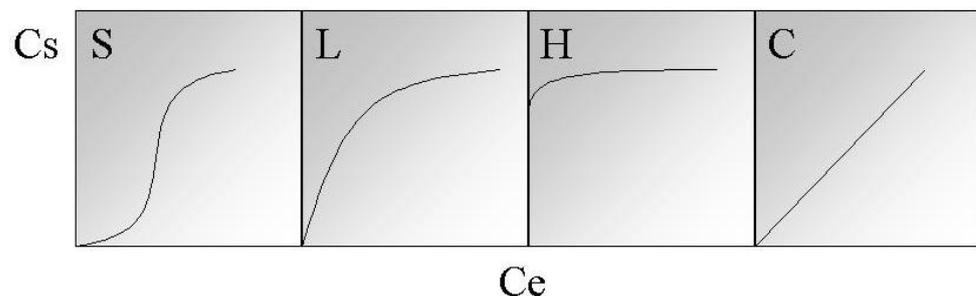


Figura 7. Tipos de isothermas de adsorción según la clasificación de Giles et al. (1960).

- **Isothermas tipo S:** La curvatura inicial de la isoterma indica que la adsorción está facilitada a elevadas concentraciones de soluto. Suelen observarse cuando se da una interacción específica entre el soluto y el adsorbente, cuando existe una moderada atracción entre las moléculas de soluto adsorbidas o cuando las moléculas de soluto y las de disolvente compiten por los sitios de adsorción del adsorbente.
- **Isothermas tipo L:** La curvatura inicial de la isoterma indica que a medida que transcurre la adsorción aumenta la dificultad para que las moléculas de soluto encuentren sitios de adsorción vacantes. No suele haber fenómenos de competencia entre el soluto y el disolvente por los sitios de adsorción, por lo que a menudo se habla de adsorción específica.
- **Isothermas tipo H:** Se consideran un caso especial de las isothermas tipo L en las que el soluto tiene tan alta afinidad por el adsorbente que para disoluciones diluidas la adsorción es total. Es poco habitual y suele darse para adsorbatos de elevado peso molecular como micelas iónicas o especies poliméricas.
- **Isothermas tipo C o de reparto constante:** Se caracterizan por presentar una relación lineal entre la cantidad de soluto adsorbido y la concentración del mismo en la disolución de

equilibrio. Debido a que es el tipo de curva que se obtiene para el reparto de un soluto entre dos disolventes inmiscibles, algunos autores utilizan el término “partición” o “reparto” del soluto entre el adsorbente y la disolución (Rutherford et al., 1992).

Ecuaciones de adsorción. Para representar numéricamente las isotermas de adsorción de los plaguicidas, éstas suelen ajustarse a ecuaciones matemáticas o modelos de adsorción, entre las cuales la ecuación de Freundlich es una de las más utilizadas.

La ecuación de Freundlich es una ecuación empírica que relaciona la cantidad de soluto adsorbido con la concentración en equilibrio existente en disolución. Se puede expresar como:

$C_s = K_f \cdot C_e^{N_f}$, o como su expresión logarítmica:

$$\log C_s = \log K_f + N_f \cdot \log C_e$$

En estas expresiones **C_s** es la cantidad de soluto adsorbida a la concentración de equilibrio **C_e**, mientras que **K_f** y **N_f** son constantes características que pueden obtenerse del ajuste lineal de los datos de **log C_s** vs **log C_e**.

El valor absoluto de **K_f** coincide con la cantidad de soluto adsorbido para una concentración de equilibrio **C_e=1**, por lo que es considerado como una medida de la capacidad de adsorción del sólido para el soluto en cuestión. El parámetro **N_f** coincide con la pendiente de la representación lineal de **log C_s** vs **log C_e** y se considera una medida de la intensidad de la adsorción. Los valores de **K_f** pueden usarse para comparar la capacidad de adsorción de diferentes sistemas adsorbente-adsorbato siempre que las condiciones experimentales hayan sido las mismas (Bowman y Sans, 1985) y los valores de **N_f** sean similares (Hance, 1967), pero es importante que el valor de **C_e=1** esté dentro o cerca del intervalo de concentraciones experimentales (Hermosín y Cornejo, 1987).

Los valores de **N_f** están relacionados con la forma de la isoterma de adsorción: tipo **C** cuando **N_f = 1**, tipo **L** cuando **N_f < 1** y tipo **S** cuando **N_f > 1**.

A veces, la adsorción se evalúa a una única concentración inicial en vez de en un rango de concentraciones. En este caso puede obtenerse la constante de equilibrio, **K_d**, a dicha concentración, como la razón entre **C_s** y **C_e**, la cual puede utilizarse para comparar el grado de adsorción de diferentes compuestos en un mismo suelo o de un mismo compuesto en diferentes suelos en unas condiciones experimentales determinadas y a la concentración inicial de compuesto en cuestión.

1.2.1.1.3. Reversibilidad de la adsorción

La desorción es el proceso contrario a la adsorción, por el que las moléculas adsorbidas vuelven a la disolución del suelo. El estudio de la desorción suele llevarse a cabo mediante diluciones sucesivas, por las que, tras la medida de la adsorción, se sustituye parte de la disolución de equilibrio por una disolución libre de plaguicida permitiendo que se reestablezca el equilibrio. Cuando la isoterma de desorción del plaguicida no coincide con la de su adsorción se dice que existe histéresis. El grado de reversibilidad del proceso de adsorción puede expresarse por el coeficiente de histéresis, H , dado como el cociente entre los valores de N_f para la desorción y para la adsorción ($H = N_{fd} / N_{fa}$) (O'Connor et al., 1980; Barriuso et al., 1994). El coeficiente H puede oscilar entre 0, para procesos completamente irreversibles, y 1, cuando la isoterma de desorción sigue el mismo camino que el de la adsorción.

1.2.1.2. Lixiviación

La lixiviación es el proceso por el cual el agua, procedente de la lluvia o el riego, arrastra o disuelve moléculas de plaguicida dando lugar a un movimiento vertical a lo largo del perfil del suelo, lo que incide tanto en la efectividad biológica del plaguicida como en la contaminación de aguas subterráneas. El riesgo de contaminación de acuíferos por el transporte vertical de un plaguicida está determinado fundamentalmente por el balance entre la velocidad de transporte a través del suelo y la degradación a lo largo del perfil, ya que este último proceso disminuye el riesgo de contaminación de las aguas subterráneas (Bowman, 1989).

1.2.1.2.1. Factores que influyen en la lixiviación

Algunos de los factores más importantes que influyen en la lixiviación de los plaguicidas son los siguientes:

- **Adsorción por los coloides del suelo:** La adsorción del plaguicida a las partículas del suelo retrasa su movimiento vertical a través del mismo (Beck et al., 1993; Cornejo et al., 2005). En los horizontes más superficiales, la materia orgánica suele ser la determinante de la adsorción de plaguicidas, impidiendo o disminuyendo la lixiviación. A medida que va aumentando la profundidad, el contenido en materia orgánica disminuye y son los filosilicatos y los óxidos metálicos los que controlan los procesos de adsorción-desorción (Beck et al.,

1993). Con los procesos de desorción, los plaguicidas vuelven a estar en disolución y, por lo tanto, pueden movilizarse a lo largo del perfil del suelo mediante los procesos de lixiviación (Worrall et al., 1999). A veces, la movilización de los coloides del suelo con plaguicida adsorbido a ellos puede dar lugar a un transporte facilitado, acelerando la lixiviación del plaguicida (Cox et al., 1997a).

- **Estructura del suelo:** El movimiento vertical de los plaguicidas en el suelo tiene lugar a través de: a) macroporos (flujo preferencial), donde predominan los procesos de transporte hidrodinámico y difusión y b) lentamente, a través de los microporos, donde predominan los procesos de difusión, adsorción y degradación (Cox et al., 1997b).
- **Características del plaguicida:** Las principales características del plaguicida que influyen en su lixiviación son aquellas que determinan el grado de retención por los coloides del suelo, como por ejemplo la ionizabilidad, solubilidad en agua, presión de vapor y carácter hidrófobo (Weber et al., 1980). Plaguicidas catiónicos, como es el caso del paraquat y diquat, son poco móviles, debido a los fuertes enlaces iónicos que forman con el complejo de cambio catiónico de los coloides del suelo. Herbicidas con propiedades básicas, como las s-triazinas, presentan una movilidad de baja a moderada, que será dependiente del pH de los suelos. Teniendo en cuenta la relación inversa existente entre el pH y la adsorción de bases débiles, la movilidad será mayor bajo condiciones neutras o alcalinas que bajo condiciones ácidas. Por su parte, los herbicidas con carácter ácido, como es el caso del MCPA, suelen ser muy móviles, debido a su baja adsorptividad. Al pH del suelo, en condiciones normales mayor que el pK_a de la molécula de MCPA ($pK_a= 3.1$), este herbicida se encuentra cargado negativamente, y por tanto es poco retenido tanto por las arcillas como por la materia orgánica del suelo, debido a la repulsión de sus cargas electrostáticas. Los herbicidas no iónicos poco solubles en agua, como el oxifluorfen (solubilidad en agua = 0.1 mg/l), son muy poco móviles en disolución debido a su baja solubilidad (Kogan et al., 2007), si bien pueden ser móviles en estado gaseoso, cuando tienen una alta presión de vapor, lo que puede conllevar pérdidas por volatilización (Glottelty y Caro, 1975). Plaguicidas más solubles, como el fluometurón (solubilidad en agua= 100 mg/l), son muy móviles, debido a su baja adsorptividad.
- **Aporte de agua:** La intensidad y frecuencia de aporte de agua, ya sea por lluvia o riego, afectan en gran medida al movimiento y distribución de los plaguicidas en el suelo. Las lluvias poco después de la aplicación de un plaguicida tienen una gran

influencia en la cantidad de plaguicida lavado, ya que la retención aumenta progresivamente con el tiempo de residencia (Wauchope, 1978; Cox et al., 1998).

- **Prácticas culturales:** La estructura del suelo y su porosidad se alteran por prácticas culturales como la adición de residuos orgánicos y los sistemas de laboreo de conservación, influyendo, por tanto, estas prácticas en la movilidad de los plaguicidas (Cox et al., 1997b).

1.2.1.2.2. Estudio de la lixiviación

La lixiviación del plaguicida puede estudiarse en el laboratorio o en el campo. Si bien los estudios de campo reflejan situaciones reales, resultan mucho más difíciles de interpretar por el elevado número de variables que intervienen. Aunque los estudios de laboratorio pueden no ser totalmente representativos de condiciones reales, en ellos se controlan perfectamente todos los factores que influyen en el experimento y, por lo tanto, son muy convenientes a la hora de evaluar la influencia de parámetros individuales, como por ejemplo el tipo de formulación.

Los **métodos de laboratorio** que se emplean más frecuentemente para el estudio de la lixiviación son la cromatografía de capa de suelo y sobre todo la percolación en columnas. Esta última consiste en determinar el movimiento vertical del plaguicida en columnas de suelo tras la adición de diferentes volúmenes de agua, previa aplicación del plaguicida en la superficie de la columna. Pueden usarse columnas de suelo empaquetadas a mano o columnas de suelo inalterado. En ambos casos suele analizarse la cantidad de plaguicida lixiviado y la cantidad residual en las distintas profundidades de la columna al finalizar el experimento.

Los **estudios de campo** tienen la ventaja de llevarse a cabo bajo condiciones reales del suelo, en las que éste mantiene su estructura original y se dan las condiciones normales de campo. Los métodos más empleados son los lisímetros y las extracciones con barrena. Los lisímetros consisten en un tubo que oscila entre 10 a 50 cm de diámetro y de 50 a 150 cm de longitud. En general, están hechos de acero inoxidable o PVC. Uno de los extremos está afilado para facilitar su penetración en el suelo y en él se coloca un tamiz para impedir que lleguen partículas del suelo al recipiente colector, que suele ser de vidrio. Los lixiviados se recogen por succión mediante un tubo de plástico o teflón. Los lisímetros, al ser sistemas cerrados, permiten el control exacto del agua que percola a través del suelo (Bergström, 1990).

Mediante las extracciones con barrena puede evaluarse el movimiento vertical del plaguicida en el campo analizando muestras tomadas a diferentes profundidades y a diferentes tiempos tras la aplicación del producto.

1.2.1.3. Escorrentía

El proceso de **escorrentía** o transporte en superficie tiene lugar cuando la precipitación o el riego superan la tasa de infiltración de agua en el suelo. Según Wauchope (1978), las pérdidas de plaguicidas por escorrentía tienen lugar en disolución, en el caso de plaguicidas muy solubles en agua, o con el plaguicida adsorbido a los coloides del suelo para plaguicidas poco solubles en agua. Los factores más importantes que determinan las pérdidas por escorrentía son las condiciones climáticas, las características del suelo y del plaguicida y las prácticas culturales.

La erosión del suelo por el agua es uno de los problemas más importantes de la olivicultura mediterránea. Anualmente millones de toneladas de suelo son arrastradas por las aguas de escorrentía, lo cual reduce paulatinamente la fertilidad del suelo (Ramos et al., 2008).

En Andalucía, el cultivo del olivar ha ocupado tradicionalmente suelos marginales, poco fértiles y con elevadas pendientes. Sólo en las últimas décadas se han puesto cultivos en zonas con condiciones aceptables de suelo. Esta región se caracteriza por una pluviometría irregular con una estación seca pronunciada y lluvias en ocasiones torrenciales, donde las cuencas suelen presentar elevadas pendientes, hecho que facilita el proceso de escorrentía o arrastre superficial y no favorece el aprovechamiento de las aguas de lluvia. Esta pérdida de agua limita en muchos casos la producción y favorece otros problemas asociados, como la pérdida de suelo, contaminación de aguas por nutrientes y pesticidas y colmatación de embalses (Rodríguez et al., 2004).

1.2.1.4. Otros procesos de transporte.

Otros procesos de transporte que en diversas circunstancias pueden tener una gran importancia en la dinámica y el comportamiento de los plaguicidas en el medio ambiente son: la volatilización, la difusión y la absorción por plantas y microorganismos.

La **volatilización** consiste en el paso del plaguicida a la fase gaseosa, a través de la cual puede transportarse a puntos muy alejados del lugar de aplicación. Afecta al plaguicida que permanece en la superficie del suelo o de las plantas y en menor proporción al plaguicida disuelto en la disolución del suelo (Thomas, 1982).

La **difusión** es el proceso por el cual el plaguicida se traslada en el suelo debido a su energía térmica. Por este proceso se produce un movimiento neto desde posiciones de alta concentración hasta otras de menor concentración. Los factores que afectan a la difusión del plaguicida en el suelo son: a) la temperatura; b) la solubilidad, densidad de vapor y grado de adsorción del plaguicida; c) cantidad de agua y porosidad del suelo.

La **absorción** de los plaguicidas existentes en el suelo por parte de las plantas tiene lugar a través del sistema radicular. Este movimiento está supeditado en gran medida a la fijación del plaguicida a los coloides del suelo y constituye la finalidad de la aplicación de los productos fitosanitarios a los suelos. Las plantas y microorganismos asimilan plaguicidas acumulándolos y metabolizándolos. La gran variedad de plantas y organismos resistentes a determinados plaguicidas, lo son porque los metabolizan a compuestos no tóxicos, lo que constituye una vía natural de descomposición (Schmidt y Fedtke, 1977).

1.2.2. PROCESOS DE TRANSFORMACIÓN

Los procesos de transformación o degradación que afectan a los plaguicidas en los suelos se pueden dividir, según su origen, en tres grandes grupos: procesos de degradación química, procesos de degradación microbiana (biodegradación) y procesos de fotodegradación. Estos procesos conducen a la desaparición del producto, generalmente con formación de compuestos de menor toxicidad, por lo que reducen la contaminación de plantas y aguas superficiales y subterráneas (Cheng y Lehmann, 1985). No obstante, a veces los productos de degradación pueden resultar más tóxicos para ciertos organismos que el propio plaguicida del que proceden.

1.2.2.1. Degradación química

Las reacciones de degradación química más frecuentes son las reacciones hidrolíticas y de sustitución y las reacciones redox, y pueden ocurrir tanto en disolución como catalizadas por la superficie de las partículas del suelo (Cormejo et al., 1983). Los factores más importantes que afectan a los procesos de degradación química son el pH, el potencial redox, la temperatura y la composición de la disolución y de la fracción coloidal del suelo. La adsorción del plaguicida a los coloides del suelo puede tener un doble efecto, ya que puede proteger al plaguicida de la degradación química, pero también puede potenciarla, como en el caso de reacciones catalizadas por la superficie de los componentes coloidales. Los cationes de cambio de los minerales de la arcilla y el agua de hidratación participan en muchas reacciones de degradación catalizadas por la superficie (Russell et al., 1968; Laird, 1996). Así por ejemplo, se ha visto que la elevada acidez superficial de minerales de la arcilla esmectíticos, originada por la elevada polarización del agua de hidratación de los cationes de cambio, favorece la degradación química de herbicidas como la atrazina y la simazina a los hidroxí-derivados correspondientes (Laird, 1996; Celis et al., 1997a).

1.2.2.2. Biodegradación

Los procesos de biodegradación se deben fundamentalmente a la microflora del suelo (bacterias y hongos). En la biodegradación de plaguicidas se generan minerales como NH₃, CO₂ y H₂O. La tasa de biodegradación suele aumentar con la temperatura y con el aumento de la humedad del suelo hasta capacidad de campo (Parker y Doxtader, 1983; Allen y Walter, 1987), debido a un aumento de la población microbiana. Cuando la transformación no es total, el pesticida es degradado a otros productos cuya toxicidad, movilidad y efectos sobre el medio son mucho menos conocidos, a pesar de que en ocasiones se trata de compuestos más tóxicos y persistentes que los productos de partida.

La Tabla 7 muestra los principales productos de degradación de algunos de los herbicidas utilizados en el olivar.

Tabla 7. Principales productos de degradación de algunos de los herbicidas autorizados para el olivar cuyo medio de formación es el suelo (Pesticide Properties Data Base, 2010).

<i>Herbicida</i>	<i>Metabolitos</i>		
<i>Diclobenil</i>	2, 6- diclorobenzamida	Ácido 2,6- diclorobenzoico	o-clorobenzamida
<i>Diflufenican</i>	2-4-difluoroanilina		
<i>Diurón</i>	1-(3,4-diclorofenil)-3- metilurea	3,4-diclorofenilurea	3,4-dicloroanilina
<i>Glifosato</i>	Ácido aminometilfosfónico		
<i>MCPA</i>	2-metil-4-clorofenol		
<i>Oxifluorfén</i>	[4[2-cloro-4- (trifluorometilfenoxi)- 2-etoxi amino benceno]	[N-[4-{2-cloro-4- (trifluorometil)-fenoxi)- 2-etoxifenil] acetamida	
<i>Terbutilazina</i>	desetil terbutilazina	desisopropil atrazina	

Cinética de la biodegradación de plaguicidas. La curva de biodegradación de un plaguicida es importante porque dicta la disponibilidad del mismo en las estaciones de crecimiento, la contaminación de aguas superficiales y subterráneas, la bioacumulación en la macrobiota y la pérdida de eficacia. Habitualmente se considera que los herbicidas se

degradan siguiendo una cinética de primer orden, donde la velocidad de degradación es proporcional a la concentración (Figura 8).

Para los plaguicidas que son cometabolizados, es decir, no usados como sustrato de crecimiento, se asume que una cinética de primer orden es apropiada. La expresión cinética más exacta es, de hecho, la cinética de pseudo-primer orden, donde la tasa depende tanto de la concentración de plaguicida como del número de microorganismos degradadores de plaguicida. Sin embargo, debido a las dificultades que entraña numerar estos microorganismos, se usan las constantes de primer orden o la vida media. Los plaguicidas con una vida media por debajo de 10 días se consideran relativamente no persistentes; los plaguicidas con una vida media por encima de 100 días se consideran relativamente persistentes (Kearney et al., 1997).

Para los plaguicidas usados por los microorganismos como sustratos de crecimiento es frecuente observar curvas sigmoidales de biodegradación (Figura 8). Los datos de la curva sigmoidal son más difíciles de interpretar que los de la curva exponencial (primer orden) debido a su no linealidad. La curva sigmoidal del plaguicida metabolizado se puede describir usando una cinética de crecimiento microbiano; sin embargo, se requieren cuatro constantes cinéticas. Por consiguiente, es más difícil predecir la persistencia del plaguicida en el medio ambiente.

Es frecuente observar la variabilidad (espacial y temporal) en la curva de biodegradación de algunos plaguicidas. Las curvas de biodegradación tienden a ser específicas debido a las diferencias en el número de degradaciones específicas del plaguicida, la biodisponibilidad del plaguicida y parámetros del suelo tales como la temperatura, humedad y pH. La curva del metabolismo es directamente proporcional a la densidad de población de los microorganismos que degradan el plaguicida así como a la biodisponibilidad de este último. Estudios realizados indican que el plaguicida adsorbido en las partículas del suelo no está inmediatamente disponible para la biodegradación; debe desorberse en la disolución del suelo antes de ser metabolizado (Rodríguez, 2005). Bajo ciertas condiciones límite, existe una correlación positiva entre la curva del metabolismo y la temperatura del suelo, la humedad y el pH, aunque existe una excepción, como por ejemplo, las reacciones oxidativas que son menos probables que ocurran en el agua del suelo debido a la baja difusión de oxígeno, mientras que las transformaciones catalizadas por hongos son más frecuentes a bajo pH y/o en suelos húmedos (Kearney et al., 1997).

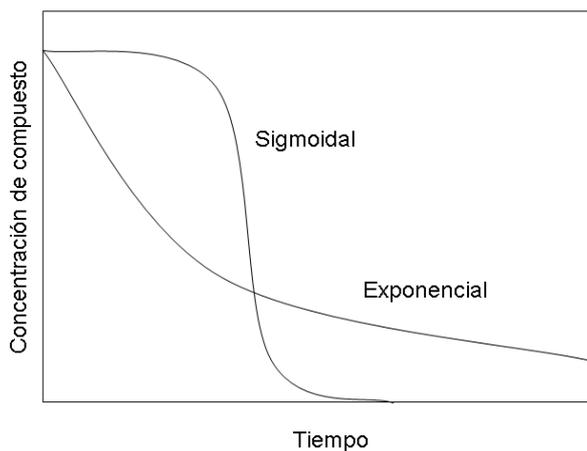


Figura 8. Cinéticas de la biodegradación de plaguicidas.

1.2.2.3. Fotodegradación

La fotodegradación consiste en la transformación del plaguicida inducida por la luz solar (Horspool, 1970), que puede tener lugar mediante reacciones de oxidación, reducción, hidrólisis, sustitución e isomerización. Esta reacción es importante en los primeros centímetros del suelo, en la superficie de las plantas y en ecosistemas acuáticos. A medida que el plaguicida penetra en el suelo, los procesos de fotodegradación son menos frecuentes, debido a que la radiación solar puede llegar a atenuarse hasta un 90% en los primeros 0.2 mm del suelo.

El proceso de fotodescomposición depende de factores como la intensidad y tiempo de exposición del plaguicida a la radiación solar, la presencia de catalizadores fotoquímicos, que pueden favorecer la descomposición, el pH del suelo, el grado de aireación del suelo, el estado en el que se encuentra el plaguicida (sólido, en disolución, vapor, etc.), el grado de adsorción y la estructura química del plaguicida.

La fotodegradación puede ser directa, cuando el plaguicida se degrada por la acción directa de la radiación solar, o indirecta, cuando la energía de la radiación solar es absorbida por otros compuestos que luego transmiten esa energía a la molécula del plaguicida o bien dan lugar a especies reactivas intermedias que pueden entrar en reacción con el plaguicida (Mansour et al., 1989).

1.3. FILOSILICATOS INALTERADOS Y MODIFICADOS: PROPIEDADES ADSORBENTES

1.3.1. CONCEPTO, CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES Y CLASIFICACIÓN DE LOS FILOSILICATOS

Los filosilicatos son silicatos laminares naturales cuya estructura se puede derivar de la unión de unidades tetraédricas Si-O y unidades octaédricas Al-(O, OH) ó Mg-(O, OH). La estructura global del mineral está originada por el apilamiento de láminas tridimensionales, a su vez formadas a partir de la condensación de capas bidimensionales de tetraedros con capas bidimensionales de octaedros. Estas estructuras laminares tridimensionales pueden ser de dos tipos (Figura 9):

- **Minerales 1:1:** Cada lámina se forma por la condensación de una capa tetraédrica y otra octaédrica. Las láminas se unen entre sí por puentes de hidrógeno OH-O de capas adyacentes.
- **Minerales 2:1:** Cada lámina está constituida por una capa octaédrica situada entre dos capas tetraédricas de forma que la unión entre láminas tiene lugar a través de fuerzas de van der Waals entre átomos de O de capas adyacentes. Estas láminas pueden ser eléctricamente neutras, pero en la mayoría de los casos poseen una carga negativa permanente. El origen de esta carga está en las sustituciones isomórficas de cationes como el Si^{4+} de las capas tetraédricas por otros cationes de un tamaño parecido pero de inferior carga, como por ejemplo el Al^{3+} . También se pueden dar sustituciones en la capa octaédrica, como por ejemplo de Al^{3+} por Mg^{2+} . Además, en medio ácido pueden existir sitios con carga positiva que se atribuyen a grupos hidroxilos básicos protonados de los bordes de las capas octaédricas. Las sustituciones isomórficas son más numerosas y variadas en el caso de los minerales del tipo 2:1. Por ello, los minerales del tipo 2:1 se clasifican en grupos atendiendo a la carga negativa permanente de las láminas (Tabla 8). El contenido de K^+ (no intercambiable) en el espacio interlaminar del mineral aumenta siguiendo el orden: esmectitas < vermiculitas < illitas < micas, por ello las esmectitas son las que tienen mayor capacidad de intercambio catiónico y de expansibilidad de sus láminas por hidratación de sus cationes intercambiables.

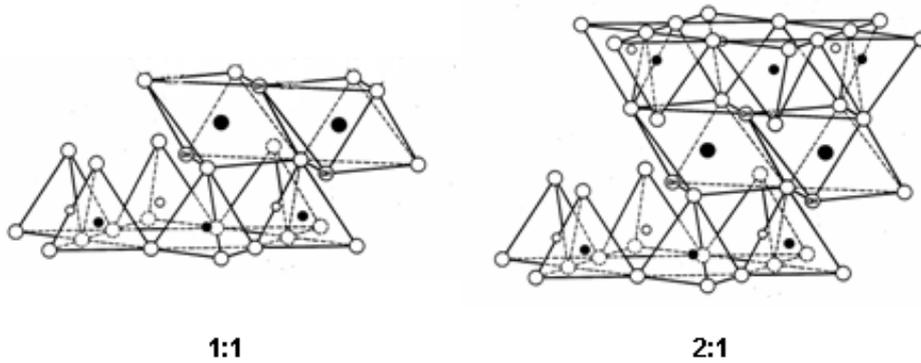


Figura 9. Estructura de los filosilicatos 1:1 y 2:1.

Cada grupo de los minerales 2:1 se puede subdividir en dos subgrupos: minerales dioctaédricos, si las posiciones octaédricas están ocupadas por Al, y minerales trioctaédricos, si lo están por Mg.

En los minerales con carga laminar distinta de cero, la carga negativa está compensada por *cationes inorgánicos* más o menos hidratados que se sitúan entre las láminas del mineral y en los bordes, pudiendo ser cambiables o no cambiables. Las propiedades fisicoquímicas de estos minerales están determinadas por la carga laminar y la naturaleza química de los cationes interlaminares.

En el caso de las esmectitas, el espacio interlaminar está ocupado por cationes de cambio más o menos hidratados. La hidratación de los cationes trae consigo el aumento de la *distancia de separación entre las láminas*. La separación de las láminas tiene importantes repercusiones desde el punto de vista de la capacidad adsorbente de estos minerales, ya que da lugar a un aumento de la superficie accesible para la adsorción de moléculas orgánicas polares e iónicas (Vicente et al., 1989; Lagaly, 1994; Trujillano et al., 2009; Carretero y Pozo, 2009).

Existe un grupo (2:1:1) con una estructura similar a la de los minerales del tipo 2:1, al cual pertenecen las cloritas, en el que el balance de carga se mantiene por la presencia, en el espacio interlaminar, de grupos hidroxilos coordinados octaédricamente, similares a las capas octaédricas. Por tanto, su capacidad de intercambio catiónico es nula, al igual que su capacidad de hinchamiento (Karathanasis et al., 1983; Ezzaim et al., 1999).

La Tabla 8 muestra una clasificación de los filosilicatos junto con algunas de las principales especies minerales (Brown y Nadeau, 1984; Martin et al., 1991; Stephen, 1995).

Tabla 8. Clasificación de los filosilicatos y algunas especies minerales.

TIPO	Grupo (x ^a)	Subgrupo	Algunas especies minerales; Fórmula Ideal.	
1:1	Caolinitas-serpentininas x ~ 0	Caolinitas	<u>Diquita</u> : Al ₂ Si ₂ O ₅ (OH) ₄	
			<u>Haloisita</u> : Al ₂ Si ₂ O ₅ (OH) ₄ ·2H ₂ O	
			<u>Metahaloisita</u> : Al ₂ Si ₂ O ₅ (OH) ₄	
			<u>Caolinita</u> : Al ₂ Si ₂ O ₅ (OH) ₄	
			<u>Nacrita</u> : Al ₂ Si ₂ O ₅ (OH) ₄	
		<u>Anauxita</u> : Al ₂ Si ₂ O ₇ (OH) ₄		
		Serpentininas	<u>Crisotilo</u> : Mg ₃ Si ₂ O ₅ (OH) ₄	
			<u>Antigorita</u> : Mg ₃ Si ₂ O ₅ (OH) ₄	
			<u>Amesita</u> : Mg ₂ Al(SiAl)O ₅ (OH) ₄	
			<u>Bertierina</u> : (Fe ^{II} , Fe ^{III} , Al, Mg) ₂₋₃ (SiAl) ₂ O ₅ (OH) ₄	
<u>Cronstedtita</u> : Fe ^{II} ₂ Fe ^{III} (Si, Fe ^{III})O ₅ (OH) ₄				
Pirofilita-talco x ~ 0	Pirofilita	<u>Pirofilita</u> : Al ₂ Si ₄ O ₁₀ (OH) ₂		
		<u>Ferripirofilita</u> : Fe ^{III} ₂ Si ₄ O ₁₀ (OH) ₂		
2:1	Esmectitas x ~ 0.2-0.6	Diocotáedricas (montmorillonitas)	<u>Montmorillonita</u> : 0.33M ⁺ ·(Al _{1.67} Mg _{0.33})Si ₄ O ₁₀ (OH) ₂	
			<u>Beidellita</u> : 0.33M ⁺ ·Al ₂ (Si _{3.67} Mg _{0.33})O ₁₀ (OH) ₂	
			<u>Nontronita</u> : 0.33M ⁺ ·Fe ^{III} ₂ (Si _{3.67} Mg _{0.33})O ₁₀ (OH) ₂	
			<u>Volkonskoita</u> : 0.33M ⁺ ·(Fe ^{III} , C ^{III} , Mg) ₂ (Si, Al) ₂ O ₁₀ (OH) ₂	
		Triocotáedricas (saponitas)	<u>Saponita</u> : 0.33M ⁺ ·(Mg, Fe ^{II}) ₃ (Si _{3.67} Al _{0.33})O ₁₀ (OH) ₂	
			<u>Sauconita</u> : 0.33M ⁺ ·Zn ₃ (Si _{3.67} Al _{0.33})O ₁₀ (OH) ₂	
			<u>Hectorita</u> : 0.33M ⁺ ·(Mg, Li) ₃ Si ₄ O ₁₀ (OH) ₂	
		Vermiculitas x ~ 0.6-0.9	Diocotáedricas	<u>Vermiculita dioctaedrica</u> : 0.67M ⁺ ·(Al, Fe ^{III} , etc.) ₂ (Si, Al) ₄ O ₁₀ (OH) ₂
			Triocotáedricas	<u>Vermiculita</u> : 0.67M ⁺ ·(Mg, Fe ^{II} , etc.) ₃ (Si, Al) ₄ O ₁₀ (OH) ₂
		Micas-iiitas x ~ 1	Diocotáedricas	<u>Moscovita</u> : KAl ₂ (Si ₃ Al)O ₁₀ (OH) ₂
<u>Paragonita</u> : NaAl ₂ (Si ₃ Al)O ₁₀ (OH) ₂				
<u>ilita</u> : (K, H ₃ O)(Al, Mg, Fe ^{II}) ₂ (Si, Al) ₄ O ₁₀ (OH) ₂				
Triocotáedricas	<u>Glauconita</u> : (K, Na)(Fe ^{III} , Al, Mg) ₂ (Si, Al) ₄ O ₁₀ (OH) ₂			
	<u>Flogopita</u> : KMg ₃ (Si ₃ Al)O ₁₀ (OH, F) ₂			
	<u>Biotita</u> : K(Mg, Fe ^{II}) ₃ (Si ₃ Al)O ₁₀ (OH, F) ₂			
Micas fráguiles x ~ 2	Diocotáedricas	<u>Margarita</u> : CaAl ₂ (Si ₂ Al ₂)O ₁₀ (OH) ₂		
	Triocotáedricas	<u>Clintonita</u> : Ca(Mg, Al) ₃ (SiAl ₃)O ₁₀ (OH) ₂		
2:1:1	Cloritas x variable	Diocotáedricas	<u>Sudoita</u> : Mg ₂ (Al, Fe ^{III}) ₃ Si ₃ AlO ₁₀ (OH) ₃	
		Triocotáedricas	<u>Clinocloro</u> : (Mg, Fe ^{II}) ₅ Al(Si ₃ Al)O ₁₀ (OH) ₃	
			<u>Nimita</u> : (Ni, Mg, Fe ^{II}) ₅ Al(Si ₃ Al)O ₁₀ (OH) ₃	
2:1 (fibrosos)	Hornitas x variable	Mixoditriocotáedricas	<u>Paliqorskita</u> : (Al, Mg) ₂ Si ₄ O ₁₀ (OH)·4H ₂ O	
		Triocotáedricas	<u>Sepiolita</u> : Mg ₄ Si ₆ O ₁₅ (OH) ₂ ·6H ₂ O	

^ax= carga eléctrica por fórmula ideal

1.3.2. LAS ESMECTITAS COMO ADSORBENTES DE PLAGUICIDAS

Por sus superficies internas accesibles y expandibles, los filosilicatos del grupo de las esmectitas presentan muy buenas propiedades adsorbentes para diversos contaminantes. Las esmectitas poseen una estructura laminar con una carga negativa permanente entre 0.5 y 1 por cada celda, que es compensada por cationes interlaminares que le confieren una amplia variedad de sitios de adsorción, tanto en sus superficies externas como en el espacio interlaminar (Lagaly, 1994). Los centros activos de las esmectitas, para interactuar con moléculas o iones orgánicos e inorgánicos, son determinados puntos estructurales (Figura 10):

1. *Cationes de cambio hidratados en la interlámina y en los bordes del mineral.* Los sitios donde se localiza la carga, procedente de las sustituciones isomórficas, están compensados por cationes de cambio que se asocian a moléculas de agua y tienen un fuerte carácter hidrofílico.
2. *Grupos silanoles y aluminoles de los bordes de ruptura.* Originados por la ruptura de los enlaces Si-O-Si y Al-O-Si (Cerezo et al., 2003). Se convierten en sitios de carga variable según el pH del medio.
3. *Grupos siloxano laminares de los planos basales.* Estas zonas de la superficie de los planos basales externos o interlaminares comprendidos entre sitios cargados tienen carácter hidrófobo (Jaynes y Boyd, 1991a).

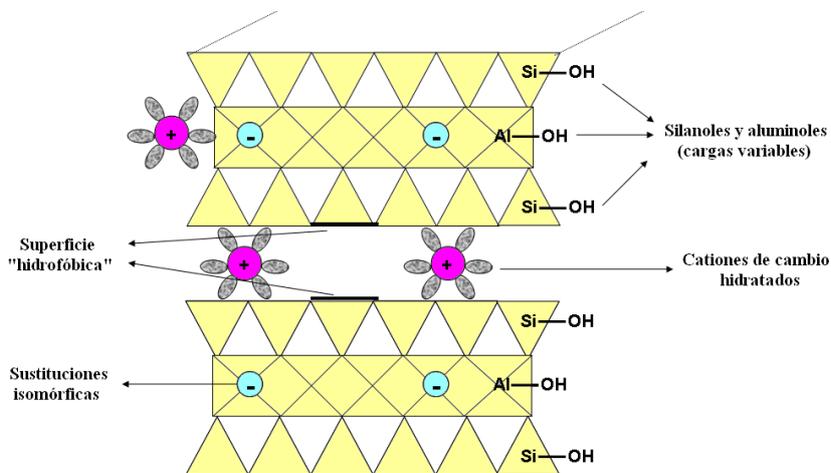


Figura 10. Centros activos de un mineral esmectítico en relación con la adsorción de plaguicidas.

Los mecanismos de interacción con los plaguicidas dependen en gran medida de las características de carga del plaguicida:

1. **Plaguicidas catiónicos y protonables.** Los plaguicidas catiónicos son adsorbidos rápidamente por las esmectitas mediante procesos de intercambio iónico. La adsorción y desorción de estos plaguicidas siguen los patrones de las interacciones electrostáticas entre los cationes y las cargas superficiales del mineral de la arcilla (Philen et al., 1971).
2. **Plaguicidas aniónicos y ácidos débiles.** Los compuestos aniónicos son repelidos por las superficies basales con carga negativa de las esmectitas, dando como resultado una adsorción muy pequeña o nula (Celis et al., 1999b). En el mineral de la arcilla existen sitios de adsorción para los plaguicidas aniónicos, aunque no son muy numerosos. Pueden unirse a los bordes cargados positivamente (si el pH es inferior a 5), mediante puentes de hidrógeno, a metales polivalentes en los sitios de intercambio o, con las condiciones apropiadas, mediante la dominancia de la atracción por fuerzas de van der Waals (Lagaly, 2001).
3. **Plaguicidas neutros: Hidrófobos o Polares.** Los compuestos orgánicos hidrófobos no tienen una alta afinidad por las esmectitas, debido al ambiente hidrofílico de la superficie del mineral creado por los cationes hidratados interlaminares (Jaynes y Vance, 1996). Las fuerzas de van der Waals son más fuertes cuando el plaguicida puede aproximarse a los átomos de oxígeno de la superficie de siloxano del mineral (regiones "hidrofóbicas").

Los plaguicidas con grupos funcionales polares (-OH, =O, -NH₂, -NO₂) son retenidos mediante fuerzas electrostáticas (ión-dipolo) o enlaces de coordinación. Los enlaces de coordinación se forman directamente entre las esmectitas y el adsorbato o a través de moléculas de agua que actúan como ligandos puentes, según el carácter fuerte-débil de ambos constituyentes de la interacción. En todos los casos, los enlaces por puentes de hidrógeno juegan un papel fundamental. Estos enlaces pueden darse con los grupos OH de los bordes del mineral y también con los átomos de oxígeno de la superficie de siloxano.

1.3.3. REACCIONES DE MODIFICACIÓN DE LAS ESMECTITAS

Por sus características de carga, las esmectitas son buenos adsorbentes de cationes y moléculas polares inorgánicas y orgánicas. Sin embargo, debido a la fuerte hidratación de los cationes cambiables inorgánicos, que confieren propiedades hidrofílicas a

su superficie, su capacidad de adsorción de compuestos orgánicos hidrófobos se ve considerablemente reducida (Jaynes y Vance, 1996). Algo similar ocurre con los compuestos aniónicos, que son repelidos por las superficies basales con carga negativa, dando como resultado una adsorción muy pequeña o nula (Celis et al., 1999b).

La modificación de las propiedades superficiales de las esmectitas mediante la sustitución de los cationes inorgánicos naturales de su espacio interlaminar por cationes orgánicos puede mejorar las propiedades adsorbentes del mineral para compuestos no iónicos hidrofóbicos y compuestos ácidos (Lagaly, 2001; Cornejo et al., 2004). *Las arcillas orgánicas u organoarcillas* son filosilicatos de tipo expandibles modificados mediante la sustitución de sus cationes interlaminares inorgánicos por cationes orgánicos.

En general, la entrada de cationes orgánicos en el espacio interlaminar de las esmectitas puede seguir *mecanismos* de naturaleza diferente, siendo los principales las reacciones de intercambio catiónico y la adsorción física.

1. **Reacciones de intercambio catiónico.** Ocurren mediante interacciones electrostáticas entre la superficie cargada negativamente del mineral de la arcilla y las cargas positivas de los cationes orgánicos que se introducen en él. La reacción de intercambio catiónico sigue la forma: $vAX_{\sigma} + \sigma OC^{v+} = vA^{\sigma+} + \sigma OCX_v$, donde $A^{\sigma+}$ es el catión inorgánico cambiante, σ la valencia de este catión, OC^{v+} el catión orgánico y v su valencia, y X^- determina un sitio de cambio de la superficie del mineral de la arcilla. Por lo general, esta reacción se lleva a cabo por la adición de una disolución acuosa del catión orgánico a una suspensión de la arcilla.

Las reacciones de cambio iónico están influenciadas por parámetros importantes como el tipo de filosilicato y su carga superficial (Xu y Harsh, 1990, 1992), la naturaleza del catión inorgánico intercambiado, las condiciones de la disolución y la estructura del catión orgánico (Lee et al., 2002), tanto en lo que respecta a la longitud de las cadenas alquílicas laterales como a la accesibilidad del grupo catiónico. Así, en el caso de cationes alquilamonio, la accesibilidad del grupo que porta la carga positiva determina la solvatación por moléculas de agua, que atenúa la interacción entre éstos y la superficie de la arcilla. Por ello, los alquilamonios cuaternarios son los más fuertemente adsorbidos directamente por interacciones con las superficies cargadas de la arcilla (Aue et al., 1976).

2. **Adsorción física.** Ocurre mediante interacciones hidrofóbicas que se dan por un lado, entre las regiones hidrofóbicas del catión orgánico y las zonas menos hidrofílicas de la arcilla, como la superficie de siloxanos y, por otro, entre los

cationes orgánicas entre sí, lo que explica la posible entrada de cationes orgánicas al espacio interlaminar por encima de la capacidad de intercambio catiónico (C.I.C.) de la arcilla. En este caso, la naturaleza del enlace hidrofóbico es una combinación de la atracción de los grupos hidrofóbicos de los cationes orgánicos entre sí y su tendencia a ser repelidos por el agua (Rosen, 1987). El tamaño de las moléculas es un factor importante en la adsorción, de forma que cuanto mayor es el peso molecular del compuesto, las moléculas son más fuertemente adsorbidas, por poseer un mayor número de puntos de contacto con la superficie del mineral (Greenland, 1965). La energía de adsorción de estas moléculas llega a ser incluso superior a la del agua, a la que pueden desplazar del espacio interlaminar.

El mecanismo de adsorción condiciona en gran medida las características de las organoarcillas resultantes (Xu y Boyd, 1995) así como su estabilidad, afectando a tres aspectos principalmente: la cantidad de catión orgánico adsorbido, el grado de desorción del catión orgánico y la resistencia de éste a ser degradado. La adsorción de surfactantes catiónicos de gran tamaño en el espacio interlaminar de las esmectitas es muy irreversible (Zhang et al., 1993; Moronta, 2004).

Los cationes orgánicos que más se han utilizado en la preparación de las organoarcillas son los *iones alquilamonios cuaternarios* de gran tamaño, de fórmula general $[(\text{CH}_3)_n \text{NR}_{4-n}]^+$, donde R es un hidrocarburo aromático o alifático (Carrizosa et al., 2001). Dependiendo de la densidad de carga laminar y del tamaño de los radicales, los cationes orgánicos pueden adoptar distintas configuraciones en la interlámina: monocapa, bicapa, pseudotrimolecular o parafínica (Jaynes y Vance, 1996) (Figura 11). La técnica de difracción de rayos X permite la determinación de la disposición del catión orgánico en la interlámina, e incluso, recientemente, se ha avanzado en la caracterización de estas estructuras a partir de su visualización por medio de la técnica de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de alta resolución (Figura 12).

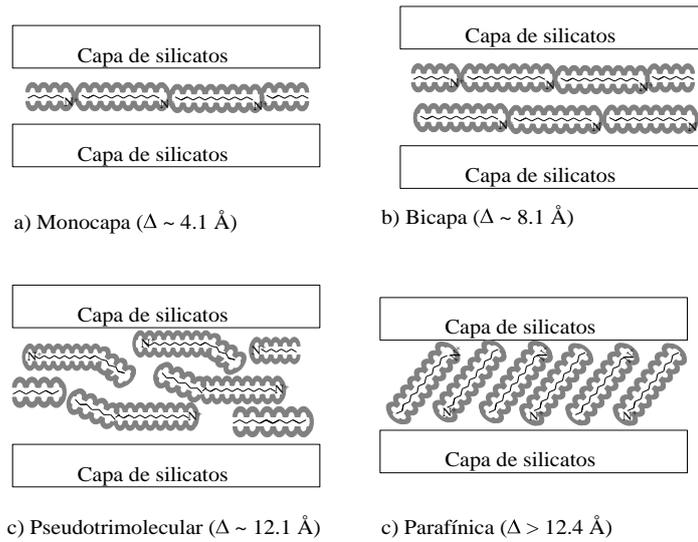


Figura 11. Posibles disposiciones de los cationes orgánicos de cadena larga en el espacio interlamina de las organoarcillas y magnitud de la distancia interlamina. Δ representa la amplitud del espacio interlamina.

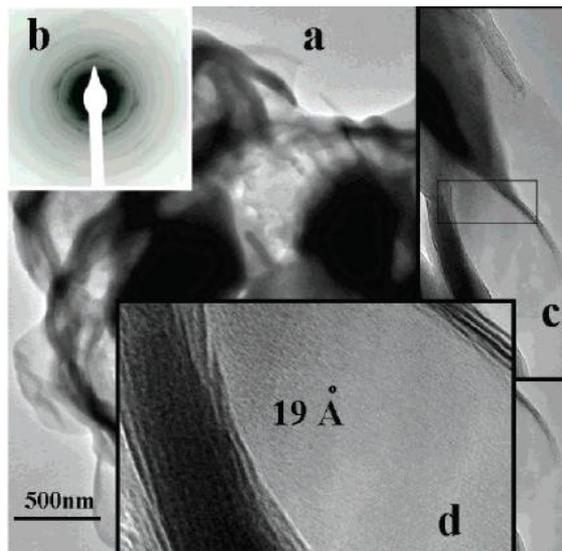


Figura 12. Imágenes de una muestra de montmorillonita de Wyoming (SWy-1) saturada con cationes hexadeciltrimetilamonio (HDTMA) tomadas por microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (Yaron-Marcovich et al., 2005).

1.3.3.1. Interacciones de plaguicidas con esmectitas modificadas con cationes inorgánicos

Diversos estudios han demostrado cómo la naturaleza del catión inorgánico interlamilar puede influir en las propiedades adsorbentes de las esmectitas. Cox et al. (1995), por ejemplo, observaron que la adsorción del herbicida tiazafurón a una montmorillonita de Wyoming (SWy-1) aumentaba al disminuir el potencial iónico del catión interlamilar. Los autores proponen que la adsorción del herbicida ocurre por desplazamiento de moléculas de agua de hidratación de los cationes interlaminares y que dicho desplazamiento es más fácil a medida que disminuye el potencial iónico del catión interlamilar.

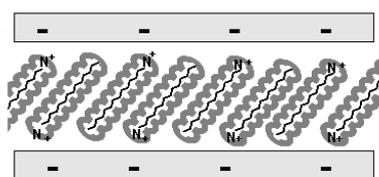
Se ha observado que la saturación con cationes Fe (III) aumenta considerablemente la afinidad de las esmectitas por plaguicidas con carácter básico como la metamitrona, el tiazafurón o s-triazinas como la atrazina y la simazina (Cox et al., 1995, Celis et al., 1996, 1997a). Como resultado del alto poder polarizante de los cationes Fe (III), las moléculas de agua de hidratación llegan a ionizarse con la formación de policationes de Fe e iones H^+ . Este proceso aumenta la acidez superficial de las esmectitas incrementando la retención de moléculas con carácter básico, las cuales pueden protonarse en la interlámina y ser adsorbidas como especies catiónicas. La introducción de policationes de Fe y de Al en el espacio interlamilar de las esmectitas también se ha utilizado para la creación de pilares interlaminares que aumentan la accesibilidad del espacio interlamilar para diversas especies orgánicas y, por consiguiente, su adsorción al mineral (Sannino et al., 1999; Vreysen y Maes, 2006).

1.3.3.2. Interacciones de plaguicidas con esmectitas modificadas con cationes orgánicos

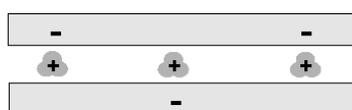
Debido al carácter hidrofílico y a su carga superficial negativa, los minerales de la arcilla, y en concreto los filosilicatos esmectíticos han demostrado ser buenos adsorbentes de plaguicidas catiónicos y altamente polares, pero su capacidad adsorbente para plaguicidas poco solubles o no iónicos es normalmente baja. La fuerte hidratación de los cationes inorgánicos de cambio naturales de los silicatos laminares da lugar a un ambiente hidrofílico en la superficie del mineral de la arcilla, que reduce considerablemente la capacidad adsorbente de las arcillas para compuestos hidrofóbicos. El desplazamiento de estos cationes intercambiables por cationes orgánicos mediante reacciones de intercambio iónico consigue modificar la naturaleza de la superficie del mineral de la arcilla, de hidrofílica a hidrofóbica.

Como ya se ha mencionado, los cationes orgánicos más utilizados para la modificación de los minerales de la arcilla son los iones alquilamonio cuaternarios, de fórmula general $[(CH_3)_n NR_{4-n}]^+$, donde R es un hidrocarburo aromático o alifático (Redding et al., 2002; Bonczek et al., 2002). Según Boyd et al. (1991), las organoarcillas con este tipo de cationes orgánicos pueden dividirse en dos clases con distintas características adsorbentes dependiendo del tamaño del catión interlaminar introducido:

1. La incorporación de cationes alquilamonio de *gran tamaño*, tales como el octadecilamonio (ODA), dioctadecildimetilamonio (DODA) y hexadeciltrimetilamonio (HDTMA), en las interláminas de las arcillas esmectíticas, da lugar a organoarcillas con una elevada afinidad por plaguicidas neutros (Aguer et al., 2000) e incluso por plaguicidas ácidos (Celis et al., 1999b; Carrizosa et al., 2000, 2001). Son las llamadas *organoarcillas organofílicas* (Figura 13). En ellas, los grandes cationes alquilamonios se fijan a la superficie de la arcilla e interaccionan entre sí, formando una fase mucho menos polar que la de la arcilla sin tratar. La fase interlaminar formada a partir de las cadenas alquílicas de los cationes alquilamonio actúa como un medio de partición para compuestos orgánicos no iónicos y elimina eficazmente tales compuestos del agua (Jaynes y Vance, 1996).
2. Las características adsorbentes de las organoarcillas formadas a partir de *pequeños cationes amonio cuaternarios*, tales como el tetrametilamonio, son diferentes, ya que los pequeños cationes orgánicos existen como especies discretas en la superficie del mineral de la arcilla, sin formar una fase de partición orgánica (Brixie y Boyd, 1994). En estas organoarcillas, llamadas *adsortivas* (Figura 13), los cationes orgánicos actúan como pilares no hidratados que expanden las láminas de la arcilla, quedando expuesta la abundante área superficial de siloxano (Brixie y Boyd, 1994).



a) Organoarcilla organofílica



b) Organoarcilla adsortiva

Figura 13. Organoarcillas a) organofílicas y b) adsortivas.

Además del tamaño de las cadenas de hidrocarburos, la carga superficial del mineral de la arcilla y la cantidad de catión orgánico en la interlámina han demostrado ser factores determinantes de las propiedades adsorbentes de las arcillas intercambiadas con alquilamonios, ya que estos parámetros determinan la disposición del catión orgánico en el espacio interlaminar del mineral de la arcilla y, por tanto, el espacio disponible para las moléculas de plaguicidas a albergar (Jaynes y Boyd, 1991b; Jaynes y Vance, 1996; Celis et al., 1999a, 2000a).

La modificación selectiva de minerales de la arcilla con cationes orgánicos que contienen grupos funcionales apropiados para maximizar la afinidad del adsorbente por el plaguicida constituye una nueva línea de investigación (Figura 14). A pesar de que este concepto ha sido aplicado para desarrollar organoarcillas con elevada afinidad y selectividad por metales pesados, existe poca información acerca de cómo cationes orgánicos con diferentes grupos funcionales influyen en la adsorción de plaguicidas por las organoarcillas.

Nir et al. (2000) señalaron la importancia de la compatibilidad estructural entre la molécula del plaguicida y el catión alquilamonio preadsorbido en el mineral de la arcilla en el rendimiento de las organoarcillas como adsorbentes de plaguicidas. Alacloro y metolacloro contienen un anillo bencénico en su estructura y muestran una gran afinidad por montmorillonitas modificadas con cationes orgánicos que poseen anillos bencénicos, tales como benciltrimetilamonio o feniltrimetilamonio.

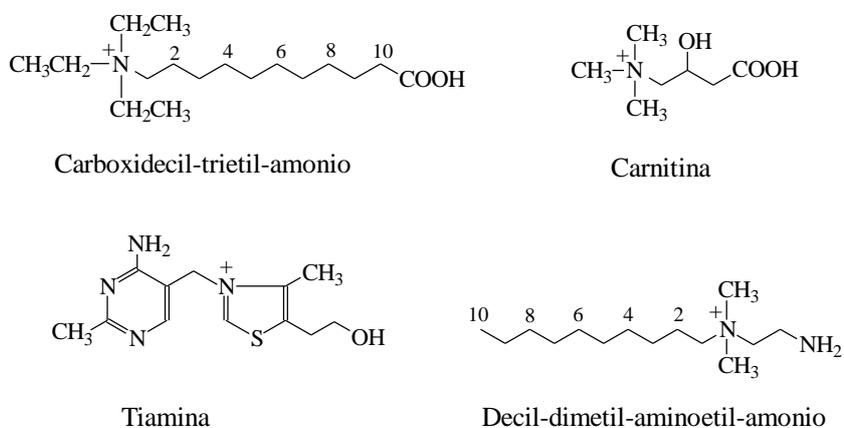


Figura 14. Algunos cationes orgánicos funcionalizados utilizados para la preparación de organoarcillas.

Cruz-Guzmán et al. (2004, 2005) encontraron que cationes orgánicos naturales con grupos funcionales polares apropiados permitían la modificación selectiva de minerales de la arcilla para optimizar su afinidad por determinados plaguicidas. Usando los cationes L-carnitina, éster dimetilico de la L-cistina y tiamina como cationes modificadores, los autores demostraron que la naturaleza química del catión orgánico influía en gran medida en la adsorción del herbicida simazina por las arcillas modificadas (Figura 15), probablemente a través de una combinación de efectos de funcionalidad y efectos estéricos (Cruz-Guzmán et al., 2004). Por ello, sugieren la posibilidad de modificar las superficies de los minerales de la arcilla con cationes orgánicos con grupos funcionales apropiados para crear un microambiente en la interlámina diseñado para mejorar la afinidad del mineral de la arcilla por los plaguicidas. La idoneidad de los cationes orgánicos naturales para este objetivo se consideró ser particularmente interesante al objeto de minimizar el impacto medioambiental de los adsorbentes cuando son incorporados en ecosistemas naturales para su aplicación práctica.

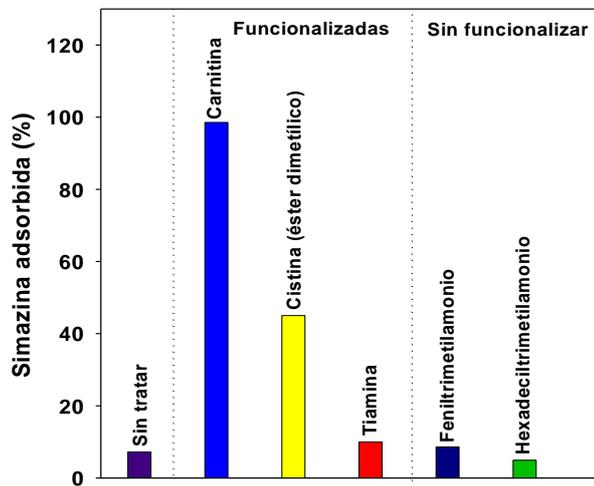


Figura 15. Porcentaje de herbicida simazina adsorbido por montmorillonita sin tratar (SWy-2) y montmorillonita modificada con diferentes cationes orgánicos. La concentración inicial de herbicida fue de 1 mg/l.

1.3.4. MINERALES DE LA ARCILLA INALTERADOS Y MODIFICADOS COMO ADSORBENTES EN FORMULACIONES DE LIBERACIÓN LENTA DE PLAGUICIDAS.

Los problemas medioambientales derivados del uso de plaguicidas, en particular de plaguicidas con una elevada movilidad, se ha convertido en un tema de actualidad debido al aumento de la presencia de estos compuestos en aguas superficiales y subterráneas. Para compensar las pérdidas por transporte y degradación y asegurar un control adecuado de plagas y enfermedades, los plaguicidas son aplicados a concentraciones superiores a las estrictamente requeridas para el control de la plaga a combatir, hecho que incrementa la probabilidad de escorrentía y lixiviación y aumenta el riesgo de contaminación de aguas superficiales y subterráneas (Gerstl et al., 1998a,b). Este problema se ve acrecentado en el caso de plaguicidas con una elevada solubilidad en agua, debido al elevado riesgo de transporte hasta zonas lejanas del lugar de aplicación, ya que el plaguicida se disuelve rápidamente en la solución del suelo (Fernández-Pérez et al., 2000).

Actualmente, la mayoría de las formulaciones de plaguicidas existentes en el mercado contienen el ingrediente activo en una forma inmediatamente disponible y que, por ello, es rápidamente liberado al medioambiente (Johnson y Pepperman, 1998). Para plaguicidas muy solubles, estas formulaciones dan como resultado rápidas pérdidas de plaguicida poco después de su aplicación, antes de que las moléculas tengan tiempo de difundir a través de los agregados del suelo y alcanzar los sitios de adsorción presentes en los mismos (Gish et al., 1991; Cox et al., 2000). Recientemente, ha aumentado el interés por reducir las pérdidas de plaguicidas por transporte mediante el desarrollo de formulaciones más sostenibles, tales como las formulaciones de liberación lenta (Figura 16), en las cuales sólo una parte del ingrediente activo se encuentra en una forma inmediatamente disponible, mientras que la mayor parte se encuentra atrapado o adsorbido sobre un soporte inerte que lo va liberando gradualmente con el tiempo (Fernández-Pérez et al., 1998).

Los efectos beneficiosos relacionados con el uso de formulaciones de liberación lenta incluyen la reducción de la cantidad de producto requerida para el control de plagas, una disminución del riesgo de contaminación medioambiental originado por pérdidas por transporte del plaguicida (ej: lixiviación o volatilización), ahorro de energía y mano de obra por la reducción del número de aplicaciones requeridas en comparación con las formulaciones convencionales, aumento en la seguridad para el aplicador del plaguicida, y en general un descenso de los efectos perjudiciales (Gerstl et al., 1998b).

En los últimos años, el uso de constituyentes naturales del suelo tales como arcillas, óxidos de hierro o ácidos húmicos (Margulies et al., 1994; Carr et al., 1994; Gerstl et al., 1998a; Fernández-Pérez et al., 1998; Johnson y Pepperman, 1998; González-Pradas et al., 1999; El-Nahhal et al., 2000; Hermosín et al., 2001) como soportes en formulaciones de plaguicidas ha suscitado un renovado interés (Scher, 1999). En este sentido, las arcillas poseen propiedades únicas, como su elevada superficie específica asociada a su pequeño tamaño de partículas, bajo coste, y su presencia en la mayoría de suelos y sedimentos.

Margulies et al. (1994) usaron montmorillonitas y sepiolitas como soportes para el herbicida volátil EPTC (S-etil dipropiltiocarbamato) y mostraron la reducción de la volatilización de EPTC por el uso de los minerales de la arcilla como soportes del herbicida. A 30°C, la vida media ($T_{1/2}$) de EPTC en su forma libre fue de 10 h, mientras que cuando estaba adsorbido en la montmorillonita el $T_{1/2}$ aumentó a más de 5 días. De forma similar, cuando el EPTC se incorporaba al suelo, el $T_{1/2}$ aumentaba de 4 a 9 días al aplicarlo en forma adsorbida respecto a la libre. Johnson y Pepperman (1998) estudiaron la liberación controlada de los herbicidas atrazina y alaclor por la adición de minerales seleccionados. Cox et al. (2000) trataron una montmorillonita con Fe(III) para aumentar la afinidad del mineral de la arcilla por los herbicidas simazina y 2,4-D, y prepararon complejos arcilla-herbicida que reducían la lixiviación de los herbicidas en columnas de suelo empaquetadas a mano en comparación con el uso de los herbicidas en sus formas libres. Celis et al. (2002a,b) obtuvieron resultados similares para los herbicidas picloram y hexazinona en Fe(III)-montmorillonita.

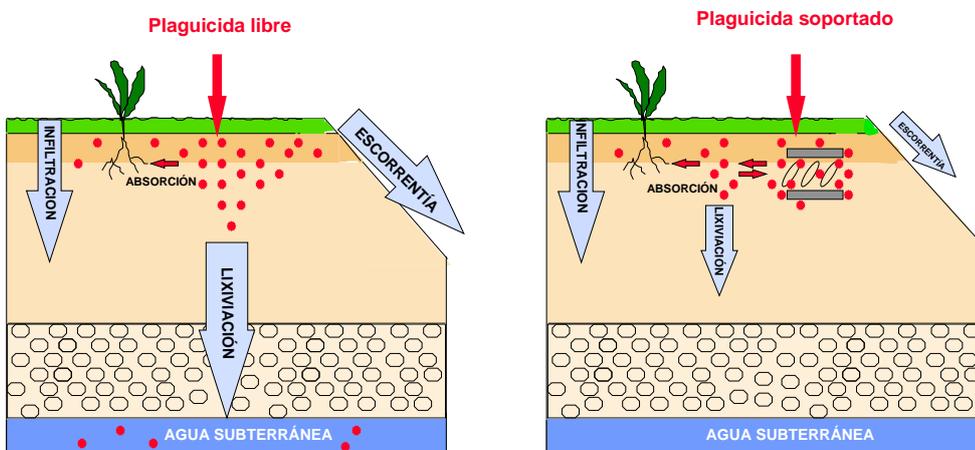


Figura 16. Efecto del tipo de formulación en las pérdidas por transporte de los plaguicidas aplicados al suelo.

La modificación de la superficie de los minerales de la arcilla a través de la incorporación de cationes orgánicos en las interláminas permite aumentar la capacidad de adsorción para pesticidas seleccionados y controlar la desorción una vez añadidos al medioambiente. Se han propuesto diferentes tipos de formulaciones basadas en organoarcillas, particularmente arcillas intercambiadas con cationes alquilamonio (Carrizosa et al., 2000, 2001; Undabeytia et al., 2000; Lagaly, 2001; Nenneman et al., 2001; Hermosín et al., 2001; Celis et al., 2002a). A pesar de ello, mientras que se ha prestado mucha atención a describir la diversidad de interacciones organoarcillas-pesticidas (Hermosín y Cornejo, 1993; Zhao et al., 1996; Boyd et al., 1988; Celis et al., 1999b, 2000a; Nir et al., 2000; Carrizosa et al., 2000, 2001, 2003; Cox et al.; 2002), la información acerca de los factores que controlan el grado de liberación de los plaguicidas en las formulaciones de organoarcillas es mucho más limitada. También son pocos los estudios que validan el comportamiento de las formulaciones organoarcilla-plaguicida bajo condiciones reales, aunque los resultados obtenidos por varios autores para condiciones de campo son prometedores en cuanto a una posible aplicación práctica de estas formulaciones (El-Nahhal et al., 1998; El-Nahhal, 2003; Celis et al., 2005; Cornejo et al., 2008b).

Uno de los mayores inconvenientes observados en algunas formulaciones arcilla-plaguicida ha sido la gran cantidad de plaguicida no liberado de la formulación, la cual podría dar lugar a contaminación de suelos y requerir un aumento de la dosis de aplicación para liberar la misma cantidad de ingrediente activo (Celis et al., 2002a,b, Cornejo et al., 2004). Así por ejemplo, formulaciones de hexazinona soportada en Fe(III)-montmorillonita liberaron del 75% al 20% del herbicida asociado al mineral de la arcilla (Celis et al., 2002a). Gerstl et al. (1998a) también observaron que una gran proporción (35-70%) del ingrediente activo permanecía adsorbido en formulaciones de liberación controlada de alaclor al final de los experimentos de liberación. De forma similar, Johnson y Pepperman (1998) encontraron entre un 5 y un 27% de alaclor y atrazina formulados con bentonita, montmorillonita, caolinita y óxido de hierro (III) que no se había liberado.

Las características del mineral de la arcilla, la cantidad y naturaleza de los cationes interlaminares, la relación arcilla-pesticida y el procedimiento seguido para preparar la formulación afectan a la interacción del pesticida con el adsorbente y al grado de liberación (El-Nahhal et al., 1998; Gerstl et al., 1998b; Undabeytia et al., 2000; Nennemann et al., 2001; Hermosín et al., 2001; Celis et al., 2002a, 2005; Carrizosa et al., 2003). El-Nahhal et al. (1998) comprobaron que complejos de organoarcilla con 0.5 mmol de benciltrimetilamonio/g de montmorillonita proporcionaban una mayor cantidad adsorbida y una mejor formulación de alaclor comparada con benciltrimetilamonio preadsorbido hasta la capacidad de cambio catiónico de la arcilla (0.8 mmol/g). Hermosín et al. (2001) mostraron que la liberación de fenurón a partir de organoarcillas era inversamente

proporcional al poder adsorbente de la organoarcilla y al tiempo de mezclado fenurón-organocilla.

Por lo tanto, un conocimiento profundo del efecto de todas estas variables parece crucial a la hora de optimizar el rendimiento de las formulaciones de liberación lenta de pesticidas para aplicaciones prácticas.



2. Objetivos



Los repetidos episodios de contaminación de aguas superficiales y subterráneas originados por herbicidas utilizados en el cultivo del olivar han provocado en los últimos años una considerable alarma social en nuestro país, que ha derivado en la prohibición y/o restricciones de uso de materias activas extensamente empleadas como herbicidas en este cultivo. En el olivar se dan condiciones que favorecen las pérdidas por procesos de lixiviación y escorrentía de los herbicidas aplicados, lo que obliga a utilizar dosis de herbicidas considerablemente superiores a las estrictamente necesarias para el control de las malas hierbas y, a menudo, a aumentar el número de aplicaciones anuales. El hecho de que las formulaciones convencionales de herbicidas contengan la mayor parte de las materias activas en una forma inmediatamente disponible acentúa el riesgo de pérdidas por transporte del producto fitosanitario y, por consiguiente, los problemas medioambientales y de pérdida de eficacia.

La hipótesis de partida para el presente estudio ha sido que el desarrollo de formulaciones de liberación lenta o controlada para herbicidas utilizados en el olivar podría reportar importantes beneficios relacionados fundamentalmente con la menor movilidad que presentan las materias activas cuando éstas se aplican adsorbidas en un soporte adecuado. En este contexto, este trabajo se ha diseñado con la finalidad de ensayar formulaciones de liberación lenta o controlada de algunos de los herbicidas más utilizados en el cultivo del olivar, preparadas a partir del soporte de los mismos en minerales de la arcilla tratados con diferentes cationes específicamente elegidos para aumentar la afinidad del mineral por los herbicidas seleccionados. Acompañadas de otras medidas, como por ejemplo de estrategias de control de la erosión, es de esperar que estas formulaciones contribuyan a disminuir las pérdidas por transporte de los herbicidas aplicados al suelo, lo que por una parte reduciría el riesgo de contaminación de las aguas y por otra podría permitir disminuir las cantidades de materia activa necesarias para un control adecuado de las malas hierbas.

El objetivo global de este trabajo se pretende alcanzar mediante el desarrollo y consecución de los siguientes objetivos específicos:

1. Desarrollar y caracterizar adsorbentes basados en el mineral de la arcilla montmorillonita, inalterada y modificada por la incorporación de diferentes cationes en sus espacios interlaminares, con una elevada afinidad por tres de los herbicidas más utilizados en el cultivo del olivar: diurón, terbutilazina y MCPA.

2. Evaluar mediante experimentos de laboratorio y de campo la utilidad de algunos de los adsorbentes desarrollados como posibles soportes para la preparación de formulaciones de liberación lenta de diurón, terbutilazina y MCPA, con el fin de atenuar el impacto ambiental provocado por los mismos tras su aplicación a suelos de olivar.

Para la consecución de los objetivos planteados, se seleccionaron dos montmorillonitas (SWy-2 y SAz-1) que se modificaron mediante el tratamiento con diferentes cationes con el fin de aumentar su afinidad por los herbicidas diurón, terbutilazina y MCPA. Las montmorillonitas modificadas se caracterizaron y se determinó la afinidad de los herbicidas por las mismas mediante estudios de adsorción-desorción. Con las montmorillonitas modificadas que presentaron las mejores propiedades adsorbentes para cada herbicida, se prepararon complejos adsorbente-herbicida, siguiendo diversas metodologías y mediante experimentos de laboratorio se evaluó la capacidad de los complejos preparados para reducir la velocidad de liberación de los herbicidas y su lixiviación en suelos, respecto a formulaciones comerciales convencionales de los herbicidas. Asimismo, se comparó la persistencia y biodisponibilidad en suelos y la eficacia biológica de las formulaciones de los herbicidas soportados en las montmorillonitas modificadas respecto a las formulaciones comerciales de referencia. Por último, se seleccionó una de las formulaciones desarrolladas para comparar en condiciones reales de campo la incidencia de los procesos de transporte por lixiviación y escorrentía, así como la eficacia biológica, para dicha formulación respecto a una formulación comercial convencional.



3. Materiales y métodos



3.1. MATERIALES

3.1.1. HERBICIDAS

3.1.1.1. Diurón

El Diurón (3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea) (Figura 17) es un herbicida perteneciente al grupo de las fenilureas. Es un sólido incoloro en su estado puro, de peso molecular 233.1 g/mol. Su solubilidad en agua es 42 mg/l a 25°C y es bastante soluble en disolventes orgánicos como en acetona (53 g/kg), benceno, etc. Su punto de fusión es de 158-159°C y su presión de vapor 0.41 mPa a 50°C. Algunos nombres comerciales de este herbicida son: crisuron, diater, di-on, karmex, unidrón... (Worthing y Hance, 1991).

El producto técnico utilizado en este trabajo ha sido diurón de alta pureza (> 98%) en forma de polvo soluble, suministrado por Sigma-Aldrich.

La formulación comercial de diurón usada en diferentes ensayos ha sido DIURÓN 80 WDG (80% p/p de diurón, en forma de gránulo dispersable en agua) proporcionado por la casa comercial Massó.

El diurón es un herbicida residual absorbido por vía radicular y transportado por el xilema. Actúa como inhibidor de la fotosíntesis. Puede ser empleado para el control de una amplia variedad de plantas anuales y perennes de hoja ancha y malas hierbas. Resulta selectivo en cultivos de alfalfa, algodónero, cítricos, espárragos, frutales, olivo y vid. Debe ser aplicado en preemergencia de las malas hierbas o asociado con un herbicida de contacto o traslocación a una dosis de 2-4 kg/ha. En cítricos, frutales de pepita, olivo y vid, las aplicaciones deben realizarse en otoño o al comienzo de la primavera (Liñán, 1994).

En el suelo, el diurón es moderadamente persistente, teniendo una vida media entre uno y varios meses. Puede degradarse a tres metabolitos: 1-(3,4-diclorofenil)-3-metilurea, 3,4-diclorofenil urea y 3,4-dicloroanilina (PPDB, 2010). Por los problemas medioambientales ocasionados por el uso del diurón, la Unión Europea prohibió la aplicación de este producto desde el 13 de diciembre de 2007 y las posibles prórrogas expiraron el 13 del diciembre de 2008. Sin embargo, dicha decisión ha sido revisada recientemente autorizándose su uso, aunque a dosis de aplicación inferiores a las que este herbicida venía aplicándose con anterioridad (directiva 2008/91/CE, BOE de 31 de marzo de 2009).

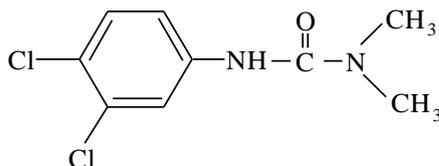


Fig 17. Estructura química de la molécula de diurón.

- Nomenclatura IUPAC: 3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea
- Fórmula: $C_9H_{10}Cl_2N_2O$
- Peso molecular: 233.10 g/mol
- Solubilidad en agua (25°C): 42 mg/l

3.1.1.2. Terbutilazina y atrazina

La terbutilazina (N^2 -*tert*-butil-6-cloro- N^4 -etil-1, 3, 5-triazina-2,4-diamina) (Figura 18) es un herbicida de la familia de las s-triazinas. Es un polvo incoloro con una solubilidad en agua de 8.5 mg/l a 20°C, 41 g/l en acetona, 14 g/l en etanol, 12 g/l en n-octanol y 0.36 g/l en n-hexano. Su punto de fusión está entre los 177 y 179 °C y su presión de vapor 0.15 mPa a 25°C. Algunos nombres comerciales de este producto son Athado líquido, Tillanex, Bellacide y Cuña.

El producto técnico utilizado en este trabajo ha sido terbutilazina de alta pureza (99%) en forma de polvo incoloro suministrado por Dr. Ehrenstorfer.

El producto comercial usado en diferentes ensayos ha sido CUÑA (terbutilazina 500 g/l en forma de suspensión concentrada suministrada por Spicam Inagra S.A.).

La terbutilazina es un herbicida usado en preemergencia y postemergencia temprana para el control de malas hierbas, bien absorbido por las raíces y muy débilmente foliar (Liñan, 2009). Se trasloca a través del xilema hacia los puntos de acción. Interfiere en la función clorofílica por inhibición de la transferencia de electrones en el receptor del fotosistema II en la reacción de Hill, y de la absorción de CO_2 . En el suelo se produce, por vía microbiana, una desmetilación de la cadena lateral, una hidroxilación que resulta de la hidrólisis de los átomos de Cl y del grupo amino desmetilado y la ruptura del anillo. Su vida media en el suelo es de 30-90 días, según el tipo de suelo (Worthing y Hance, 1991). Las plantas tolerantes la descloran rápidamente y la convierten en hidroxiterbutilazina. Está autorizada en los cultivos y plantaciones de cítricos, frutales de pepita, maíz y olivo (Liñan, 2008) y actualmente su dosis de aplicación está restringida a 1 kg/ha y año (Liñan, 2009).

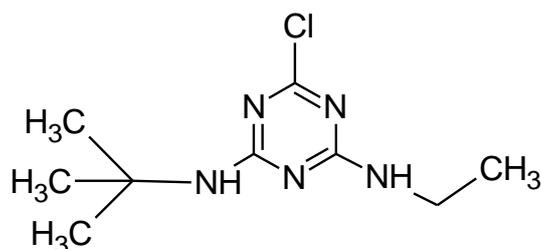


Fig 18. Estructura química de la molécula de terbutilazina.

- Nomenclatura IUPAC: *N*²-*tert*-butil-6-cloro-*N*⁴-etil-1, 3, 5-triazina-2,4-diamina.
- Fórmula: C₉H₁₆ClN₅
- Peso molecular: 229.7 g/mol
- Solubilidad en agua (25°C): 8.5 mg/l

Con el objetivo de ampliar los estudios de biodegradación de los herbicidas, se seleccionó el herbicida atrazina por disponer de una bacteria (*Pseudomonas* sp. cepa ADP) específica para su degradación. La atrazina (6-cloro-*N*²-etil-*N*⁴-isopropil-1, 3, 5-triazina-2,4-diamina) (Figura 19) es un herbicida del grupo de las triazinas con una estructura muy similar a la de terbutilazina. Es un sólido pulverulento e incoloro de peso molecular 215.7 g/mol. Su solubilidad en agua a 20°C es 35 mg/l y tiene una solubilidad en diclorometano a 20°C de 28000 mg/l. Su punto de fusión es 175.8°C y se descompone antes de alcanzar la ebullición.

El herbicida no marcado con ¹⁴C utilizado fue suministrado por Chem Service (West Chester, PA) con una pureza del 98%. La atrazina marcada con ¹⁴C fue adquirida de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), siendo su actividad específica de 1.63 MBq/mg y pureza radioquímica 98.7 %.

La atrazina actúa de modo selectivo y su acción es sistémica con actividad residual y foliar. Es útil en pre-emergencia, inmediatamente después de la siembra y antes de la germinación del cultivo, o en post-emergencia temprana, si bien tiene mejor acción herbicida cuando se aplica en post-emergencia. Controla malezas de hoja angosta, inhibiendo la fotosíntesis (fotosistema II). Su vida media en el suelo oscila entre uno y tres meses y puede degradarse en el mismo a tres metabolitos diferentes (6-desisopropil atrazina, desetil atrazina y 2-hidroxi atrazina).

Debido a los problemas de contaminación de aguas superficiales y subterráneas provocados por este herbicida, la Comunidad Europea (CE) prohibió su uso en marzo de 2004 (2002/248/CE). No obstante, el herbicida atrazina se ha seleccionado en este trabajo para los experimentos de biodisponibilidad por ser una molécula muy estudiada y considerada como modelo en numerosos estudios sobre dinámica de herbicidas en suelos y aguas desde los años 60 y por disponer de bacterias adaptadas para su degradación. Además, pertenece a la misma familia que la terbutilazina, que es uno de los herbicidas estudiados en esta Tesis Doctoral.

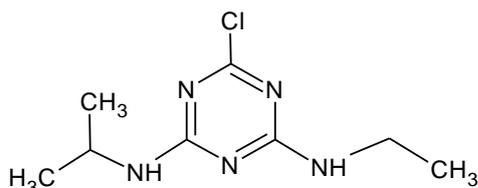


Fig 19. Estructura química de la molécula de atrazina.

- Nomenclatura IUPAC: 6-cloro-N²-etil-N⁴-isopropil-1,3,5-triazina-2,4-diamina
- Fórmula: C₈H₁₄ClN₅
- Peso molecular: 215.68 g/mol
- Solubilidad en agua (20°C): 35 mg/l

3.1.1.3. MCPA

El MCPA (ácido 4-cloro-2-metil-fenoxiacético) (Figura 20) pertenece a la familia de los fenoxiácidos. Su peso molecular es 200.6 g/mol y tiene una solubilidad en agua de 825 mg/l y un pKa= 3.1. La solubilidad en dietil éter es 770 g/l (25°C), 26.5 en tolueno, 49 en xileno, 5 en heptano, 480 en acetona, 775 en metanol, 69 en diclorometano, 0.323 en n-hexano y 218 en n-octano (Cabrera, 2008). Su punto de fusión es de 119-120.5 °C y su presión de vapor 2.3×10^{-2} mPa a 25°C. Algunos nombres comerciales de este producto son Procer M-40, Herbimur y AYAX.

El producto técnico utilizado ha sido MCPA de alta pureza (98.8 %) suministrado por Sigma-Aldrich.

El producto comercial ha sido AYAX (sal amina de MCPA 600 g/l en forma de concentrado soluble suministrado por Tratamientos Guadalquivir S.L.).

El MCPA es un herbicida hormonal, sistémico, selectivo, absorbido por vía foliar rápidamente y también por las raíces. Interfiere en la división y diferenciación celular así como en la síntesis de proteínas (Liñan, 2006). Se utiliza para el control de malas hierbas anuales o perennes de hoja ancha cuando se aplica en postemergencia de las mismas. Es selectivo y puede aplicarse en cereales, lino, arroz, vides, guisantes, patatas, espárragos y olivo a una dosis de 0.28-2.25 kg/ha. Con frecuencia se usa en combinación con otros herbicidas. Su vida media en suelos va de los 7 a los 14 días, con un promedio aproximado de 2 a 3 semanas. El MCPA se degrada en suelos, siendo el 2-metil-4-clorofenol uno de los metabolitos encontrados más frecuentemente.

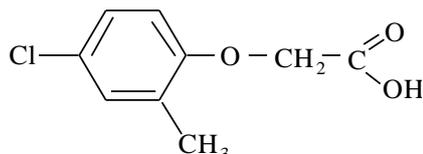


Fig 20. Estructura química de la molécula de MCPA.

- Nomenclatura IUPAC: ácido 4-cloro-2-metil-fenoxiacético
- Fórmula: $C_9H_9ClO_3$
- Peso molecular: 200.62 g/mol
- Solubilidad en agua (25°C): 825 mg/l

3.1.2. SUELOS

En este trabajo se han utilizado cuatro suelos (S1, S2, S3 y S4), los tres primeros procedentes de la finca experimental del IRNAS, que está situada en la localidad de Coria del Río (Sevilla), y el último procedente de Becker (Minnesota, EE.UU.). El suelo S1 se clasifica texturalmente como franco-arcillo-arenoso, el suelo S2 como arenoso-franco, el S3 como franco-arcillo-arenoso y el suelo S4 como franco-areno-arcilloso (Tabla 9).

Los suelos S1 y S2 fueron los usados para la mayoría de los experimentos de laboratorio (adsorción, lixiviación, persistencia y bioensayos). El suelo S3 fue en el que se realizó la experiencia en condiciones de campo y el S4 se usó de forma específica para el ensayo de biodisponibilidad, que fue realizado durante una estancia en el Departamento de *Ciencia del Suelo* de la Universidad de Minnesota.

Tabla 9. Procedencia, clasificación textural y experimentos en los que fueron usados cada uno de los cuatro suelos.

Suelo	Procedencia	Textura	Experimento
(S1)	Coria del Río (Sevilla)	Franco-arcillo-arenoso	Laboratorio (a)
(S2)	Coria del Río (Sevilla)	Arenoso-franco	Laboratorio (a)
(S3)	Coria del Río (Sevilla)	Franco-arcillo-arenoso	Campo
(S4)	Becker (MN, EE.UU.)	Franco-areno-arcilloso	Laboratorio (b)

(a) Estudios de adsorción, persistencia, lixiviación y bioeficacia.

(b) Estudios de biodisponibilidad.

Las muestras de los suelos se recogieron de una profundidad de 0-20 cm, se secaron al aire y se tamizaron usando un tamiz de 2 mm, antes de su caracterización y/o uso.

Las propiedades físico-químicas de los suelos S1, S2 y S3 fueron determinadas en los laboratorios de análisis de suelos del I.R.N.A.S. por la metodología usual. El suelo S4 fue analizado en los laboratorios del Departamento de *Ciencia del Suelo* del Campus de St. Paul de la Universidad de Minnesota (EE.UU.).

3.1.3. ADSORBENTES

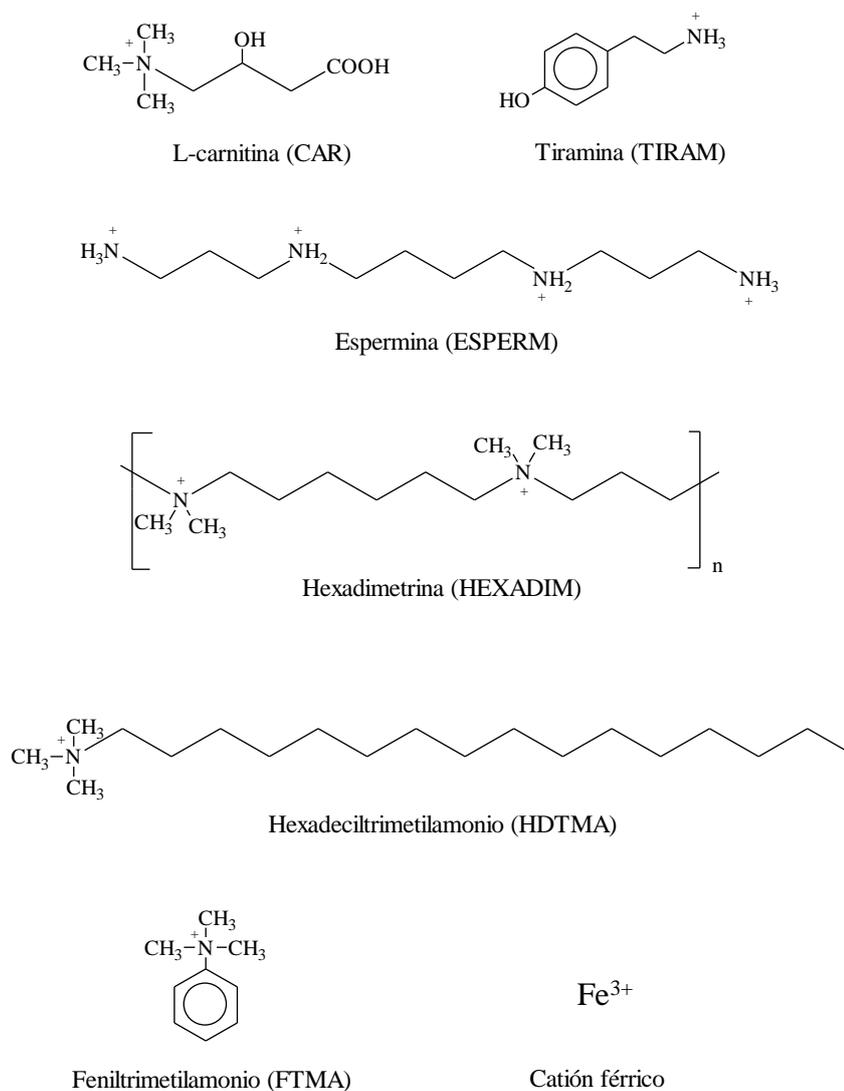
Las montmorillonitas SWy-2, rica en Na^+ , y SAz-1, rica en Ca^{2+} , suministradas por "The Clay Minerals Society" fueron modificadas con diferentes cationes. La Tabla 10 muestra algunas de las características más importantes de las montmorillonitas, mientras que la Figura 21 muestra la estructura de los cationes utilizados para la modificación de las mismas.

En general, los cationes seleccionados difieren en sus tamaños y la presencia de distintos grupos funcionales en sus estructuras, con el objeto de establecer una relación entre los herbicidas seleccionados y las características estructurales de los cationes. Los cationes orgánicos L-carnitina, tiramina y espermina fueron seleccionados debido a su origen natural, lo cual podría reducir la preocupación acerca de la incorporación de estos materiales en el suelo y ambientes acuáticos. El catión inorgánico Fe (III) fue escogido debido a que éste, al interaccionar con las montmorillonitas, provoca un aumento en la acidez superficial de las mismas, incrementando con ello la adsorción de algunos herbicidas al complejo (Celis, 1996; Celis et al., 1997a, 2002a). Además, con el fin de comparar las propiedades adsorptivas de los adsorbentes, se seleccionaron los cationes hexadeciltrimetilamonio y feniltrimetilamonio, dos cationes extensamente estudiados en la bibliografía (El-Nahhal et al., 2001; Cruz-Guzmán et al., 2004, 2005), y el polímero sintético hexadimetrina.

Tabla 10. Características de las montmorillonitas SWy-2 y SAz-1.

Montmorillonita	Origen	CIC ^a (cmol _c /kg)	Carga laminar (mol/celda unidad)	d ₀₀₁ ^a (nm)
SWy-2	Wyoming (EE.UU)	76	0.66	1.5
SAz-1	Arizona (EE.UU.)	120	1.11	1.4

^aCIC: Capacidad de Intercambio Catiónico; d₀₀₁: Espaciado basal.

**Figura 21.** Cationes utilizados para la modificación de las montmorillonitas.

Para la síntesis de las montmorillonitas intercambiadas con espermina, L-carnitina, hexadimetrina y tiramina, la cantidad de catión orgánico (sal de cloruro o bromuro) correspondiente al 50% ó 100% de la capacidad de intercambio de SWy-2 o SAz-1 (Tabla 10) fue disuelta en 50 ml de HNO₃ 1 mM y añadida a 1 g de montmorillonita. La suspensión fue agitada durante 24 h, centrifugada, lavada tres veces con 100 ml de agua destilada y después liofilizada. También se prepararon muestras blanco de las montmorillonitas por agitación durante 24 h de 1 g de montmorillonita en 50 mL de HNO₃ 1 mM, lavando 3 veces con 100 ml de agua destilada y después liofilizando.

La preparación de las organoarcillas con los cationes alquilamonio hexadeciltrimetilamonio (HDTMA) y feniltrimetilamonio (FTMA) se llevó a cabo mediante un tratamiento de 100 g de los minerales de la arcilla (SWy-2 y SAz-1) con una disolución etanol-agua (50-50) del cloruro de alquilamonio (HDTMA ó FTMA) que contenía la cantidad de catión orgánico correspondiente al 50 ó 100% de la CIC de la montmorillonita. Las suspensiones se agitaron durante 24 h, se centrifugaron, se lavaron 3 veces con una mezcla etanol:agua (50:50), después con agua destilada y por último se dializaron y liofilizaron.

Para la saturación de la montmorillonita SWy-2 con Fe³⁺ se trataron 10 g de ésta con 100 ml de una disolución de FeCl₃ 1 M, se agitó durante 24 h y se centrifugó. El líquido sobrenadante fue retirado y sustituido por otros 100 ml de la disolución de FeCl₃, repitiendo este proceso tres veces. La arcilla resultante fue lavada con agua destilada hasta que quedó libre de cloruros y finalmente se liofilizó.

La nomenclatura de todas las arcillas modificadas preparadas se resume en la Tabla 11.

Tabla 11. Nomenclatura de las montmorillonitas modificadas utilizadas como adsorbentes. Cantidad de catión añadida y grado de saturación esperado de la C.I.C. de la arcilla.

Muestra	Montmorillonita	Catión modificador	Cantidad de catión modificador añadido (g/kg arcilla)	SCt ^a (%)
SWy-2 (Sin tratar)	SWy-2	-	-	-
SWy-2 (Blanco)	SWy-2	-	-	-
SW-Fe	SWy-2	Fe (III)	558	100
SW-CAR₁₀₀	SWy-2	L-carnitina	97.8	100
SW-ESPERM₅₀	SWy-2	Espermina	19.7	50
SW-ESPERM₁₀₀	SWy-2	Espermina	39.4	100
SW-HEXADIM₅₀	SWy-2	Hexadimetrina	40.9	50
SW-HEXADIM₁₀₀	SWy-2	Hexadimetrina	81.8	100
SW-TIRAM₅₀	SWy-2	Tiramina	52.7	50
SW-TIRAM₁₀₀	SWy-2	Tiramina	105.4	100
SW-FTMA₅₀	SWy-2	Feniltrimetilamonio	51.9	50
SW-FTMA₁₀₀	SWy-2	Feniltrimetilamonio	103.9	100
SW-HDTMA₅₀	SWy-2	Hexadeciltrimetilamonio	107.9	50
SW-HDTMA₁₀₀	SWy-2	Hexadeciltrimetilamonio	215.8	100
SAz-1 (Sin tratar)	SAz-1	-	-	-
SAz-1 (Blanco)	SAz-1	-	0	0
SA-CAR₁₀₀	SAz-1	L-carnitina	153.7	100
SA-ESPERM₅₀	SAz-1	Espermina	30.9	50
SA-ESPERM₁₀₀	SAz-1	Espermina	61.8	100
SA-HEXADIM₅₀	SAz-1	Hexadimetrina	64.2	50
SA-HEXADIM₁₀₀	SAz-1	Hexadimetrina	128.4	100
SA-TIRAM₅₀	SAz-1	Tiramina	82.8	50
SA-TIRAM₁₀₀	SAz-1	Tiramina	165.6	100
SA-FTMA₅₀	SAz-1	Feniltrimetilamonio	81.6	50
SA-FTMA₁₀₀	SAz-1	Feniltrimetilamonio	163.2	100
SA-HDTMA₅₀	SAz-1	Hexadeciltrimetilamonio	170.4	50
SA-HDTMA₁₀₀	SAz-1	Hexadeciltrimetilamonio	340.8	100

^aSCt: Porcentaje teórico de la C.I.C. compensada por los cationes modificadores.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE LOS HERBICIDAS

3.2.1.1. Cromatografía líquida de alta resolución

El método analítico que se ha utilizado para la determinación de los herbicidas diurón, terbutilazina y MCPA y para los análisis de atrazina sin marcar con ^{14}C es la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de fase reversa. El cromatógrafo utilizado es de la marca comercial "Waters Millipore" y consta de un controlador del sistema (Waters 600E System Controller), un detector de radiación ultravioleta emitida por una lámpara de deuterio (Waters 998 Photodiode Array Detector) y un inyector automático de muestras (Waters 717 Autosampler). Estos sistemas son controlados por un ordenador mediante el programa "Millenium 2010 Chromatography Manager, versión 2.15.01".

La Tabla 12 muestra las condiciones de determinación de cada uno de los herbicidas estudiados, obtenidas a partir de la puesta a punto del método cromatográfico.

Tabla 12. Condiciones de análisis de los herbicidas por HPLC.

Herbicida	Fase móvil (%)	λ Detección (nm)	Tiempo retención (min)	LD ^a (mg/l)	LC ^a (mg/l)
Diurón	Acetonitrilo: Agua (40: 60)	250	4.5	0.01	0.04
MCPA	Metanol: H ₃ PO ₄ dil. pH 2 (60:40)	230	4.6	0.02	0.05
Terbutilazina	Acetonitrilo: Agua (50: 50)	220	3.8	0.01	0.02
Atrazina	Acetonitrilo: Agua (50:50)	220	4.8	0.01	0.02

^aLos límites de detección (LD) y cuantificación (LC) del HPLC se calcularon según Camacho-Muñoz et al. (2009).

Todos los herbicidas fueron analizados empleando una columna Nova Pack C₁₈ de 150 mm de longitud y 3.9 mm de diámetro interno. El volumen de inyección fue de 25 μl y el flujo de fase móvil de 1 ml min^{-1} .

3.2.1.2. Conteo por centelleo líquido

El método analítico que se ha utilizado en el estudio de biodisponibilidad para la determinación de atrazina marcada con ^{14}C ha sido el conteo por centelleo líquido. El

contador de centelleo utilizado ha sido de la marca Tri-Carb modelo 1500 Packard. El tiempo de análisis fue de 5 minutos, utilizando 1 ml de muestra mezclado con 5 ml de líquido de centelleo Ecolite (+) suministrado por MP Biomedical (ICN) (Irvine, CA, EE. UU.).

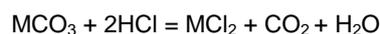
3.2.2. CARACTERIZACIÓN DE LAS MONTMORILLONITAS INALTERADAS Y MODIFICADAS

El análisis del contenido en C y N de las muestras de motmorillonitas inalteradas y modificadas se llevó a cabo usando un analizador elemental Carlo Erba, modelo EA 1108. Los valores del espaciado basal de las muestras se determinaron a partir de los diagramas de difracción de rayos X, obtenidos sobre agregados orientados, usando un difractómetro Siemens D-5000 con radiación $\text{CuK}\alpha$. Los espectros de Infrarrojos con transformada de Fourier (FTIR) se registraron a través de discos de KBr con un 1% de muestra, usando un espectrómetro Nicolet 5 PC. El análisis térmico se realizó en un aparato Setaran TG-DTD 92, modelo 1618, usando 15 mg de muestra diluida en 35 mg de Al_2O_3 . El análisis térmico diferencial (DTA) y el análisis termogravimétrico (TG) fue realizado al aire entre temperatura ambiente y 900°C usando una rampa de $10^\circ\text{C}/\text{min}$.

3.2.3. CARACTERIZACIÓN DE LOS SUELOS

Una vez realizada la toma de muestra de los suelos (0-20 cm), éstos se dejaron secar al aire y se tamizaron con un espacio de malla de 2 mm, conservándolos en cámara fría a una temperatura de 4°C . La textura de los suelos se determinó por sedimentación (Gee y Bauder, 1982).

La determinación cuantitativa de carbonatos se llevó a cabo a través de la descomposición de los carbonatos por la acción del ácido clorhídrico, con desprendimiento de anhídrido carbónico gaseoso, según la reacción:



Conociendo la cantidad de CO_2 desprendida mediante la medida de su volumen, presión y temperatura, puede calcularse la cantidad de carbonatos en la muestra de suelo.

El contenido de materia orgánica de los suelos se determinó por oxidación con dicromato potásico, y se calculó el porcentaje de materia orgánica de la muestra como cociente entre los centímetros cúbicos de disolución de dicromato gastados, multiplicado por el factor de normalidad, y los gramos de muestra ensayados.

En el caso de los suelos S1 y S2, al ser los utilizados en la mayoría de los experimentos de laboratorio, se llevó a cabo una caracterización más exhaustiva consistente en medidas de distribución de tamaños de poro y determinación de la mineralogía de la fracción arcilla.

Así, la distribución de tamaños de poro (de 40 a 0.004 μm) de dichos suelos se determinó por porosimetría de intrusión de mercurio usando un porosímetro Carlo Erba 2000. Para la medida de la porosidad, se tomó un agregado de cada suelo de aproximadamente 1 gramo, que se secó a 90°C durante 24 h antes del análisis de porosimetría.

La fracción arcilla de los suelos S1 y S2 (fracción de tamaño de partícula < 2 μm) se separó por sedimentación, tras una eliminación previa de carbonatos con acetato/acético (pH=5) (Jackson, 1975). La mineralogía de las fracciones arcilla se determinó por difracción de rayos X sobre agregados orientados saturados en Mg^{2+} y K^+ tratados con etilenglicol y calcinadas a 500°C, respectivamente (Brown, 1961).

3.2.4. ESTUDIOS DE ADSORCIÓN-DESORCIÓN

Adsorción-desorción de los herbicidas a las montmorillonitas. La adsorción de los herbicidas a todas las muestras de montmorillonitas inalteradas y modificadas (Tabla 11) fue medida por triplicado a una sola concentración inicial $C_{\text{ini}} = 1 \text{ mg/l}$. Para ello, 20 mg de muestra adsorbente se equilibraron por agitación durante 24 h a $20 \pm 2^\circ\text{C}$ con una disolución de herbicida de 1 mg/l, preparada en agua destilada a partir de una disolución de 200 mg/l preparada en metanol. Tras equilibrar, las suspensiones se centrifugaron y se retiraron 4 ml de la disolución sobrenadante para su análisis.

La concentración de herbicida de las disoluciones sobrenadantes (C_e) se determinó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) como se describe en el apartado 3.2.1. También se agitó durante 24 h una disolución del herbicida sin adsorbente y se usó como control. El porcentaje de herbicida adsorbido (%Ads) por los diferentes adsorbentes se calculó usando la siguiente fórmula:

$$\% \text{Ads} = [(C_{\text{ini}} - C_e) / C_{\text{ini}}] \times 100$$

También se obtuvieron las isotermas de adsorción-desorción de los herbicidas a muestras seleccionadas. Para ello, se prepararon duplicados de 20 mg de las muestras

adsorbentes con 8 ml de disoluciones iniciales del herbicida a diferentes concentraciones ($C_{ini} = 0.1, 0.2, 1$ y 2 mg/l) por agitación mecánica a $20 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 24 h. Tras equilibrar, las suspensiones se centrifugaron y se retiraron 4 ml de las disoluciones sobrenadantes para su análisis. La concentración de herbicida en las disoluciones sobrenadantes se determinó por HPLC. La cantidad de herbicida adsorbido se calculó por la diferencia entre las concentraciones de las disoluciones iniciales y las de equilibrio. Para la obtención de la cantidad adsorbida (C_s), se utiliza la siguiente fórmula:

$$C_s = [(C_{ini} - C_e)/M] \times V$$

donde

C_{ini} = concentración inicial de herbicida en mg/l.

C_e = concentración de herbicida en la disolución de equilibrio en mg/kg.

M = masa de adsorbente en kilogramos ($2 \cdot 10^{-5}$ kg).

V = volumen de disolución en litros ($8 \cdot 10^{-3}$ l).

Representando los datos de C_s frente a C_e se obtiene la isoterma de adsorción del herbicida al adsorbente en cuestión, a la temperatura a la que se realiza el estudio. Todos los puntos de las isotermas de adsorción se obtuvieron por duplicado.

Las isotermas de adsorción se ajustaron a la ecuación de Freundlich:

$$\log(C_s) = \log(K_f) + N_f \log(C_e)$$

donde C_s es la cantidad de soluto adsorbida a la concentración de equilibrio C_e y las constantes K_f y N_f son una medida de la capacidad de adsorción y de la forma de la isoterma, respectivamente. Estas constantes se obtuvieron a partir del ajuste lineal de $\log(C_s)$ frente a $\log(C_e)$.

La desorción se midió inmediatamente después de la adsorción a partir del punto de equilibrio más alto de la isoterma de adsorción, es decir, el correspondiente a la concentración inicial de 2 mg/l. Los 4 ml de líquido sobrenadante retirados para el análisis de la adsorción se sustituyeron por 4 ml de agua destilada. Después se volvió a agitar a $20 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 24 h, la suspensión se centrifugó y la concentración del herbicida se determinó en el líquido sobrenadante. Este proceso de desorción se repitió tres veces. Para calcular la cantidad de herbicida adsorbido tras cada paso de desorción (n) se utilizó la siguiente fórmula:

$$C_{sd(n)} = C_{sd(n-1)} - [C_{ed(n)} - C_{ed(n-1)}] / 2 \times V/M$$

Las isotermas de desorción se obtuvieron representando la cantidad de herbicida que permanece adsorbido, C_{sd} , a la concentración de equilibrio C_{ed} tras cada paso de desorción. Estas isotermas también se ajustaron a la ecuación de Freundlich, obteniéndose los coeficientes de desorción correspondientes, K_{fdes} y N_{fdes} , a partir del ajuste lineal de $\log(C_{sd})$ frente a $\log(C_{ed})$. Además, se calcularon los coeficientes de histéresis como el cociente entre los valores de N_f de la desorción y la adsorción $H = N_{fdes}/N_f$. Esta constante es indicativa de las diferencias entre las isotermas de adsorción y de desorción.

Adsorción-desorción de los herbicidas a los suelos. Para la obtención de las isotermas de adsorción-desorción de los herbicidas diurón, terbutilazina y MCPA a los suelos S1 y S2, se prepararon triplicados de 5 g de suelo con 10 ml de las disoluciones iniciales del herbicida ($C_{ini} = 0.1, 0.2, 1$ y 2 mg/l) por agitación mecánica a $20 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 24 h. Tras equilibrar, las suspensiones se centrifugaron y se retiraron 5 ml de las disoluciones sobrenadantes para su análisis (Figura 22). La concentración de herbicida en las disoluciones sobrenadantes se determinó por HPLC. La cantidad de herbicida adsorbido fue calculada por la diferencia entre las concentraciones de las disoluciones iniciales y las de equilibrio y se representó frente a la concentración de equilibrio, obteniéndose las isotermas de adsorción que se ajustaron a la ecuación de Freundlich. Debido a la importancia de la materia orgánica en la adsorción de plaguicidas, se expresó, además, el coeficiente de adsorción K_f en función del contenido en carbono orgánico del suelo como el cociente entre los valores de K_f y la fracción de carbono orgánico ($K_{oc} = K_f/f_{oc}$).

La desorción se midió inmediatamente después de la adsorción a partir del punto de equilibrio más alto de la isoterma de adsorción, es decir, el correspondiente a la concentración inicial de 2 mg/l. Los 5 ml de líquido sobrenadante retirados para el análisis de la adsorción se sustituyeron por 5 ml de agua destilada. Tras agitar a $20 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 24 h, las suspensiones se centrifugaron y la concentración del herbicida se determinó en el líquido sobrenadante. Este proceso de desorción se repitió tres veces.

Los cálculos de las cantidades adsorbidas y desorbidas se realizaron como se ha descrito para las arcillas.

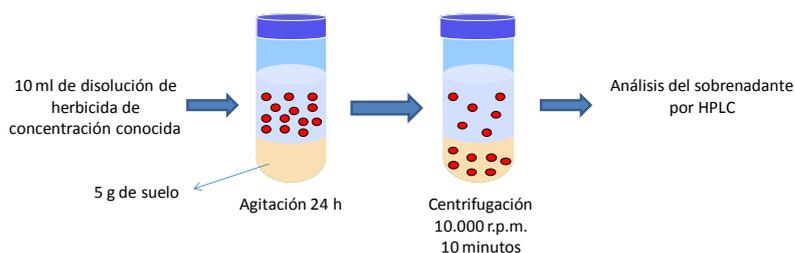


Figura 22. Esquema del proceso de adsorción de los herbicidas en las muestras de suelo.

3.2.5. PREPARACIÓN DE FORMULACIONES ADSORBENTE-HERBICIDA

Con aquellas montmorillonitas modificadas que en los estudios de adsorción-desorción mostraron las mejores propiedades adsorbentes, se prepararon complejos de liberación lenta o controlada de los herbicidas, que posteriormente serían utilizados para realizar estudios de velocidad de liberación en medio acuoso, persistencia y movilidad en suelos, biodisponibilidad y bioensayos.

Para la preparación de las formulaciones, se utilizaron dos metodologías:

1) Adsorción en fase acuosa: Consistió en poner en contacto una determinada cantidad del adsorbente seleccionado con una disolución acuosa concentrada del herbicida. Tras agitar la suspensión, se filtró el sólido (complejo adsorbente-herbicida) y se dejó secar al aire.

2) Mezcla física seguida de adición/evaporación de disolvente: Se llevó a cabo con fines comparativos y cuando por el procedimiento anterior las cantidades de herbicida adsorbidas en el adsorbente resultaron ser muy pequeñas, bien por alcanzarse la saturación del adsorbente o bien porque una baja solubilidad en agua del herbicida limitaba las cantidades adsorbidas. En estos casos se preparó una mezcla física del adsorbente y el herbicida en sus formas sólidas y en la proporción deseada y se añadió una pequeña cantidad de disolvente, generalmente orgánico, que posteriormente se dejó evaporar. El disolvente facilita la interacción adsorbente-herbicida y tras su evaporación se consigue el complejo con la cantidad de herbicida deseada (Hermosín et al., 2001; Celis et al., 2002b).

Los procedimientos específicos de síntesis llevados a cabo con cada herbicida se detallan a continuación y están resumidos en la Tabla 13:

En el caso de **diurón** las montmorillonitas seleccionadas como soportes del herbicida fueron SW-ESPERM₁₀₀, SW-HDTMA₁₀₀ y SA-HDTMA₁₀₀. Con ellas, se prepararon tres complejos por adsorción (procedimiento 1) poniendo en contacto 100 mg de organoarcilla con 160 ml de una disolución de diurón de 40 mg l⁻¹ (solubilidad de diurón en agua= 42 mg l⁻¹). Las suspensiones resultantes se agitaron durante 24 horas y posteriormente se filtraron, recuperando el sólido, que se dejó secar al aire y se molió en un mortero de ágata. Además, con fines comparativos se preparó un complejo con un 4% de herbicida siguiendo el procedimiento 2. Para ello se mezclaron 960 mg de la organoarcilla SW-ESPERM₁₀₀ con 40 mg de herbicida, se añadió 1 ml de metanol, se dejó evaporar al aire, moliendo el sólido resultante en un mortero de ágata.

Para **terbutilazina**, las montmorillonitas seleccionadas fueron SW-Fe, SW-CAR₁₀₀ y SA-HDTMA₁₀₀. Se prepararon dos complejos por adsorción (procedimiento 1) con SW-

CAR₁₀₀ y SA-HDTMA₁₀₀ poniendo en contacto 100 mg de organoarcilla con 200 ml de una disolución de terbutilazina de 5 mg l⁻¹. Las suspensiones se agitaron durante 24 horas y se centrifugaron a 10.000 r.p.m. durante 10 minutos. De los 200 ml de líquido sobrenadante, 180 ml se reemplazaron por 180 ml de la disolución de terbutilazina de 5 mg l⁻¹. Este proceso se repitió tres veces consecutivas. A continuación, se filtró a vacío y el sólido resultante se dejó secar al aire y se molió en un mortero de ágata. Además, se prepararon complejos al 4% de herbicida con los adsorbentes SW-Fe, SW-CAR₁₀₀ y SA-HDTMA₁₀₀ usando diferentes disolventes tal y como se indica en la Tabla 13. Para ello, se mezclaron 960 mg del adsorbente con 40 mg de herbicida, se añadió 1 ml de disolvente, se dejó evaporar al aire y el sólido resultante se molió en un mortero de ágata.

Tabla 13. Procedimientos específicos de preparación de formulaciones llevados a cabo con diurón, terbutilazina y MCPA.

Herbicida	Arcillas utilizadas como soportes	Método de preparación	
		Adsorción en fase acuosa (mg l ⁻¹) ^a	Mezcla física + disolvente ^b
Diurón	SA-HDTMA ₁₀₀	40	–
	SW-HDTMA ₁₀₀	40	–
	SW-ESPERM ₁₀₀	40	MeOH
Terbutilazina	SA-HDTMA ₁₀₀	5	MeOH
	SW-CAR ₁₀₀	5	MeOH, Acetona, H ₂ O
	SW-Fe	–	H ₂ O
MCPA	SA-HDTMA ₁₀₀	600 , 200	MeOH
	SW-HDTMA ₁₀₀	600	–
	SA-HEXADIM ₁₀₀	–	MeOH

^a Se indica la concentración de herbicida (mg l⁻¹) utilizada en la síntesis.

^b Se indica el disolvente utilizado para la preparación de los complejos.

En el caso de **MCPA**, se seleccionaron las muestras SW-HDTMA₁₀₀, SA-HDTMA₁₀₀ y SA-HEXADIM₁₀₀. Para SA-HDTMA₁₀₀ se prepararon complejos por adsorción usando dos disoluciones de MCPA a diferente concentración (600 mg l⁻¹ y 200 mg l⁻¹). Para

ello se mezclaron 500 mg de la organoarcilla con 200 ml de cada una de las disoluciones de MCPA. La suspensión resultante se agitó durante 24 horas y se filtró y el sólido resultante se dejó secar al aire y se molió. Para SW-HDTMA₁₀₀, sólo se preparó un complejo por adsorción con la disolución de MCPA de 600 mg l⁻¹ siguiendo el mismo procedimiento que para SA-HDTMA₁₀₀. Con fines comparativos se prepararon también complejos al 6% de herbicida con los adsorbentes SA-HDTMA₁₀₀ y SA-HEXADIM₁₀₀ poniendo en contacto 500 mg de organoarcilla con 30 mg del herbicida y 1 ml de MeOH.

Tras la preparación de los complejos de diurón y terbutilazina, 10 mg de éstos se extrajeron con 10 ml de metanol (24 h) para calcular directamente las cantidades de herbicida presente en los mismos. Para la extracción del herbicida MCPA de los complejos, se pesaron 10 mg de éstos y se extrajeron (24 h) con 10 ml de la fase móvil usada para el análisis de MCPA por HPLC (40% H₃PO₄ diluido a pH 2: 60% MeOH).

Para la preparación de las formulaciones de **atrazina** usadas en los estudios de biodisponibilidad, se eligió una relación organoarcilla: herbicida lo suficientemente alta para asegurar que la mayor parte del herbicida se encontrara interaccionando con la organoarcilla. Se seleccionaron las muestras SW-CAR₁₀₀ y SA-HDTMA₁₀₀ y se pusieron en contacto 300 mg de cada una de estas organoarcillas con 10 ml de una disolución de atrazina marcada con ¹⁴C de 20 mg l⁻¹ en MeOH. Se llevó a sequedad usando una corriente de N₂ y el polvo resultante se molió en un mortero de ágata. La radioactividad de los complejos preparados fue de 1.08 KBq por mg de complejo.

3.2.6. CINÉTICAS DE LIBERACIÓN EN AGUA

La liberación de los herbicidas diurón, terbutilazina y MCPA a partir de las diferentes formulaciones preparadas se estudió en agua en condiciones estáticas. Dichas cinéticas de liberación en agua se obtuvieron en botes de vidrio de 500 ml de capacidad a los que se les añadió 250 ml de agua y 0.5 mg del herbicida, bien como complejos con las montmorillonitas modificadas o como producto comercial (Figura 23). A los tiempos seleccionados (entre 0 y 168 horas), los botes se agitaron, se dejaron reposar durante 10 minutos y se tomaron 2 ml de disolución que se filtraron y analizaron por HPLC para determinar la concentración de herbicida en disolución. Todos los experimentos se realizaron por duplicado.



Figura 23. Cinética de liberación de los herbicidas a partir de diferentes formulaciones.

3.2.7. EXPERIMENTOS DE INCUBACIÓN DE LOS HERBICIDAS EN LOS SUELOS

3.2.7.1. Curvas de disipación

El estudio de la cinética de disipación de los herbicidas en suelos se llevó a cabo en botes de vidrio de 750 ml con 600 g de suelo S1 y S2 tratados con el herbicida a una dosis de 1.7 mg/kg de suelo (Figura 24). Para la aplicación del herbicida se siguió una metodología similar a la descrita por Brinch et al. (2002). Se añadieron 150 g de suelo y 140 ml de agua y, a continuación, el herbicida (1 mg) en forma de formulación comercial o en forma de formulaciones de arcilla. Se homogeneizó la muestra y se añadieron tres porciones de suelo de 150 g cada una. El experimento se realizó por duplicado incubándose los suelos a temperatura ambiente y tomándose una muestra de 5 g de suelo cada semana que se extrajeron con 10 ml de metanol (terbutilazina y diurón) o mezcla metanol: H_3PO_4 diluido a $pH=2$ (60:40) (MCPA) para determinar la concentración de herbicida en la misma. La humedad del suelo (25%) se mantuvo constante a lo largo de todo el experimento.



Figura 24. Cinética de disipación de los herbicidas en forma de diferentes formulaciones.

3.2.7.2. Estudio de biodisponibilidad

Con el fin de profundizar en la cinética de biodegradación de los herbicidas soportados en las arcillas, se llevó a cabo un estudio para determinar el efecto del tipo de formulación en la mineralización del herbicida atrazina por la bacteria *Pseudomonas* sp. cepa ADP (bacteria específica de la degradación de atrazina, capaz de usar atrazina como única fuente de C y N). Dicho experimento se llevó a cabo pesando 10 g de suelo S4 en tubos de centrífuga a los que se añadió atrazina marcada con ^{14}C a una dosis de 1 mg kg^{-1} y 168.2 Bq g^{-1} , bien en forma libre (disuelta en 0.75 ml de metanol) o bien soportada en las montmorillonitas modificadas SW-CAR₁₀₀ y SA-HDTMA₁₀₀ (ver apartado 3.2.5).

Tras la aplicación del herbicida, las muestras de suelo fueron inoculadas con 1 ml de suspensión de *Pseudomonas* sp. cepa ADP, equivalente a una concentración de 1×10^8 microorganismos g^{-1} de suelo, y posteriormente se colocó lana de vidrio sobre el suelo y un vial con 4 ml de NaOH 0.5 M sobre la misma. Los suelos se incubaron a 25°C en oscuridad durante un periodo de 2 semanas llevando un control del ^{14}C mineralizado ($^{14}\text{CO}_2$ recogido en los 4 ml de NaOH) a lo largo del experimento.

Al final del periodo de 2 semanas de incubación, las muestras de suelo tratadas con atrazina e inoculadas se extrajeron con 20 ml de una disolución de CaCl_2 0.01 N, se agitaron durante 24 horas, se centrifugaron (1500 r.p.m.; 15 minutos) y se midió el volumen final y su radioactividad. Posteriormente, se realizaron tres extracciones más, las dos primeras con una disolución MeOH: H_2O 4:1 y la última con MeOH. La fase orgánica de estas tres fracciones se evaporó con una corriente de N_2 y se midió el volumen obtenido y su radioactividad. Con las fracciones obtenidas de las dos primeras extracciones, se realizó una recolección por HPLC cada minuto durante el tiempo de análisis y se midió en el contador de centelleo añadiendo 5 ml de líquido de centelleo. Finalmente, se realizó un análisis por combustión del ^{14}C en las muestras de suelo. Este mismo procedimiento de extracción y combustión también se llevó a cabo con muestras de suelo control, inmediatamente después de añadir el herbicida, bien en forma libre o como formulación de las organoarcillas, para comparar la distribución de la radioactividad en los extractos y retenida por el suelo a tiempo cero y tras el periodo de incubación.

3.2.8. EXPERIMENTOS DE LIXIVIACIÓN EN COLUMNAS DE SUELOS

Para el estudio de la lixiviación de los herbicidas en el laboratorio se utilizaron columnas de vidrio de 30 cm de longitud y 3.1 cm de diámetro interno (Figura 25).

Para el relleno de las columnas se utilizó lana de vidrio, arena de mar lavada de grano grueso y los suelos S1 y S2. En primer lugar, se colocó la lana de vidrio y 10 g de arena de mar (para evitar el arrastre de partículas de suelo a los lixiviados) y posteriormente se rellenaron a intervalos de 5 cm con el suelo, hasta llegar a 20 cm, empaquetándose a mano. Se termina añadiendo de nuevo 10 g de arena de mar para evitar la formación de canales preferenciales.

Antes de aplicar el herbicida, las columnas se saturaron con 100 ml de agua destilada y se dejaron drenar libremente durante 24 h. El lixiviado se recogió y se midió en una probeta. Para el cálculo del volumen de poros de la columna de suelo se halló la diferencia entre el agua aplicada hasta saturación (100 ml) y el volumen de lixiviado de cada columna, dando un resultado para el suelo S1 de 62.7 ± 0.5 ml y para el suelo S2 de 58.5 ± 0.5 ml.

Una vez saturadas las columnas, se añadió el herbicida correspondiente a una dosis de 2 kg/ha en forma de producto comercial disuelto en agua y en forma de diferentes complejos arcilla-herbicida. Para facilitar la aplicación de los sólidos se utilizaron 15 ml de agua. Para cada formulación, el experimento se realizó por triplicado.

El experimento se prolongó durante 76, 51 y 14 días para diurón, terbutilazina y MCPA respectivamente en el caso del suelo S1 y 64, 54 y 10 días para el suelo S2, en los que diariamente se aplicaron 15 ml de agua destilada y se recogieron los lixiviados, que se filtraron y analizaron por HPLC para determinar la concentración de herbicida presente en los mismos.



Figura 25. Columnas de suelo usadas para el experimento de lixiviación.

Al finalizar el experimento de lixiviación, el suelo contenido en la columna se dividió en 4 porciones de 5 cm que se extrajeron mediante agitación durante 24 h con 100 ml de metanol en el caso de diurón y terbutilazina ó 100 ml de mezcla MeOH: H₃PO₄ diluido a

pH=2 (60:40) en el caso de MCPA. El líquido sobrenadante se filtró y se analizó por HPLC para determinar la cantidad residual de herbicida en las columnas.

3.2.9. BIOENSAYOS

3.2.9.1. Bioensayo general

El estudio de la eficacia biológica de las distintas formulaciones de los herbicidas diurón, terbutilazina y MCPA se llevó a cabo en el laboratorio por medio de un bioensayo realizado con berro (*Lepidum sativum*), que se eligió por ser una planta sensible a estos herbicidas y con buena tasa de germinación. Los materiales utilizados en estos bioensayos fueron los siguientes:

- Macetas con superficie= 50 cm² para diurón y MCPA y de 32 cm² para terbutilazina.
- Lana de vidrio.
- Suelo (S1 y S2).
- Arena de mar lavada de grano grueso (Panreac).
- Placas Petri.
- Semillas de berro (*L. sativum*).
- Herbicidas (Diurón, Terbutilazina y MCPA) en forma de formulación comercial y formulaciones de arcilla.

En el fondo de las macetas se colocó la lana de vidrio y la arena de mar (30 g) para facilitar el drenaje de agua y evitar pérdidas de partículas de suelo. Posteriormente las macetas se rellenaron con el suelo (220 g/maceta para diurón y MCPA y 100 g/maceta para terbutilazina), se colocaron en placas Petri y se les añadió agua hasta que la maceta quedó saturada. Tras dejar drenar 24 h, se sembraron 15 semillas de berro (*Lepidum sativum*) en cada maceta de superficie 50 cm² y 9 semillas en las macetas de 32 cm², se semienterraron y se añadió unos 10 g de suelo aproximadamente para cubrir las semillas plantadas. A continuación, se aplicó el herbicida a una dosis de 2 kg/ha, en forma de formulación comercial y de los distintos complejos arcilla-herbicida, preparando además macetas a las que no se les aplicó herbicida y que sirvieron de control. Para el caso de MCPA, debido a su efecto pre y post emergente, éste se aplicó también después de dejar germinar las

semillas, seleccionando el suelo S1 para el experimento en condiciones de postemergencia y el suelo S2 para el experimento en condiciones de preemergencia.

Las macetas se prepararon por duplicado, se colocaron en un lugar idóneo para su germinación y se regaron diariamente (Figuras 26, 27). La eficacia biológica se determinó mediante el control visual del crecimiento de plantas durante el transcurso del bioensayo y determinando la biomasa en cada maceta dos semanas después de la aplicación del herbicida.



Figura 26. Preparación de macetas utilizadas para bioensayos.



Figura 27. Macetas durante un bioensayo realizado con Berro (*Lepidum Sativum*).

3.2.9.2. Bioensayos con simulación de alto riesgo de lixiviación

Para el caso de MCPA se diseñó además un bioensayo en condiciones de aporte de agua abundante (60 l/m^2) inmediatamente después de la aplicación del herbicida usando las macetas con superficie de 50 cm^2 , en las que se colocó en el fondo la lana de vidrio y la arena de mar (30 g) y se rellenaron con 220 g de los suelos S1 y S2 cada una. A

continuación, se aplicó el herbicida a una dosis de 2 kg/ha en forma de formulación comercial o como formulación de la organoarcilla seleccionada: SA-HDTMA₁₀₀ ads (200 ppm). Además, se prepararon macetas a las que no se aplicó el herbicida y que sirvieron de control. Justo después de la aplicación del herbicida se añadieron 300 ml de agua y se recogió el agua lixiviada de las macetas que se analizó por HPLC, después de lo cual se sembraron las semillas de berro y se comprobó la efectividad biológica de las formulaciones.

El objetivo de este experimento fue comprobar si el uso de estas formulaciones podría evitar la necesidad de una segunda aplicación del herbicida en el caso de que se hubiese dado un episodio de lluvia intensa poco después de la aplicación del herbicida.

3.2.10. EXPERIMENTO DE CAMPO

El estudio de campo se realizó en la finca experimental que el IRNAS posee en la localidad sevillana de Coria del Río. Se tomaron dos parcelas de 4 m² cada una (4 x 1 m) dejando una separación entre ambas de 5 m, en cada una de las cuales existía un depósito para recoger el agua de escorrentía procedente de las mismas (Figuras 28 y 29). En una de las parcelas se aplicó el producto comercial de diurón y en la otra se aplicó la formulación de diurón soportada en SW-ESPERM₁₀₀, preparada por adición/evaporación de metanol con un contenido de herbicida del 4%. La dosis aplicada en cada parcela fue 3 kg/ha de herbicida en forma de formulación comercial o como formulación de liberación lenta. El sólido y la disolución comercial se suspendieron en 16 litros de agua para realizar la aplicación. A partir de este momento no se aplicó agua de forma artificial. La aplicación del herbicida se realizó el 27/11/08 y durante el tiempo que duró el experimento se llevó un control de las temperaturas y precipitaciones ocurridas.

A tiempos seleccionados, se realizaron diferentes tomas de muestra del suelo y del agua de escorrentía. Las muestras de suelo se extrajeron a cuatro profundidades (0-5, 5-10, 10-20 y 20-30 cm) de tres puntos diferentes de las parcelas, usando una barrena, y posteriormente se analizó el contenido de diurón en las mismas mediante extracción de 5 g de suelo con 10 ml de metanol. Después de cada episodio de lluvia intensa, se procedió a la medida del volumen del agua de escorrentía y toma de muestra de la misma para su filtrado y posterior análisis de diurón por HPLC, tanto en disolución como asociado a las partículas en suspensión. La determinación del diurón en disolución se llevó a cabo por inyección directa del agua de escorrentía filtrada en el HPLC, mientras que la determinación del diurón asociado a las partículas se llevó a cabo previa separación de éstas por filtración (0.45 µm) y posterior extracción con metanol y análisis del extracto por HPLC.

Al finalizar el experimento se evaluó la bioeficacia de la aplicación de las formulaciones de diurón comparando la biomasa obtenida de las parcelas tratadas con el herbicida con la de otra parcela control donde no se había aplicado el herbicida.

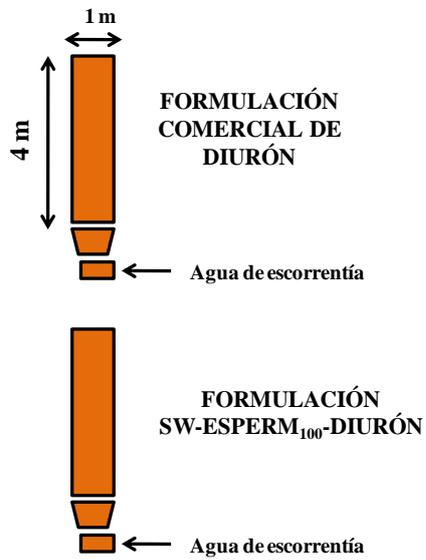


Figura. 28. Esquema de las microparcels. **Figura 29.** Fotografía de una de las microparcels.



4. Resultados y discusión



4.1. CARACTERÍSTICAS DE LAS MONTMORILLONITAS MODIFICADAS

4.1.1. ANÁLISIS ELEMENTAL

La composición de las muestras de montmorillonitas inalteradas y modificadas utilizadas en este trabajo se resume en la Tabla 14. El porcentaje real de la CIC de SWy-2 y SAz-1 ocupado por cationes orgánicos (Tabla 14) se calculó a partir del contenido en N de las muestras. Las cantidades de espermina, hexadimetrina, feniltrimetilamonio y hexadeciltrimetilamonio presentes en las muestras están próximas a las añadidas durante la síntesis. En cambio, la tiramina y la L-carnitina manifestaron cierta resistencia a reaccionar con SWy-2 y SAz-1, pues la cantidad de estos cationes orgánicos en las montmorillonitas modificadas resultó ser considerablemente menor que la añadida durante la síntesis. Estos resultados están de acuerdo con los presentados por Cruz-Guzmán et al. (2004, 2005), quienes encontraron que cationes orgánicos polares pequeños y monovalentes, como es el caso de la carnitina y la tiramina, presentaban una cierta resistencia a reaccionar con esmectitas comparado con cationes orgánicos grandes y/o polivalentes. También de acuerdo con Cruz-Guzmán et al. (2004, 2005), los resultados de la Tabla 14 muestran que la resistencia de la tiramina y la carnitina a reaccionar con las montmorillonitas es más pronunciada para SAz-1 comparado con SWy-2. Esto es debido probablemente a la presencia de Ca^{2+} como el principal catión inorgánico natural en SAz-1, ya que el Ca^{2+} es más difícil de reemplazar que los cationes Na^+ de SWy-2 (Theng et al., 1967).

En el caso de la muestra de montmorillonita SWy-2 tratada con Fe (III), se asumió estar saturada en este catión, si bien cabe destacar que debido a la gran tendencia del Fe (III) a hidrolizar y polimerizar es muy probable que la muestra SW-Fe contenga no sólo monómeros Fe^{3+} sino también pequeños policationes del tipo $[\text{Fe(III)-OH}]$ (Rengasamy y Oades, 1977; Celis et al., 1997b). Además, se sabe que el elevado poder polarizante del Fe^{3+} induce la ionización de moléculas de agua durante los procesos de hidrólisis/polimerización, lo que da lugar a la presencia de H_3O^+ adsorbidos y a un aumento de la acidez superficial de la arcilla (Celis et al., 1996).

Tabla 14. Resultados del análisis elemental de las muestras de montmorillonitas sin modificar y modificadas.

Adsorbente	Montmorillonita	Cación modificador	C	N	SCt ^a	SCt ^a
			(%)	(%)	Esperada (%)	Medida (%)
SWy-2 (Sin tratar)	SWy-2	-	0.29 ± 0.01	< 0.05	0	0
SWy-2 (Blanco)	SWy-2	-	0.32 ± 0.01	< 0.05	0	0
SW-Fe	SWy-2	Fe	0.26 ± 0.01	< 0.05	-	-
SW-CAR ₁₀₀	SWy-2	L-carnitina	4.10 ± 0.11	0.61 ± 0.01	100	61
SW-ESPERM ₅₀	SWy-2	Espermina	1.65 ± 0.02	0.56 ± 0.01	50	53
SW-ESPERM ₁₀₀	SWy-2	Espermina	2.86 ± 0.12	1.01 ± 0.08	100	96
SW-HEXADIM ₅₀	SWy-2	Hexadimetrina	3.22 ± 0.03	0.44 ± 0.02	50	42
SW-HEXADIM ₁₀₀	SWy-2	Hexadimetrina	5.78 ± 0.06	0.89 ± 0.01	100	88
SW-TIRAM ₅₀	SWy-2	Tiramina	3.00 ± 0.01	0.34 ± 0.01	50	33
SW-TIRAM ₁₀₀	SWy-2	Tiramina	4.42 ± 0.01	0.63 ± 0.01	100	62
SW-FTMA ₅₀	SWy-2	Feniltrimetilamonio	4.54 ± 0.08	0.52 ± 0.02	50	51
SW-FTMA ₁₀₀	SWy-2	Feniltrimetilamonio	6.70 ± 0.06	0.82 ± 0.01	100	82
SW-HDTMA ₅₀	SWy-2	Hexadeciltrimetilamonio	9.74 ± 0.04	0.56 ± 0.01	50	58
SW-HDTMA ₁₀₀	SWy-2	Hexadeciltrimetilamonio	14.84 ± 0.02	0.84 ± 0.01	100	93
SAz-1 (Sin tratar)	SAz-1	-	< 0.1	< 0.05	0	0
SAz-1 (Blanco)	SAz-1	-	< 0.1	< 0.05	0	0
SA-CAR ₁₀₀	SAz-1	L-carnitina	4.10 ± 0.01	0.64 ± 0.01	100	41
SA-ESPERM ₅₀	SAz-1	Espermina	2.12 ± 0.01	0.87 ± 0.01	50	53
SA-ESPERM ₁₀₀	SAz-1	Espermina	3.78 ± 0.02	1.55 ± 0.01	100	96
SA-HEXADIM ₅₀	SAz-1	Hexadimetrina	4.76 ± 0.12	0.76 ± 0.02	50	47
SA-HEXADIM ₁₀₀	SAz-1	Hexadimetrina	8.52 ± 0.04	1.36 ± 0.01	100	88
SA-TIRAM ₅₀	SAz-1	Tiramina	3.02 ± 0.10	0.40 ± 0.01	50	25
SA-TIRAM ₁₀₀	SAz-1	Tiramina	5.28 ± 0.12	0.79 ± 0.05	100	50
SA-FTMA ₅₀	SAz-1	Feniltrimetilamonio	6.85 ± 0.02	0.84 ± 0.01	50	54
SA-FTMA ₁₀₀	SAz-1	Feniltrimetilamonio	9.58 ± 0.07	1.19 ± 0.01	100	79
SA-HDTMA ₅₀	SAz-1	Hexadeciltrimetilamonio	14.51 ± 0.03	0.85 ± 0.01	50	60
SA-HDTMA ₁₀₀	SAz-1	Hexadeciltrimetilamonio	22.50 ± 0.01	1.29 ± 0.01	100	101

^a SCt: grado de saturación en catión modificador, es decir, porcentaje de la capacidad de intercambio catiónico de la montmorillonita ocupada por cationes modificadores (esperada y calculada a partir del contenido en N).

4.1.2. DIFRACCIÓN DE RAYOS X

Los valores del espaciado basal, d_{001} , de los agregados orientados secados al aire de las montmorillonitas modificadas junto con los de los blancos de las montmorillonitas SWy-2 y SAz-1 se incluyen en la Tabla 15. Los bajos valores de d_{001} (11-15 Å) para las muestras modificadas con los cationes orgánicos espermina, hexadimetrina, tiramina y carnitina son coherentes con el pequeño tamaño de la tiramina y carnitina, y sugieren la ordenación de la espermina y hexadimetrina, de mayor tamaño, formando una monocapa

horizontal entre las láminas de la arcilla (Jaynes y Boyd, 1991b; Lagaly, 1982; Roberts et al., 2006).

Tabla 15. Valores de espaciado basal (d_{001}) en Å de las montmorillonitas SWy-2 y SAz-1 sin modificar y modificadas.

Adsorbente	d_{001} (Å)		Disposición más probable del catión orgánico
	T_{amb}	200°C	
SWy-2 (Blanco)	15.1	10.0	-
SW-Fe	12.8	10.0	-
SW-CAR ₁₀₀	14.2	12.0	Especies discretas
SW-ESPERM ₅₀	13.1 ^a	11.2	Monocapa horizontal
SW-ESPERM ₁₀₀	13.0	12.4	Monocapa horizontal
SW-HEXADIM ₅₀	14.2 ^a	13.8	Monocapa horizontal
SW-HEXADIM ₁₀₀	14.0	13.8	Monocapa horizontal
SW-TIRAM ₅₀	14.3	11.8	Especies discretas
SW-TIRAM ₁₀₀	14.4	12.9	Especies discretas
SW-FTMA ₅₀	14.4	14.4	Especies discretas
SW-FTMA ₁₀₀	14.6	14.4	Especies discretas
SW-HDTMA ₅₀	16.6 ^a	14.2 ^c	Monocapa/ Bicapa horizontal
SW-HDTMA ₁₀₀	18.0	18.0 ^c	Bicapa horizontal
SAz-1 (Blanco)	15.2	- ^b	-
SA-CAR ₁₀₀	14.8	- ^b	Especies discretas
SA-ESPERM ₅₀	13.1 ^a	12.5	Monocapa horizontal
SA-ESPERM ₁₀₀	13.0	12.5	Monocapa horizontal
SA-HEXADIM ₅₀	14.2 ^a	14.0	Monocapa horizontal
SA-HEXADIM ₁₀₀	14.2	14.0	Monocapa horizontal
SA-TIRAM ₅₀	15.0	- ^b	Especies discretas
SA-TIRAM ₁₀₀	15.0	- ^b	Especies discretas
SA-FTMA ₅₀	15.1	15.1	Especies discretas
SA-FTMA ₁₀₀	15.0	15.0	Especies discretas
SA-HDTMA ₅₀	17.3 ^a	17.3 ^c	Bicapa
SA-HDTMA ₁₀₀	24.0	22.2 ^c	Parafínica

^a Difracción basal ancha, poco definida; ^b Difracción basal no definida; ^c Muestras secadas a 150°C.

En el caso de los cationes orgánicos carnitina, espermina, hexadimetrina y tiramina, la disminución en el espaciado basal de SWy-2 y SAz-1 tras el tratamiento con los cationes orgánicos observado a temperatura ambiente (Tabla 15) se puede atribuir a la sustitución del catión inorgánico interlaminar y su agua de hidratación por cationes orgánicos menos hidratados. Esta observación es coherente con el descenso en la

intensidad de la banda de vibración de infrarrojos correspondiente al agua de hidratación de la montmorillonita (3440 cm^{-1}) después del tratamiento con espermina, hexadimetrina y tiramina que se discutirá más adelante (apartado 4.1.3.1.) y también con la magnitud del primer paso de pérdida de masa observado durante la descomposición térmica de las muestras (apartado 4.1.3.2.). Después del calentamiento a 200°C (Tabla 15, Figura 30), la muestra de SWy-2 blanco colapsa ($d_{001} \approx 10\text{ \AA}$), mientras que las arcillas SWy-2 modificadas con los cationes orgánicos muestran cierta resistencia a colapsar ($d_{001} > 10\text{ \AA}$), confirmando la presencia de los cationes orgánicos en las interláminas del mineral (Celis et al., 2000a; Cruz-Guzmán et al., 2004). Para las muestras de SAz-1 calentadas a 200°C , se obtuvieron resultados similares, aunque la difracción basal de SAz-1 inalterada calentada a 200°C no estuvo bien definida, presumiblemente debido a su elevada CIC, lo cual puede producir después del calentamiento una distribución heterogénea de las láminas o una rehidratación parcial de la muestra durante el análisis de difracción de rayos-X (Cruz-Guzmán et al., 2005).

Los valores de d_{001} obtenidos para las montmorillonitas intercambiadas con FTMA y HDTMA (Tabla 15) están de acuerdo con valores publicados previamente para estas organoarcillas (Jaynes y Boyd, 1991a y b; Roberts et al., 2006). En las interláminas de SWy-2 y SAz-1, el catión FTMA existe como especies discretas, dando como resultado un espaciado basal de aproximadamente $14\text{-}15\text{ \AA}$. El catión HDTMA forma bicapas ($d_{001} \approx 18\text{ \AA}$) en montmorillonitas de baja carga laminar, tales como SWy-2, y una estructura parafínica ($d_{001} \approx 24\text{ \AA}$) en la montmorillonita SAz-1 de alta carga laminar (Tabla 15).

De acuerdo con lo observado por Celis et al. (2002a), los valores de espaciado basal (d_{001}) de la muestra SW-Fe (Tabla 15) no muestran evidencias de formación de grandes pilares de Fe en el espacio interlaminar de la montmorillonita durante la síntesis. Debido a la tendencia a hidrolizar y polimerizar del catión Fe^{3+} , los sitios de cambio de SW-Fe estarían ocupados probablemente por iones H_3O^+ y pequeños policationes $[\text{Fe(III)-OH}]$, los cuales son los responsables del valor del espaciado basal $d_{001} = 12.8\text{ \AA}$ medido para SW-Fe a temperatura ambiente y que no impiden el colapso de las láminas tras el calentamiento a 200°C (Celis et al., 1997a).

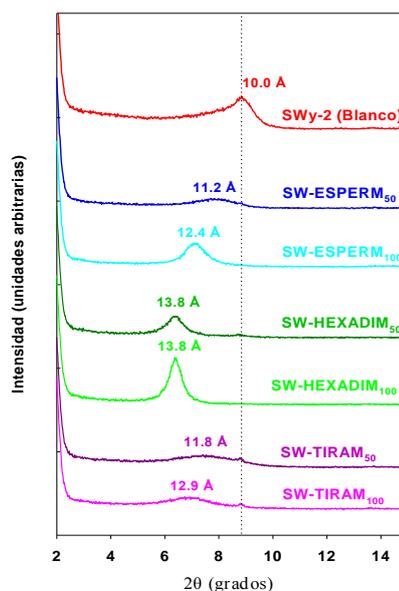


Figura 30. Diagramas de difracción de rayos X de los agregados orientados correspondientes a las muestras de SWy-2 modificadas con espermina, hexadimetrina y tiramina secadas a 200°C.

4.1.3. ESPECTROSCOPIA INFRARROJA Y ANÁLISIS TÉRMICO DE LAS MUESTRAS TRATADAS CON ESPERMINA, HEXADIMETRINA Y TIRAMINA

En el caso de las muestras modificadas con los cationes orgánicos espermina, hexadimetrina y tiramina se llevó a cabo una caracterización adicional por espectroscopía de infrarrojos y análisis térmico. En dicho estudio, no se han incluido a las muestras intercaladas con carnitina, FTMA y HDTMA porque los espectros de IR y diagramas termogravimétricos de dichas muestras o de muestras muy similares han sido discutidos previamente en la bibliografía (El-Nahhal et al., 2000; Celis et al., 2000b; Cruz-Guzmán et al., 2004), estando bien descrita la presencia de estos cationes en las montmorillonitas modificadas.

4.1.3.1. Espectroscopía Infrarroja

Los espectros FTIR de las montmorillonitas SWy-2 y SAz-1 tratadas con espermina, hexadimetrina y tiramina junto con los de las muestras blanco de las arcillas y los de los cationes orgánicos puros se muestran en la Figura 31. La asignación de bandas se llevó a cabo de acuerdo con Bellamy (1975). La presencia de nuevas bandas en el

espectro de infrarrojos de las muestras de montmorillonitas modificadas, respecto a las presentes en el espectro de las arcillas blanco, ponen de manifiesto la presencia de los cationes orgánicos en las arcillas modificadas. Además, el descenso en la intensidad de la banda a 3440 cm^{-1} , correspondiente al agua de hidratación de la montmorillonita, después del tratamiento con los cationes espermina, hexadimetrina y tiramina, indica la sustitución, durante la reacción de intercambio, de los cationes inorgánicos hidratados originales de las montmorillonitas por cationes orgánicos menos hidratados.

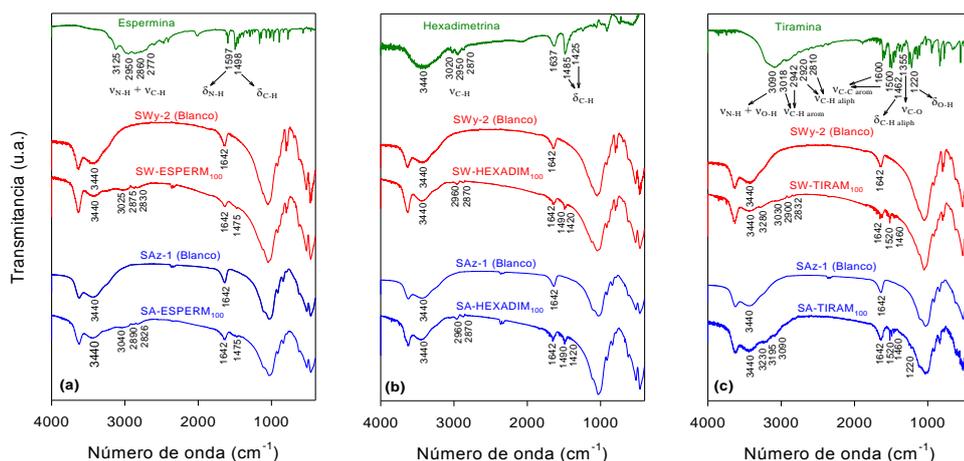


Figura 31. Espectros de infrarrojos con transformada de Fourier de muestras de montmorillonitas sin modificar (blancos) y modificadas con espermina, hexadimetrina y tiramina.

El grupo de bandas entre 2770 cm^{-1} y 3125 cm^{-1} en el espectro FT-IR de la espermina pura (Figura 31a) puede asignarse a la vibración de tensión de N-H de los grupos $-\text{NH}_3^+$ y $-\text{NH}_2^+$ y a las vibraciones de tensión de C-H de los grupos $-\text{CH}_2-$. Las bandas cercanas a 1600 cm^{-1} y 1500 cm^{-1} pueden asignarse a los modos de deformación de N-H y C-H, respectivamente. Todas estas bandas también se identificaron en el espectro FT-IR de SW-ESPERM₁₀₀ y SA-ESPERM₁₀₀, aunque la localizada cerca de 1600 cm^{-1} parece ocultada por la vibración de deformación del agua de hidratación de la arcilla, localizada a 1642 cm^{-1} . El desplazamiento de las bandas de vibración de N-H y C-H tras la interacción de la espermina con SWy-2 y SAz-1 revela la participación de estos grupos en la interacción con las montmorillonitas.

Las bandas entre 2870 cm^{-1} y 3020 cm^{-1} en el espectro de FT-IR de la hexadimetrina pura (Figura 31b) puede asignarse a la vibración de tensión de C-H de los grupos $-\text{CH}_2-$ y $-\text{CH}_3-$, mientras que los modos de deformación correspondientes a C-H aparecen a 1485 cm^{-1} ($-\text{CH}_2-$) y 1425 cm^{-1} ($-\text{CH}_3-$). Las bandas a 3440 cm^{-1} y 1637 cm^{-1} correspondientes, respectivamente, a la tensión O-H y la vibración de deformación de O-H del agua de hidratación, son indicativos de la rápida absorción de agua por el bromuro de hexadimetrina en los discos de KBr, como resultado del elevado carácter higroscópico de este catión orgánico. Las vibraciones de tensión y deformación de C-H de la hexadimetrina también fueron identificadas en el espectro de SW-HEXADIM₁₀₀ y SA-HEXADIM₁₀₀ a 2960 y 2870 cm^{-1} (C-H tensión) y a 1490 y 1420 cm^{-1} (C-H deformación). Éstas sólo estuvieron ligeramente desplazadas en comparación con sus posiciones en el compuesto puro.

La banda de absorción a aproximadamente 3090 cm^{-1} en el espectro de tiramina (Figura 31c) puede asignarse a la vibración de tensión de N-H del grupo $-\text{NH}_3^+$ y a la vibración de tensión del O-H del grupo fenólico, donde el enlace intermolecular da como resultado el desplazamiento de la vibración de tensión hacia longitudes de onda más bajas comparadas con los valores típicos de los grupos fenoles libres. Las bandas correspondientes a los modos de vibración de tensión C-H aromático aparecen cerca de 3000 cm^{-1} , mientras que los correspondientes a C-H alifáticos se identifican a 2920 y 2810 cm^{-1} . Las bandas que aparecen aproximadamente a 1600 cm^{-1} y 1500 cm^{-1} pueden asignarse a las vibraciones de tensión de C-C aromáticos, aunque el modo de deformación N-H de $-\text{NH}_3^+$ podría contribuir en la banda localizada a 1600 cm^{-1} . También fueron identificadas bandas correspondientes a la vibración de deformación de C-H de los grupos $-\text{CH}_2-$ (1462 cm^{-1}) y la tensión de C-O (1355 cm^{-1}) y la vibración de deformación de O-H (1220 cm^{-1}) del grupo fenólico (Figura 31c). La mayoría de las bandas de vibración de la tiramina también aparecieron en el espectro de SW-TIRAM₁₀₀ y SA-TIRAM₁₀₀.

4.1.3.2. Análisis térmico

En consonancia con lo publicado previamente sobre el comportamiento térmico de complejos organoarcillosos (Yariv, 2004; Xi et al., 2004), la descomposición térmica de SW-ESPERM₁₀₀, SW-HEXADIM₁₀₀ y SW-TIRAM₁₀₀ tuvo lugar en tres pasos (Figura 32).

El primer paso de pérdida de masa se observa a una temperatura próxima a 150°C y se puede atribuir a la deshidratación del agua adsorbida en la arcilla y en el catión interlaminar. Este primer paso de pérdida de masa es considerablemente más elevado en la montmorillonita SWy-2 sin modificar que en las arcillas modificadas, lo que revela la baja hidratación de los cationes orgánicos comparados con los iones Na^+ originales en la muestra de SWy-2 sin modificar. Se observa una segunda pérdida de masa a un rango de

temperatura entre 200 y 550°C, que puede asignarse a la pérdida del catión orgánico. La magnitud de esta segunda pérdida de masa estuvo relacionada directamente con el contenido de las muestras en carbono orgánico: SW-HEXADIM₁₀₀ > SW-TIRAM₁₀₀ > SW-ESPERM₁₀₀ > SWy-2 (Blanco) (Tabla 14). El tercer paso de pérdida de masa se relaciona con la deshidroxilación del mineral y ocurre a un rango de temperatura entre 550 y 700°C.

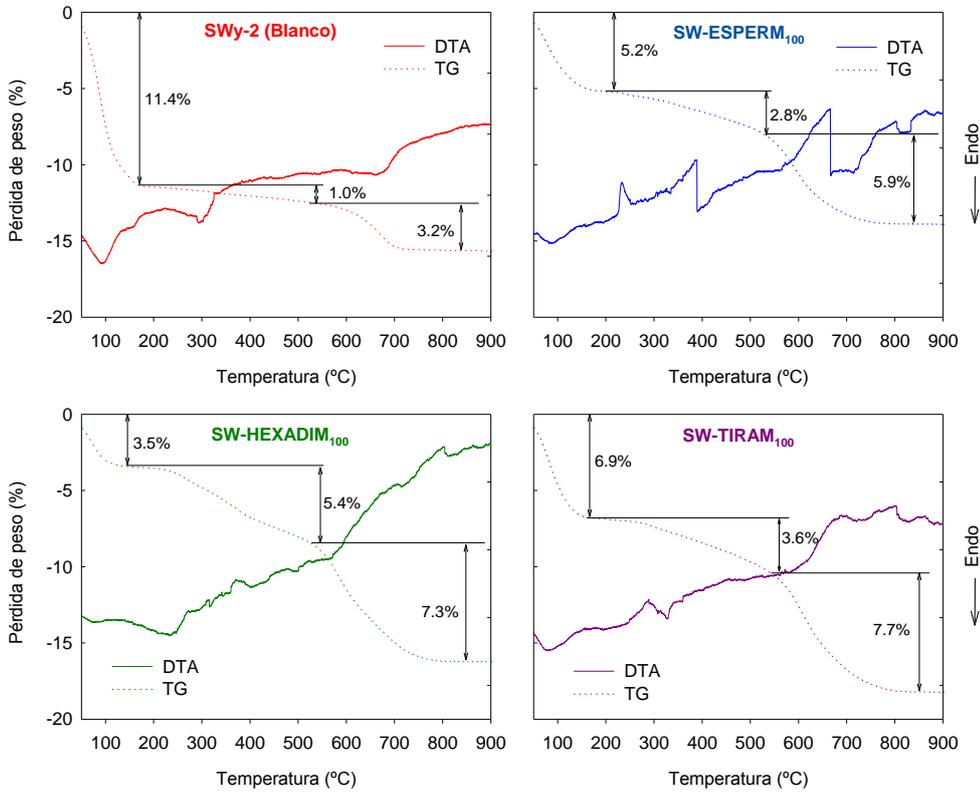


Figura 32. Análisis termogravimétrico (TG) y análisis térmico diferencial (DTA) de las muestras de SWy-2 modificadas con espermina, hexadimetrina y tiramina.

4.2. CARACTERIZACIÓN DE LOS SUELOS

La Tabla 16 muestra las principales características físico-químicas de los suelos utilizados en los diferentes experimentos realizados.

Tabla 16. Características físico-químicas de los suelos utilizados. AF: arena fina; AG: arena gruesa; L: limo; A: arcilla; C.O.: carbono orgánico oxidable; M.O.: materia orgánica.

	pH	CaCO ₃ %	AG	AF %	L	A	C.O. %	M.O. %
Suelo 1 (S1)	8.5	16.9	50	13	16	21	1.39	2.40
Suelo 2 (S2)	8.4	6.5	64	19	7	10	0.71	1.23
Suelo 3 (S3)	8.7	2.7	71	3	4	22	0.53	0.91
Suelo 4 (S4)	7.7	-	49 ^a		27	24	1.30	-

^aAG + AF

Como se ha mencionado en el apartado 3.1.2., los suelos S1 y S2 fueron los utilizados en la mayoría de los experimentos de laboratorio. Estos suelos proceden de la finca experimental que el IRNAS posee en la localidad de Coria del Río (Sevilla) y se seleccionaron por ser representativos de suelos de olivar con un elevado potencial de lixiviación para herbicidas, al tener una textura gruesa y un bajo contenido en materia orgánica. El suelo S2 presenta un mayor contenido en arena y menor contenido en materia orgánica que el S1 por lo que es de esperar que presente un riesgo de lixiviación de herbicidas incluso más acentuado que el S1. El suelo S3 corresponde a las parcelas en las que se llevó a cabo el experimento en condiciones de campo y se seleccionó por tener características texturales similares a los utilizados en los experimentos de laboratorio. Por último, el suelo S4, procedente de Becker (Minnesota, EE.UU), se usó de forma específica para el ensayo de biodisponibilidad del herbicida atrazina, que fue realizado durante una estancia en el Department of Soil, Water and Climate de la Universidad de Minnesota. Este suelo presenta un menor contenido en arena y un mayor contenido en limo que los anteriores, si bien su contenido en carbono orgánico es muy similar al del suelo S1.

Por ser los suelos S1 y S2 los utilizados para la mayoría de los experimentos realizados en la presente Tesis Doctoral, se llevó a cabo una caracterización adicional de los mismos determinando su distribución de tamaños de poros, por la técnica de intrusión de mercurio, y la mineralogía de sus fracciones arcilla, a partir de los difractogramas de agregados orientados de las fracciones arcilla sometidas a diferentes tratamientos.

En la Figura 33 se representan las gráficas obtenidas tras las medidas de intrusión de mercurio. Las gráficas muestran distribuciones de tamaños de poro diferentes para cada

uno de los dos suelos. En el suelo S2 los máximos de la distribución del volumen relativo (diagrama de barras) se encuentran desplazados hacia los macroporos, concentrándose la mayoría en el rango de poro que abarca desde 10 a 100 μm , aproximadamente. Este suelo tiene, por el contrario, pocos poros de mediano y pequeño tamaño. El suelo S1, al igual que el S2, tiene el máximo del volumen relativo situado en la zona de los macroporos pero distribuido de forma más homogénea, con un mayor volumen relativo de poros de tamaño mediano. En general, estos resultados son coherentes con las características texturales de los suelos, de forma que la textura más gruesa del suelo S2 reduce la presencia de poros de menor tamaño e incrementa los de mayor tamaño.

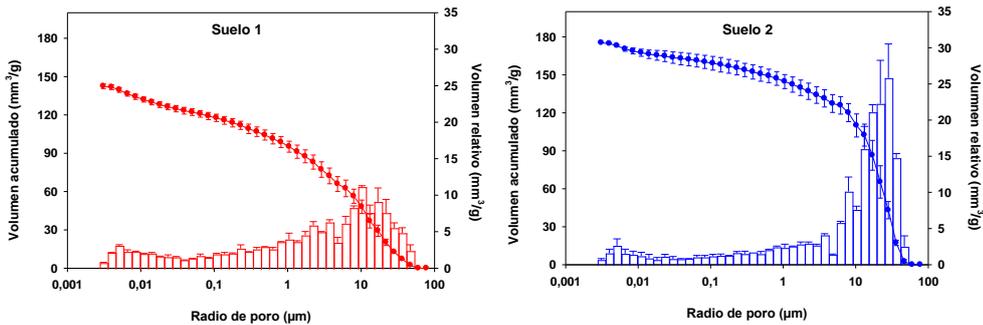


Figura 33. Distribución de tamaños de poro obtenida por intrusión de mercurio de los suelos S1 y S2.

La Figura 34 muestra los difractogramas de las fracciones arcilla de los suelos S1 y S2 sometidas a diferentes tratamientos. Los difractogramas de las fracciones arcilla de los suelos revelan que ambos poseen porcentajes elevados de Montmorillonita e Ilita y un menor contenido en Caolinita (Tabla 18). La diferencia más significativa entre ambos suelos es que en el suelo S1 el componente mayoritario es la montmorillonita mientras que en el S2 lo es la Ilita.

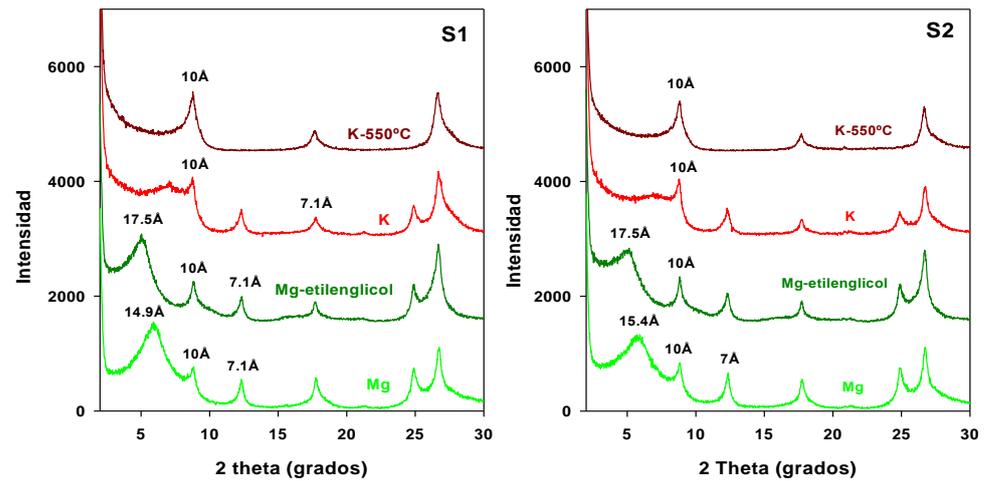


Figura 34. Difractograma de los agregados orientados de las fracciones arcilla de los suelos S1 y S2 sometidas a diferentes tratamientos.

Tabla 17. Porcentaje relativo de filosilicatos presentes en la fracción arcilla de los suelos S1 y S2.

Filosilicato ^a	Suelo 1 (S1)	Suelo 2 (S2)
Montmorillonita (18Å) (%)	45	33
Ilita (10Å) (%)	42	48
Caolinita (7Å) (%)	13	19

^a Porcentajes determinados a partir de los difractogramas de las muestras tratadas con etilenglicol usando un poder reflectante de 1 para caolinita, 0.5 para ilita y 2 para montmorillonita.

4.3. ESTUDIOS DE ADSORCIÓN-DESORCIÓN DE LOS HERBICIDAS A LAS MONTMORILLONITAS MODIFICADAS Y SIN MODIFICAR Y A LOS SUELOS

4.3.1. ESTUDIOS DE ADSORCIÓN-DESORCIÓN A LAS MONTMORILLONITAS

El protocolo experimental para los estudios de adsorción de los herbicidas diurón, terbutilazina y MCPA a las montmorillonitas modificadas y sin modificar consistió en medir la adsorción a una concentración inicial de 1 mg l^{-1} para todas las muestras y realizar posteriormente un estudio completo de isotermas de adsorción-desorción en un rango de concentraciones $0.1\text{-}2 \text{ mg l}^{-1}$ para aquellas muestras que presentaron las mejores propiedades adsorbentes.

4.3.1.1. Estudios de adsorción a concentración única

En la Figura 35 se muestra el porcentaje de diurón, terbutilazina y MCPA adsorbido por las montmorillonitas inalteradas y modificadas a la concentración inicial de 1 mg l^{-1} y una relación sólido:disolución de $20 \text{ mg adsorbente:}8 \text{ ml disolución de herbicida}$. Lo primero que hay que destacar es que para cada herbicida se observan diferentes grados de mejora de las propiedades adsorbentes de las montmorillonitas modificadas dependiendo de la naturaleza del catión modificador, del tipo de montmorillonita y de la cantidad de catión modificador en las montmorillonitas.

En general, los tres herbicidas manifiestan una gran afinidad por la montmorillonita SAz-1 modificada con HDTMA y moderada o baja afinidad por SAz-1 sin modificar y modificada con los otros cationes orgánicos (Figura 35). Esto se puede explicar debido a la estructura parafínica ($d_{001} > 22 \text{ \AA}$) que resulta de la incorporación de los cationes HDTMA en SAz-1 y que se forma por la elevada carga de la montmorillonita SAz-1, lo cual crea una fase orgánica interlaminar con una gran afinidad por el herbicida. El pequeño espaciado basal combinado con la proximidad de cationes adyacentes que resulta tras la incorporación de los otros cationes orgánicos en las interláminas de la montmorillonita SAz-1, da como resultado un pequeño espacio interno disponible para la adsorción de herbicida (Cruz-Guzmán et al., 2005). Sin embargo, ciertos cationes orgánicos dan lugar a algún aumento en la adsorción de diurón, terbutilazina y MCPA a SAz-1, principalmente para las muestras con mayores contenidos en cationes orgánicos (Figura 35). Esto se debe presumiblemente a las interacciones del herbicida con los cationes en la superficie externa de la montmorillonita modificada (Cruz-Guzmán et al., 2005).

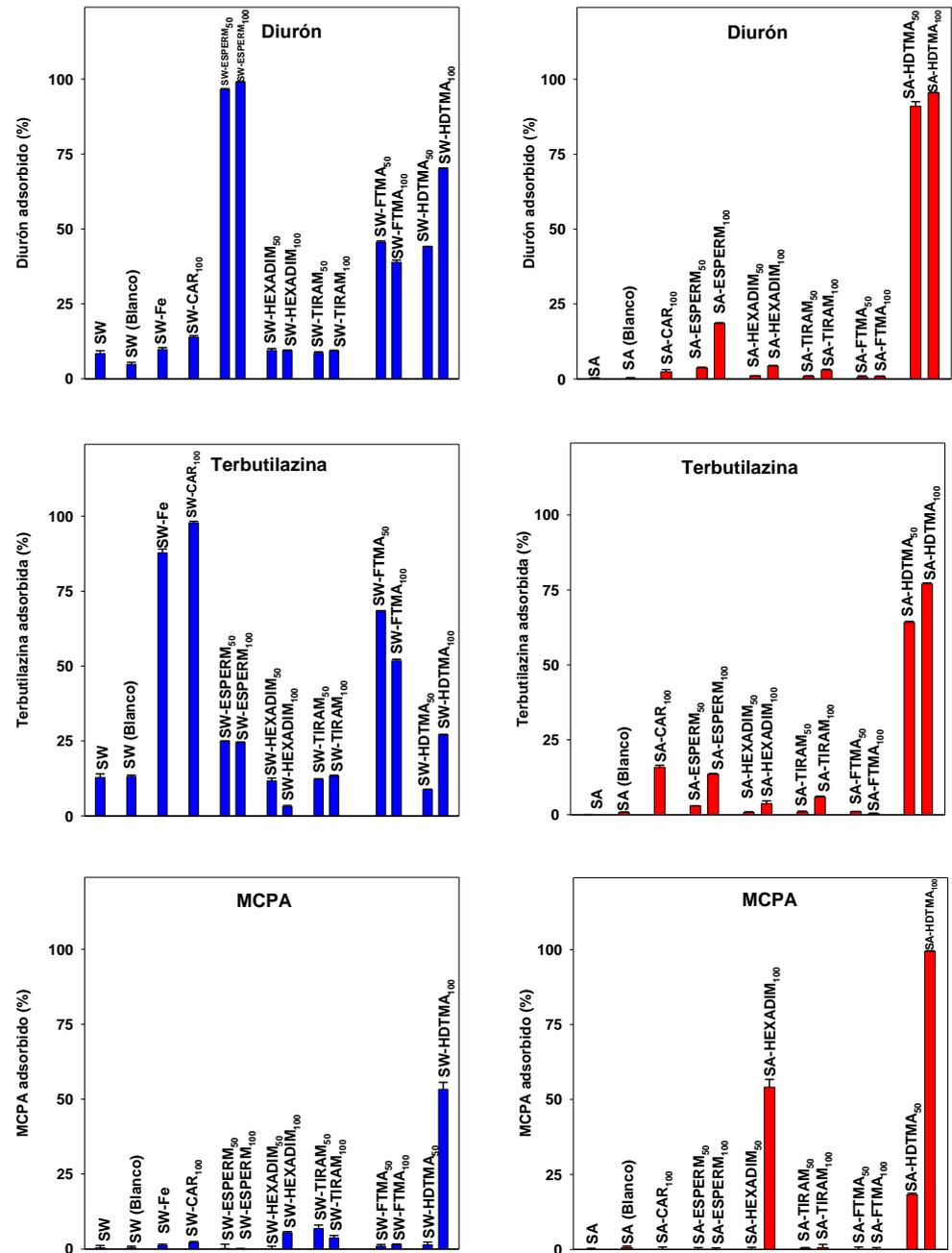


Figura 35. Porcentaje de diurón, terbutilazina y MCPA adsorbido por las muestras de montmorillonitas modificadas y sin modificar a una concentración inicial de 1 mg l^{-1} y una relación sólido:disolución 20 mg:8 ml.

Para las muestras preparadas con la montmorillonita SWy-2, de baja carga laminar, la modificación con los cationes carnitina e Fe (III) da lugar a arcillas con una fuerte afinidad por terbutilazina, mientras que la modificación con espermina da lugar a un gran aumento en la adsorción de diurón. Por su parte, la modificación con los cationes alquilamonio, FTMA y HDTMA, da como resultado organoarcillas con una afinidad moderada por estos herbicidas (Figura 35). La gran afinidad de terbutilazina por SWy-2 modificada con carnitina puede atribuirse al débil carácter básico de la terbutilazina ($pK_a = 2.0$), lo cual permite una interacción ácido-base con el grupo carboxílico de la carnitina. Se ha demostrado que este mecanismo es el responsable de la elevada adsorción del herbicida simazina por SWy-2 modificada con carnitina (Cruz-Guzmán et al., 2004). Algo parecido ocurre con el catión Fe (III), que al aumentar la acidez superficial de la montmorillonita, también permite la adsorción de terbutilazina probablemente en su forma protonada (Celis et al., 1997a). La gran afinidad del diurón por SWy-2 modificada con espermina podría deberse a la combinación de i) enlace de hidrógeno entre el grupo C=O del herbicida y los grupos NH_3^+ / NH_2^+ de la espermina y ii) interacciones hidrofóbicas entre el herbicida y las cadenas alquílicas de la espermina. Se ha demostrado que las interacciones polares entre los grupos C=O de los pesticidas y el grupo amino protonado de las aminas primarias pueden jugar un papel importante en la adsorción de pesticidas por organoarcillas (Hermosín y Cornejo, 1993; Celis et al., 2000a). Sin embargo, creemos que la cadena alquílica de la espermina probablemente contribuye a estabilizar la interacción del diurón con SWy-2 modificada con espermina, ya que la tiramina también contiene un grupo NH_3^+ y no proporcionó a SWy-2 una elevada afinidad por el diurón (Figura 35). Independientemente de los mecanismos que operan, nuestros resultados ilustran cómo las características químicas del catión representan un factor importante en el comportamiento de las organoarcillas como adsorbentes de herbicidas.

La baja adsorción de MCPA por la mayoría de las muestras de SWy-2 (Figura 35) es debida al carácter aniónico de este herbicida al pH de equilibrio de las suspensiones durante el estudio de adsorción ($pH > 5$). Únicamente HDTMA, cuando es incorporado al 100% de la capacidad de cambio (CIC) del mineral, hace que el MCPA muestre cierta afinidad por SWy-2, pero este efecto es considerablemente menor que el observado después de la incorporación de los cationes de HDTMA en la montmorillonita de elevada carga laminar SAz-1 (Figura 35). Este hecho se debe a que la estructura parafínica de SA-HDTMA₁₀₀ resulta ser mejor medio para la adsorción de MCPA que la estructura bilaminar de SW-HDTMA₁₀₀. Estos resultados son muy similares a los obtenidos previamente para la adsorción de pesticidas aniónicos en SWy-2 y SAz-1 modificadas con el catión HDTMA (Celis et al., 1999b; Cruz-Guzmán et al., 2005).

4.3.1.2. Isotermas de adsorción

Las isotermas de adsorción de los herbicidas diurón, terbutilazina y MCPA en muestras seleccionadas se muestran en la Figura 36. En todos los casos, el pH de equilibrio de las suspensiones fue superior a 5, por lo que las formas moleculares de terbutilazina ($pK_a= 2.0$) y diurón y la forma aniónica de MCPA ($pK_a= 3.1$) debieron predominar durante los experimentos de adsorción. Para los tres herbicidas, se volvió a observar diferentes grados de mejora de las propiedades adsorbentes de las montmorillonitas modificadas, dependiendo de la naturaleza del catión modificador y el tipo de arcilla.

Las isotermas de adsorción (Figura 36) y los correspondientes valores de K_f (Tabla 18) muestran cómo se mantiene el orden adsorbente observado en los estudios a una sola concentración. Las isotermas se ajustan al tipo C ($N_f \sim 1$) o al tipo L ($N_f < 1$), según la clasificación de Giles et al. (1960). En este último caso, la curva inicial de la isoterma indica que a medida que transcurre la adsorción aumenta la dificultad para que las moléculas de soluto encuentren sitios de adsorción vacantes.

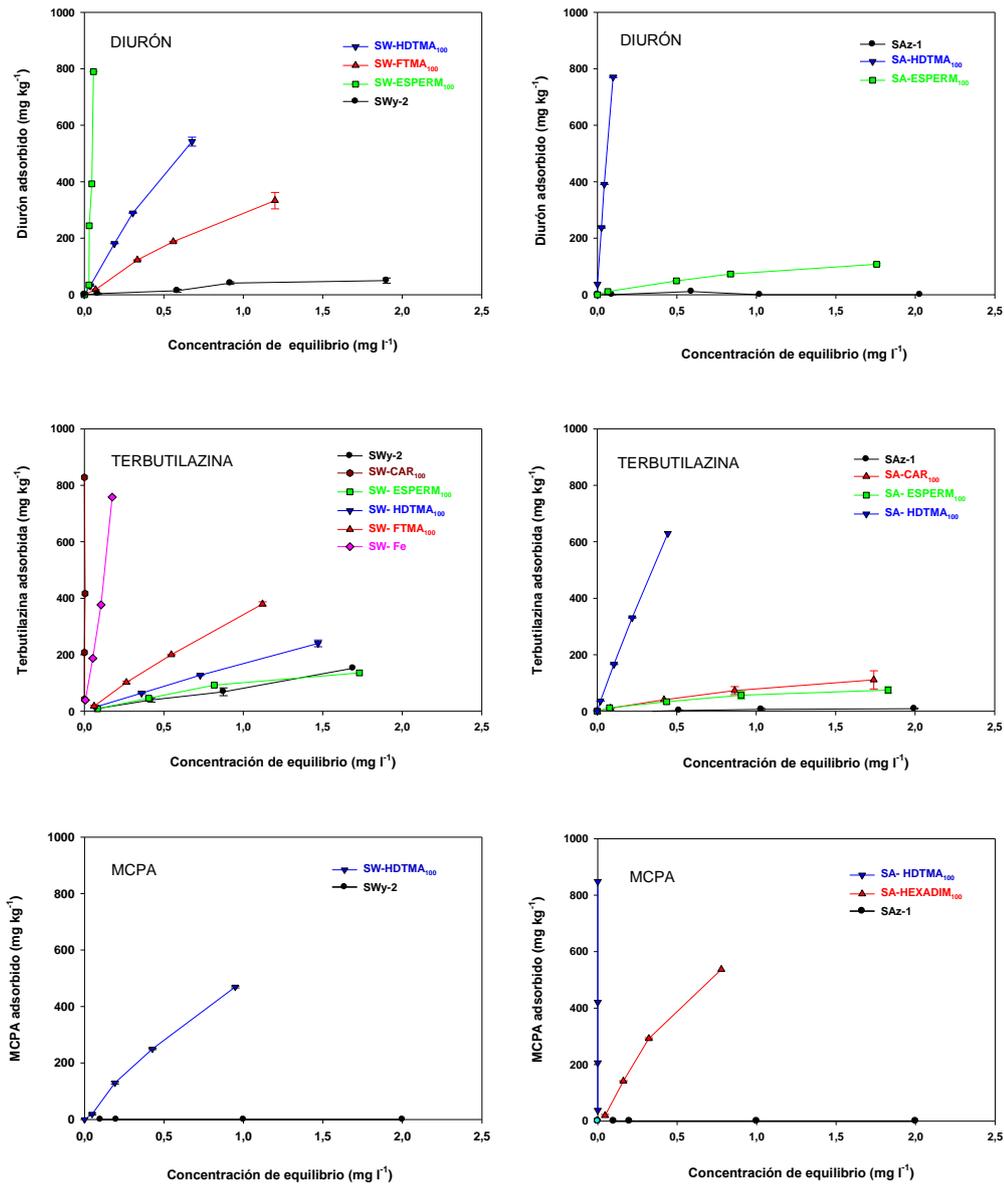


Figura 36. Isotermas de adsorción de diurón, terbutilazina y MCPA en muestras de montmorillonitas modificadas seleccionadas.

Tabla 18. Coeficientes de Freundlich para la adsorción de diurón, terbutilazina y MCPA a muestras de montmorillonitas sin modificar y modificadas.

DIURÓN			
Muestra	K_f	N_f	R^2
SWy-2	0 ^a	–	–
SW-ESPERM ₁₀₀	– ^a	–	–
SW-FTMA ₁₀₀	321 (280 - 368) ^b	1.05 ± 0.09 ^b	0.98
SW-HDTMA ₁₀₀	912 (797 - 978)	1.00 ± 0.05	0.99
SAz-1	0 ^a	–	–
SA-ESPERM ₁₀₀	77 (74 - 81)	0.71 ± 0.03	0.99
SA-HDTMA ₁₀₀	5861 (5190 - 6619)	0.87 ± 0.04	0.99
TERBUTILAZINA			
Muestra	K_f	N_f	R^2
SWy-2	0 ^a	–	–
SW-CAR ₁₀₀	– ^a	–	–
SW-Fe	3020 (2399 - 3802)	0.89 ± 0.08	0.98
SW-ESPERM ₁₀₀	83 (74 - 91)	0.87 ± 0.08	0.98
SW-FTMA ₁₀₀	363 (331 - 398)	1.06 ± 0.06	0.99
SW-HDTMA ₁₀₀	166 (166 - 166)	0.92 ± 0.00	0.99
SAz-1	0 ^a	–	–
SA-CAR ₁₀₀	76 (72 - 79)	0.79 ± 0.04	0.99
SA-HDTMA ₁₀₀	1318 (1288 - 1318)	0.92 ± 0.01	0.99
SA-ESPERM ₁₀₀	20 (7 - 55)	0.19 ± 0.82	0.02
MCPA			
Muestra	K_f	N_f	R^2
SWy-2	0 ^a	–	–
SW-HDTMA ₁₀₀	588 (479 - 721)	1.08 ± 0.12	0.98
SAz-1	0 ^a	–	–
SA-HDTMA ₁₀₀	– ^a	–	–
SA-HEXADIM ₁₀₀	540 (486 - 594)	1.05 ± 0.09	0.99

^a Estas muestras no se ajustan a la ecuación de Freundlich debido a que la adsorción del herbicida es muy elevada (-) o muy baja (0).

^b rango de error estándar.

4.3.1.3. Isotermas de desorción

Las isotermas de desorción de diurón, terbutilazina y MCPA para los adsorbentes escogidos reflejaron en general un comportamiento bastante reversible con valores de H ($=N_{fdes}/N_f$) predominantemente elevados (Figuras 37, 38, 39; Tabla 19). No obstante, se dan casos con elevada adsorción, como la adsorción de diurón por SW-ESPERM₁₀₀ y SA-HDTMA₁₀₀, que dan isotermas mal definidas, lo que complica el análisis de la desorción (Barriuso et al., 1994). En principio, cabe destacar que la observación de un comportamiento reversible de la desorción podría ser ventajoso en términos de reciclaje de los adsorbentes una vez usados como filtros para la descontaminación de aguas y también para el uso de los adsorbentes como soportes en formulaciones en liberación lenta para el herbicida seleccionado.

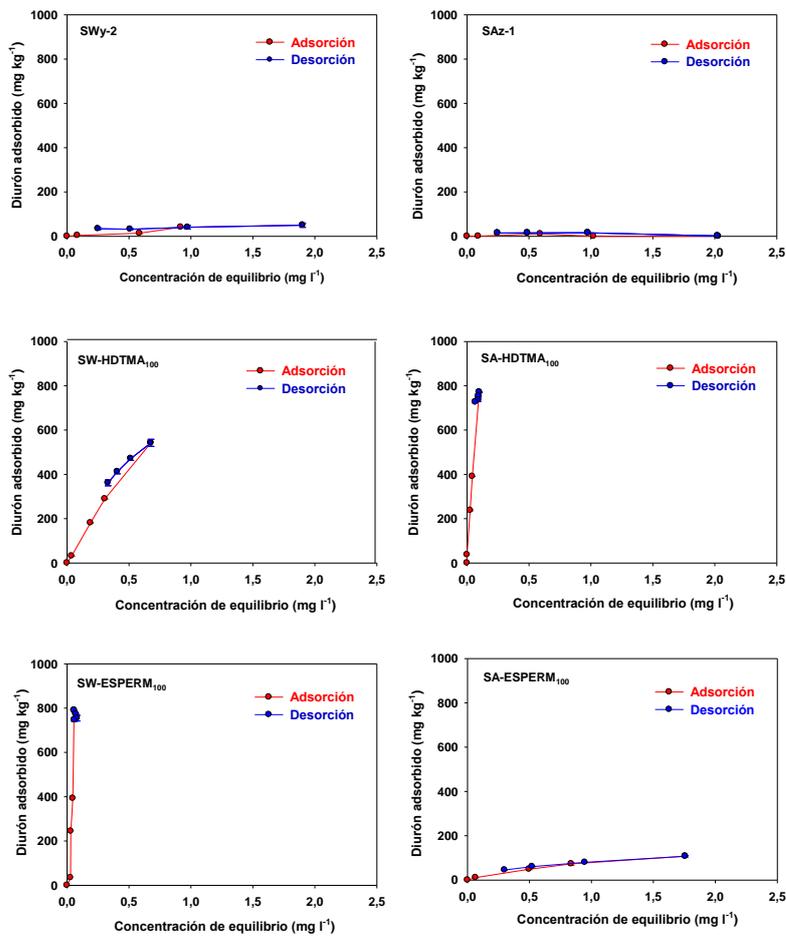


Figura 37. Isotermas de adsorción-desorción de diurón en muestras de montmorillonitas modificadas seleccionadas.

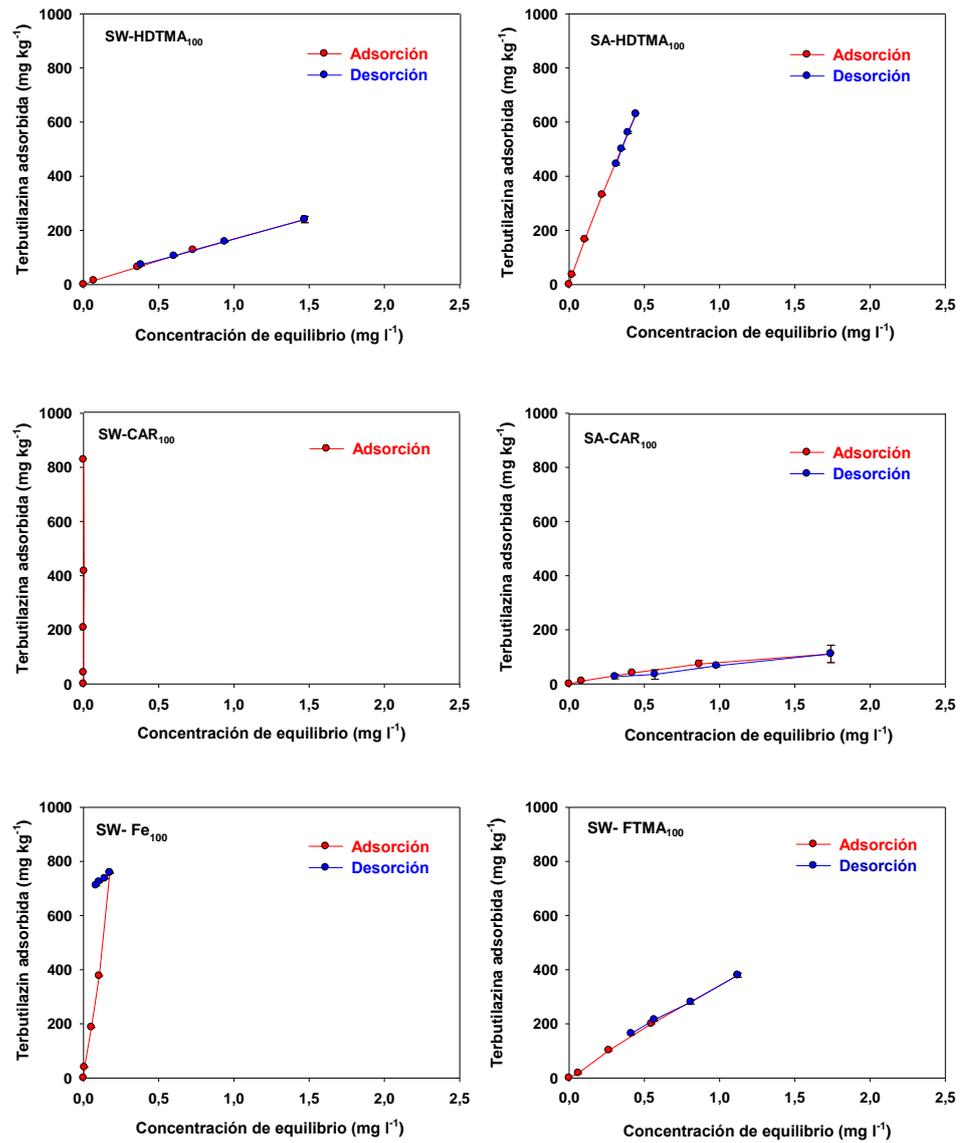


Figura 38. Isothermas de adsorción-desorción de terbutilazina en muestras de montmorillonitas modificadas seleccionadas.

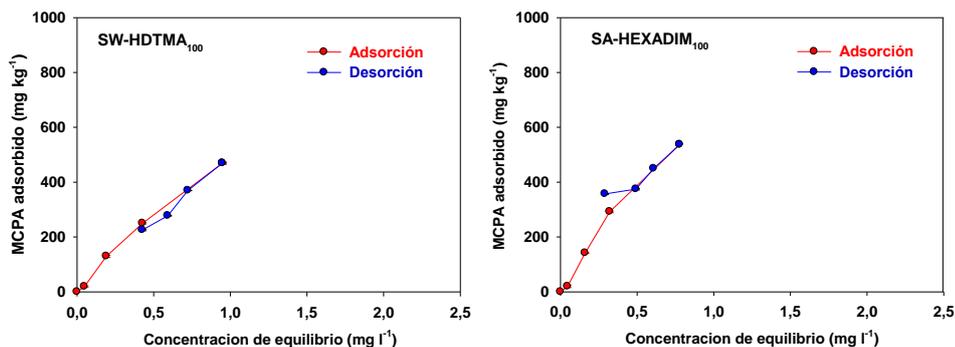


Figura 39. Isothermas de adsorción-desorción de MCPA en muestras de montmorillonitas modificadas seleccionadas.

Tabla 19. Coeficientes de Freundlich para la desorción de diurón, terbutilazina y MCPA de muestras de montmorillonitas modificadas.

DIURÓN				
Muestra	$K_{f \text{ des}}$	$N_{f \text{ des}}$	R^2	H^a
SW-ESPERM ₁₀₀	— ^b	—	—	—
SW-HDTMA ₁₀₀	681 (669 - 692)	0.56 ± 0.02	0.997	0.56
SA-ESPERM ₁₀₀	82 (81 - 83)	0.48 ± 0.09	0.999	0.68
SA-HDTMA ₁₀₀	1096 (867 - 1174)	0.12 ± 0.06	0.667	0.14
TERBUTILAZINA				
Muestra	$K_{f \text{ des}}$	$N_{f \text{ des}}$	R^2	H
SW-Fe	871 (851 - 871)	0.08 ± 0.01	0.97	0.09
SW-FTMA ₁₀₀	339 (331 - 339)	0.83 ± 0.03	0.99	0.78
SW-CAR ₁₀₀	— ^b	—	—	—
SW-HDTMA ₁₀₀	166 (166 - 166)	0.89 ± 0.02	0.99	0.97
SA-CAR ₁₀₀	66 (60 - 71)	0.84 ± 0.11	0.96	1.06
SA-HDTMA ₁₀₀	1412 (1349 - 1445)	0.99 ± 0.03	0.99	1.08
MCPA				
Muestra	$K_{f \text{ des}}$	$N_{f \text{ des}}$	R^2	H
SW-HDTMA ₁₀₀	489 (464 - 515)	0.95 ± 0.10	0.98	0.96
SA-HEXADIM ₁₀₀	554 (499 - 616)	0.40 ± 0.14	0.81	0.38

^aCoficiente de histéresis, $H=N_{f \text{ des}}/N_f$

^bEsta muestra no se ajusta a la ecuación de Freundlich debido a que la adsorción del herbicida es muy elevada.

4.3.2. ESTUDIOS DE ADSORCIÓN-DESORCIÓN A LOS SUELOS

Para evaluar la afinidad de los herbicidas por los suelos S1 y S2, se obtuvieron las isotermas de adsorción-desorción de diurón, terbutilazina y MCPA, las cuales se muestran en la Figura 40. Las constantes resultantes del ajuste de las isotermas a la ecuación de Freundlich se resumen en las Tablas 20 y 21.

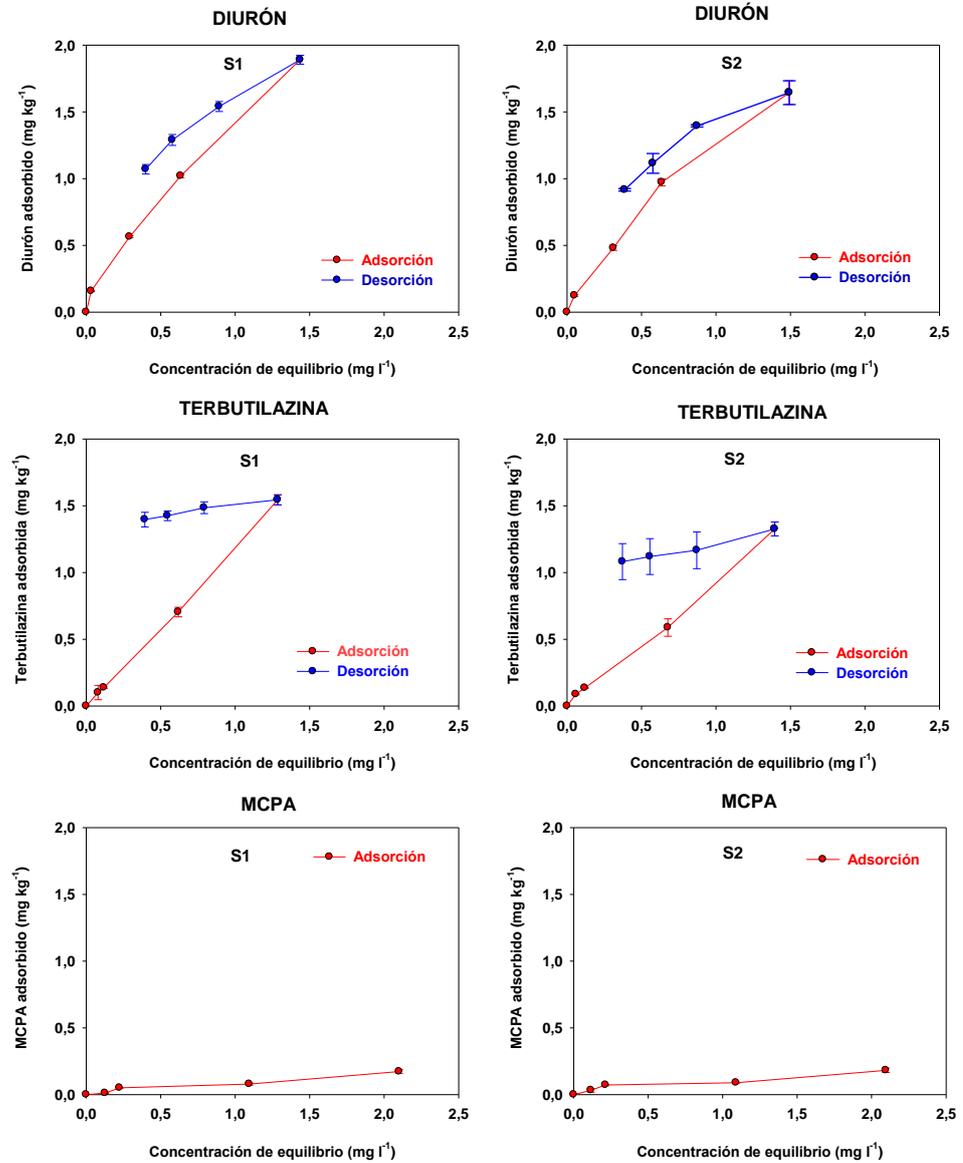


Figura 40. Isotermas de adsorción-desorción de diurón, terbutilazina y MCPA a los suelos S1 y S2.

Comparando las isothermas de adsorción de diurón y terbutilazina para los dos suelos se observa que la adsorción de los herbicidas al suelo S1 es ligeramente superior a la del S2. El mayor contenido en arcilla y materia orgánica del suelo S1 (Tabla 16) hace que éste posea una mayor superficie específica y reactividad superficial, lo que aumenta la adsorción de los herbicidas respecto al suelo S2 (con mayor contenido en arena y menor cantidad de materia orgánica). Para MCPA, la cantidad de herbicida adsorbida por los dos suelos fue muy pequeña, probablemente debido a que esta molécula tiene una gran afinidad por la fase acuosa y a la repulsión entre la carga negativa de este herbicida, al pH de los suelos considerados, y la carga neta negativa de la materia orgánica y la arcilla (Hamaker y Thompson, 1972), lo que provoca que exista poca afinidad por las partículas de suelo. Además, no existen diferencias significativas en la adsorción en ambos suelos, debido a su escasa adsorción.

El diurón es adsorbido en mayor medida por cada suelo en relación a terbutilazina, lo que se refleja en valores ligeramente superiores de los coeficientes K_f y K_{oc} (Tabla 20). Comparando ambos herbicidas, la desorción de terbutilazina es más irreversible, mientras que el diurón refleja un comportamiento bastante reversible para los dos suelos (Figura 40). Esto se refleja en los valores del coeficiente de histéresis $H (= N_{f\ des} / N_{f\ ads})$, que son mucho menores para terbutilazina que para diurón (Tabla 21). En el caso de MCPA, debido a su escasa adsorción, no se obtuvieron las isothermas de desorción.

Tabla 20. Coeficientes de Freundlich para la adsorción de diurón, terbutilazina y MCPA a los suelos S1 y S2.

Diurón				
Suelo	K_f	N_f	R^2	K_{oc}^a
S1	1.26 (1.15 - 1.39)	0.62 ± 0.06	0.973	91 (83 - 100)
S2	1.17 (1.10 - 1.26)	0.75 ± 0.05	0.987	165 (155 - 177)
Terbutilazina				
Suelo	K_f	N_f	R^2	K_{oc}
S1	1.11 (1.05 - 1.16)	0.96 ± 0.03	0.996	80 (76 - 83)
S2	0.94 (0.88 - 1.00)	0.87 ± 0.04	0.994	132 (124 - 141)
MCPA				
Suelo	K_f	N_f	R^2	K_{oc}
S1	0.17 (0.09 - 0.32)	1.04 ± 0.54	0.552	12 (6 - 23)
S2	0.19 (0.11 - 0.34)	0.70 ± 0.46	0.4306	27 (15 - 48)

^a Valor de K_f normalizado al contenido en carbono orgánico de los suelos.

Tabla 21. Coeficientes de Freundlich para la desorción de diurón y terbutilazina en los suelos S1 y S2.

Diurón				
Suelo	$K_{f\ des}$	$N_{f\ des}$	R^2	H^a
S1	1.62 (1.50 - 1.74)	0.44 ± 0.01	0.998	0.71
S2	1.42 (1.38 - 1.45)	0.44 ± 0.04	0.984	0.59
Terbutilazina				
Suelo	$K_{f\ des}$	$N_{f\ des}$	R^2	H
S1	1.51 (1.44 - 1.51)	0.09 ± 0.01	0.992	0.09
S2	1.23 (1.21 - 1.26)	0.15 ± 0.03	0.914	0.17

^a Coeficiente de histéresis, $H = N_{f\ des} / N_f$.

4.4. PREPARACIÓN DE FORMULACIONES ADSORBENTE-HERBICIDA

Para la preparación de formulaciones de liberación controlada de los herbicidas diurón, terbutilazina y MCPA se seleccionaron las montmorillonitas modificadas con mayor afinidad por cada uno de los herbicidas (Tabla 22). Tal y como se describe en el apartado 3.2.5., inicialmente las formulaciones se prepararon por adsorción del herbicida al adsorbente seleccionado usando una disolución concentrada de herbicida (procedimiento 1). Además, con fines comparativos y cuando por el procedimiento anterior las cantidades de herbicida adsorbidas en el adsorbente resultaron ser pequeñas, también se prepararon formulaciones mezclando el adsorbente y el herbicida, como sólidos, en la proporción deseada y añadiendo posteriormente una pequeña cantidad de disolvente, generalmente orgánico, que luego se dejó evaporar (procedimiento 2).

Tabla 22. Montmorillonitas modificadas seleccionadas para la preparación de las formulaciones de liberación controlada de cada herbicida.

Arcillas seleccionadas			
Diurón	SA-HDTMA ₁₀₀	SW-HDTMA ₁₀₀	SW-ESPERM ₁₀₀
Terbutilazina	SA-HDTMA ₁₀₀	SW-Fe	SW-CAR ₁₀₀
MCPA	SA-HDTMA ₁₀₀	SW-HDTMA ₁₀₀	SA-HEXADIM ₁₀₀

Tras la preparación de las formulaciones, 10 mg de éstas se extrajeron con 10 ml de metanol, en el caso de diurón y terbutilazina, o con 10 ml de una mezcla 60:40 de metanol y ácido fosfórico diluido (pH= 2), en el caso de MCPA, para determinar las cantidades de herbicida extraíble en las mismas.

Como puede observarse en la Tabla 23, excepto para las formulaciones de terbutilazina preparadas con SW-Fe y SW-CAR₁₀₀, las cantidades de herbicida extraídas resultaron ser bastante próximas a las esperadas, es decir, a las cantidades añadidas en el caso del procedimiento 2 o a las calculadas de forma indirecta a partir de la diferencia entre la cantidad de herbicida añadida y la no adsorbida durante la preparación de los complejos o formulaciones por el procedimiento 1. Asumiendo que las extracciones proporcionan una estimación de la cantidad de herbicida potencialmente disponible o liberable de los complejos, estos resultados indican que la mayor parte de los herbicidas en los complejos preparados podría ser liberada tras la aplicación al suelo del complejo.

Tabla 23. Porcentaje de herbicida en los complejos calculado por métodos indirecto y directo.

Complejos	% diurón (método indirecto)	% diurón (método directo)
SW-HDTMA ₁₀₀ ads (40 ppm) ^a	1.03 ± 0.01	0.92 ± 0.02
SW-ESPERM ₁₀₀ ads (40 ppm) ^a	1.66 ± 0.01	1.43 ± 0.01
SW-ESPERM ₁₀₀ mez (MeOH) ^b	4.00 ± 0.00	3.23 ± 0.04
SA-HDTMA ₁₀₀ ads (40 ppm) ^a	3.23 ± 0.01	2.82 ± 0.03
Complejos	% terbutilazina (método indirecto)	% terbutilazina (método directo)
SW-CAR ₁₀₀ ads (6 ppm) ^a	1.49 ± 0.01	0.82 ± 0.02
SW-CAR ₁₀₀ mez (MeOH) ^b	4.00 ± 0.00	2.40 ± 0.10
SW-CAR ₁₀₀ mez (H ₂ O) ^b	4.00 ± 0.00	3.03 ± 0.05
SW-CAR ₁₀₀ mez (Acetona) ^b	4.00 ± 0.00	3.01 ± 0.10
SA-HDTMA ₁₀₀ ads (6 ppm) ^a	0.82 ± 0.02	0.60 ± 0.01
SA-HDTMA ₁₀₀ mez (MeOH) ^b	4.00 ± 0.00	3.54 ± 0.16
SW-Fe ads (6 ppm) ^a	0.9 ± 0.02	0.40 ± 0.02
SW-Fe ads (H ₂ O) ^b	4.00 ± 0.00	0.35 ± 0.06
Complejos	% MCPA (método indirecto)	% MCPA (método directo)
SW-HDTMA ₁₀₀ ads (600 ppm) ^a	6.00 ± 0.00	6.06 ± 0.06
SA-HDTMA ₁₀₀ ads (600 ppm) ^a	14.00 ± 0.00	12.61 ± 0.44
SA-HDTMA ₁₀₀ ads (200ppm) ^a	6.00 ± 0.00	5.60 ± 0.09
SA-HDTMA ₁₀₀ mez (MeOH) ^b	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.04
SA-HEXADIM ₁₀₀ mez (MeOH) ^b	6.00 ± 0.00	5.20 ± 0.29

^a Complejos preparados por el procedimiento 1 (se indica la concentración de la disolución de herbicida utilizada en la síntesis).

^b Complejos preparados por el procedimiento 2 (se indica el disolvente adicionado en la síntesis).

Para los complejos de terbutilazina con SW-CAR₁₀₀ y SW-Fe, las cantidades extraídas fueron considerablemente menores que las esperadas (Tabla 23) y en el caso del complejo SW-Fe (4% H₂O) además se observó que la cantidad de terbutilazina extraíble con metanol disminuía con el paso del tiempo (Figura 41). Es interesante destacar que el análisis elemental de este complejo dio un contenido en N muy superior al extraíble con metanol y que además se mantenía constante con el tiempo, lo que indica que la terbutilazina está presente en el complejo, pero es retenida por la muestra SW-Fe de forma irreversible, haciendo que su extractabilidad con metanol sea cada vez más reducida. Este hecho, que está probablemente relacionado con el mecanismo de adsorción de terbutilazina a través de interacciones ácido-base con SW-CAR y SW-Fe, limitaría la utilidad práctica de los complejos de terbutilazina preparados con estos adsorbentes, ya que una gran parte del herbicida presente en los mismos presentaría una notable resistencia a ser liberado, lo cual es necesario para ejercer su acción biológica.

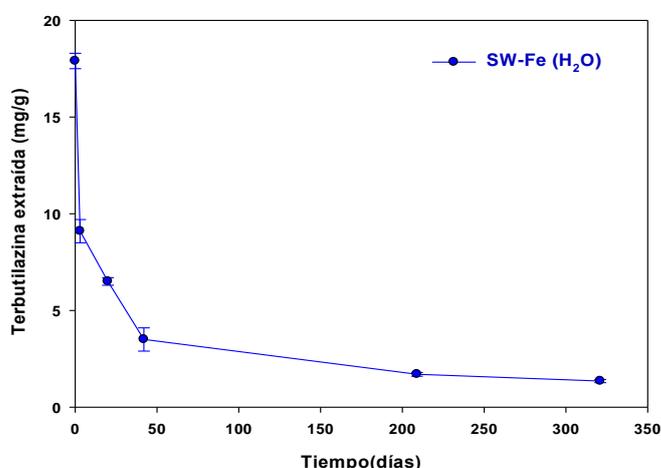


Figura 41. Terbutilazina extraída del complejo SW-Fe mez (H₂O) a diferentes tiempos desde la preparación del complejo.

Las formulaciones de atrazina empleadas en el estudio de biodisponibilidad realizado en esta memoria se prepararon por mezcla del herbicida y el adsorbente (SA-HDTMA₁₀₀ ó SW-CAR₁₀₀) usando una disolución de atrazina en metanol que se dejó evaporar. Se eligió una relación organoarcilla: herbicida lo suficientemente alta para asegurar que la mayor parte del herbicida se encontrara interaccionando con la organoarcilla (ver apartado 3.2.5.). Se asumió por tanto que todo el herbicida se encontraba adsorbido.

4.5. CINÉTICAS DE LIBERACIÓN EN AGUA

Las cinéticas de liberación en agua se obtuvieron para comparar la velocidad y la cantidad total de diurón, terbutilazina y MCPA que los complejos preparados pueden liberar en medio acuoso y condiciones estáticas. En las Figuras 42, 43 y 44 se han representado las cinéticas de liberación para los distintos complejos y para formulaciones comerciales convencionales usadas como referencia. En el eje de ordenadas de las gráficas se representa la cantidad de diurón, terbutilazina y MCPA liberado en porcentaje del total aplicado y en el eje de abscisas está representado el tiempo transcurrido durante el ensayo.

Las cinéticas de liberación se ajustaron a la ecuación

$$M_t/M_z = K \cdot t^n + c \quad [\text{Ec. 1}]$$

la cual ha sido utilizada por otros autores para describir curvas de liberación de diferentes formulaciones de plaguicidas (Ritger y Peppas, 1987; González-Pradas et al., 1999; Hermosín et al., 2001; Celis et al., 2002a). En ella, M_t/M_z representa el porcentaje de herbicida liberado a tiempo t , y K , n y c son constantes que definen la curva de liberación. Estos parámetros se muestran en la Tabla 24 para las diferentes formulaciones ensayadas, junto con los valores de t_{50} (tiempo en el que se libera el 50% del herbicida), calculados utilizando la misma ecuación. Conviene destacar que aunque esta ecuación puede sobreestimar la cantidad de herbicida liberado para valores de t elevados, llegando a dar valores de M_t/M_z superiores al 100%, resulta útil para comparar el comportamiento de diferentes sistemas de liberación lenta dentro del periodo experimental evaluado.

Lo primero que hay que destacar es que para las formulaciones comerciales usadas como referencia la liberación de los herbicidas se produce prácticamente de manera instantánea, lo que contrasta con las formulaciones de arcilla preparadas, en las que la liberación ocurre de manera gradual a lo largo del tiempo (Figuras 42-44). Así, las cantidades liberadas a $t=0$, que se corresponden con los valores del parámetro c en la Tabla 24, oscilan entre 6-19% para los complejos de terbutilazina, 9-22% para los de diurón y 12-79% para los de MCPA, mientras que los valores de c obtenidos para las formulaciones comerciales convencionales usadas como referencia fueron siempre superiores al 90%. En el caso de diurón y MCPA la mayor parte del herbicida se libera dentro de las primeras 48-72 horas y la cantidad de herbicida liberada en el medio acuoso permanece después prácticamente constante a lo largo del tiempo (Figuras 42 y 44). Para terbutilazina, la liberación ocurre de forma más lenta durante todo el periodo experimental evaluado (Figura 43).

Tabla 24. Constantes del ajuste a la ecuación $M_t/M_z = Kt^n + c$ de los datos de liberación de diurón, terbutilazina y MCPA en agua para las formulaciones organoarcilla-herbicida y para formulaciones comerciales convencionales.

DIURÓN					
Adsorbente	c	K	n	R ²	t ₅₀ (horas)
SW-HDTMA ₁₀₀ ads	21.8 ± 6.7	22.0 ± 6.9	0.229 ± 0.054	0.927	3
SW-ESPERM ₁₀₀ ads	9.4 ± 3.4	11.0 ± 3.5	0.237 ± 0.052	0.931	> 200
SW-ESPERM ₁₀₀ mez (MeOH)	14.3 ± 3.3	14.8 ± 3.1	0.312 ± 0.038	0.982	17
SA-HDTMA ₁₀₀ ads	8.2 ± 2.2	12.9 ± 2.1	0.278 ± 0.029	0.986	69
Comercial	94.4 ± 1.3	11.9 ± 1.5	0.010 ± 0.02	0.934	< 0.1
TERBUTILAZINA					
Adsorbente	c	K	n	R ²	t ₅₀ (horas)
SW-CAR ₁₀₀ ads	19.2 ± 3.4	13.6 ± 3.2	0.280 ± 0.040	0.972	19
SW-CAR ₁₀₀ mez (MeOH)	13.0 ± 3.2	25.3 ± 3.1	0.249 ± 0.021	0.990	5
SW-CAR ₁₀₀ mez (H ₂ O)	12.3 ± 4.0	29.3 ± 4.1	0.220 ± 0.023	0.984	3
SW-CAR ₁₀₀ mez (Acetona)	11.2 ± 4.6	23.7 ± 4.6	0.240 ± 0.032	0.973	8
SA-HDTMA ₁₀₀ ads	5.9 ± 4.3	15.2 ± 3.9	0.316 ± 0.045	0.975	29
SA-HDTMA ₁₀₀ mez (MeOH)	12.0 ± 5.2	21.9 ± 5.0	0.270 ± 0.039	0.972	8
Comercial	91.5 ± 1.6	1.7 ± 1.5	0.295 ± 0.146	0.750	< 0.1
MCPA					
Adsorbente	c	K	n	R ²	t ₅₀ (horas)
SW-HDTMA ₁₀₀ ads	63.0 ± 4.6	19.9 ± 5.3	0.146 ± 0.044	0.918	< 0.1
SA-HDTMA ₁₀₀ ads (600 ppm)	45.0 ± 6.6	36.2 ± 7.7	0.125 ± 0.035	0.935	< 0.1
SA-HDTMA ₁₀₀ ads (200 ppm)	41.5 ± 6.5	27.0 ± 7.2	0.174 ± 0.045	0.933	< 0.1
SA-HDTMA ₁₀₀ mez (MeOH)	12.6 ± 7.4	28.9 ± 7.6	0.257 ± 0.046	0.967	3
SA-HEXADIM ₁₀₀ mez (MeOH)	79.0 ± 2.9	16.0 ± 3.5	0.054 ± 0.036	0.887	< 0.1
Comercial	101.7 ± 2.3	0.6 ± 2.5	0.208 ± 0.75	0.070	< 0.1

Frente a una liberación próxima al 100% del herbicida añadido en forma libre, la liberación de **diurón** (Figura 42) no fue completa tras finalizar el ensayo, con porcentajes finales de diurón liberado del 83, 57, 41 y 80 % para SW-HDTMA₁₀₀ (ads), SA-HDTMA₁₀₀ (ads), SW-ESPERM₁₀₀ (ads), y SW-ESPERM₁₀₀ mez (MeOH), respectivamente. Para los complejos preparados por adsorción, estas liberaciones siguen un orden inverso a las capacidades de adsorción (K_f) medidas para las organoarcillas (Tabla 18); aquellas cuya adsorción del herbicida es mayor (SW-ESPERM₁₀₀ y SA-HDTMA₁₀₀) liberan una menor cantidad de herbicida. El complejo preparado por mezcla con SW-ESPERM₁₀₀ libera más rápido y en mayor proporción que el análogo por adsorción. Esto puede atribuirse a que al

contener un porcentaje de herbicida superior al que contienen las formulaciones preparadas por adsorción (Tabla 23), puede que parte del herbicida no esté adsorbido, y por lo tanto, se encuentre más disponible para su liberación.

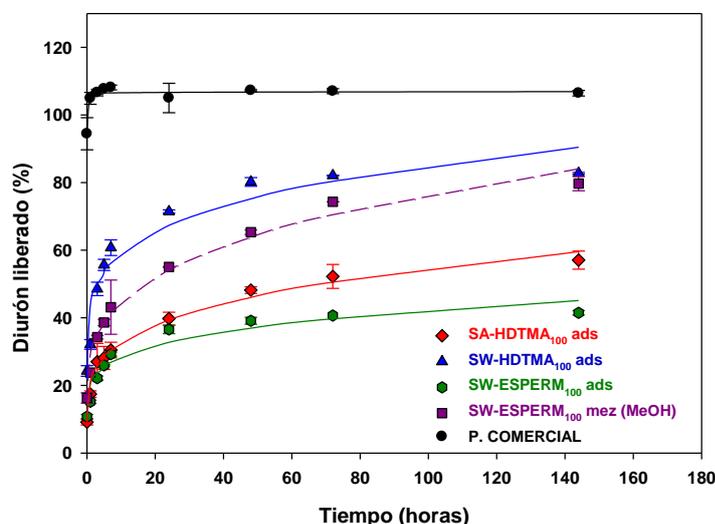


Figura 42. Cinética de liberación de diurón en agua a partir de diferentes formulaciones de organoarcillas y de la formulación comercial. Los símbolos corresponden a los datos experimentales, mientras que las líneas corresponden a los ajustes a la ecuación $M_t/M_z = c + Kt^n$. El complejo preparado por mezcla con adición de disolvente se representa con línea discontinua.

En la Figura 43 se muestran las cinéticas de liberación de **terbutilazina** en agua, en la cual no se ha incluido la formulación con la arcilla SW-Fe debido a que, como se discute en el apartado 4.4., la mayor parte del herbicida es retenido por esta arcilla de una forma irreversible. Se observa, al igual que en el caso de diurón, que los dos complejos preparados por adsorción liberan una cantidad de herbicida menor que los preparados por mezcla y, además, ambos presentan un comportamiento similar en cuanto a la cantidad total de herbicida liberado (81% para SW-CAR₁₀₀ y 78% para SA-HDTMA₁₀₀), lo cual está de acuerdo con las capacidades de adsorción de estas organoarcillas (Tabla 18). Para el resto de formulaciones, SW-CAR₁₀₀ mez (MeOH), SW-CAR₁₀₀ mez (Acetona), SW-CAR₁₀₀ mez (H₂O) y SA-HDTMA₁₀₀ mez (MeOH), las liberaciones de terbutilazina al final del experimento fueron cercanas al 100%, poniéndose de manifiesto que existen pocas diferencias debido al tipo de disolvente utilizado para su preparación. En general, se observa que la cantidad máxima de terbutilazina liberada depende de la forma de

preparación del complejo, liberando un mayor porcentaje de herbicida las mezclas físicas de cada formulación organoarcilla-herbicida que aquellas preparadas por adsorción en fase acuosa. Como se ha comentado para diurón, esto se debe a que en el caso de las mezclas físicas, al tener un contenido mayor de herbicida (Tabla 23), puede que no todo el herbicida añadido se encuentre adsorbido en el adsorbente y, por lo tanto, exista una fracción más disponible para su liberación. Por el contrario, en las formulaciones preparadas por adsorción todo el herbicida presente en las mismas se encuentra adsorbido y la liberación se produce más lentamente.

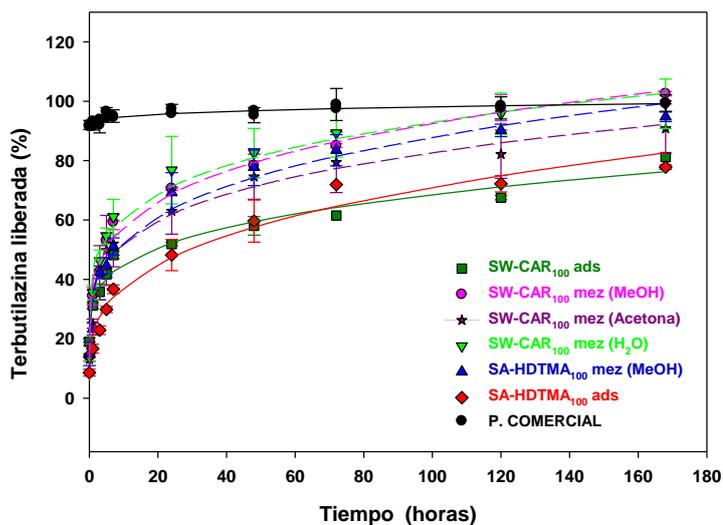


Figura 43. Cinética de liberación de terbutilazina en agua a partir de diferentes formulaciones de organoarcillas y de la formulación comercial. Los símbolos corresponden a los datos experimentales, mientras que las líneas corresponden a los ajustes a la ecuación $M_t/M_z = c + Kt^n$. Los complejos preparados por mezcla con adición de disolvente se representan con línea discontinua.

Para el caso de **MCPA** (Figura 44), en general, las cinéticas de liberación son más rápidas que las encontradas para diurón y terbutilazina, lo que indica una interacción más débil con los adsorbentes, probablemente debido al carácter aniónico de este herbicida. Para los complejos preparados por adsorción, la cantidad liberada a $t = 0$, que se corresponde con el valor de c en la Tabla 24, es inferior para SA-HDTMA₁₀₀ que para SW-HDTMA₁₀₀, siguiendo así un orden inverso a las capacidades de adsorción medidas para las organoarcillas (Tabla 18). Comparando las dos formulaciones de SA-HDTMA₁₀₀

preparadas por adsorción utilizando dos concentraciones diferentes de MCPA, el valor de c es ligeramente inferior para la formulación preparada con una disolución de 200 ppm que para la preparada con la disolución de 600 ppm, lo que indica que una mayor cantidad de herbicida adsorbido facilita la liberación del herbicida. Por otra parte, se observa que en el caso de MCPA, el complejo preparado por mezcla con MeOH libera más lento que los análogos obtenidos por adsorción, lo que contrasta con los resultados obtenidos con diurón y terbutilazina. Esto puede explicarse porque en el caso de MCPA los complejos preparados por adsorción tienen un contenido en herbicida similar o incluso superior al del complejo preparado por mezcla con MeOH (Tabla 23).

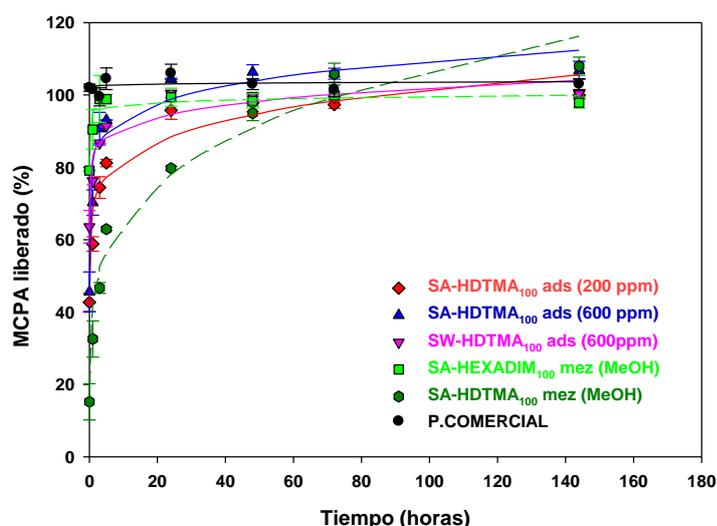


Figura 44. Cinética de liberación de MCPA en agua a partir de diferentes formulaciones de organoarcillas y de la formulación comercial. Los símbolos corresponden a los datos experimentales, mientras que las líneas corresponden a los ajustes a la ecuación $M_t/M_z = c + Kt^n$. Los complejos preparados por mezcla con adición de disolvente se representan con línea discontinua.

En conclusión, cabe destacar que para los tres herbicidas los complejos preparados liberan el ingrediente activo al medio acuoso más lentamente que las formulaciones comerciales, siendo el MCPA el que se libera más rápido de los tres herbicidas, seguido de diurón y terbutilazina. Además, las cinéticas de liberación descritas por los parámetros c , K y n que se muestran en la Tabla 24 dependen tanto del adsorbente como de la forma de preparación de los complejos. En particular, parece que bajos

contenidos en herbicida acentúan la interacción arcilla-herbicida haciendo que la liberación se produzca más lentamente. Esto hace posible seleccionar el tipo de formulación más adecuado en función de la velocidad de liberación deseada.

4.6. EXPERIMENTOS DE INCUBACIÓN DE LOS HERBICIDAS EN LOS SUELOS

4.6.1. CURVAS DE DISIPACIÓN

La Figura 45 muestra las curvas de disipación de los herbicidas diurón, terbutilazina y MCPA en los suelos seleccionados para este estudio tras la aplicación de los herbicidas como formulación comercial convencional y como complejos con organoarcillas seleccionadas. Las curvas de disipación de los herbicidas diurón y MCPA son del tipo sigmoideal, lo que a menudo se asocia a la utilización del herbicida como sustrato de crecimiento microbiano. Sin embargo, la degradación de terbutilazina parece responder a una cinética de primer orden, donde el herbicida es cometabolizado, es decir, no se utiliza como sustrato de crecimiento (Kearney et al., 1997). Cuando la degradación del herbicida no es total, éste se transforma a otros productos cuya toxicidad, movilidad y efectos sobre el medio son menos conocidos. Los principales productos intermedios en la degradación de diurón, terbutilazina y MCPA son los que se muestran en la Tabla 25. Sorensen et al. (2003) encontraron que la biodegradación de diurón en suelos daba como último producto de degradación más abundante el metabolito 3, 4-dicloroanilina. En el caso de terbutilazina, son des-etil terbutilazina y des-isopropil atrazina los principales productos de degradación en suelos (Loos y Niessner, 1999) y para MCPA es 2-metil-4-clorofenol (Crespín et al., 2001). En nuestro caso, se realizó el seguimiento de los principales metabolitos de diurón (1-(3,4-diclorofenil)-3-metilurea (DCPMU) y (3,4-diclorofenilurea) (DCPU)) durante el proceso de disipación, observándose que la cantidad de DCPMU detectada aumentaba con la cantidad de diurón degradada y que con el transcurso del tiempo este metabolito sufría otro proceso de degradación hacia DCPU. En el caso de terbutilazina y MCPA no se detectaron en los cromatogramas picos que pudieran corresponder a algunos de los metabolitos descritos en la bibliografía para estos herbicidas.

Tabla 25. Principales productos de degradación de diurón, terbutilazina y MCPA cuyo medio de formación es el suelo (PPDB, 2010).

<i>Herbicida</i>	<i>Metabolitos</i>		
Diurón	1-(3,4-diclorofenil)-3-metilurea	3,4-diclorofenilurea	3,4-dicloroanilina
MCPA	2-metil-4-clorofenol		
Terbutilazina	des-etil terbutilazina	des-isopropil atrazina	

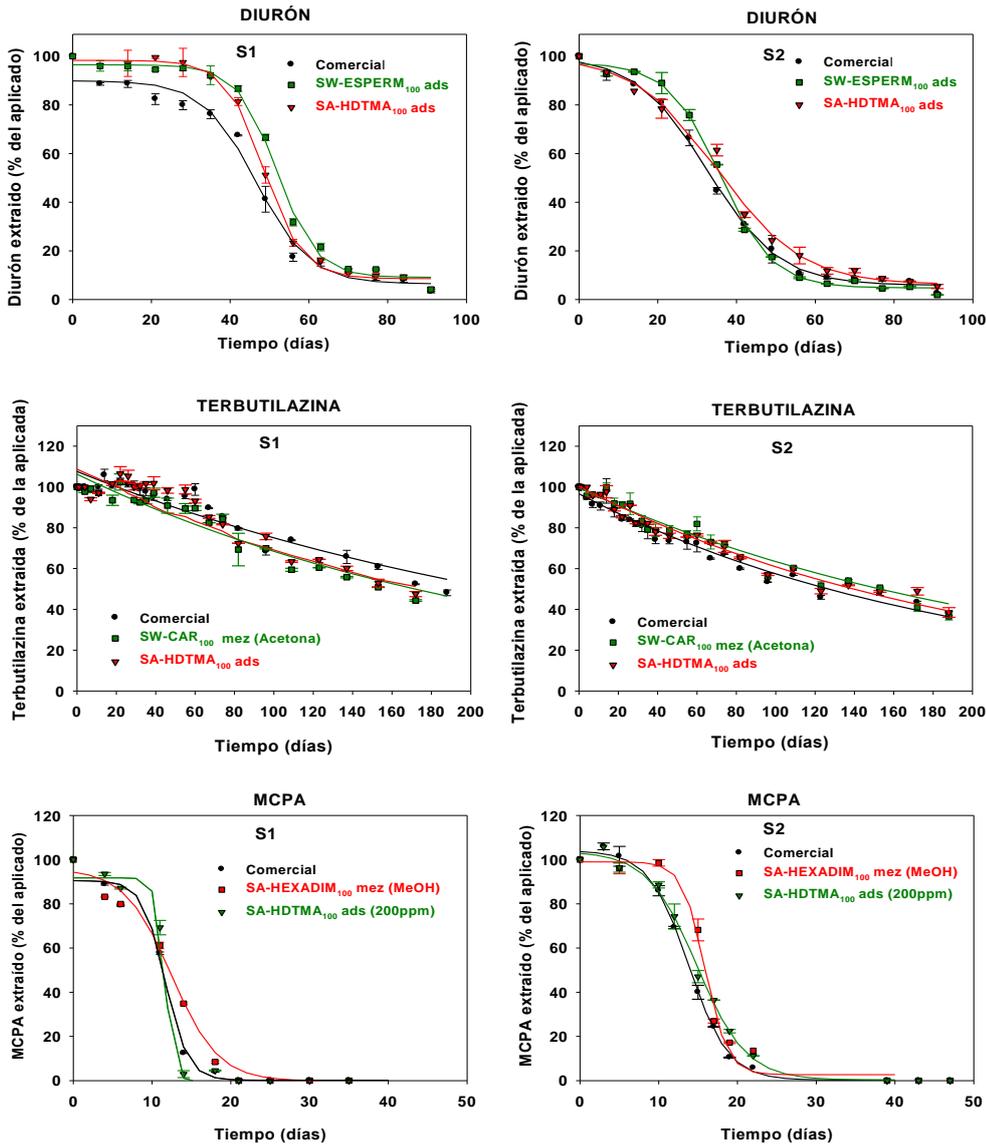


Figura 45. Curvas de disipación de diurón, terbutilazina y MCPA aplicados a los suelos S1 y S2 como formulaciones de organoarcillas y como formulaciones comerciales convencionales. Los símbolos corresponden a los datos experimentales, mientras que las líneas corresponden al ajuste de los mismos a las ecuaciones 2 (terbutilazina) y 4 (diurón y MCPA).

Teniendo en cuenta la forma de las curvas obtenidas, las cinéticas de disipación de terbutilazina se ajustaron a una ecuación de primer orden:

$$C = C_0 \cdot e^{-k \cdot t} \quad [\text{Ec. 2}]$$

donde C representa la concentración de herbicida a tiempo t , C_0 es la concentración a $t = 0$ y k es una constante que define la caída exponencial de la curva. El tiempo necesario para que la concentración de herbicida se reduzca a la mitad puede calcularse, haciendo $C = C_0/2$, como:

$$TD_{50} = \frac{\ln 2}{K} \quad [\text{Ec. 3}]$$

En el caso de diurón y MCPA, los datos de disipación se ajustaron a una curva sigmoideal con cuatro parámetros:

$$C = Y_0 + \frac{a}{1 + \exp\left(-\frac{(t - t_0)}{b}\right)} \quad [\text{Ec. 4}]$$

donde C representa la concentración de herbicida a tiempo t , Y_0 es la concentración a $t = \infty$, es decir, la cantidad residual no degradable, a es la diferencia entre la concentración inicial y la concentración mínima (Y_0), t_0 corresponde al tiempo para el cual C es igual al 50% de a , y b es el tiempo al cual C es el 75 % de a menos el tiempo al cual C es el 25 % de a (Han et al., 2008). El tiempo necesario para que la concentración de herbicida se reduzca a la mitad puede calcularse, haciendo $C = (a + Y_0)/2$, como:

$$TD_{50} = t_0 - b \cdot \ln\left(\frac{2a}{a - Y_0} - 1\right) \quad [\text{Ec. 5}]$$

Las constantes cinéticas obtenidas tras el ajuste de los datos de disipación de terbutilazina a una cinética de primer orden (Ec. 2) y tras el ajuste de los datos de disipación de diurón y MCPA a una cinética sigmoideal (Ec. 4) se muestran en las Tablas 26 y 27, junto con los tiempos necesarios para que la concentración de herbicida se reduzca al 50% de la inicial, TD_{50} , obtenidos a partir de dichas constantes (Ec. 3 y 5). En el caso de diurón y MCPA, los valores de TD_{50} están muy próximos a los valores de t_0 debido a que la fracción residual no degradable, Y_0 , es en general pequeña (Tabla 27). La Figura 45 refleja que las curvas resultantes del ajuste describen bastante bien los datos experimentales obtenidos.

Tabla 26. Constantes del ajuste de los datos de disipación de terbutilazina en suelos a una cinética de primer orden (Ec. 2).

TERBUTILAZINA					
Formulación		C_0	K	R^2	TD_{50} (días)
SW-CAR ₁₀₀ mez (Acetona)	S1	106 ± 2	0.0044 ± 0.0003	0.921	159
	S2	100 ± 1	0.0050 ± 0.0002	0.969	139
SA-HDTMA ₁₀₀ ads	S1	109 ± 3	0.0040 ± 0.0004	0.856	173
	S2	100 ± 1	0.0045 ± 0.0002	0.970	141
Comercial	S1	108 ± 2	0.0036 ± 0.0003	0.909	190
	S2	97 ± 1	0.0052 ± 0.0002	0.966	133

Tabla 27. Constantes del ajuste de los datos de disipación de diurón y MCPA en suelos a una cinética de tipo sigmoïdal (Ec. 4).

DIURÓN							
Formulación		Y_0	a	t_0	b	R^2	TD_{50} (días)
SW-ESPERM ₁₀₀ ads	S1	9.1 ± 1.6	87.3 ± 2.2	51.9 ± 0.6	-5.0 ± 0.5	0.996	53
	S2	4.7 ± 1.0	92.5 ± 1.9	35.9 ± 0.5	-6.6 ± 0.5	0.998	37
SA-HDTMA ₁₀₀ ads	S1	8.6 ± 1.1	89.7 ± 1.6	48.6 ± 0.4	-4.9 ± 0.4	0.998	50
	S2	6.1 ± 2.2	93.8 ± 5.4	35.4 ± 1.6	-10.6 ± 1.5	0.993	37
Comercial	S1	6.4 ± 0.8	83.5 ± 4.2	46.7 ± 1.3	-6.8 ± 1.2	0.986	48
	S2	5.8 ± 0.1	94.4 ± 2.8	32.6 ± 0.7	-9.1 ± 0.7	0.997	34

MCPA							
Formulación		Y_0	a	t_0	b	R^2	TD_{50} (días)
SA-HDTMA ₁₀₀ ads (200 ppm)	S1	0.9 ± 1.8	92.6 ± 3.0	11.7 ± 0.3	-0.6 ± 0.3	0.995	12
	S2	0.3 ± 1.3	103.4 ± 2.4	14.9 ± 0.3	-3.1 ± 0.2	0.997	15
SA-HEXADIM ₁₀₀ mez (MeOH)	S1	-1.9 ± 2.9	96.0 ± 6.2	12.5 ± 0.6	-3.0 ± 0.6	0.990	12
	S2	2.7 ± 2.4	96.3 ± 4.1	15.9 ± 0.3	-1.4 ± 2.9	0.989	16
Comercial	S1	0.2 ± 2.7	90.3 ± 4.7	11.7 ± 0.4	-1.5 ± 0.4	0.987	12
	S2	0.2 ± 0.9	103.8 ± 1.6	13.8 ± 0.2	-2.5 ± 0.3	0.999	14

Los datos de la Figura 45 y de las Tablas 26 y 27 ponen de manifiesto que la persistencia de los herbicidas en los suelos estudiados aumenta en el siguiente orden; MCPA < diurón < terbutilazina. Los valores de TD_{50} para los suelos utilizados en este trabajo oscilan entre 12-16 días para MCPA, entre 34-53 días para diurón y entre 133-190

días para terbutilazina. En el caso de MCPA, estos resultados están de acuerdo con la rápida degradación que suele sufrir este herbicida en suelos tras un cierto periodo de latencia (Worthing y Hance, 1991; PPDB, 2010). Los valores de TD_{50} obtenidos en este trabajo para diurón y terbutilazina son algo más bajos y algo más altos, respectivamente, que los valores medios que pueden encontrarse en la bibliografía (Worthing y Hance, 1991; PPDB, 2010), pero están muy próximos a los obtenidos por Cabrera et al. (2007), quienes utilizaron un suelo arenoso mediterráneo con unas características muy similares a las de los suelos S1 y S2 empleados en este trabajo.

Respecto al tipo de suelo, la persistencia de diurón y terbutilazina en el suelo S2 es ligeramente más corta que en el suelo S1, mientras que la persistencia de MCPA fue similar en los dos suelos (Figura 45, Tablas 26 y 27). El suelo S2 es un suelo con una textura más gruesa que el S1 (Tabla 16) y que además presenta una menor capacidad de retención para los herbicidas diurón y terbutilazina (Figura 40, Tabla 20), lo que probablemente haya facilitado la disponibilidad de estos herbicidas para los microorganismos del suelo. El MCPA, por sus características ácidas, presenta una mínima adsorción tanto al suelo S1 como al S2 (Figura 40, Tabla 20), lo que unido a su escasa persistencia, puede explicar su comportamiento similar en los dos suelos utilizados.

En cuanto al tipo de formulación, los datos de la Figura 45 y las Tablas 26 y 27 muestran que las curvas de disipación no variaron sustancialmente por el tipo de formulación. Esto indica que la mayor parte del herbicida se encuentra en las formulaciones de organoarcillas en una forma potencialmente disponible para los microorganismos del suelo y que su adsorción a la organoarcilla, por tanto, no limita su degradabilidad, probablemente porque la desorción ocurre de forma rápida a medida que el herbicida se va disipando de la disolución del suelo por procesos degradativos.

4.6.2. ESTUDIOS DE BIODISPONIBILIDAD

A pesar de que existen una gran variedad de mecanismos involucrados en la disponibilidad de los herbicidas en el suelo, el efecto neto de éstos se resume en los coeficientes de distribución suelo/agua. Según éstos, sólo los herbicidas en disolución, o que no se encuentran retenidos en el suelo, estarán disponibles para ser transportados o degradados, mientras que la fracción adsorbida al suelo puede ser o no potencialmente disponible para los microorganismos. A menudo se asume que la fracción extraíble con disolventes orgánicos es una medida de la fracción de herbicida potencialmente disponible para ser degradado (Koskinen et al., 2001), e incluso existen estudios recientes que han apuntado que la fracción adsorbida puede ser directamente degradada por los microorganismos del suelo (Park et al., 2001; Singh et al., 2003).

Con el objeto de profundizar acerca de la biodisponibilidad de los herbicidas soportados en formulaciones de organoarcilla, se diseñó una experiencia en la que al suelo S4 se añadió atrazina marcada con ^{14}C , bien en forma libre o soportada en formulaciones de organoarcilla, y se adicionó una suspensión de *Pseudomonas* sp. Cepa ADP capaz de mineralizar el herbicida. La mineralización de la atrazina se siguió durante 2 semanas a partir de la medida del $^{14}\text{CO}_2$ formado. Además, a tiempo cero y tras las dos semanas de incubación, se determinó la cantidad de ^{14}C extraíble en fase acuosa, fase orgánica y retenida en el suelo, esta última por combustión. Se utilizó atrazina para los experimentos de biodisponibilidad por pertenecer a la misma familia que la terbutilazina, que es uno de los herbicidas estudiados en esta Tesis Doctoral y, además, por disponer de bacterias adaptadas para su degradación. Para la preparación de las formulaciones, se utilizaron las organoarcillas SA-HDTMA₁₀₀ y SW-CAR₁₀₀ y se eligió una relación organoarcilla: herbicida lo suficientemente alta para asegurar que la mayor parte del herbicida se encontrara interaccionando con la organoarcilla (300 mg organoarcilla: 0.2 mg atrazina).

En general, a tiempo cero la cantidad de ^{14}C -atrazina extraíble y no extraíble para las formulaciones de organoarcillas fue aproximadamente la misma que para la atrazina libre, con > 96 % extraíble y < 4 % no extraíble (Figura 46). No obstante mientras que para la formulación de SW-CAR₁₀₀, la relación entre la cantidad de atrazina en el extracto metanólico y el acuoso fue muy similar a la encontrada para la atrazina libre, en el caso de la atrazina soportada en SA-HDTMA₁₀₀, la relación entre la cantidad de herbicida en el extracto orgánico y la cantidad de atrazina en el extracto acuoso fue superior (Figura 46), reflejando la existencia de una mayor cantidad de herbicida adsorbido, probablemente a la organoarcilla. Considerando la cantidad de atrazina en la disolución acuosa como la concentración de equilibrio y la cantidad extraída con MeOH como la adsorbida (Cabrera et al., 2008b), se han calculado los coeficientes de distribución para la atrazina libre y para las dos formulaciones de organoarcilla observándose cómo SA-HDTMA₁₀₀ es la que tiene un valor de K_f más alto (1.7 l/kg) mientras que los valores de SW-CAR₁₀₀ y la atrazina libre están próximos (1.2 y 1.4 l/kg respectivamente), lo cual refleja el hecho de que el complejo con SW-CAR₁₀₀ no presenta una mayor cantidad de atrazina adsorbida, es decir, en el extracto metanólico, que el herbicida libre. Este hecho podría parecer contradictorio si tenemos en cuenta la elevada capacidad de adsorción de SW-CAR₁₀₀ para la atrazina, que es incluso superior a la mostrada por la organoarcilla SA-HDTMA₁₀₀ (Figura 47). Este dato podría estar indicando que en presencia del suelo, la capacidad de adsorción de SW-CAR₁₀₀ pudiera verse de alguna forma reducida o anulada, lo que no ocurre con SA-HDTMA₁₀₀.

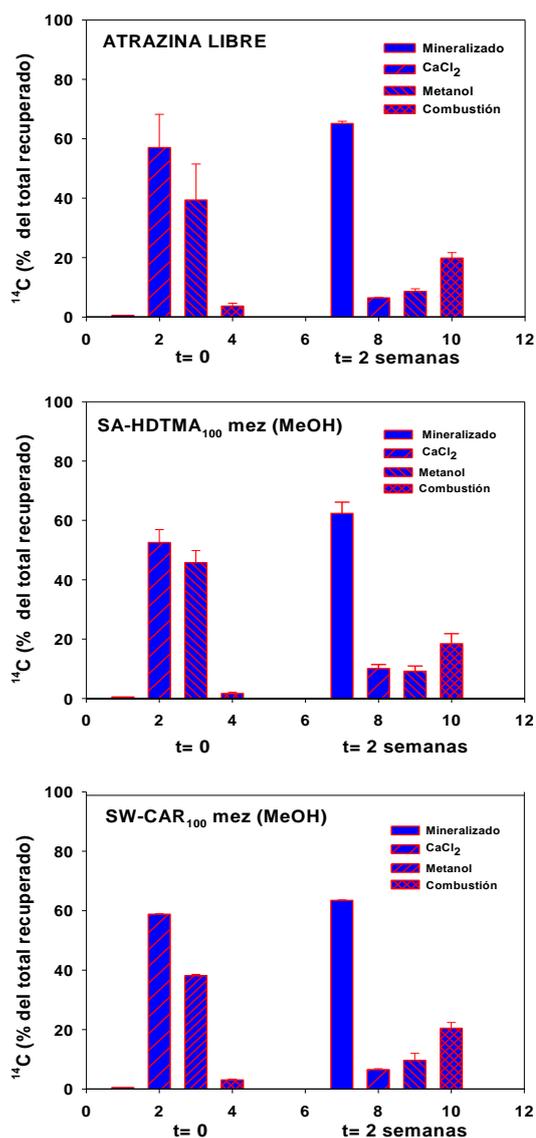


Figura 46. Porcentaje de atrazina mineralizada, extraída en fase acuosa y orgánica y no extraíble durante el experimento de biodisponibilidad con el suelo S4.

La cantidad total de ^{14}C -atrazina extraíble, durante las dos semanas que duró el período de incubación, disminuye desde 98 a 19 % en SA-HDTMA₁₀₀, desde 97 a 16 % en SW-CAR₁₀₀ y desde 96 a 15 % en la atrazina libre (Figura 46). Este hecho es debido principalmente a la degradación microbiológica del herbicida, que aumenta de 0 a 63 % desde el tiempo inicial al final del experimento, así como a un aumento de la fracción irreversiblemente adsorbida (Figura 46).

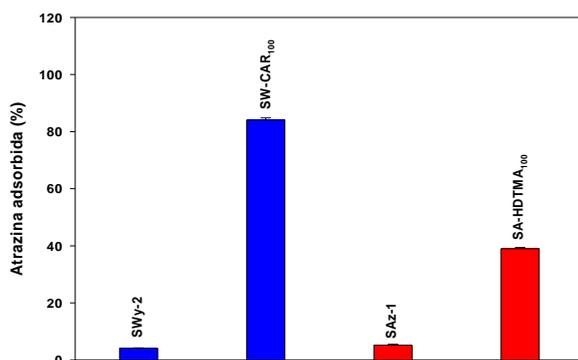


Figura 47. Porcentaje de atrazina adsorbida por las muestras de montmorillonitas seleccionadas, modificadas y sin modificar, a una concentración inicial de herbicida de 1 mg l^{-1} y relación sólido: disolución 20 mg: 8 ml.

La disponibilidad de atrazina, en forma libre o como formulación de organoarcillas, para ser degradada por la bacteria *Pseudomonas* sp. Cepa ADP, se representa en la Figura 48 como la cantidad de $^{14}\text{CO}_2$ formado durante el experimento de mineralización. En general, la mayoría de la ^{14}C -atrazina aplicada se mineralizó durante los seis primeros días de incubación (46 % en SA-HDTMA₁₀₀, 54 % en SW-CAR₁₀₀ y 56 % en la atrazina libre (Figuras 46 y 48). La mineralización al final del experimento fue superior al 80 % de la fracción inmediatamente disponible (extracto acuoso), que se redujo del 53 al 10 % en SA-HDTMA₁₀₀, del 59 al 6 % en SW-CAR₁₀₀ y del 57 al 6 % en la atrazina libre. Los microorganismos también mineralizaron la mayoría de la fracción menos disponible (> 70 %, extracto orgánico) que se redujo del 46 al 9 % en SA-HDTMA₁₀₀, del 30 al 10 % en SW-CAR₁₀₀ y del 39 al 9 % en la atrazina libre.

Aunque la cantidad total de ^{14}C -atrazina mineralizada fue similar para las diferentes formulaciones evaluadas (62-65 %), la mineralización de atrazina se produjo más lentamente en las muestras de suelo que contienen la formulación de liberación lenta SA-HDTMA₁₀₀ que la mineralización de la atrazina libre. Para el caso de SW-CAR₁₀₀, a pesar de que esta organoarcilla muestra gran afinidad por la atrazina (Figura 47), incluso superior a SA-HDTMA₁₀₀, la mineralización transcurre de forma similar que para la atrazina aplicada en forma libre, sin observarse un retraso como ocurre para SA-HDTMA₁₀₀. A través de la realización de sucesivas desorciones de atrazina de las formulaciones SA-HDTMA₁₀₀ y SW-CAR₁₀₀ usando diferentes disoluciones (Figura 49) se comprobó que, en el caso de SW-CAR₁₀₀, la desorción de atrazina se produce prácticamente al 100% en el primer paso de la desorción cuando ésta se lleva a cabo con NaOH 0.01M, debido probablemente a que el elevado pH de la disolución favorece la ruptura del enlace entre el grupo carboxilo y la

molécula de atrazina (Cruz-Guzmán et al., 2004). Si la desorción se realiza con MeOH, se observa que éste no es capaz de extraer toda la atrazina adsorbida y si se realiza con agua o con una solución de NaCl, las desorciones son prácticamente nulas. Este hecho sugiere que debido al elevado pH= 7.5 del suelo S4 se ha podido producir la desprotonación del grupo carboxilo de la carnitina perdiendo así sus propiedades adsorbentes por la atrazina y haciendo que ésta se libere al medio y se comporte de igual forma a como lo hace la atrazina aplicada en forma libre. Este fenómeno no se observa en el caso de SA-HDTMA₁₀₀ para el cual se produce una desorción progresiva con agua y con las disoluciones de NaCl y NaOH (Figura 49). Para MeOH, en el primer paso se desorbe toda la atrazina poniendo de manifiesto que todo el herbicida podría estar en una forma potencialmente disponible para ejercer su acción biológica.

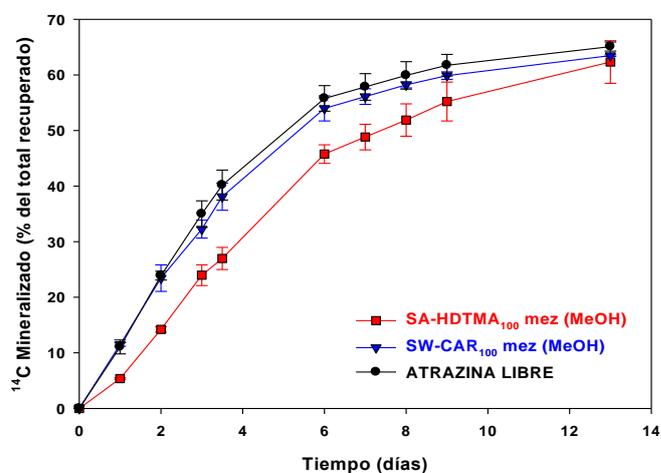


Figura 48. Mineralización de atrazina, en forma libre o como formulación de organoarcillas, en el suelo S4 por la bacteria *Pseudomonas* sp. Cepa ADP.

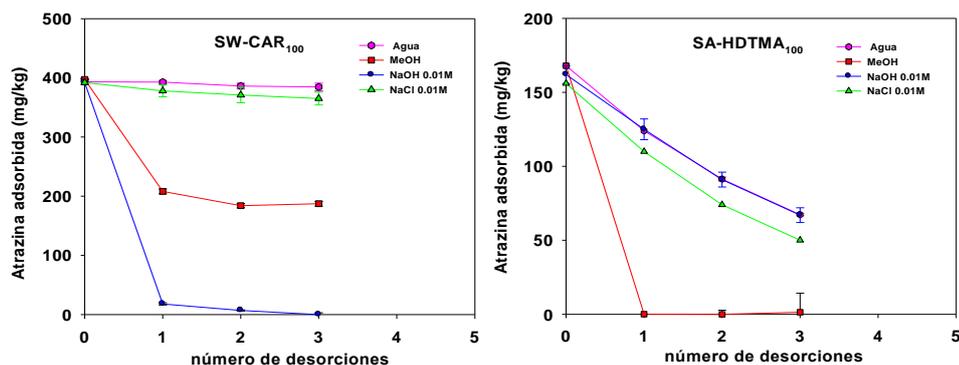


Figura 49. Desorción de atrazina a partir de SW-CAR₁₀₀ y SA-HDTMA₁₀₀ por diluciones sucesivas con diferentes extractantes.

En resumen, podemos concluir diciendo que tanto en el caso de las formulaciones seleccionadas como en la atrazina libre, el porcentaje total mineralizado de ^{14}C es el mismo, lo cual pone de manifiesto la disponibilidad del herbicida en las organoarcillas para ejercer su acción biológica. También se observa que el mecanismo de interacción entre el herbicida y la formulación influye en el comportamiento de la organoarcilla en el suelo, ya que en el caso de SA-HDTMA₁₀₀, la interacción entre las cadenas alquílicas de hexadeciltrimetilamonio y la atrazina es de tipo hidrofóbica y la que tiene lugar entre el grupo ácido de la carnitina y la atrazina es una interacción ácido-base (Figura 50). Según Laird (1996), la interacción con el N de la atrazina podría producirse a través de cualquiera de los 5 átomos de N de la molécula de herbicida a través de cualquiera de sus estructuras tautómeras. Al pH elevado del suelo S4, el complejo SW-CAR₁₀₀-atrazina se descompone liberando el herbicida inmediatamente en la disolución del suelo, haciéndolo disponible para su degradación, mientras que la liberación del herbicida a partir de SA-HDTMA₁₀₀ ocurre de forma progresiva, lo que ralentiza la mineralización del herbicida.

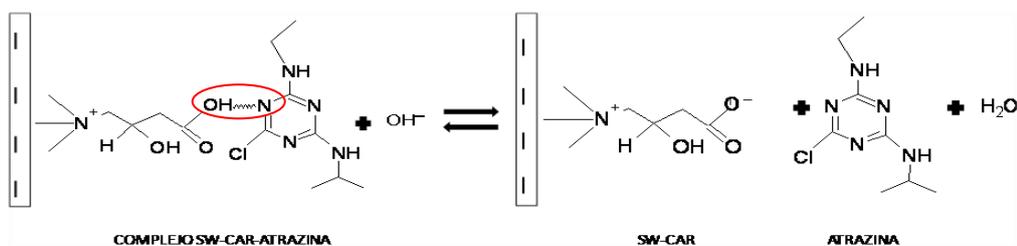


Figura 50. Posible mecanismo de descomposición del complejo SW-CAR₁₀₀-atrazina a elevados valores de pH.

4.7. EXPERIMENTOS DE LIXIVIACIÓN

Para la realización de los estudios de lixiviación de diurón, terbutilazina y MCPA se usaron formulaciones de organoarcillas seleccionadas. Dichas formulaciones y los productos comerciales de los herbicidas se aplicaron a la superficie de columnas de suelo previamente saturadas con agua y el proceso de lixiviación se siguió por aplicación diaria de 15 ml de agua destilada, recogida y análisis de los lixiviados. Los resultados de este estudio se muestran en las Figuras 51, 52, 54, 55, 57 y 58 correspondientes a los dos tipos de suelos (S1 y S2), en forma de perfil de elución en concentraciones de diurón, terbutilazina y MCPA en los lixiviados y como curvas de elución acumulativas.

La curva de elución relativa de **diurón** aplicado como producto comercial sobre el suelo S1 mostró un pico de concentración máxima del herbicida a aproximadamente 390 ml de agua, lo que equivale a 6.2 volúmenes de poro (Figura 51 izquierda, Tabla 28). Este pico aparece a 285 ml de agua añadida en el caso del suelo S2 (Figura 52 izquierda), lo cual equivale a 4.8 volúmenes de poro.

En los perfiles de elución para las formulaciones SW-HDTMA₁₀₀ ads, SA-HDTMA₁₀₀ ads, SW-ESPERM₁₀₀ ads y SW-ESPERM₁₀₀ mez (MeOH), se observa que, para los dos suelos, los picos de concentración máxima se encuentran desplazados hacia la derecha con respecto al producto comercial. En el suelo S1, dependiendo del tipo de formulación, se desplaza hasta los 465-675 ml, lo que equivale a 7.7-10.8 volúmenes de poro, respectivamente (Tabla 28). En el suelo S2, los picos de concentración máxima se desplazan a 450-600 ml, lo que equivale a 6.2-10.3 volúmenes de poro, respectivamente (Tabla 28). Esto pone de manifiesto que, para ambos suelos, la adsorción del herbicida a la organoarcilla retrasa la posición del máximo de la curva a mayores volúmenes de poro. El retraso más pronunciado se observó para SA-HDTMA₁₀₀ ads en ambos suelos, lo que se corresponde con la elevada capacidad de adsorción de la organoarcilla SA-HDTMA₁₀₀ y al perfil de liberación en agua de dicha formulación. Además del retraso en la posición del máximo, también se observa cómo para los dos suelos, en el caso de las formulaciones de organoarcilla las concentraciones de diurón en los lixiviados disminuyen con respecto al producto comercial, produciéndose un achatamiento de las curvas de elución. La concentración máxima que alcanza el producto libre es de 0.19 mg/l en el suelo S1 y 0.26 mg/l en el suelo S2 y ésta se reduce entre un 50% y un 65%, dependiendo del suelo y de la formulación (Tabla 18). De nuevo, el descenso más pronunciado se da para SA-HDTMA₁₀₀ ads, lo que está de acuerdo con los resultados obtenidos en las cinéticas de liberación en agua. En éstas, SA-HDTMA₁₀₀ ads y SW-ESPERM₁₀₀ ads son las formulaciones que daban lugar a menores concentraciones en disolución (Figura 42), es por ello que también dan lugar a menores concentraciones de herbicida en los lixiviados. Las concentraciones de

herbicida en los lixiviados dependen, además del tipo de suelo y de la organoarcilla considerada, de la forma de preparación de la formulación. Así, para el caso de SW-ESPERM₁₀₀ se observa, para ambos suelos, cómo la mayoría de los valores de concentración son menores para la formulación preparada por adsorción que para la preparada por mezcla. El complejo preparado por mezcla da lugar a concentraciones más elevadas de herbicida en los lixiviados debido posiblemente a que al contener un mayor porcentaje de herbicida, parte de éste no esté adsorbido y se encuentre más disponible para su lixiviación, tal y como se observó en las pruebas de liberación en agua (Figura 42).

Comparando la lixiviación del herbicida en los dos tipos de suelo, la que se da en el suelo S2 es por lo general más rápida que la que se da en el suelo S1. Esto es debido a la diferencia entre las texturas de cada suelo, más gruesa y con mayor volumen de macroporos en el caso del suelo S2 (Tabla 16, Figura 33), y a la menor capacidad de adsorción del suelo S2 en comparación con el S1, como puso de manifiesto el estudio de la adsorción-desorción de diurón a los suelos (Figura 40).

Tabla 28. Porcentaje de diurón lixiviado, extraído de las columnas y no recuperado durante el experimento de lixiviación con los suelos S1 y S2. Concentración máxima de herbicida en los lixiviados y volumen de poro al que apareció dicha concentración máxima (VP_{máx}).

DIURÓN						
	Suelo	Lixiviado (%)	Extraído (%)	No recuperado (%)	Concentración máxima de diurón (mg/l)	VP _{máx}
Comercial	S1	42 ± 5	14 ± 5	44	0.19 ± 0.02	6.2
	S2	52 ± 1	10 ± 1	38	0.26 ± 0.02	4.8
SW-HDTMA ₁₀₀ ads	S1	28 ± 3	27 ± 5	45	0.11 ± 0.02	9.4
	S2	24 ± 1	5 ± 3	71	0.11 ± 0.02	7.8
SW-ESPERM ₁₀₀ ads	S1	16 ± 8	20 ± 8	64	0.08 ± 0.02	7.7
	S2	22 ± 1	10 ± 2	68	0.09 ± 0.01	9.0
SW-ESPERM ₁₀₀ mez (MeOH)	S1	21 ± 3	25 ± 0	54	0.08 ± 0.01	9.6
	S2	24 ± 2	12 ± 3	64	0.10 ± 0.01	6.2
SA-HDTMA ₁₀₀ ads	S1	15 ± 4	25 ± 1	60	0.06 ± 0.01	10.8
	S2	11 ± 0	7 ± 5	82	0.07 ± 0.02	10.3

Las curvas de elución acumuladas de diurón (Figuras 51 y 52 derecha) representan la recuperación acumulativa de diurón en los lixiviados de las columnas de suelo. Se observa que, en el caso de las formulaciones preparadas por adsorción, el porcentaje total lixiviado está relacionado de forma inversa con la capacidad de adsorción medida para las organoarcillas, siendo para el suelo S1 de un 15 % para SA-HDTMA₁₀₀ ads, 16 % para SW-ESPERM₁₀₀ ads y 28 % en el caso de SW-HDTMA₁₀₀ ads (Tabla 28). En el suelo S2 estos porcentajes son de 11% para SA-HDTMA₁₀₀ ads, 22 % para SW-ESPERM₁₀₀ ads y 24 % para SW-HDTMA₁₀₀ ads. Para la formulación SW-ESPERM₁₀₀ mez

DIURÓN/SUELO 1

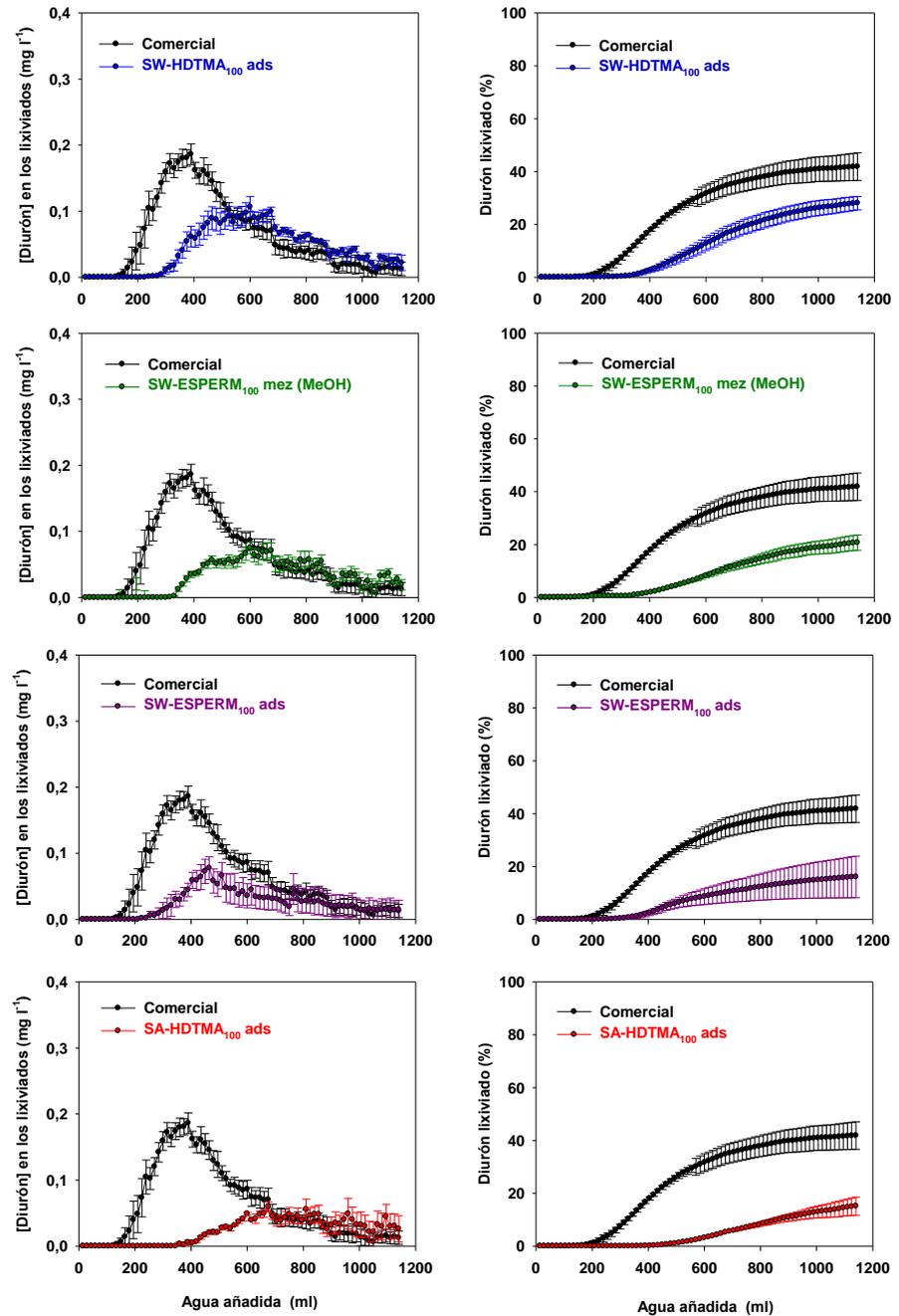


Figura 51. Curvas de elución relativas (izquierda) y acumuladas (derecha) para diurón aplicado a las columnas de suelo S1 como formulaciones de organoarcillas y como formulación comercial.

DIURÓN/SUELO 2

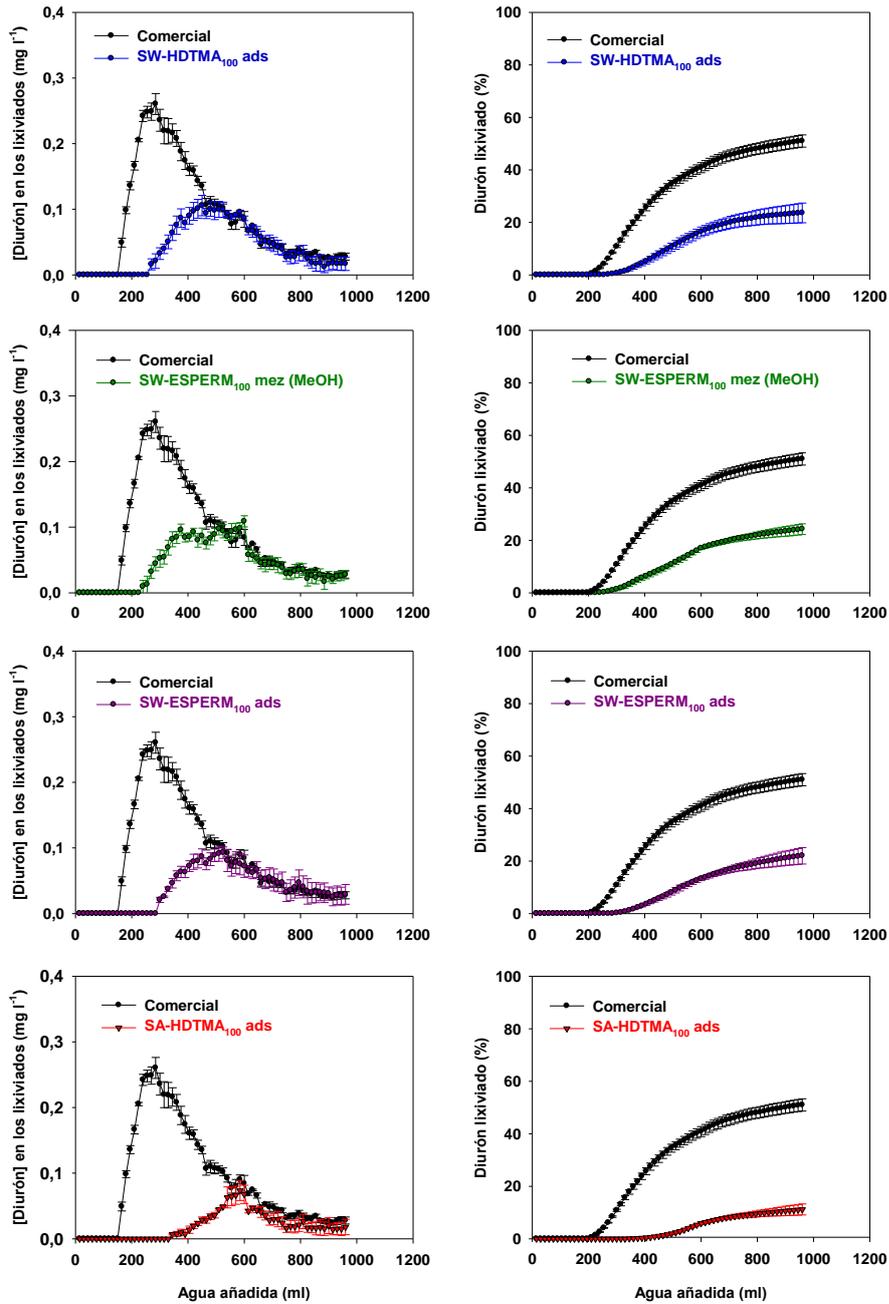


Figura 52. Curvas de elución relativas (izquierda) y acumuladas (derecha) para diurón aplicado a las columnas de suelo S2 como formulaciones de organoarcillas y como formulación comercial.

(MeOH), el porcentaje lixiviado es de 21 % en el suelo S1 y 24 % en el S2. Una mayor adsorción de diurón a la organoarcilla ha podido aumentar el tiempo de residencia del herbicida en la columna incrementando la degradación y disminuyendo las cantidades lixiviadas.

Tras los estudios de lixiviación se realizó la extracción del herbicida en el suelo con una disolución metanólica, obteniéndose la distribución de diurón que se muestra en la Figura 53. Las diferencias en los porcentajes de herbicida extraídos en el caso de las formulaciones con respecto al producto comercial puede deberse a que al ser más lenta la liberación del herbicida, en el caso de los complejos, éste no haya lixiviado aún, lo cual se pone de manifiesto al observar que la concentración de herbicida va aumentando con la profundidad. No obstante, un aumento del tiempo de residencia del herbicida en la columna también puede incrementar los procesos degradativos. Es importante destacar el mayor porcentaje de diurón extraído en el suelo S1 con respecto al S2 debido por una parte a una mayor retención del herbicida por el suelo S1 y por otra a la mayor persistencia del herbicida en dicho suelo (Figura 45). Se observa que a menor porcentaje lixiviado existe un mayor porcentaje de diurón no recuperado oscilando entre 60 % para SA-HDTMA₁₀₀ ads y 45 % para SW-HDTMA₁₀₀ ads en el suelo S1 y entre 80 % y 60 % en el S2 (Tabla 28). El porcentaje de diurón no recuperado (Tabla 28) puede encontrarse adsorbido de forma irreversible al suelo, puede que se haya degradado durante la lixiviación o puede que aún esté retenido en las formulaciones.

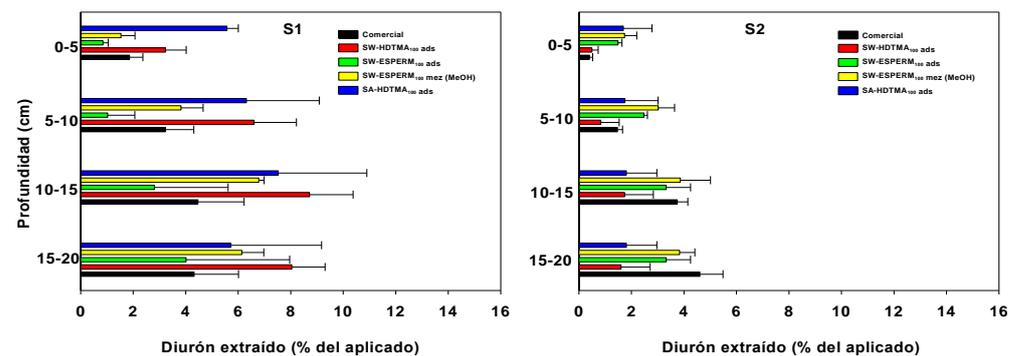


Figura 53. Gráficas de las extracciones de diurón de las columnas de suelo (S1 y S2) al finalizar el experimento de lixiviación.

En las Figuras 54 y 55, las curvas de elución relativa de **terbutilazina** correspondientes al producto comercial mostraron los picos de concentración máxima del herbicida a 285 ml de agua (4.6 volúmenes de poro) para el suelo S1 y 195 ml (3.2 volúmenes de poro) para el S2 (Tabla 29). La terbutilazina, por tanto, lixivía más rápido que

el diurón en los dos suelos. En el caso de los complejos SA-HDTMA₁₀₀ ads, SW-CAR₁₀₀ ads, SA-HDTMA₁₀₀ mez (MeOH) y SW-CAR₁₀₀ mez (Acetona) los picos de concentración máxima se encuentran también desplazados a la derecha con respecto al producto comercial, alcanzando valores de entre 330 y 405 ml en el suelo S1, equivalente a 5.1-6.3 volúmenes de poro, respectivamente. En el suelo S2, estos valores son de 240-375 ml, equivalente a 4.0-6.0 volúmenes de poro. Se observa que el retraso de la posición del máximo de la curva del herbicida soportado en las organoarcillas es menos pronunciado que en el caso de diurón, siendo más evidente en las formulaciones preparadas por adsorción y menos pronunciado en el caso de aquellas preparadas por mezcla. Esto se pone especialmente de manifiesto para SA-HDTMA₁₀₀, para la que, tanto el descenso en la concentración máxima como el desplazamiento en la posición de la misma, son más pronunciados para aquella formulación preparada por adsorción que para la preparada por mezcla.

Las curvas de elución de terbutilazina soportada en SW-CAR₁₀₀, por cualquiera de los dos métodos de preparación de la formulación (adsorción ó mezcla), muestran un comportamiento similar a las curvas de elución del producto comercial (Figuras 54 y 55 izquierda), lo que contrasta con la elevada capacidad de adsorción de SW-CAR₁₀₀ para terbutilazina. Este hecho es debido a que la terbutilazina se une a SW-CAR₁₀₀ por medio de un enlace ácido-base (Cruz-Guzmán et al., 2004; Celis et al., 2007) que en medio básico se rompe liberando el herbicida. Para los dos suelos seleccionados, debido al elevado pH de los mismos, se produce la desprotonación del grupo carboxilo de la carnitina perdiendo sus propiedades adsorbentes por la terbutilazina, que se libera rápidamente y lixivia de forma similar al producto comercial. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos en los estudios de biodisponibilidad de atrazina, ya que ambos herbicidas se comportan de forma similar al pertenecer los dos a la familia de las triazinas.

Para los dos suelos, las concentraciones de terbutilazina en los lixiviados son menores, excepto para SW-CAR₁₀₀ ads, en las formulaciones de organoarcillas respecto al producto comercial siendo de 0.36 y 0.60 mg/l para este último en los suelos S1 y S2, respectivamente. Estas concentraciones se reducen un 60 y 47 % para SA-HDTMA₁₀₀ ads y SA-HDTMA₁₀₀ mez MeOH respectivamente en el suelo S1 y un 67 y 33 % en el suelo S2.

Las Figuras 54 y 55 a la derecha muestran la recuperación acumulativa de terbutilazina de los lixiviados de las columnas de suelo. Se puede observar cómo la formulación preparada por adsorción (SA-HDTMA₁₀₀ ads) es la que presenta un porcentaje de lixiviación menor, 24% para el suelo S1 y 51% para el S2 (Tabla 29). Este hecho no se observa para SW-CAR₁₀₀ ads debido al fenómeno comentado anteriormente de

descomposición del complejo al elevado pH de los suelos. Tanto para esta formulación como para SW-CAR₁₀₀ mez (Acetona), el porcentaje de terbutilazina recuperado es incluso

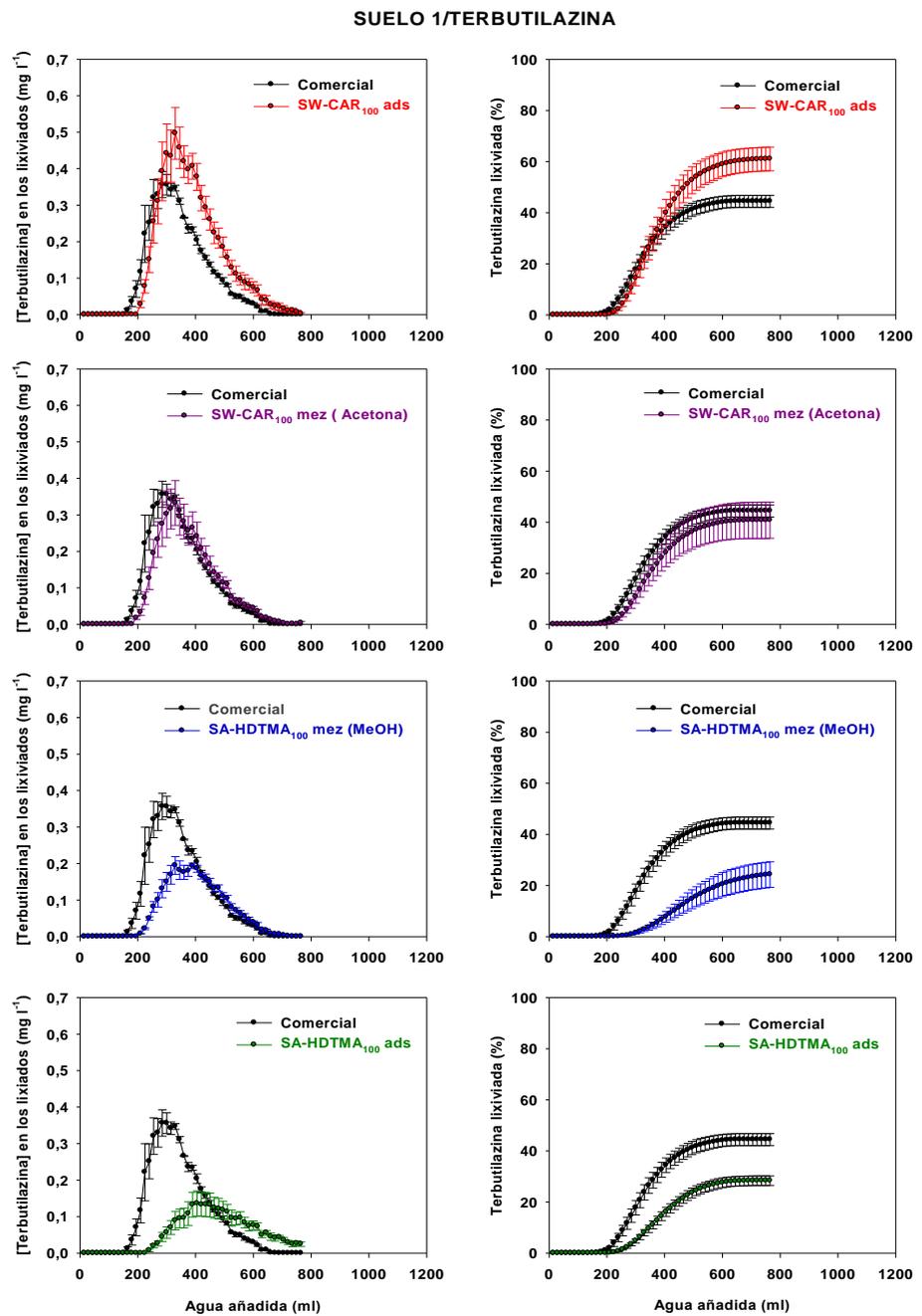


Figura 54. Curvas de elución relativas (izquierda) y acumuladas (derecha) para terbutilazina aplicada a las columnas de suelo S1 como formulaciones de organoarcillas y como formulación comercial.

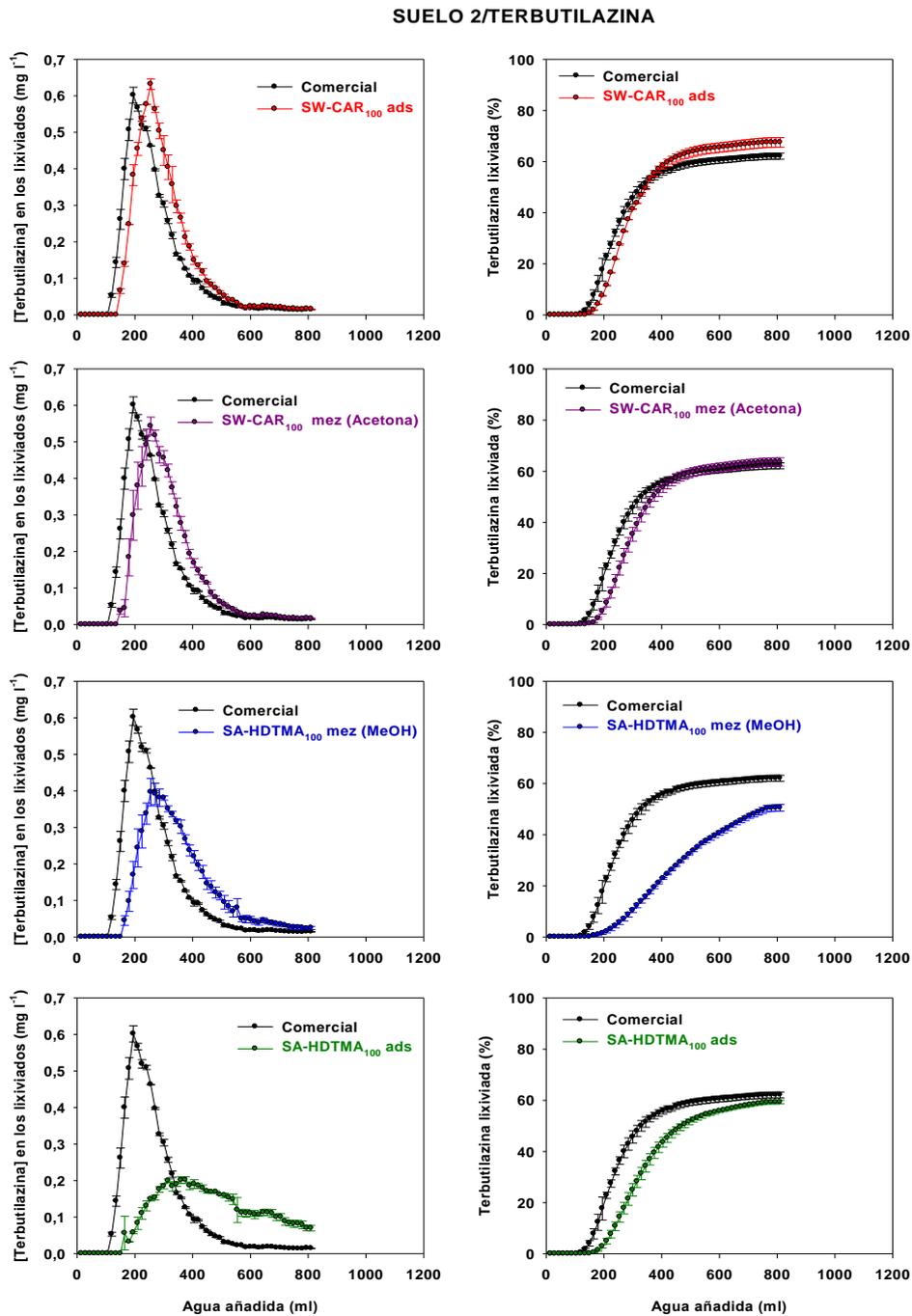


Figura 55. Curvas de elución relativas (izquierda) y acumuladas (derecha) para terbutilazina aplicada a las columnas de suelo S2 como formulaciones de organoarcillas y como formulación comercial.

superior al esperado, debido a la consideración de una cantidad de herbicida adsorbida en la organoarcilla estimada por extracción con metanol incluso inferior a la liberable en medio básico (Figuras 54 y 55).

Tabla 29. Porcentaje de terbutilazina lixiviada, extraída de las columnas y no recuperada durante el experimento de lixiviación con los suelos S1 y S2. Concentración máxima de herbicida en los lixiviados y volumen de poro al que apareció dicha concentración máxima ($VP_{m\acute{a}x}$).

TERBUTILAZINA						
	Suelo	Lixiviado (%)	Extraído (%)	No recuperado (%)	Concentración máxima de terbutilazina (mg/l)	$VP_{m\acute{a}x}$
Comercial	S1	44 ± 2	30 ± 10	26	0.36 ± 0.04	4.6
	S2	62 ± 1	19 ± 0	19	0.60 ± 0.02	3.2
SW-CAR ₁₀₀ ads	S1	61 ± 5	13 ± 0	26	0.46 ± 0.06	5.4
	S2	67 ± 2	31 ± 6	2	0.63 ± 0.01	4.2
SW-CAR ₁₀₀ mez (Acetona)	S1	41 ± 7	6 ± 0	53	0.33 ± 0.06	5.1
	S2	64 ± 2	30 ± 11	6	0.54 ± 0.03	4.0
SA-HDTMA ₁₀₀ ads	S1	24 ± 5	23 ± 5	53	0.14 ± 0.03	6.3
	S2	51 ± 1	22 ± 0	27	0.20 ± 0.01	6.0
SA-HDTMA ₁₀₀ mez (MeOH)	S1	28 ± 2	6 ± 0	66	0.19 ± 0.01	5.2
	S2	59 ± 1	6 ± 2	35	0.40 ± 0.04	4.3

Después de realizar los estudios de lixiviación se realizó la extracción del herbicida biodisponible en el suelo con una disolución metanólica, obteniéndose la distribución de terbutilazina que se muestra en la Figura 56. Los perfiles de distribución para ambos suelos son muy similares, a excepción de SW-CAR₁₀₀ (ads y mez), para los que, no obstante, existe una elevada varianza en los resultados de extracción.

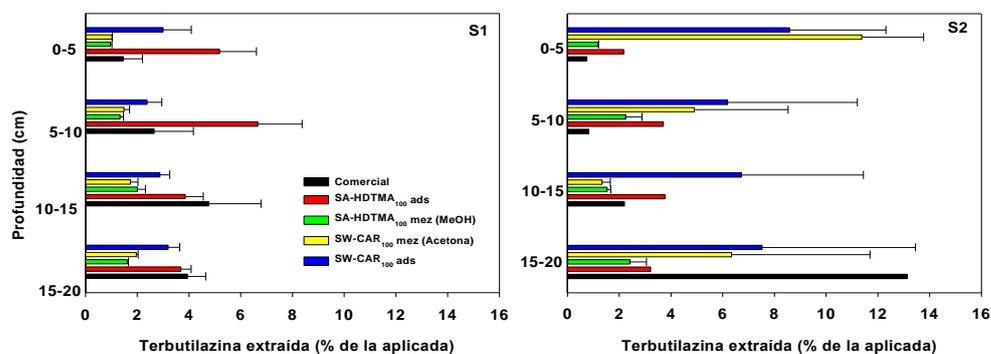


Figura 56. Gráficas de las extracciones de terbutilazina de las columnas de suelo (S1 y S2) al finalizar el experimento de lixiviación.

En las Figuras 57 y 58, las curvas de elución relativas de **MCPA** para la formulación comercial convencional en ambos suelos presentan los picos de concentración máxima del herbicida a 75 ml, es decir, muy próximos a 1 volumen de poro. Este hecho indica que existe una mínima adsorción de MCPA tanto al suelo S1 como al S2. Sin embargo, para el caso de los complejos SA-HDTMA₁₀₀ ads (200 ppm) y SA-HEXADIM₁₀₀ mez (MeOH), se observa una forma más ancha de los picos, además de presentarse desplazados hacia la derecha, encontrándose el pico de más alta concentración oscilando entre 90-105 ml de agua añadida lo cual equivale a 1.3-1.6 volúmenes de poro. Se observa que, para MCPA, tanto los valores de los volúmenes de poro a los que se encuentra el pico de concentración máxima como la variación de éstos en las formulaciones de organoarcilla con respecto al producto comercial, son pequeños al compararlos con diurón y terbutilazina. Este hecho se debe a su escasa adsorción al suelo y a su rápida degradación. Es interesante señalar que la concentración de MCPA en los lixiviados correspondientes a los complejos disminuye con respecto al producto comercial y que este descenso está relacionado directamente con las capacidades de adsorción de las organoarcillas para MCPA, siendo más pronunciado para SA-HDTMA₁₀₀ y menos para SA-HEXADIM₁₀₀, sobre todo con el suelo S2. La concentración que alcanza el producto libre en el suelo S1 es de 2.55 mg/l y 3.47 mg/l en el S2, y ésta se reduce aproximadamente un 50% para el caso del suelo S1 al ser añadido en forma de formulación y hasta un 78% en el caso del suelo S2, lo cual se refleja en la curva de recuperación acumulativa donde el porcentaje total lixiviado es de sólo el 16% (Tabla 30). Esto es debido a la elevada adsorción de MCPA a SA-HDTMA₁₀₀, lo que provoca que la liberación del herbicida se produzca muy lentamente, dando tiempo para degradarse durante su movimiento lento a través de la columna.

Tabla 30. Porcentaje de MCPA lixiviado, extraído de las columnas y no recuperado durante el experimento de lixiviación con los suelos S1 y S2. Concentración máxima de herbicida en los lixiviados y volumen de poro al que apareció dicha concentración máxima ($VP_{\text{máx}}$).

MCPA						
	Suelo	Lixiviado (%)	Extraído (%)	No recuperado (%)	Concentración máxima de MCPA (mg/l)	$VP_{\text{máx}}$
Comercial	S1	77 ± 9	0	23	2.55 ± 0.04	1.0
	S2	80 ± 12	0	20	3.47 ± 0.27	1.1
SA-HDTMA₁₀₀ ads (200ppm)	S1	56 ± 8	0	44	1.40 ± 0.28	1.5
	S2	16 ± 2	0	84	0.76 ± 0.09	1.6
SA-HEXADIM₁₀₀ mez (MeOH)	S1	52 ± 13	0	48	1.24 ± 0.45	1.4
	S2	90 ± 4	0	10	3.19 ± 0.24	1.3

Comparando la forma de las curvas de lixiviación en los dos suelos, la correspondiente al suelo S2 es menos achatada que la del suelo S1, lo cual indica una lixiviación más rápida del herbicida debido a la menor capacidad de adsorción del suelo S2 con respecto al S1, y a su textura más gruesa.

SUELO S1/MCPA

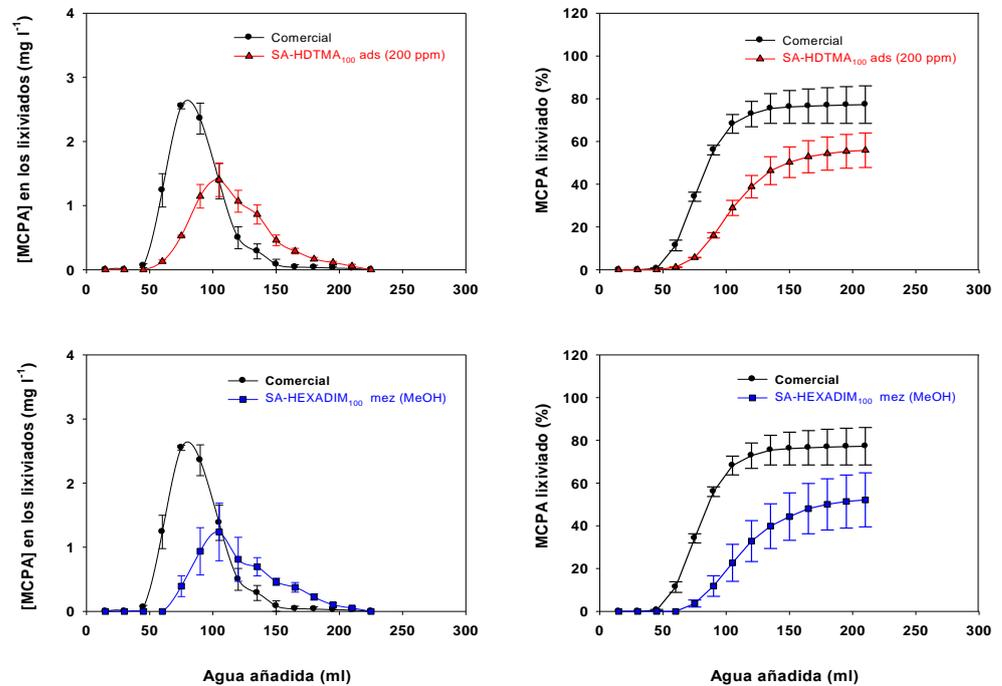


Figura 57. Curvas de elución relativas (izquierda) y acumuladas (derecha) para MCPA aplicado a las columnas de suelo S1 como formulaciones de organoarcillas y como formulación comercial.

El hecho de que no se encontraran residuos de MCPA en las extracciones de las columnas al final del experimento de lixiviación (Tabla 30) se debe a la escasa persistencia del herbicida en los dos suelos. Así, los tiempos de vida media de MCPA oscilan entre los 12 días para el suelo S1 y los 14-16 para el S2 (Tabla 27), lo cual está dentro del orden de duración del experimento de lixiviación.

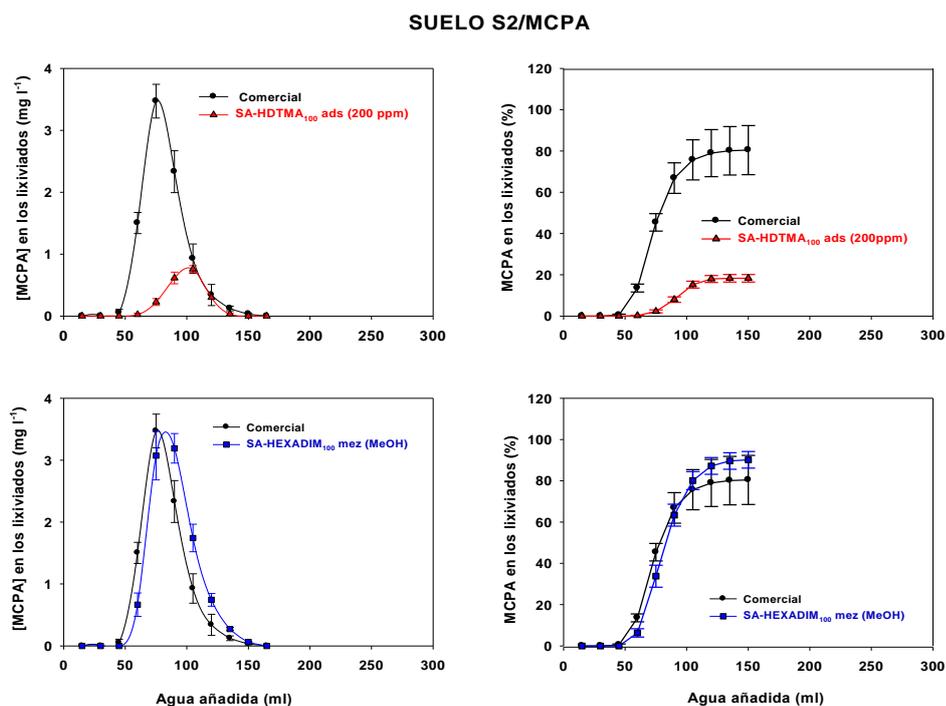


Figura 58. Curvas de elución relativas (izquierda) y acumuladas (derecha) para MCPA aplicado a las columnas de suelo S2 como formulaciones de organoarcillas y como formulación comercial

En definitiva, los resultados de lixiviación muestran cómo el uso de formulaciones de organoarcilla reduce las concentraciones de diurón, terbutilazina y MCPA en los lixiviados y desplaza el máximo de concentración hacia mayores volúmenes de agua añadida, reduciendo también la cantidad total lixiviada respecto al uso de las formulaciones comerciales convencionales usadas como referencia. Esto pone de manifiesto la habilidad de las organoarcillas para disminuir concentraciones elevadas de herbicida en el medio, evitando su arrastre y percolación a lo largo del perfil del suelo cuando estas altas concentraciones van asociadas a lluvias que ocurren poco después de la aplicación del herbicida. El perfil de lixiviación depende, además del tipo de suelo, tanto de la naturaleza de la organoarcilla en la que se soporta el herbicida como de la forma de preparación de la formulación, lo que ofrece la posibilidad de controlar ambas variables con el objeto de alcanzar un patrón de lixiviación deseado.

4.8. BIOENSAYOS

4.8.1. BIOENSAYO GENERAL

La acción herbicida de diurón, terbutilazina y MCPA se ensayó en el laboratorio para formulaciones de liberación controlada basadas en organoarcillas seleccionadas para cada herbicida, usando semillas de berro (*Lepidum sativum*) sembradas en los suelos S1 y S2. Inmediatamente después de sembrar las semillas de berro, es decir en preemergencia, se aplicaron los herbicidas tanto en forma de formulación comercial libre como de formulaciones basadas en organoarcilla. Para el caso de MCPA, debido a que puede tener efectos pre- y postemergentes, éste se aplicó también después de dejar germinar las semillas con el fin de comparar la efectividad biológica de las dos formas de aplicación. Esta eficacia se determinó tanto por medidas de reducción del peso herbáceo fresco respecto a macetas control sin herbicida (Figura 59) como por evaluación visual del estado de las plantas de berro a lo largo del bioensayo (Figuras 60, 61 y 62).

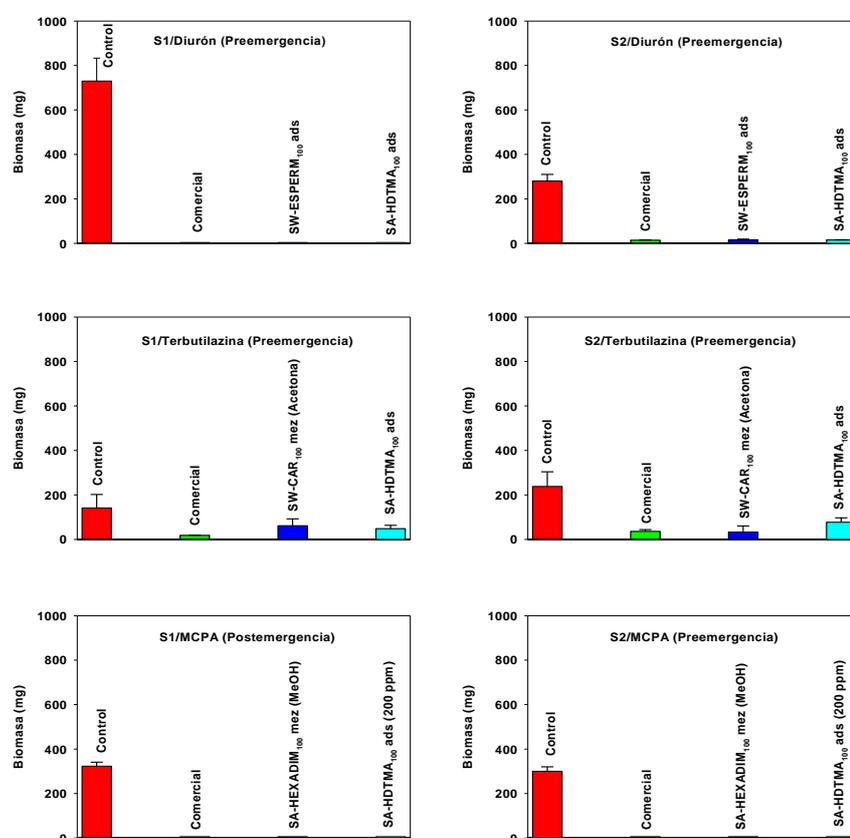


Figura 59. Peso herbáceo fresco de las macetas dos semanas después de la aplicación del herbicida.

Los bioensayos realizados con diurón y terbutilazina en forma de formulaciones basadas en las organoarcillas seleccionadas mostraron una elevada inhibición del crecimiento de las plantas tras la aplicación del herbicida en preemergencia y a una dosis de 2 kg/ha, al ser comparados con el crecimiento de las plantas en las macetas sin herbicida. Las Figuras 60 y 61 muestran el estado de las plantas dos semanas después de la siembra-aplicación del herbicida para las distintas formulaciones, que es similar al observado para las macetas tratadas con la formulación comercial del herbicida.

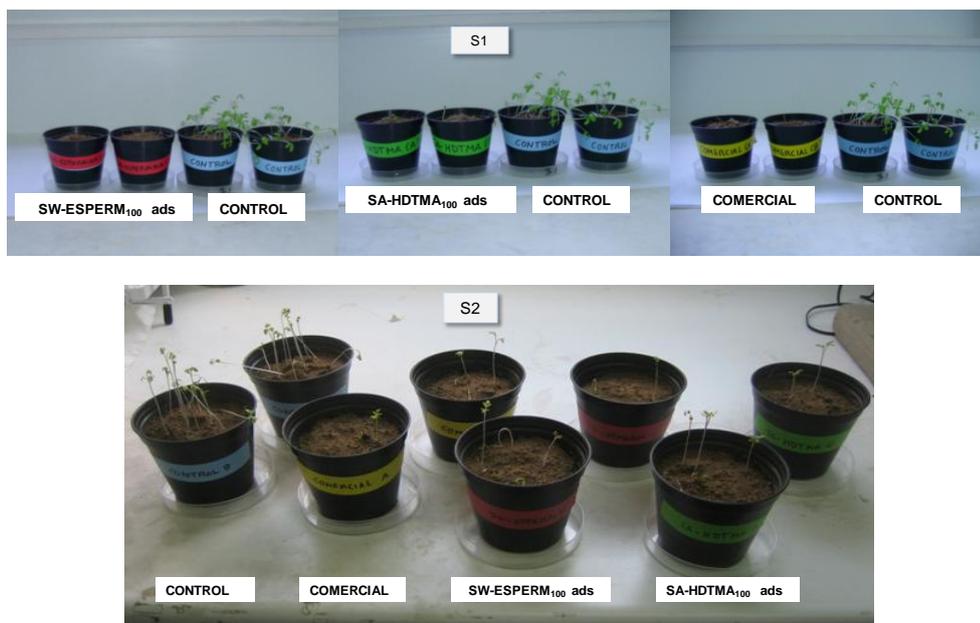


Figura 60. Resultados de los bioensayos realizados en los suelos S1 y S2 con Berro (*Lepidum sativum*). Efectos de adición de **diurón** en forma de producto comercial libre y en forma de complejos con organoarcillas.

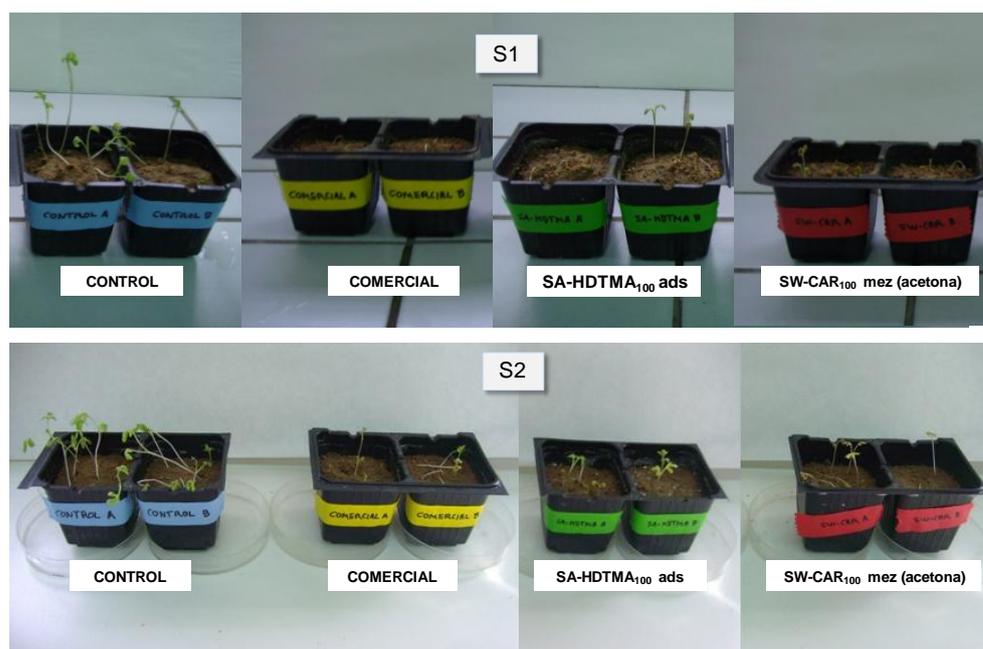


Figura 61. Resultados de los bioensayos realizados en los suelos S1 y S2 con Berro (*Lepidum sativum*). Efectos de adición de **terbutilazina** en forma de producto comercial libre y en forma de complejos con organoarcillas.

Los ensayos correspondientes a la aplicación de MCPA a las macetas con suelo S2 sembradas con berro en forma de organoarcillas y como producto comercial en preemergencia, también a 2 kg/ha, muestran cómo este herbicida impide que las semillas de berro lleguen a germinar, con una inhibición próxima al 100% (Figura 62, abajo). Comparando estos resultados con los obtenidos tras aplicar el herbicida en postemergencia, dos semanas después de la siembra, usando suelo S1, se observa que la mortalidad de las plantas es alta y similar para todos los tratamientos (Figura 62, arriba). Por tanto, se comprueba, en todos los casos, que las formulaciones de liberación lenta de MCPA tienen una eficacia en su acción herbicida comparable a la del MCPA libre tanto en preemergencia como en postemergencia.

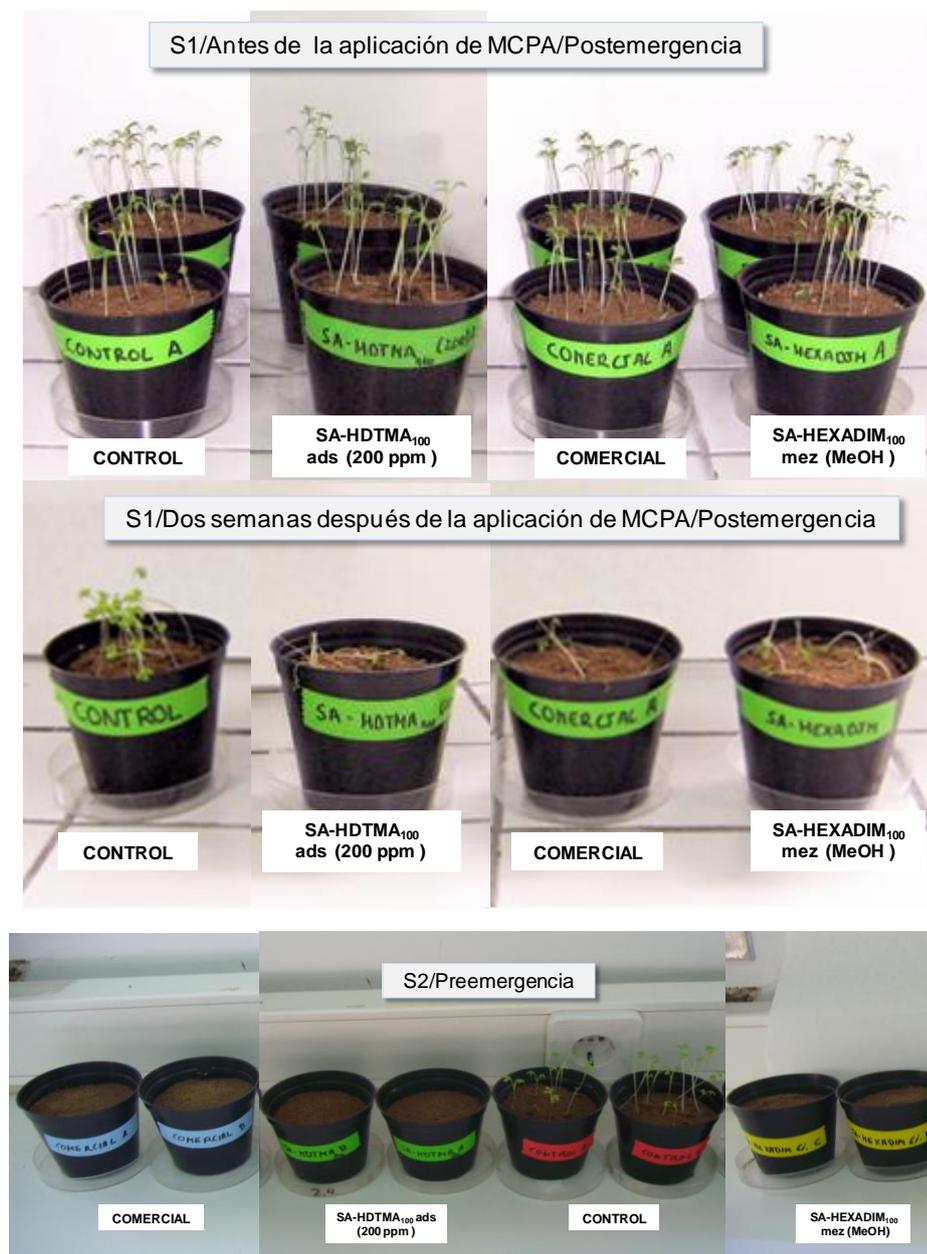


Figura 62. Resultados de los bioensayos realizados, en el suelo S1 en postemergencia y en el S2 en preemergencia, con Berro (*Lepidum sativum*). Efectos de adición de MCPA en forma de producto comercial libre y en forma de complejos con organoarcillas.

4.8.2. BIOENSAYOS CON SIMULACIÓN DE ALTO RIESGO DE LIXIVIACIÓN

En el caso de MCPA se llevó a cabo un ensayo en condiciones de aporte de agua abundante (60 l/m^2) en el que se añadieron 300 ml de agua justo después de la aplicación del herbicida a los suelos S1 y S2 a una dosis de 2 kg/ha, bien como formulación comercial convencional o en forma de formulación con la organoarcilla SA-HDTMA₁₀₀ ads (200 ppm), después de lo cual se sembraron las semillas de berro y se comprobó la efectividad biológica de las formulaciones.

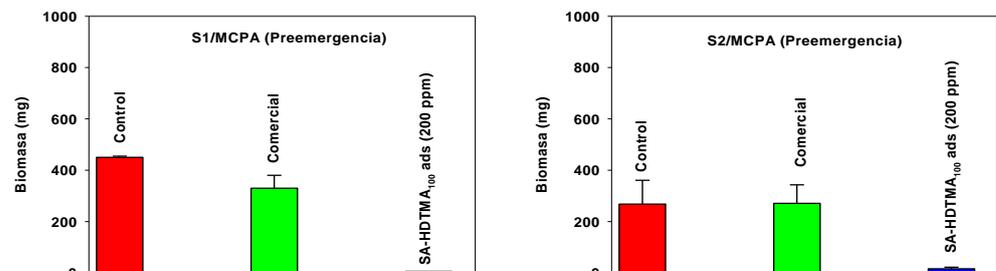


Figura 63. Peso herbáceo fresco de las macetas en el bioensayo con simulación de lluvia abundante tras la aplicación del herbicida MCPA.

Al analizar los lixiviados de las macetas tras la aplicación de los 300 ml de agua, se observó que > 90% del producto comercial se había perdido por lixiviación en los dos suelos, mientras que en el caso de la formulación SA-HDTMA₁₀₀ ads (200 ppm) se había perdido sólo entre un 60 y un 75% del herbicida, dependiendo del suelo considerado. El resto de herbicida que permanece en la maceta fue suficiente para el control de las semillas de berro, lo que contrasta con la pérdida total de eficacia observada en las macetas tratadas con el producto comercial (Figuras 63 y 64). La Figura 63 muestra el peso herbáceo de las macetas dos semanas después de la siembra, observándose cómo las pérdidas por lixiviación del herbicida comercial anulan su eficacia al ser comparado con las macetas control. Sin embargo, en el caso de la formulación de liberación controlada de MCPA, parte del herbicida permanece en la maceta reduciéndose las pérdidas por lixiviación y siendo la cantidad remanente eficaz en el control del berro. La relevancia de este resultado radica en que en una situación real similar a la simulada en este experimento, la lluvia poco después de la aplicación del herbicida hubiera obligado a una segunda aplicación de herbicida comercial, mientras que con el uso de la formulación SA-HDTMA₁₀₀ ads (200 ppm) se protege al herbicida de la lixiviación permaneciendo una gran parte de éste en el suelo después del episodio de lluvia intensa y manteniéndose un control adecuado de las malas hierbas.

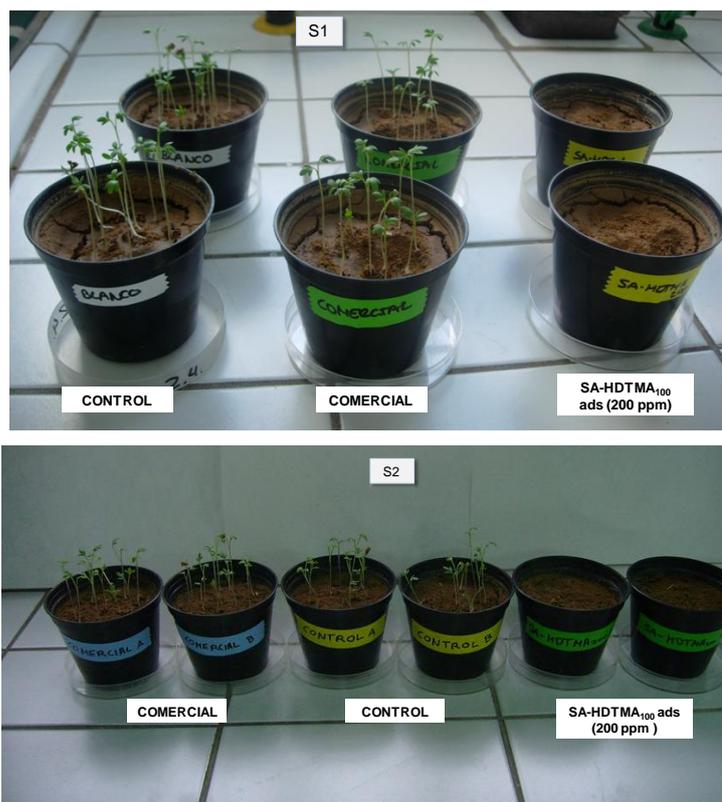


Figura 64. Resultados de los bioensayos realizados en los suelos S1 y S2 con Berro (*Lepidum sativum*) en condiciones de elevado aporte de agua poco después de la aplicación del herbicida MCPA. Efectos de adición de MCPA en forma de producto comercial libre y en forma de complejo con la organoarcilla SA-HDTMA₁₀₀ ads (200ppm).

Todos estos resultados sugieren que los complejos preparados pueden ser aplicados a dosis recomendadas para el uso de diurón, terbutilazina y MCPA, reduciendo la lixiviación del herbicida a través del perfil de suelo y manteniendo una eficacia en el control de malas hierbas que puede ser incluso superior a la del herbicida libre, si se producen episodios de abundantes lluvias poco después de la aplicación del herbicida.

4.9. EXPERIMENTO DE CAMPO

Con el fin de comparar la magnitud de los procesos de transporte por lixiviación y escorrentía y la bioeficacia de las formulaciones en condiciones reales de campo, se seleccionó una de las formulaciones de liberación lenta del herbicida diurón y se comparó con la formulación comercial convencional del herbicida. Antes de la aplicación del herbicida se realizó una toma de muestra del suelo de cada una de las dos parcelas en las que se realizó el experimento, en tres puntos de las mismas y a cuatro profundidades. El contenido de diurón en éstas se determinó mediante una extracción de 5 g de suelo con 10 ml de metanol y se analizó por HPLC, dando como resultado que no existían residuos de diurón en las parcelas antes de comenzar el experimento. Tras la aplicación del herbicida, bien como producto comercial o como formulación SW-ESPERM₁₀₀ mez (MeOH), se tomaron muestras de suelo, a diferentes profundidades y a tiempos que fueron seleccionados en función de las precipitaciones ocurridas, las cuales se congelaron para su posterior extracción y análisis.

En la Figura 65 se aportan datos de temperatura y precipitaciones ocurridas en el transcurso del experimento y en la Figura 66 se representa la concentración de diurón en mg kg⁻¹, aplicado como producto comercial (izquierda) o como formulación de la organoarcilla SW-ESPERM₁₀₀ mez (MeOH) (derecha), extraída de las muestras de suelo tomadas a distintos tiempos después de la aplicación del herbicida y a diferentes profundidades. Se observa una mayor variabilidad en los datos correspondientes al suelo tratado con la formulación SW-ESPERM₁₀₀ mez (MeOH), debido probablemente a la heterogeneidad en la distribución de la formulación. Para ambos casos las cantidades más altas corresponden a los primeros centímetros de suelo, lo cual es coherente con la baja movilidad de diurón observada en los ensayos de lixiviación en el laboratorio.

Comparando ambas formulaciones, la concentración de diurón en cada una de las tomas de muestra es superior en el caso de la formulación de organoarcilla que en la formulación del producto comercial debido a que el diurón en forma libre se mueve más rápido que el liberado de la organoarcilla y también porque la degradación del herbicida es más rápida en el producto comercial. Este último hecho se pone de manifiesto en la Figura 67 donde se representa la concentración del metabolito de diurón 1-(3,4-diclorofenil)-3-metilurea (DCPMU) en las parcelas tratadas con la formulación comercial (izquierda) y con la formulación de liberación lenta (derecha) a distintos días desde la aplicación del herbicida y a distintas profundidades. A los 20 días del comienzo del experimento se observa la presencia de este metabolito en ambas muestras. Para la formulación comercial, la concentración del metabolito con el paso del tiempo disminuye, ya que éste es sólo un intermedio en el proceso de degradación del diurón. Sin embargo, para la formulación de la

organoarcilla, al producirse una liberación lenta del herbicida, su degradación también es paulatina con el tiempo y la concentración de DCPMU aumenta hasta el día 68. Al comparar los tiempos de vida media de diurón obtenidos en los experimentos de incubación realizados en el laboratorio en los suelos S1 y S2 con los tiempos de vida media obtenidos en los experimentos de campo se observa que estos últimos son comparables (entre 20 y 40 días para el producto comercial y más de 70 días para la formulación SW-ESPERM₁₀₀) con los obtenidos en el laboratorio (entre 36 y 50 días dependiendo del tipo de suelo y de formulación). No obstante, hay que considerar que debido a la época en la que se realizó el experimento de campo las temperaturas promedio fueron inferiores ($T_{\text{máx}}=15.2\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $T_{\text{mín}}=4.8\text{ }^{\circ}\text{C}$) (Figura 65) a las del laboratorio (20°C), lo cual pudo influir en el retraso en la degradación del herbicida.

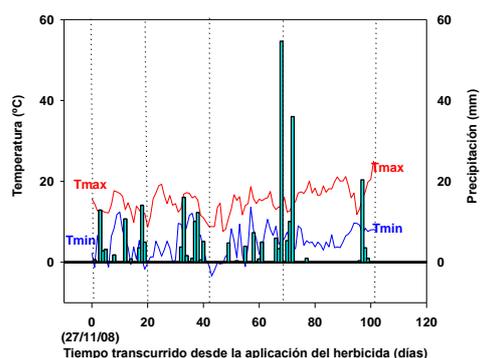


Figura 65. Datos de pluviometría y temperatura medidos durante el tiempo que duró el experimento de campo. Las líneas verticales discontinuas corresponden a los días de toma de muestra de suelo.

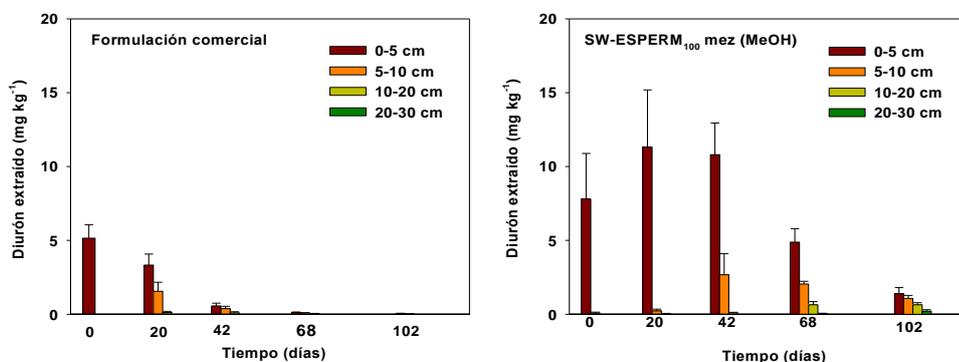


Figura 66. Concentración de diurón (mg kg^{-1}) en las parcelas tratadas con la formulación comercial (izquierda) y con la formulación SW-ESPERM₁₀₀ mez (MeOH) (derecha) a distintas profundidades y a distintos días desde la aplicación del herbicida durante el experimento de campo.

A medida que transcurre el tiempo, va disminuyendo la concentración de diurón en el horizonte superior (0-5 cm) y aumenta en los horizontes más profundos, coincidiendo con episodios de lluvia intensos, siendo prácticamente inexistente en el perfil más inferior (20-30 cm) (Figura 66). Este hecho es más pronunciado en el caso de la formulación comercial de diurón donde a los 20 días del comienzo del experimento existe un 30 % del total de diurón extraído a una profundidad de 5-10 cm, mientras que en caso de la formulación SW-ESPERM₁₀₀ mez (MeOH) el porcentaje a esta profundidad representa sólo un 2% del total. Situaciones similares se observan en los días 42 y 68 en los que el porcentaje de diurón a la profundidad de 5-10 cm representa respectivamente el 36 y 35 % del total extraído para la formulación comercial, mientras que para la formulación de organoarcilla el porcentaje de diurón a dicha profundidad representa sólo el 20 y 27 %, respectivamente. Estos resultados ponen de manifiesto que la fracción de diurón extraíble se mueve más lentamente cuando el herbicida es aplicado como complejo soportado en organoarcilla que como formulación comercial convencional.

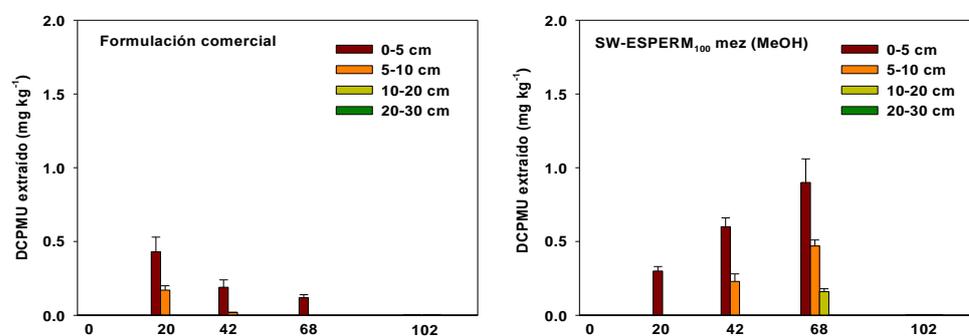


Figura 67. Concentración de DCPMU (mg kg⁻¹) en las parcelas tratadas con la formulación comercial (izquierda) y con la formulación SW-ESPERM₁₀₀ mez (MeOH) (derecha) a distintos días y a distintas profundidades desde la aplicación del herbicida durante el experimento de campo.

Durante el tiempo que duró el experimento también se realizó un seguimiento del volumen y de la concentración de diurón en las aguas de escorrentía. En la Tabla 31 se muestran los valores del volumen de agua recogido en los días de toma de muestra y la concentración de diurón encontrada, tanto en disolución como asociada a las partículas en suspensión.

Tabla 31. Volumen de agua de escorrentía y concentración de diurón encontrada en disolución y en las partículas en suspensión.

	Tiempo desde la aplicación (días)	agua recogida (litros)	[diurón] en aguas escorrentía (mg l ⁻¹)	[diurón] en partículas en suspensión (mg kg ⁻¹)
Comercial	8	0.079	0	0
SW-ESPERM ₁₀₀	8	0.067	0	0
Comercial	22	0	0	0
SW-ESPERM ₁₀₀	22	0	0	0
Comercial	42	0	0	0
SW-ESPERM ₁₀₀	42	0	0	0
Comercial	68	6.5	0	0
SW-ESPERM ₁₀₀	68	10.5	0.048 ± 0.002	0.033
Comercial	84	42	0.024 ± 0.000	0
SW-ESPERM ₁₀₀	84	39	0.064 ± 0.001	0.031

Después de un episodio de lluvia intensa ocurrido el día 67, se observa que el volumen del agua de escorrentía recogida es de 6.5 y 10.5 litros para la formulación comercial y la de organoarcilla, respectivamente. Se detecta una concentración de diurón de 0.048 mg/l en el caso de la formulación de organoarcilla, lo cual está de acuerdo con el hecho de que el diurón se libera más lentamente cuando el herbicida es aplicado como complejo de organoarcilla que como formulación comercial convencional. Este hecho se repite de forma más pronunciada en el día 84 donde el volumen de agua de escorrentía fue de 42 litros para la formulación comercial y 39 para SW-ESPERM₁₀₀ mez (MeOH). Tras estos episodios de intensas lluvias, se detectaron concentraciones de diurón para los dos tipos de formulaciones aunque esta cantidad es más alta en el caso del complejo de la organoarcilla, lo cual está de acuerdo con los resultados de las extracciones de muestras de suelo obtenidos para el día 68. Este proceso de escorrentía resta eficacia al herbicida y origina su presencia en lugares no deseados, con los consiguientes problemas medioambientales. Este hecho podría considerarse como un aspecto negativo, ya que al ser la persistencia de diurón mayor en el caso de SW-ESPERM₁₀₀ mez (MeOH), también es mayor el riesgo de contaminación por procesos de lixiviación y escorrentía cuando estos procesos se producen a tiempos prolongados tras la aplicación del herbicida. Pero es posible que después de los episodios intensos de lluvia que tuvieron lugar, en la práctica probablemente hubiese sido necesario repetir la aplicación del herbicida como formulación comercial, en cuyo caso se hubieran obtenido concentraciones superiores de diurón como

producto comercial que como formulación de organoarcilla. Por otra parte, cabe esperar que si estos episodios de escorrentía se hubiesen producido poco después de la aplicación del herbicida, habrían sido mucho más importantes y habrían afectado en mayor medida a la formulación comercial.

Al finalizar el experimento se evaluó la bioeficacia de la aplicación de las formulaciones de diurón comparando la biomasa obtenida de las parcelas tratadas con el herbicida con la de una parcela donde no se había aplicado el herbicida. En la Figura 68 (recuadro rojo) se muestra la biomasa seleccionada correspondiente a un cuarto de una de las cuatro secciones en las que se dividió la parcela, despreciando los 5 cm de los bordes de la misma. La Figura 69 representa el peso herbáceo por metro cuadrado de las parcelas tratadas con la formulación comercial de diurón, la formulación de liberación lenta SW-ESPERM₁₀₀ mez (MeOH) y la parcela sin tratar. Los resultados muestran que la formulación de liberación lenta de diurón tiene una eficacia en su acción herbicida comparable a la del diurón libre.



Figura 68. Parcelas completas (arriba) y ampliación de un cuarto de las mismas (abajo) sin tratar (control) y tratadas con diurón como formulación comercial convencional y como formulación basada en la organoarcilla SW-ESPERM₁₀₀. El recuadro rojo indica el área de la parcela seleccionada para cuantificar la biomasa.

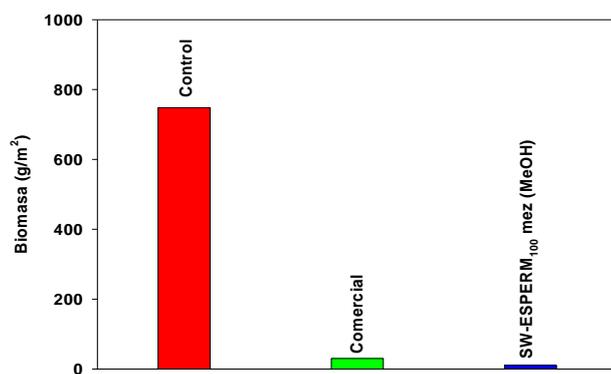


Figura 69. Peso herbáceo fresco por metro cuadrado en las parcelas al finalizar el experimento de campo.



5. Conclusiones



Los resultados obtenidos a lo largo del desarrollo del presente trabajo nos permiten establecer las siguientes conclusiones:

1. La caracterización de las organoarcillas preparadas en este trabajo confirman que los cationes orgánicos polares pequeños y monovalentes, como la carnitina y la tiramina, presentan una cierta resistencia a reaccionar con las esmectitas comparado con cationes orgánicos grandes y/o polivalentes. Dicha resistencia es más pronunciada cuando el catión inorgánico original a reemplazar presente en el mineral de la arcilla es divalente (Ca^{2+}) en vez de monovalente (Na^+).
2. Los estudios de adsorción-desorción de los herbicidas diurón, terbutilazina y MCPA a las montmorillonitas modificadas muestran que la modificación con determinados cationes inorgánicos u orgánicos puede aumentar considerablemente la afinidad de las montmorillonitas SWy-2 y SAz-1 por el herbicida. En general, la afinidad depende tanto de la naturaleza del catión modificador y la cantidad de éste en la arcilla como de la montmorillonita considerada, ya que estos factores determinan las características funcionales y estéricas de la montmorillonita modificada.
3. Las cinéticas de liberación de diurón, terbutilazina y MCPA obtenidas en agua a partir de complejos preparados soportando el herbicida en montmorillonitas modificadas seleccionadas, ponen de manifiesto que la liberación del herbicida a la disolución acuosa se produce más lentamente en las formulaciones de montmorillonitas modificadas que en el caso de formulaciones comerciales convencionales usadas como referencia. Para cada herbicida, las cinéticas de liberación dependen tanto del adsorbente como de la forma de preparación de los complejos.
4. Las cinéticas de disipación de diurón, terbutilazina y MCPA en suelos muestran que la persistencia de los herbicidas depende más del tipo de suelo que de la formulación. La mayor parte del herbicida en las formulaciones de arcilla parece estar en una forma potencialmente disponible para su disipación en el suelo.
5. Los estudios de biodisponibilidad realizados con el herbicida atrazina revelaron que la cantidad total de herbicida mineralizado por la bacteria *Pseudomonas* sp, cepa ADP, no varía por soportar el herbicida en organoarcillas, lo que pone de manifiesto la elevada disponibilidad del herbicida soportado para ser

biodegradado. Sin embargo, los estudios de biodisponibilidad también ilustraron la importancia que tiene el mecanismo de interacción entre el herbicida y la organoarcilla en la cinética de biodegradación, ya que determina la velocidad de liberación del herbicida en presencia del suelo y, por consiguiente, la velocidad a la que es biodegradado.

6. Los resultados obtenidos en los experimentos de lixiviación en columnas ponen de manifiesto, para los dos suelos considerados, un retraso en la lixiviación de diurón, terbutilazina y MCPA tras su aplicación como formulaciones de organoarcillas, así como una disminución de las concentraciones de herbicida en los lixiviados, respecto a la aplicación de formulaciones comerciales convencionales. Los perfiles de lixiviación dependen de las características del suelo y el herbicida, así como del adsorbente y forma de preparación de las formulaciones, lo que permite seleccionar estas variables para conseguir un perfil de lixiviación deseado. En la mayoría de los casos, el mayor tiempo de residencia del herbicida en las columnas de suelo tras su aplicación como formulaciones de arcilla lleva consigo una menor cantidad de herbicida lixiviada debido a una mayor incidencia de los procesos degradativos.

7. Los bioensayos realizados en el laboratorio con Berro (*Lepidum sativum*) demostraron la efectividad biológica de todas las formulaciones utilizadas a dosis similares a las recomendadas para el uso de los herbicidas en el campo, lo que sugiere que los complejos preparados pueden ser aplicados a dosis recomendadas para diurón, terbutilazina y MCPA, reduciendo la lixiviación del herbicida a través del perfil de suelo y manteniendo una eficacia en el control de plantas sensibles. Además, los bioensayos realizados con MCPA demostraron que, cuando tiene lugar un aporte de agua abundante poco después de la aplicación del producto fitosanitario, las menores pérdidas por lixiviación asociadas al uso de formulaciones de arcilla ayudan a mantener la eficacia biológica del herbicida aplicado, al contrario de lo que ocurre con formulaciones comerciales convencionales, para las que las pérdidas por lixiviación son más acentuadas.

8. El experimento de campo realizado para comparar el comportamiento de una formulación del herbicida diurón soportado en la organoarcilla SW-ESPERM₁₀₀ con el de una formulación comercial convencional puso de manifiesto que el uso de la formulación de organoarcilla da lugar a un movimiento más lento del herbicida a

través del perfil del suelo y a una mayor persistencia del herbicida, siendo similar la eficacia biológica de los dos tratamientos. Los episodios de escorrentía tuvieron lugar varias semanas después del tratamiento con el herbicida, lo que no permitió establecer el beneficio de las formulaciones basadas en organoarcilla en un escenario de alto riesgo de pérdidas por escorrentía del producto recién aplicado al suelo.

9. Como conclusión general podemos decir que el uso de formulaciones de liberación lenta o controlada para herbicidas utilizados en el olivar, desarrolladas a partir de montmorillonitas modificadas con cationes inorgánicos u orgánicos, puede ser útil para reducir la elevada movilidad que presentan las materias activas cuando éstas se aplican como formulaciones comerciales convencionales. Acompañadas de otras medidas, estas formulaciones podrían contribuir a disminuir las pérdidas por transporte de los herbicidas aplicados a los suelos de olivar, lo que por una parte reduciría el riesgo de contaminación de las aguas y por otra permitiría disminuir las cantidades de materia activa necesarias para el control adecuado de malas hierbas.



6. Bibliografía



- Aguer J.P., Hermosín M.C., Calderón M.J., Cornejo J. 2000. Fenuron sorption by homoionic natural and modified smectites. *J. Environ. Sci. Health*. B35, 279-296.
- Aiken G.R., McKnight D.M., Wershaw R.L. (eds). 1985. *Humic Substances in Soil, Sediments and Water*. Wiley Intersci. New York.
- Albarrán A., Celis R., Hermosín M.C., López-Piñeiro A., Ortega-Calvo J.J., Cornejo J. 2003. Effects of solid olive-mill waste addition to soil on sorption, degradation and leaching of the herbicide simazine. *Soil Use Manag.* 19, 150-156.
- Albarrán A. 2004. Movilidad, Persistencia y Mecanismos de Evolución de la Simazina en Suelos de Extremadura. TDR. Universidad de Extremadura.
- Allen R., Walker A. 1987. The influence of soil properties on the rates of degradation of metamitron, metazachlor and metribuzin. *Pestic. Sci.* 18, 95-111.
- Anselme C., Bruchet A., Mallevalle J. 1992. Influence and Removal of Organics in Drinking Water. (Eds., J.P. Duquet y J. Mallevalle), Lewis Publishers, Chelsea.
- Aue D.H., Webb H.M., Bowers M.T. 1976. A thermodynamic analysis of solvation effects on the basicities of alkylamines. An electrostatic analysis of substituent effects. *J. Am. Chem. Soc.* 98, 318-330.
- Bailey G.W., White J.L. 1970. Factors influencing the adsorption, desorption and movement of pesticides in soils. *Residue Review* 32, 29-92.
- Barranco D., Fernández-Escobar R., Rallo L. 2001. *El Cultivo del Olivar*. Mundi Prensa, Junta de Andalucía.
- Barriuso E., Laird D.A., Koskinen W.C., Dowdy R.H. 1994. Atrazine desorption from smectites. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 58, 1632-1638.
- Beck A.J., Johnston A.E.J., Jones K.C. 1993. Movement of nonionic organic chemicals in agricultural soils. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 23, 219-248.
- Bellamy L.J. 1975. *The Infrared Spectra of Complex Molecules*, 3rd ed; Vol. I. Chapman & Hall. London.

Bergström L. 1990. Leaching of chlorsulfuron and metsulfuron methyl in three Swedish soils measured in field lysimeters. *J. Environ. Qual.* 19, 701-706.

Bonczek J.L., Harris W.G., Nkedi-Kizza P. 2002. Monolayer to bilayer transitional arrangements of hexadecyltrimethylammonium cations on Na-montmorillonite. *Clays Clay Min.* 50, 11-17.

Bowman B.T., Sans W.W. 1985. Partitioning behaviour of insecticides in soil-water systems. I. Adsorbent concentration effects. *J. Environ. Qual.* 14, 265-269.

Bowman B.T. 1989. Mobility and persistence of the herbicides atrazine, metolachlor y terbuthylazine in plainfield sand determined using field lysimeters. *Environ. Toxicol. Chem.* 8, 485-491.

Boyd S.A., Shaobai S., Lee J.F., Mortlan M.M. 1988. Pentachlorophenol sorption by organo-clays. *Clays Clay Miner.* 36, 125-130.

Boyd S.A., Jaynes W.F., Ross B.S. 1991. Immobilization of organic contaminants by organoclay: Application to soil restoration and hazardous waste contaminants. En: *Organic Substances and Sediments in Water*. (R.A. Baker, Ed.), vol 1, pp. 181-200. Lewis, Chelsea, MI.

Brinch U.C., Ekelund F., Jacobsen C.S. 2002. Method for spiking soil samples with organic compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 1808-1816.

Brixie J.M., Boyd S.A. 1994. Treatment of contaminated soils with organoclays to reduce leachable pentachlorophenol. *J. Environ. Qual.* 23, 1283-1290.

Brown G. 1961. *The X-Ray Identification and Crystal Structures of Clay Minerals*, (Ed. G. Brown), Mineralogical Society, London.

Brown G., Nadeau P., 1984. Crystal structure of clay minerals and related phyllosilicates. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences.* *The Royal Society.* 311, 221-240.

- Cabrera A., Cox L., Velarde P., Koskinen W. C., Cornejo J. 2007. Fate of Diuron and Terbutylazine in soils amended with two-phase olive oil mill waste. *J. Agric. Food Chem.* 55, 4828-4834.
- Cabrera A., Cox L., Koskinen W.C., Sadowsky M. 2008. Availability of triazine herbicides in aged soils amended with olive oil mill waste. *J. Agric. Food Chem.* 56, 4112-4119.
- Cabrera A. 2008. Influencia de la Adición al Suelo de Residuos de Almazara en el Comportamiento de Herbicidas Utilizados en el Cultivo del Olivar. TDR. Universidad de Sevilla.
- Calvet R., Terce M., Arvieu J.C. 1980. Adsorption des pesticides par les sols et leur constituants. *Ann. Agron.* 31, 33-385.
- Calvet R. 1989. Adsorption of organic chemicals in soils. *Environ. Health Perspect.* 83, 145-177.
- Camacho-Muñoz D., Martín J., Santos J.L., Aparicio I., Alonso E. 2009. An affordable method for the simultaneous determination of the most studied pharmaceutical compounds as wastewater and surface water pollutants. *J. Sep. Sci.* 32, 3064-3073.
- Carabias-Martínez R., Rodríguez-Gonzalo E., Fernández-Laespada M.E., Calvo-Seronero L., Sánchez-San Román F.J. 2003. Evolution over time of the agricultural pollution of waters in an area of Salamanca and Zamora (Spain). *Water Res.* 37, 928-938.
- Carr M.E., Wing R.E., Doane W.N. 1994. Clay as a carrier in starch encapsulated herbicides prepared by extrusion processing. *Starch/Staerke.* 46, 9-13.
- Carretero M.I. 2002. Clay minerals and their beneficial effects upon human health. A review. *Appl. Clay Sci.* 21, 155-163.
- Carretero M.I., Pozo M. 2009. Clay and non-clay minerals in the pharmaceutical industry Part I. Excipients and medical applications. *Appl. Clay Sci.* 46, 73-80.
- Carrizosa M.J., Calderón M.J., Hermosín M.C., Cornejo J. 2000. Organosmectites as sorbent and carrier of the herbicide bentazone. *Sci. Total Environ.* 247, 285-293.

Carrizosa M.J., Koskinen W.C., Hermosín M.C., Cornejo J. 2001. Dicamba adsorption-desorption on organoclays. *Appl. Clay Sci.* 18, 223-231.

Carrizosa M.J., Hermosín M.C., Koskinen W.C., Cornejo J. 2003. Use of organosmectites to reduce leaching losses of acidic herbicides. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 67, 511.

Celis R. 1996. Modelos de Asociación Arcilla-Óxido-Materia Orgánica del Suelo en Relación con la Adsorción de Compuestos Orgánicos. TDR. Universidad de Sevilla.

Celis R., Cox L., Hermosín M.C., Cornejo J. 1996. Retention of metamitron by model and natural particulate matter. *J. Environ. Anal. Chem.* 65, 245-260.

Celis R., Hermosín M.C., Cornejo J., Koskinen W. C. 1997a. Sorption-desorption of atrazine and simazine by model soil colloidal components. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 61, 436-443.

Celis R., Cox L., Hermosín M.C., Cornejo J. 1997b. Sorption of thiazufluron by iron- and humic acid-coated montmorillonite. *J. Environ. Qual.* 26, 472-479.

Celis R., Koskinen W.C., Hermosín M.C., Cornejo J. 1999a. Sorption and desorption of triadimefon by soils and model soil colloids. *J. Agric. Food Chem.* 47, 776-781.

Celis R., Koskinen W.C., Cecchi A.M., Bresnahan G.A., Carrizosa M.J., Ulibarri M.A., Pavlovic I., Hermosín M.C. 1999b. Sorption of the ionisable pesticide imazamox by organoclays and organohydrotalcites. *J. Environ. Sci. Health B* 34, 929-941

Celis R., Hermosín M.C., Cox L., Cornejo J. 1999c. Sorption of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid by model particles simulating naturally occurring soil colloids. *Environ. Sci. Technol.* 33, 1200-1206.

Celis R., Koskinen W.C. 1999. An isotopic exchange method for the characterization of the irreversibility of pesticide sorption-desorption in soil. *J. Agric. Food Chem.* 47, 782-790.

Celis R., Koskinen W.C., Hermosín M.C., Ulibarri M.A., Cornejo J. 2000a. Triadimefon interactions with organoclays and organohydrotalcites. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 64, 36-43.

Celis R., Hermosín M.C., Cornejo J. 2000b. Heavy metal adsorption by functionalized clays. *Environ. Sci. Technol.* 34, 4593-4599.

- Celis R., Hermosín M.C., Carrizosa M.J., Cornejo J. 2002a. Inorganic and organic clays as carriers for controlled release of the herbicide hexazinone. *J. Agric. Food Chem.* 50, 2324-2330.
- Celis R., Hermosín M.C., Cornejo L., Carrizosa M.J., Cornejo J. 2002b. Clay-herbicide complexes to retard picloram leaching in soil. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* 82, 503-517.
- Celis R., Facenda G., Hermosín M.C., Cornejo J. 2005. Assessing factors influencing the release of hexazinone from clay-based formulations. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 85, 1153-1164.
- Celis R., Trigo C., Facenda C., Hermosín M.C., Cornejo J. 2007. Selective modification of clay minerals for the adsorption of herbicides widely used in olive groves. *J. Agric. Food Chem.* 55, 6650-6658.
- Cerezo P., Aguzzi A., Viseras C., Cerezo A. 2003. Efecto de la temperatura en el espaciado d_{001} de la sepiolita y en la pérdida de peso. VI Congreso de la Sociedad Española de Farmacia Industrial y Galénica (SEFIG). 3ª Jornadas de Tecnología Farmacéutica (AEFI). Libro de comunicaciones. Granada, Ed. Comares, S.L.
- Che M., Loux M.M., Traina S.J., Logan T.J. 1992. Effect of pH on sorption and desorption of imazaquin and imazethapyr on clays and humic acid. *J. Environ. Qual.* 21, 698-703.
- Cheng H.H., Lehmann R.G. 1985. Characterization of herbicide degradation under field conditions. *Weed Sci.* 33, 7-10.
- Chiou C.T., Shoup T.D., Porter P.E. 1985. Mechanistic roles of soil humus and minerals in the sorption of nonionic organic compounds from aqueous and organic solutions. *Org. Geochem.* 8, 9-14.
- Chiou C.T., Kile D.E. 1994. Effects of polar and nonpolar groups on the solubility of organic compounds in soil organic matter. *Environ. Sci. Technol.* 28, 1139-1144.
- Clay S.A., Koskinen W.C., Allmaras R.R., Dowdy R.H. 1988. Differences in herbicide adsorption on soil using several modification techniques. *J. Environ. Sci. Health B23*, 559-573.

Cornejo J., Hermosín M.C., White J.L., Barnes J.R., Hem S.L. 1983. Role of ferric iron in oxidation of hydrocortisone by sepiolite and palygorskite. *Clays Clay Min.* 31, 109-112.

Cornejo J., Celis R., Cox L., Hermosín M.C. 2004. Pesticide-clay interactions and formulations. En: *Clay Surfaces: Fundamentals and Applications* (Eds., F. Wypych y K.G. Satyanarayana), pp. 247-266. Elsevier.

Cornejo J., Hermosín M.C., Celis R., Cox L. 2005. Methods to determine sorption of pesticides and other organic compounds. En: *Soil-Water-Solute Process Characterization: An Integrated Approach* (Eds., Álvarez Benedi J., Muñoz Carpena R.), pp. 435-463. CRC Press-Taylor & Francis Group.

Cornejo J., Celis R., Pavlovic I., Ulibarri M. 2008a. Interactions of pesticides with clays and layered double hydroxides: a review. *Clay Minerals* 43, 155-176.

Cornejo L., Celis R., Domínguez C., Hermosín M.C., Cornejo J. 2008b. Use of modified montmorillonites to reduce herbicide leaching in sports turf surfaces: Laboratory and field experiments. *Appl. Clay Sci.* 42, 284-291.

Cox L., Hermosín M.C., Cornejo J. 1995. Adsorption mechanisms of thiazafuron in mineral soil clay components. *Europ. J. Soil Sci.* 46, 431-438.

Cox L., Hermosín M.C., Celis R., Cornejo J. 1997a. Sorption of two polar herbicides in soils and soil clays suspensions. *Wat. Res.* 31, 1309-1316.

Cox L., Celis R., Hermosín M.C., Becker A., Cornejo J. 1997b. Porosity and herbicide leaching in soils amended with olive-mill wastewater. *Agric. Ecosyst. Environ.* 65, 151-161.

Cox L., Koskinen W.C., Yen P.Y. 1998. Changes in sorption of Imidacloprid with incubation time. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 62, 342-347.

Cox L., Celis R., Hermosín M.C., Cornejo J. 2000. Natural soil colloids to retard simazine and 2,4-D leaching in soil. *J. Agric. Food Chem.* 48, 93-99.

Cox L., Koskinen W.C., Hermosín M.C., Cornejo J., Arthur E.L. 2002. Sorption of two new sulfonylaminocarbonyltriazoline herbicides and their metabolites on organic and inorganic smectites. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* 82, 553-560.

- Crespín M.A., Gallego M., Valcárcel M., González J.L. 2001. Study of the degradation of the herbicides 2,4-D and MCPA at different depths in contaminated agricultural soil. *Environ. Sci. Technol.* 35, 4265-4270.
- Cruz-Guzmán M., Celis R., Hermosín M.C., Cornejo L. 2004. Adsorption of the herbicide simazine by montmorillonite modified with natural organic cations. *Environ. Sci. Technol.* 38, 180-186.
- Cruz-Guzmán M., Celis R., Hermosín M.C., Koskinen W.C., Cornejo J. 2005. Adsorption of pesticides from water by functionalized organobentonites. *J. Agric. Food Chem.* 53, 7502-7511.
- De Prado R., Cruz-Hipolito H. 2005. Mecanismos de Resistencia de las plantas a los Herbicidas. En "Resistencia a Herbicidas y Cultivos Transgénicos". Ponencias del Seminario-Taller Iberoamericano, Colonia del Sacramento, Uruguay.
- El-Nahhal Y., Nir S., Polubesova T., Margulies L., Rubin B. 1998. Leaching, phytotoxicity, and weed control of new formulations of alachlor. *J. Agric. Food Chem.* 46, 3305-3313.
- El-Nahhal Y., Nir S., Serban C., Rabinowitz O., Rubin B. 2000. Montmorillonite-phenyltrimethylammonium yield environmentally improved formulations of hydrophobic herbicides. *J. Agric. Food Chem.* 48, 4791-4801.
- El-Nahhal Y., Nir S., Serban C., Rabinovitz O., Rubin B. 2001. Organo-clay formulation of acetochlor for reduced movement in soil. *J. Agric. Food Chem.* 49, 5364-5371.
- El-Nahhal Y. 2003. Persistence, mobility, efficacy and activity of chloroacetanilide herbicide formulation under greenhouse and field experiments. *Environ. Pollut.* 124, 33-38.
- Ezzaim A., Turpault M.P., Ranger J. 1999. Quantification of weathering processes in an acid brown soil developed from tuff (Beaujolais, France). Part II. Soil formation. *Geoderma* 87, 155-177.
- Fernández-Pérez M., González-Pradas E., Ureña-Amate M.D., Wilkins R.M., Lindrup I. 1998. Controlled release of imidacloprid from a lignin matrix. Water release kinetics and soil mobility study. *J. Agric. Food Chem.* 46, 3828-3834.

Fernández-Pérez M., González-Pradas E., Villafranca-Sánchez M., Flores-Céspedes F., Ureña-Amate M.D. 2000. Bentonite and humic acid as modifying agents in controlled release formulations of diuron and atrazine. *J. Environ. Qual.* 29, 304-310.

Ferreira J.A., Martin-Neto L., Vaz C.M.P., Regitano J.B. 2002. Sorption interactions between imazaquin and a humic acid extracted from a typical Brazilian Oxisol. *J. Environ. Qual.* 31, 1665-1670.

Filius J.D., Hiemstra T., Vanriemsdijk W.H. 1997. Adsorption of small weak organic acids on goethite-modeling of mechanisms. *J. Colloid Interface Sci.* 195, 368-380.

Garrido T., Fraile J., Ninerola J.M., Figueras M., Ginebreda A., Olivella L. 2000. Survey of ground water pesticide pollution in rural areas of Catalonia (Spain). *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* 78, 51-65.

Gee, G.W., Bauder J.W. 1982. Particle size analysis. In: Klute, A. (ed). *Methods of Soil Analysis, Part 1*, 2nd Ed. American Society of Agronomy. Madison, WI. pp: 383-412.

Gerstl Z., Nasser A., Mingelgrin U. 1998a. Controlled release of pesticides in soils from clay-polymer formulations. *J. Agric. Food Chem.* 46, 3797-3802.

Gerstl Z., Nasser A., Mingelgrin U. 1998b. Controlled release of pesticides into water from clay-polymer formulations. *J. Agric. Food Chem.* 46, 3803-3809.

Giles C.H., MacEwan T.H., Nakhwa S.N., Smith D. 1960. Studies in adsorption. Part XI. A system of classification of solution adsorption isotherms, and its use in diagnosis of adsorption mechanism in measurement of specific surface area in solids. *J. Chem. Soc. London* 3, 3973-3993.

Gish T.J., Schoppet M.J., Helling C.S., Schirmohammadi A., Schnecher M.M., Wing R.E. 1991. Transport comparison of technical grade and starch-encapsulated atrazine. *Trans. ASAE.* 34, 1738.

Glotfelty D.E., Caro J.M. 1975. Introduction, transport and fate of persistent pesticides in the atmosphere. *Am. Chem. Soil Symp. Ser. No 17: Removal of Trace Contaminants from Air*, pp. 42-62.

- González-Pradas E., Fernández-Pérez M., Villafranca-Sánchez M., Martínez-López F., Flores-Céspedes F. 1999. Use of bentonite and humic acid as modifying agents in alginate-based controlled-release formulations of imidacloprid. *Pest. Sci.* 55, 546-552.
- Gramatica P., Di Guardo A. 2002. Screening of pesticides for environmental partitioning tendency. *Chemosphere* 47, 947-956.
- Greendland D.J. 1965. Interaction between clays and organic compounds in soils. Part 1. Mechanisms of interaction between clays and defined organic compounds. *Soil and Fertilizers* 28, 415-420.
- Guggenheim S., Martin R.T. 1995. Definition of clay and clay mineral: joint report of the aiipa and cms nomenclature committees. *Clay Minerals* 30, 257-259.
- Hamaker J. W., Thompson J. M., 1972. Adsorption. En: Organic Chemicals in the Soil Environment Vol. 1 (C.A.I. Goring & J. W. Hamaker, eds.). Marcel Dekker, New York, 49-143.
- Han X., Scott A.C., Fedorak P.M., Bataineh M., Martin J. W. 2008. Influence of molecular structure on the biodegradability of naphthenic acids. *Environ. Sci. Technol.* 42, 1290-1295.
- Hance R.J. 1967. The speed of attainment of sorption equilibria in some systems involving herbicides. *Weed Res.* 7, 29-36.
- Hermosín M.C., Cornejo J. 1987. Adsorption and desorption of maleic hydrazide as a function of soil properties. *Soil Sci.* 44, 250-256.
- Hermosín M.C., Cornejo J. 1993. Binding mechanism of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid by organoclays. *J. Environ. Qual.* 22, 325-331.
- Hermosín M.C., Calderón M.J., Aguer J.P., Cornejo J. 2001. Organoclays for controlled release of the herbicide fenuron. *Pest. Manag. Sci.* 57, 803-809.
- Hildebrandt A., Guillamón M., Lacorte S., Tauler R., Barceló D. 2008. Impact of pesticides used in agriculture and vineyards to surface and ground water quality (North Spain). *Water Res.* 42, 3315-3326.

Hingston F.J., Posner A.M., Quirk J.P. 1972. Anion adsorption by goethite and gibbsite. The role of the proton in determining adsorption envelopes. *J. Soil. Sci.* 23, 177-192.

Horspool W.M. 1970. Aspects of Organic Photochemistry. Ed. Academic Press. Londres.

Jackson M.L. 1975. Soil Chemical Analysis Advanced Course (ed. Jackson, M.L.) 2nd edn, Wiley-Interscience, Madison.

Jaynes W.F., Boyd S.A. 1991a. Hydrophobicity of siloxane surfaces in smectites as revealed by aromatic hydrocarbon adsorption from water. *Clays Clay Miner.* 39, 428-436.

Jaynes W.F., Boyd S.A. 1991b. Clay minerals type and organic compound sorption by hexadecyltrimethylammonium exchanged clays. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 55, 43-48.

Jaynes W.F., Vance G.F. 1996. BTEX sorption by organoclays: cosorptive enhancement and equivalence of interlayer complexes. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 60, 1742-1749.

Johnson R.M., Pepperman A.B. 1998. Release of atrazine and alachlor from clay-oxamide controlled release formulations. *Pest. Sci.* 53, 233-240.

Junta de Andalucía, 2003. El Olivar Andaluz, Consejería de Agricultura y Pesca, Sevilla.

Junta de Andalucía, 2006a. Anuario de Estadísticas Agrarias y Pesqueras de Andalucía Año 2006. Consejería de Agricultura y Pesca. <http://www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/portal/servicios/estadisticas/estadisticas/agrarias/resumen-anual.html>

Junta de Andalucía, 2006b. Buenas Prácticas en el Manejo de Suelos en el Olivar. Consejería de Agricultura y Pesca.

Karathanasis A.D., Adams A.D.F., Hajek B.F. 1983. Stability relationships in kaolinite, gibbsite and Al-hydroxy interlayered vermiculite soil systems. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 3, 1247-1251.

Kearney P.C., Shelton D.R., Koskinen W.C. 1997. Soil chemistry of pesticides. En: Encyclopedia of Chemical Technology, 4^a Edición, Vol. 22, (Ed. M. Howe-Grant) pp. 419-451, John Wiley & Sons, New York.

- Khan S.A. 1980. Physicochemical processes affecting pesticides in soil. En: Pesticides in the Soil Environment. R.J. Wakeman (ed.) Elsevier. Amsterdam, pp. 29-118.
- Kogan M., Rojas S., Gómez P., Suárez F., Muñoz J.F. 2007. Evaluation of six pesticides leaching indexes using field data of herbicide application in Casablanca Valley, Chile. *Water Sci. Technol.* 56, 169-178.
- Koskinen W.C., Cox L., Yen P.Y. 2001. Changes in sorption/bioavailability of imidacloprid metabolites in soil with incubation time. *Biol. Fertil. Soils.* 33, 546-550.
- Krutz L.J., Senseman S.A., Zablutowicz R.M., Matocha M.A. 2005. Reduced herbicide runoff from agricultural fields with vegetative filter strips: a review. *Weed Sci.* 53, 353-367.
- Lagaly G. 1982. Layer charge heterogeneity in vermiculites. *Clays Clay Miner.* 30, 215-222.
- Lagaly G. 1994. Bentonites: adsorbent of toxic substances. *Prog. Colloid. Polym. Sci.* 95, 61-72.
- Lagaly G. 2001. Pesticide-clay interactions and formulations. *Appl. Clay Sci.* 18, 205-209.
- Laird D.A. 1996. Interactions between atrazine and smectite surface. En: *Herbicide Metabolites in Surface Waters and Ground Waters*. Meyer & Truman (eds) Amer. Chem. Soc. Washington D.C. pp. 86-100.
- Lee J.J., Choi J., Park J.W. 2002. Simultaneous sorption of lead and chlorobenzene by organobentonite. *Chemosphere* 49, 1309-1315.
- Li Z. 1999. Oxyanion sorption and surface anion exchange by surfactant-modified minerals. *J. Environ. Qual.* 28, 1457-1463.
- Liñán C. 1994. Vademécum de Productos Fitosanitarios y Nutricionales. C. Liñán (ed.) Madrid.
- Liñán C. 2006. Vademécum de Productos Fitosanitarios y Nutricionales. C. Liñán (ed.) Madrid

Liñán C. 2008. Vademécum de Productos Fitosanitarios y Nutricionales. C. Liñan (ed.) Madrid

Liñán C. 2009. Vademécum de Productos Fitosanitarios y Nutricionales. C. Liñan (ed.) Madrid

Loos R., Niessner R. 1999. Analysis of atrazine, terbuthylazine and their N-dealkylated chloro and hydroxy metabolites by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry and capillary electrophoresis-ultraviolet detection. *J. Chromatogr. A.* 835, 217-229.

Loumou A., Giourga C. 2003. Olive groves: "The life and identity of the Mediterranean". *Agric. Human Values.* 20, 87-95.

Mansour M., Feicht E., Mealiar P. 1989. Improvement of the photostability of selected substances in aqueous medium. *Toxicol. Environ. Chem.* 20/21, 139-147.

Margulies L., Cohen E., Rozen H. 1987. Photostabilization of bioresmethrin by organic cations on a clay surface. *Pest. Sci.* 18, 205-2.

Margulies L., Stern T., Rubin B. 1994. Slow release of S-ethyl dipropyl carbamothioate from clay surfaces. *J. Agric. Food Chem.* 42, 1223-1227.

MARM, 2006. Perfil Ambiental de España 2006: informe basado en indicadores. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino.
http://www.mma.es/portal/secciones/calidad_contaminacion/indicadores_ambientales/perfil_ambiental_2006/index.htm

MARM, 2007a. Anuario de Estadística Agroalimentaria. Capítulo 26. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino.
<http://www.mapa.es/es/estadistica/pags/anuario/2007/indice.asp>

MARM, 2007b. Perfil Ambiental de España 2007: informe basado en indicadores. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino.
http://www.mma.es/portal/secciones/calidad_contaminacion/indicadores_ambientales/perfil_ambiental_2007/index.htm

MARM, 2010. Registro de productos fitosanitarios. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. <http://www.mapa.es/es/agricultura/pags/fitos/registro/menu.asp>

Martin R. T., Bailey S.W., Eberl D.D., Fanning D.S., Guggenheim S., Kodama H., Pevear D.R., Srodon J., Wicks F.J. 1991. Report of the clay minerals society nomenclature committee: revised classification of clay materials. *Clays Clay Miner.* 39, 333-335.

Moore D.M., Reynolds Jr. R.C. 1987. X-Ray Diffraction, Identification and Analysis of Clay Minerals. Oxford University Press, New York.

Moronta A. 2004. Catalytic and adsorption properties of modified clay surfaces. En: *Clay surfaces. Fundamentals and Applications*. (Eds., F. Wypych y K.G. Satyanarayana), pp. 321-345. Elsevir.

Négre M., Schulten H.R., Gennari M., Vindrola D. 2001. Interaction of imidazolinone herbicides with soil humic acids. Experimental results and molecular modeling. *J. Environ. Sci. Health B* 36, 107-125.

Nemeth-Konda L., Fuleky G., Morovjan G., Csokan P. 2002. Sorption behavior of acetochlor, atrazine, carbendazim, diazinon, imidacloprid and isoproturon on Hungarian agricultural soil. *Chemosphere.* 48, 545-552.

Nennemann A., Mishael Y., Nir S., Rubin B., Polubesova T., Bergaya F., Van Damme H., Lagaly G. 2001. Clay-based formulations of metolachlor with reduced leaching. *Appl. Clay Sci.* 18, 265-275.

Nir S., Undabeytia T., El-Nahhal Y., Polubesova T., Serban C., Rytwo G., Lagaly G., Rubin B. 2000. Optimization of adsorption of hydrophobic herbicides on montmorillonite preadsorbed by monovalent organic cations: interaction between phenyl rings. *Environ. Sci. Technol.* 34, 1269.

O'Connor G.A., Wierenga P.J., Cheng H.H., Doxtader K.G. 1980. Movement of 2,4,5-T through large soil columns. *Soil Sci.* 130, 157-162.

Park J.H., Kay D., Zhao X.D., Boyd S.A., Voice, T.C. 2001. Kinetic modelling of bioavailability for sorbed-phase 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *J. Environ. Qual.* 30, 1523-1527.

Parker L.W., Doxtader K.G. 1983. Kinetics of the microbial degradation of 2,4-D in soil: Effects of temperature and moisture. *J. Environ. Qual.* 12, 553-558.

Pastor M., 2002. Herbicidas en olivar: alternativas actuales al uso de la simazina. *Vida Rural*, 15 septiembre 2002, 61-67.

Pérez-Ruzafa A., Navarro S., Barba A., Marcos C., Camara M.A., Salas F., Gutierrez J.M. 2000. Presence of pesticides through trophic compartments of the food web in the Mar Menor lagoon (SE Spain). *Marine Pollut. Bull.* 40, 140-151.

PPDB: Pesticide Properties Database (<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/>), acceso: 01-05-2010.

Philen O.D., Weed S.B., Weber J.B. 1971. Surface charge characterization of layer silicates by competitive adsorption of two organic divalent cations. *Clays Clay Miner.* 19, 295-302.

Picó Y., Molto J.C., Redondo M.J. Viana F., Manes J., Font G. 1994. Monitoring pesticide levels in natural waters of the Valencia community (Spain). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 53, 230-237.

Pringnitz B.A. 2001. Herbicide mode of action chart. Iowa State University. (www.weeds.iastate.edu)

Ramos M.C., Porta J. 1994. Rainfall intensity and erosive potentiality in the NE Spain Mediterranean area: First results on sustainability of vineyards. *Nuovo Cimento della società Italiana di Fisica* 17, 291-299.

Ramos M.I., Feito F.R., Gil A.J. 2008. A study of spatial variability of soil loss with high resolution DEMs: A case study of a sloping olive grove in southern Spain. *Geoderma* 148, 1-12.

Redding A.Z., Burns S.E., Upson R.T., Anderson E.F. 2002. Organoclays sorption of benzenes as a function of total organic carbon content. *J. Colloid Interface Sci.* 250, 261-264.

Rengasamy P. y Oades J.M. 1977. Interaction of monomeric and polymeric species of metal ions with clay surfaces. I. Adsorption of iron (III) species. *Aust. J. Soil Res.* 15, 221-233.

- Ritger P., Peppas N.A. 1987. A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-fickian release from non swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or disc. *J. Controlled Release* 5, 23-36.
- Roberts M.G., Li H., Teppen B., Boyd S.A. 2006. Sorption of nitroaromatics by ammonium- and organic ammonium-exchanged smectite: shifts from adsorption/complexation to a partition-dominated process. *Clays Clay Miner.* 54, 426-434.
- Rodríguez A., Espejo A.J., González P., Ordóñez R. 2004. Efectos del manejo de suelo en la escorrentía y erosión en el olivar. *Vida Rural* 17, 34-38.
- Rodríguez N. 2005. Residualidad (carryover) de herbicidas y mezclas. *Cosecha Gruesa*. 61, 179-208
- Rosen M.J. 1987. *Surfactants and Interfacial Phenomena*. Wiley, New York.
- Russell J.D., Cruz M.I., White J.L. 1968. The adsorption of 3-aminotriazole by montmorillonite. *J. Agric. Food. Chem.* 16, 21-24.
- Rutherford D.W., Chiou C.T., Kile D.E. 1992. Influence of soil organic matter composition on the partition of organic compounds. *Environ. Sci. Technol.* 26, 336-340.
- Saavedra M.M. y Pastor M., 1994. La flora del olivar y el uso de herbicidas. *Agricultura: Revista Agropecuaria*, 746, 748-753.
- Saavedra M.M., Pastor M. 2002. *Sistemas de Cultivo en Olivar: Manejo de Malas Hierbas y Herbicidas*. Editorial Agrícola Española, Madrid. 429pp.
- Sánchez-Camazano M., Sánchez-Martín M.J., Crisanto T. 1995. Occurrence of atrazine in surface and ground waters in the province of Salamanca (Spain). *Toxicol. Environ. Chem.* 47, 203-208.
- Sannino F., Filazzola M.T., Violante A., Gianfreda L. 1999. Adsorption-desorption of simazine on montmorillonite coated by hydroxyl aluminum species. *Enviro. Sci. Technol.* 33, 4221-4225.
- Scher H.B., Ed., *Controlled-Release Delivery Systems for Pesticide*, Marcel Dekker Inc., New York, 1999.

Schmidt R.R., Fedtke C. 1977. Metamitron activity in tolerant and susceptible plants. *Pest. Sci.* 8, 611-617.

Schmidt, R.R. 1997. HRAC classification of herbicides according to mode of action. Brighton crop protection conference: weeds. Proceedings of an international conference, Brighton, UK, 17-20 November 1997.

Schnitzer M., Khan S.U. 1972. Humic Substances in the Environment. Ed. Marcel Dekker, New York.

Singh N., Megharaj M., Gates W.P., Churchman G.J., Anderson J., Kookana R.S., Naidu R., Chen Z., Slade P.G., Sethunathan N., 2003. Bioavailability of an organophosphorus pesticide, fenamiphos, sorbed on an organo clay. *J. Agric. Food Chem.* 51. 2653-2658.

Sorensen S.R., Bendig G.D., Jacobsen C.S., Walker A., Aamand J. 2003. Microbial degradation of isoproturon and related phenylurea herbicides in and below agricultural fields. *FEMS Microbiol. Ecol.* 45, 1-11.

Stephen G. 1995. Definition of clay and clay mineral: joint report of the aipea nomenclature and cms nomenclature committees. *Clays Clay Miner.* 43, 255-256.

Theng B.K.G., Greenland D.J., Quirk J. P. 1967. Adsorption of alkylammonium cations by montmorillonite. *Clays Clay Miner.* 7, 1-17.

Thomas R.G. 1982. Volatilization from soil. En: *Handbook of Chemical Property Estimation Methods*. W. J. Lyman, W.P. Reehl and D.H. Rosenblatt (eds.). McGraw Hill, New York. Cap. 16, pp. 1-50.

Trujillano R., Vicente M.A., Rives V., Korili S.A., Gil A., Ciuffi K.J. 2009. Preparation, alumina-pillaring and oxidation catalytic performances of synthetic Ni-saponite. *Microporous Mesoporous Mater.* 117, 309-316.

Undabeytia T., Nir S., Rubin B. 2000. Organo-clay formulations of the hydrophobic herbicide norflurazon yield reduced leaching. *J. Agric. Food Chem.* 48, 4767-4773.

- Vicente M.A., Sánchez-Camazano M., Sánchez-Martín M.J., Del Arco M., Martín C., Rives V., Vicente-Hernández J. 1989. Adsorption and desorption of N-methyl 8-hydroxy quinoline methyl sulfate on smectite and the potential use of the clay-organic product as an ultraviolet radiation collector. *Clays Clay Miner.* 37, 157-163.
- Vreysen S., Maes A. 2006. Influence of pH on the aluminium speciation in freeze-dried poly (hydroxo aluminum) intercalated bentonites. *Appl. Clay Sci.* 33, 260-268.
- Wauchope R.D. 1978. The pesticide content of surface water draining from agricultural fields. A review. *J. Environ. Qual.* 7, 459-472.
- Wauchope R.D., Myers R.S. 1985. Adsorption-desorption kinetics of atrazine and linuron in freshwater sediment aqueous slurries. *J. Environ. Qual.* 14, 132-136.
- Weber J.B., Swain L.R., Streck H.J., Sartori. 1980. Herbicide mobility in soil leaching columns. En: *Research Methods in Weed Science*, N.D. Camper (ed.), pp. 189-200. Southern Weed Science Society. Champaign, IL.
- Weber J.B. 1982. Ionization and adsorption-desorption of tricyclazole by soil organic matter, montmorillonite clay and Cape Fear sandy loam soil. *J. Agric. Food Chem.* 30, 584-588.
- Weber J.B., Swain L.R. 1993. Sorption of dinicolazole and metolachlor by four soils, calcium-organic matter and calcium-montmorillonite. *Soil Sci.* 156, 171-177.
- Wolfe N.L., Mingelgrin U., Miller G.C. 1990. Abiotic transformations in water, sediments, and soil. En: *Pesticides in the Soil Environment: Processes, Impacts, and Modeling* (ed. H.H. Cheng). SSSA, Madison. WI. Pp. 103-168.
- Worrall F., Parker A., Rae J.E., Johnson A.C. 1999. A study of suspended and colloidal matter in the leachate from lysimeters and its role in pesticide transport. *J. Environ. Qual.* 28, 595-604.
- Worthing C.R., Hance R.J. 1991. *The Pesticide Manual*. British Crop Protection Council, Surrey, U.K.
- Xi Y., Ding Z., He, H., Frost R.L. 2004. Structure of organoclays: an X-ray diffraction and thermogravimetric analysis study. *J. Colloid Interface Sci.* 277-116-120.

- Xu, S., Harsh J.B. 1990. Monovalent cation selectivity qualitatively modelled according to hard/soft acid base theory. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 54, 357-363.
- Xu S., Harsh J.B. 1992. Alkali cation selectivity and surface charge of 2:1 clay minerals. *Clays Clay Miner.* 40, 567-574.
- Xu S., Boyd S.A. 1995. Cationic surfactant sorption to a vermiculite subsoil via hydrophobic bonding. *Environ. Sci. Technol.* 29, 312-320.
- Yariv S. 2004. The role of charcoal on DTA curves of organo-clay complexes: an overview. *Appl. Clay Sci.* 24, 225-236.
- Yaron-Marcovich D., Chen Y., Nir S., Prost R. 2005. High resolution electron microscopy structural studies of organo-clay nanocomposites. *Environ. Sci. Technol.* 29,1231-1238.
- Zhang R.D., Krzyszowska-Waitkus A.J., Vance G.F., Qi J.G. 2000. Pesticide transport in field soils. *Adv. Environ. Res.* 4, 59-68.
- Zhang Z.Z., Sparks D.L., Scrivner N.C. 1993. Sorption and desorption of quaternary amine cations on clays. *Environ. Sci. Technol.* 27, 1625-1631.
- Zhao H., Jaynes W.F., Vance G.F. 1996. Sorption of the ionisable organic compound, dicamba (3,6-dichloro-2-methoxy benzoic acid), by organo-clays. *Chemosphere* 33, 2089-2100.



7. Publicaciones



Selective Modification of Clay Minerals for the Adsorption of Herbicides Widely Used in Olive Groves

RAFAEL CELIS,* CARMEN TRIGO, GRACIA FACENDA,
MARÍA DEL CARMEN HERMOSÍN, AND JUAN CORNEJO

Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla, CSIC, Avenida Reina Mercedes 10,
Apartado 1052, 41080 Sevilla, Spain

Ground and surface water contamination by herbicides applied to olive groves in Spain and other Mediterranean countries is demanding strategies to prevent and remediate the environmental problems repeatedly caused by such herbicides. In this study, six different organic cations (L-carnitine, spermine, hexadimethrine, tyramine, phenyltrimethylammonium, and hexadecyltrimethylammonium) were incorporated into Na-rich Wyoming montmorillonite (SWy-2) and Ca-rich Arizona montmorillonite (SAZ-1) at two different loadings (50% and 100% of the cation exchange capacity of the clays) as a strategy to enhance the affinity of the clay minerals for three herbicides widely used in olive groves: terbutylazine, diuron, and MCPA. The modified montmorillonites were characterized and tested as adsorbents of the herbicides through batch adsorption tests. At the experimental conditions used, some of the modified montmorillonites removed more than 95% of the herbicide initially present in aqueous solution, whereas the unmodified clays removed less than 15%. All three herbicides displayed very strong affinities for SAZ-1 exchanged with hexadecyltrimethylammonium cations, particularly when these were incorporated at 100% of the cation exchange capacity of the clay mineral. Terbutylazine and diuron also displayed very strong affinities for SWy-2 exchanged with L-carnitine and spermine, respectively. The chemical characteristics of the organic cation greatly influenced the adsorptive properties of the resultant organoclay. The herbicides were in general reversibly adsorbed by the modified clays. The results indicate that some of the tested modified clays could be suitable for the removal of the assayed herbicides from contaminated water and also as possible supports for the design of slow release formulations of such herbicides to attenuate their environmental impact when used in high-risk scenarios such as olive groves.

KEYWORDS: Adsorption; clay minerals; diuron; MCPA; organoclays; terbutylazine

INTRODUCTION

Ground and surface water contamination by herbicides used in olive groves in Spain and other Mediterranean countries has become a serious issue and has led authorities to prohibit or restrict the application of widely used active ingredients, such as simazine, terbutylazine, and diuron (1, 2). In olive groves, conditions that favor offsite movement of the applied herbicides predominate. Soil texture and pronounced slopes favor herbicide leaching and runoff processes. Climatic conditions of Mediterranean areas, characterized by short but heavy rainfall events, exacerbate the risk of large herbicide transport losses. To compensate for such losses, herbicides need to be applied in

concentrations greatly exceeding those strictly required for weed control, and the excessive quantities added increase the risk of surface and groundwater pollution (3). In this context, there is a need to develop strategies, such as the design of adsorbents with high loading capacities and selectivity, directed to prevent water pollution and restore soil and water contaminated with herbicides applied to olive groves, particularly in high-risk scenarios such as Mediterranean areas.

The use of unaltered and modified clay minerals as adsorbents to prevent and remediate environmental contamination by pesticides has been a subject of great interest in environmental and agricultural chemistry (4–8). The unique features of clays as adsorbent materials are mainly related to their large specific surface area associated with their layered structure, their ubiquitous occurrence in nature, and the possibility of modifying their surfaces to increase their affinity for specific adsorbates (9–11). The mechanism most widely used to increase the affinity of clays for hydrophobic organic compounds, including organic pesticides, consists of replacing the clay's natural inorganic exchange cations with organic cations through ion

Received for review March 12, 2007. Revised manuscript received June 4, 2007. Accepted June 4, 2007. This work was financed by the Spanish Ministry of Education and Science (MEC/FEDER) through Project AGL2005-05063-C02-01 and by Junta de Andalucía through Research Group RNM-124. Carmen Trigo also thanks the Spanish Ministry of Education and Science for her FPI fellowship (refBES-2006-14099).

* To whom correspondence should be addressed. Phone: +34 954624711. Fax: +34 954624002. E-mail: rcelis@irnase.csic.es.

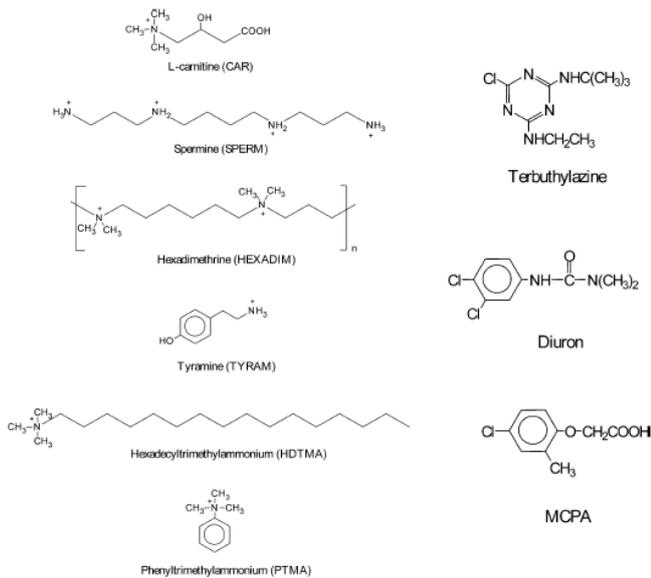


Figure 1. Chemical structures of the modifying cations and herbicides.

exchange reactions. This simple modification changes the nature of the surface from hydrophilic to hydrophobic, increasing its affinity for the pesticide molecule (4, 12–14). The organic cations most commonly used for clay mineral modification are nonfunctionalized quaternary ammonium ions of the general form $[(\text{CH}_3)_2\text{NR}]^+$ or $[(\text{CH}_3)_2\text{NR}_2]^+$, where R is an aromatic or aliphatic hydrocarbon (15, 16).

On the basis that most pesticides contain polar functionalities, it has recently been suggested that organic cations with appropriate functional groups can allow selective modification of clay mineral surfaces to maximize their affinity for selected pesticides. Thus, Cruz-Guzmán et al. (16) studied the ability of three functionalized organic cations, L-carnitine, L-cystine dimethyl ester, and thiamine, to improve the performance of the montmorillonite SWy-2 as an adsorbent of the herbicide simazine. The adsorption of simazine by montmorillonite exchanged with L-carnitine was notably high, which was attributed to the interaction of the weakly basic simazine molecule with the carboxylic functionality of L-carnitine. In a subsequent work, Cruz-Guzmán et al. (17) prepared organoclays by incorporating at different loadings four different natural organic cations into two bentonites differing in their cation exchange capacities and determined the adsorptive behavior of the resultant organoclays for six pesticides. The results revealed that most organobentonites displayed higher affinity for the pesticides than the untreated bentonites, but the improvement in adsorption capacity differed depending on the chemical characteristics of the pesticide and the interlayer organic cation. It was concluded that a suitable selection of the organic cation, on the basis of the presence of certain functional groups, can help improve the performance and selectivity of organoclays as adsorbents of pesticides with regard to the use of nonfunctionalized alkylammonium cations, which in general lack specificity. In addition, the suitability of natural organic cations for clay mineral modification was considered as particularly

interesting to reduce concern about the incorporation of the adsorbent into natural ecosystems for practical applications.

In this work, two montmorillonites (SWy-2 and SAZ-1) were modified with organic cations differing in their chemical characteristics, and the modified montmorillonites were characterized and tested as adsorbents of three herbicides widely used in olive groves: terbutylazine, diuron, and MCPA. The aim was to find efficient adsorbents that could be used to remove the assayed herbicides from contaminated water or used as potential supports for the development of slow release formulations of these herbicides to attenuate their environmental impact once applied to soil (8, 18, 19). The organic cations used for the modification of the clay minerals were L-carnitine, spermine, hexadimethrine, tyramine, phenyltrimethylammonium, and hexadecyltrimethylammonium (Figure 1). We paid particular attention to characterizing the montmorillonites treated with spermine, hexadimethrine, and tyramine because these organic cations have not been used before for the modification of SWy-2 or SAZ-1. A detailed description of the characteristics of the samples exchanged with L-carnitine, phenyltrimethylammonium, and hexadecyltrimethylammonium can be found elsewhere (8, 16, 17).

MATERIALS AND METHODS

Herbicides and Organic Cations. The chemical structures of the three herbicides, along with those of the organic cations used to modify the clay minerals, are shown in Figure 1. All pesticides and organic cations were supplied by Sigma-Aldrich as high purity compounds (purity >98%).

Preparation of the Adsorbents. SWy-2 Na-rich Wyoming montmorillonite and SAZ-1 Ca-rich Arizona montmorillonite from The Clay Minerals Society (Purdue University) were modified with the organic cations through ion exchange reactions. For the synthesis of the montmorillonites exchanged with L-carnitine, spermine, hexadimethrine, and tyramine, the amount of organic cation (chloride or bromide salt) corresponding to 50% or 100% of the cation exchange capacity of

Table 1. Characteristics of Unmodified and Modified Montmorillonite Samples

adsorbent	montmorillonite	modifying cation	C (%)	N (%)	OCIS ^a		d ₀₀₁ ^b (Å)
					expected (%)	actual (%)	
SWy-2 (untreated)	SWy-2	none	0.29 ± 0.01	< 0.05	0	0	n.d. ^c
SWy-2 (blank)	SWy-2	none	0.32 ± 0.01	< 0.05	0	0	15.1
SA-CAR ₁₀₀	SWy-2	L-carnitine	4.10 ± 0.11	0.61 ± 0.01	100	61	14.2
SA-SPERM ₅₀	SWy-2	spermine	1.65 ± 0.02	0.56 ± 0.01	50	53	13.1p
SA-SPERM ₁₀₀	SWy-2	spermine	2.86 ± 0.12	1.01 ± 0.08	100	96	13.0
SA-HEXADIM ₅₀	SWy-2	hexadimethrine	3.22 ± 0.03	0.44 ± 0.02	50	42	14.2p
SA-HEXADIM ₁₀₀	SWy-2	hexadimethrine	5.78 ± 0.06	0.89 ± 0.01	100	88	14.0
SA-TYRAM ₅₀	SWy-2	tyramine	3.00 ± 0.01	0.34 ± 0.01	50	33	14.3
SA-TYRAM ₁₀₀	SWy-2	tyramine	4.42 ± 0.01	0.63 ± 0.01	100	62	14.4
SA-PTMA ₅₀	SWy-2	phenyltrimethylammonium	4.54 ± 0.08	0.52 ± 0.02	50	51	14.4
SA-PTMA ₁₀₀	SWy-2	phenyltrimethylammonium	6.70 ± 0.06	0.82 ± 0.01	100	82	14.6
SA-HDTMA ₅₀	SWy-2	hexadecyltrimethylammonium	9.74 ± 0.04	0.56 ± 0.01	50	58	16.6p
SA-HDTMA ₁₀₀	SWy-2	hexadecyltrimethylammonium	14.84 ± 0.02	0.84 ± 0.01	100	93	18.0
SAz-1 (untreated)	SAz-1	none	< 0.1	< 0.05	0	0	n.d.
SAz-1 (blank)	SAz-1	none	< 0.1	< 0.05	0	0	15.2
SA-CAR ₅₀	SAz-1	L-carnitine	4.10 ± 0.01	0.64 ± 0.01	100	41	14.8
SA-SPERM ₅₀	SAz-1	spermine	2.12 ± 0.01	0.87 ± 0.01	50	53	13.1p
SA-SPERM ₁₀₀	SAz-1	spermine	3.78 ± 0.02	1.55 ± 0.01	100	96	13.0
SA-HEXADIM ₅₀	SAz-1	hexadimethrine	4.76 ± 0.12	0.76 ± 0.02	50	47	14.2p
SA-HEXADIM ₁₀₀	SAz-1	hexadimethrine	6.52 ± 0.04	1.36 ± 0.01	100	88	14.2
SA-TYRAM ₅₀	SAz-1	tyramine	3.02 ± 0.10	0.40 ± 0.01	50	25	15.0
SA-TYRAM ₁₀₀	SAz-1	tyramine	5.28 ± 0.12	0.79 ± 0.05	100	50	15.0
SA-PTMA ₅₀	SAz-1	phenyltrimethylammonium	6.85 ± 0.02	0.84 ± 0.01	50	54	15.1
SA-PTMA ₁₀₀	SAz-1	phenyltrimethylammonium	9.58 ± 0.07	1.19 ± 0.01	100	79	15.0
SA-HDTMA ₅₀	SAz-1	hexadecyltrimethylammonium	14.51 ± 0.03	0.85 ± 0.01	50	60	17.3p
SA-HDTMA ₁₀₀	SAz-1	hexadecyltrimethylammonium	22.50 ± 0.01	1.29 ± 0.01	100	101	24.0

^a Organic cation saturation: percentage of the CEC of the montmorillonite occupied by organic cations (calculated from the N content). ^b Basal spacing values for air-dried oriented specimens. (p indicates a poorly defined basal diffraction.) ^c Not determined.

SWy-2 (CEC_{SWy-2} = 764 mmol kg⁻¹) or SAz-1 (CEC_{SAz-1} = 1200 mmol kg⁻¹) was dissolved in 50 mL of 1 mM HNO₃ and added to 1 g of clay mineral. The suspensions were shaken for 24 h, centrifuged, washed 3 times with 100 mL of distilled water, and then freeze-dried. Blank clay samples were also prepared by shaking 1 g of montmorillonite in 50 mL of 1 mM HNO₃ for 24 h, washing three times with 100 mL of distilled water, and then freeze-drying. The HDTMA- and PTMA-montmorillonites were prepared as described in Celis et al. (8).

Characterization of the Adsorbents. Elemental analyses of the unexchanged and exchanged montmorillonite samples were performed using a Perkin-Elmer, model 1106 elemental analyzer (Perkin-Elmer Corp., Norwalk, CT). X-ray diffraction patterns were obtained on oriented specimens using a Siemens D-5000 diffractometer (Siemens, Stuttgart) with CuK_α radiation. The oriented specimens were either air-dried or dried at 200 °C and then cooled down to room temperature before X-ray diffraction measurements. To minimize rehydration of the samples, sample cooling was carried out inside a desiccator, and the time elapsed from heating to recording was as low as 5 min. Fourier-transform infrared (FTIR) spectra were recorded on KBr disks using a Nicolet 5 PC spectrometer (Nicolet Instrument Corp., WI). Thermal analyses were conducted in a Setaram TG-DTA 92 apparatus, model 1618, using a 15 mg sample diluted with 35 mg of Al₂O₃. Differential thermal analyses (DTA) and thermogravimetric analyses (TG) were performed in air between room temperature and 900 °C using a heating rate of 10 °C/min.

Adsorption-Desorption Experiments. The adsorption of terbutylazine, diuron and MCPA by the untreated and modified montmorillonite samples was measured at a single initial concentration C_{ini} = 1 mg L⁻¹ using the batch equilibration procedure. Triplicate 20 mg adsorbent samples were equilibrated by shaking for 24 h at 20 ± 2 °C with 8 mL of a 1 mg L⁻¹ herbicide solution, prepared in distilled water from a 200 mg L⁻¹ herbicide solution prepared in methanol. After equilibration, the suspensions were centrifuged and 4 mL of the supernatant solution was removed for analysis. The concentration of herbicide in the supernatant solutions (C_a) was determined by high performance liquid chromatography (HPLC) as described below. Herbicide solutions without adsorbent were also shaken for 24 h and served as controls. The percentage of herbicide adsorbed (%Ads) by

the different adsorbents was calculated by using the following formula: %Ads = [(C_{ini} - C_a)/C_{ini}] × 100.

Adsorption-desorption isotherms of terbutylazine, diuron, and MCPA on selected samples were also obtained. Duplicate 20 mg adsorbent samples were equilibrated with 8 mL of herbicide initial solutions (C_{ini} = 0.1, 0.2, 1, and 2 mg L⁻¹) by shaking mechanically at 20 ± 2 °C for 24 h. After equilibration, the suspensions were centrifuged, and 4 mL of the supernatant solutions was removed for analysis. The herbicide concentration in the supernatant solutions was determined by HPLC. The amount of herbicide adsorbed was calculated from the difference between the initial and the equilibrium solution concentrations. Desorption was measured immediately after adsorption from the highest equilibrium point of the adsorption isotherm, that is, that corresponding to the initial concentration 2 mg L⁻¹. The 4 mL of supernatant removed for the adsorption analysis was replaced with 4 mL of distilled water. After shaking at 20 ± 2 °C for 24 h, the suspensions were centrifuged, and the herbicide concentration was determined in the supernatant. This desorption procedure was repeated three times.

Herbicide Analysis. Terbutylazine, diuron, and MCPA were analyzed by HPLC using a Waters 600E chromatograph coupled to a Waters 996 diode-array detector. The analytical conditions were Novapak C18 column (150 mm length × 3.9 mm i.d.); eluent mixture, 50:50 acetonitrile/water for terbutylazine, 40:60 acetonitrile/water for diuron, and 60:40 methanol/diluted H₃PO₄ (pH 2) for MCPA, at a flow rate of 1 mL min⁻¹; 25 μL injection volume; and UV detection at 220 nm for terbutylazine, 250 nm for diuron, and 230 nm for MCPA. External calibration curves with four standard solutions between 0.1 and 2 mg L⁻¹ were used in the calculations.

RESULTS AND DISCUSSION

Elemental Analysis. The C and N contents of the unexchanged and exchanged montmorillonite samples are given in Table 1. The actual percentage of the CEC of SWy-2 and SAz-1 occupied by organic cations (Table 1) was calculated from the N content of the samples. The amounts of spermine, hexa-

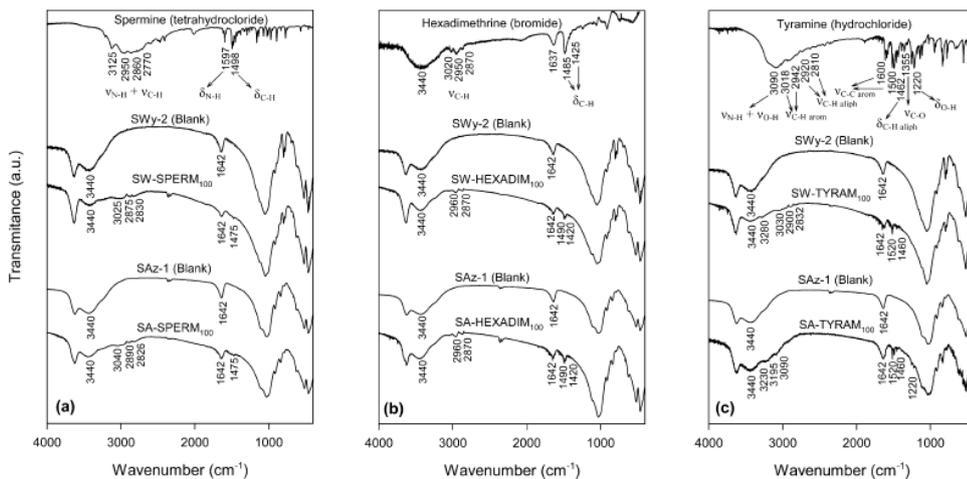


Figure 2. Fourier transform infrared spectra of selected organic cations and unmodified and modified montmorillonite samples.

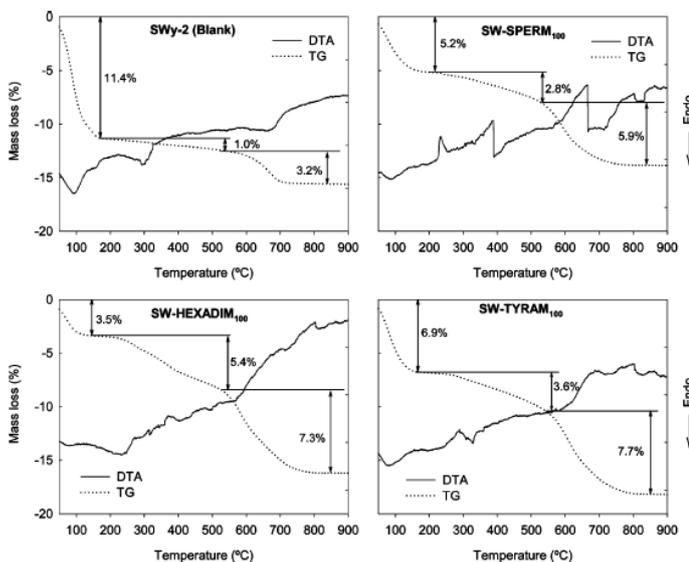


Figure 3. Thermogravimetric (TG) and differential thermal analysis (DTA) of SWy-2 samples modified with spermine, hexadimethrine, and tyramine.

dimethrine, phenyltrimethylammonium, and hexadecyltrimethylammonium present in the samples were close to those added during synthesis. In contrast, carnitine and tyramine displayed some resistance to reacting with SWy-2 and SAz-1, as their amount in the modified clays was considerably lower than that added during synthesis. These results are in accordance with those recently reported by Cruz-Guzmán et al. (16, 17), where small, monovalent polar organic cations were found to display greater resistance to reacting with smectites compared to polyvalent or larger organic cations. Also in accordance with Cruz-Guzmán et al. (17), the results in Table 1 show that the resistance of carnitine and tyramine to reacting with the

montmorillonites is exacerbated for SAz-1 as compared to SWy-2. This is probably due to the presence of Ca^{2+} as the main natural inorganic cation in SAz-1 because Ca^{2+} is more difficult to displace than Na^+ cations in SWy-2 (20).

FTIR Spectroscopy. The FTIR spectra of SWy-2 and SAz-1 treated with spermine, hexadimethrine, and tyramine together with those of the blank clay samples and the pure organic cations are shown in Figure 2. Band assignment was carried out on the basis of Bellamy (21). The appearance of new peaks in the infrared spectra of the exchanged clay samples compared to those present in the spectra of the blank clays provided further evidence for the presence of the organic cations in the modified

clays. In addition, the intensity of the band at about 3440 cm^{-1} , corresponding to the hydration water of montmorillonite, indicated a reduction in hydration water of the clays after treatment with spermine, hexadimethrine, and tyramine cations. This finding is consistent with the fact that organic cations on exchange sites of clay minerals are normally less hydrated than inorganic exchange cations (16).

The group of bands between 3125 and 2770 cm^{-1} in the FT-IR spectrum of pure spermine (Figure 2a) can be assigned to the N-H stretching vibration of the protonated $-\text{NH}_3^+$ and $-\text{NH}_2^+$ groups and to the C-H stretching vibrations of the $-\text{CH}_2-$ groups (Figure 1). The bands close to 1600 and 1500 cm^{-1} can be assigned to N-H and C-H deformation modes, respectively. All these bands were also identified in the FT-IR spectra of SW-SPERM₁₀₀ and SA-SPERM₁₀₀, although those located at about 1600 cm^{-1} were obscured by the deformation vibration of the hydration water of the clay, located at 1642 cm^{-1} . The shift of the N-H and C-H vibration bands upon the interaction of spermine with SWy-2 and SAz-1 reveals some involvement of these groups in the interaction with the clays.

The bands between 3020 and 2870 cm^{-1} in the FT-IR spectrum of pure hexadimethrine (Figure 2b) can be assigned to the C-H stretching vibration of the $-\text{CH}_2-$ and $-\text{CH}_3$ groups, the corresponding C-H deformation modes appearing at 1485 cm^{-1} ($-\text{CH}_2-$) and 1425 cm^{-1} ($-\text{CH}_3$). The bands at 3440 and 1637 cm^{-1} correspond, respectively, to the O-H stretching and O-H deformation vibrations of hydration water and indicate the rapid uptake of water by hexadimethrine bromide in the KBr disk as a result of its highly hygroscopic character. The C-H stretching and deformation vibrations of hexadimethrine were also identified in the FT-IR spectra of SW-HEXADIM₁₀₀ and SA-HEXADIM₁₀₀ at 2960 and 2870 cm^{-1} (C-H stretch) and at 1490 and 1420 cm^{-1} (C-H deformation). They were only slightly shifted compared to their position in the pure compound.

The broad absorption band at about 3090 cm^{-1} in the FT-IR spectrum of tyramine (Figure 2c) can be assigned to the N-H stretching vibration of the $-\text{NH}_3^+$ group and the O-H stretching vibration of the phenolic group, where intermolecular bonding results in shifting of the stretching vibration toward lower wavenumbers compared to typical values for free phenolic groups. Bands corresponding to aromatic C-H stretching vibration modes appeared near 3000 cm^{-1} , whereas those corresponding to aliphatic C-H were identified at 2920 and 2810 cm^{-1} . The bands appearing at about 1600 and 1500 cm^{-1} can be assigned to the aromatic C-C stretching vibrations, although the N-H deformation mode of $-\text{NH}_3^+$ could have contributed to the band located at 1600 cm^{-1} . Bands corresponding to the C-H deformation vibration of $-\text{CH}_2-$ groups (1462 cm^{-1}) and to the C-O stretching (1355 cm^{-1}) and O-H deformation (1220 cm^{-1}) vibrations of the phenolic group were also identified (Figure 2c). Most of these vibration bands of tyramine were identified in the spectra of SW-TYRAM₁₀₀ and SA-TYRAM₁₀₀.

Thermal Analysis. In accordance with the previously reported thermal behavior of organoclay complexes (22, 23), the thermal decomposition of SW-SPERM₁₀₀, SW-HEXADIM₁₀₀, and SW-TYRAM₁₀₀ took place in three steps (Figure 3). A first mass-loss step is observed between room temperature and about 150 °C and can be attributed to the dehydration of adsorption water associated with the clay and with the interlayer cation. This first mass-loss is considerably greater for the unmodified SWy-2 sample than for the modified clays, probably revealing lower hydration of the organic cations compared to

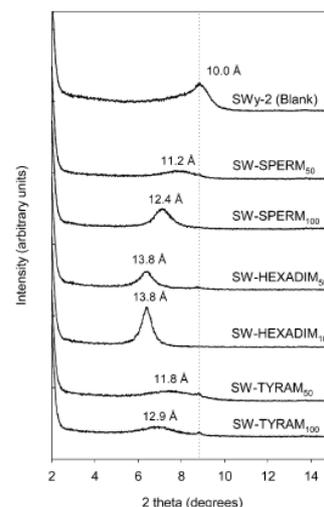


Figure 4. X-ray diffraction patterns of oriented specimens of SWy-2 samples modified with spermine, hexadimethrine, and tyramine dried at 200 °C .

the original Na^+ ions in the unmodified SWy-2 sample. A second mass-loss step is observed over the temperature range 200 – 550 °C and is assigned to the loss of organic cation. Accordingly, the magnitude of this second mass-loss was directly related to the organic carbon content of the samples: SW-HEXADIM₁₀₀ > SW-TYRAM₁₀₀ > SW-SPERM₁₀₀ > SWy-2 (Blank) (Table 1). The third mass-loss is ascribed to dehydroxylation of the mineral and occurs over the temperature range 550 – 700 °C .

X-ray Diffraction. The basal spacing values, d_{001} , for air-dried oriented specimens of the exchanged montmorillonite samples together with those of the blank SWy-2 and SAz-1 montmorillonites are included in Table 1. The low d_{001} values recorded for the samples modified with carnitine, spermine, hexadimethrine, and tyramine are consistent with the small size of carnitine and tyramine, and strongly suggest the arrangement of spermine and hexadimethrine forming a horizontal monolayer within the clay interlayers (15, 24, 25). The decrease in the basal spacing of SWy-2 and SAz-1 upon treatment with these organic cations (Table 1) can be attributed to the replacement of the inorganic interlayer cation and its hydration water by less hydrated organic cations (9, 16). This observation is consistent with the decrease in the intensity of the IR vibration band corresponding to the hydration water of montmorillonite (3440 cm^{-1}) after treatment with spermine, hexadimethrine, and tyramine (Figure 2), and also with the magnitude of the first mass-loss step observed during thermal decomposition of the samples (Figure 3). After heating at 200 °C (Figure 4), the blank SWy-2 sample collapsed ($d_{001} \approx 10.0\text{ Å}$), whereas the exchanged clays showed some resistance to collapse ($d_{001} > 10.0\text{ Å}$), confirming the presence of the organic cations in the clay interlayers (9, 16). Very similar results were obtained for the SAz-1 samples heated at 200 °C , although the basal diffraction of unexchanged SAz-1 dried at 200 °C was not well defined, presumably because of its high CEC, which may have produced a heterogeneous layer distribution after heating or a partial rehydration of the sample during X-ray diffraction

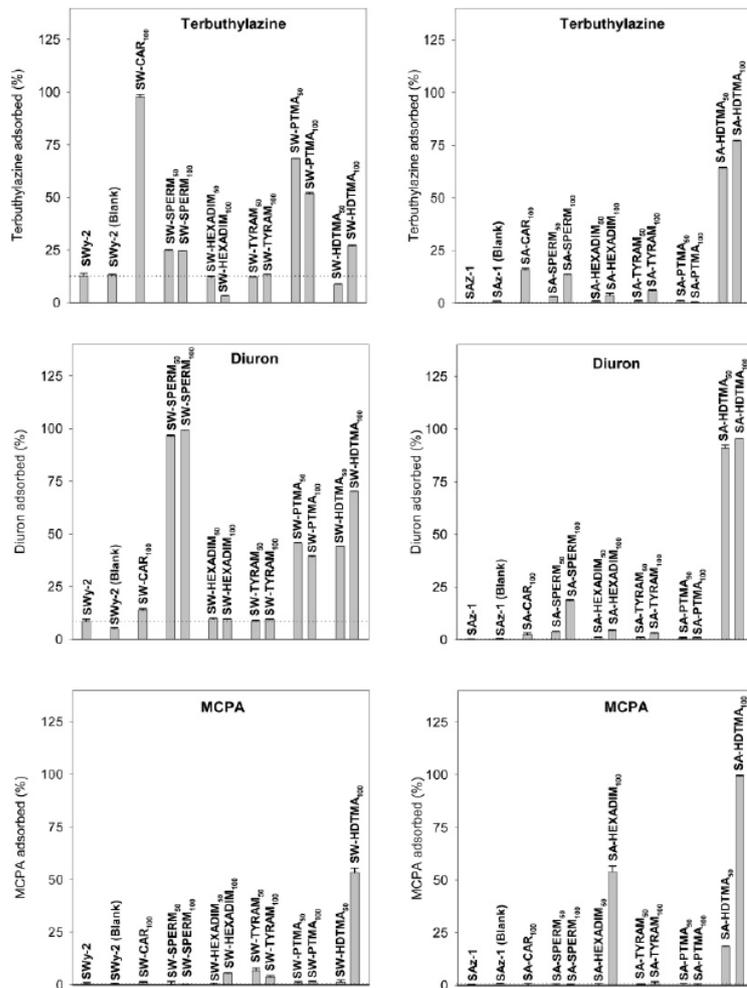


Figure 5. Percentage of terbutylazine, diuron, and MCPA adsorbed by unmodified and modified montmorillonites at an initial herbicide concentration of 1 mg L^{-1} .

analysis (17). The d_{001} values obtained for the montmorillonites exchanged with PTMA and HDTMA (Table 1) are in agreement with previously reported values for these organoclay (15, 25, 26). PTMA exists as discrete species in the interlayers of SWy-2 and SAz-1, resulting in basal spacings of about 14–15 Å. HDTMA forms a bilayer structure ($d_{001} \approx 18 \text{ Å}$) in low-charge montmorillonites such as SWy-2 and a paraffinic structure ($d_{001} \approx 24 \text{ Å}$) in the high-charge montmorillonite SAz-1 (Table 1).

Adsorption–Desorption Experiments. Figure 5 shows the percentage of terbutylazine, diuron, and MCPA adsorbed by the unmodified and modified montmorillonites at a single initial concentration of 1 mg L^{-1} . Adsorption isotherms of the herbicides on selected samples are shown in Figure 6. In all cases, the pH of the equilibrated clay–herbicide suspensions

was greater than 5 so that the molecular forms of terbutylazine ($\text{p}K_{\text{a}} = 2.0$) and diuron and the anionic form of MCPA ($\text{p}K_{\text{a}} = 3.1$) should have predominated during the adsorption experiments. Different degrees of improvement of the adsorbent properties of the modified montmorillonites were observed for all three herbicides, depending on the nature of the organic cation, the type of clay, and the amount of organic cation in the samples.

In general, all three herbicides displayed a great affinity for SAz-1 exchanged with HDTMA and moderate to low affinity for SAz-1 exchanged with the other organic cations (Figures 5 and 6). This can be explained by the paraffinic ($d_{001} > 22 \text{ Å}$) structure resulting from incorporation of HDTMA cations in SAz-1, in particular at high organic cation loadings, which

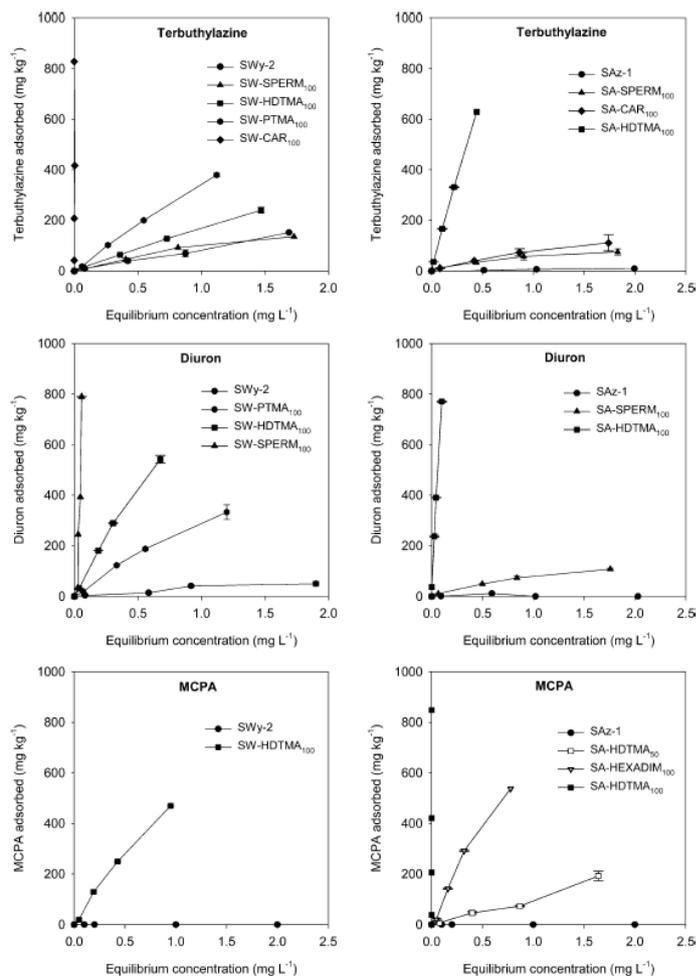


Figure 6. Adsorption isotherms of terbuthylazine, diuron, and MCPA on selected samples.

creates a wide interlayer organic phase with a strong affinity for herbicides. The small basal spacing combined with the proximity of two adjacent cations resulting from the incorporation of the other organic cations in the interlayers of the high-charge montmorillonite SAz-1 results, in general, in little internal space being available for herbicide adsorption (17). Nevertheless, certain organic cations led to some enhancement of the adsorption of terbuthylazine, diuron, and MCPA by SAz-1, mostly at high organic cation loadings (Figure 5). This is presumably due to interactions of the pesticides with the organic cations at external surfaces of the modified clays (17).

For samples prepared from the low-charge montmorillonite SWy-2, modification with carnitine and spermine resulted in organoclays with very strong affinities for terbuthylazine and diuron, respectively, whereas modification with the alkylammonium cations, PTMA and HDTMA, resulted in

organoclays with moderate affinity for these herbicides (Figures 5 and 6). The high affinity of terbuthylazine for carnitine-exchanged SWy-2 can be attributed to the weakly basic character of terbuthylazine ($pK_a = 2.0$), which allows an acid–base interaction with the carboxylic group of carnitine. This mechanism has been demonstrated to be responsible for the extensive adsorption of the herbicide simazine by carnitine-treated SWy-2 (16). However, the great affinity of diuron for spermine-exchanged SWy-2 could be a combination of (i) hydrogen bonding between the C=O group of the herbicide and the $-NH_3^+/-NH_2^+$ groups of spermine and (ii) hydrophobic interactions between the herbicide and the alkyl chains of spermine (Figure 1). Polar interactions between C=O groups of pesticides and the protonated amino group of primary amines have been shown to contribute to pesticide adsorption by organoclays (12, 13). However, we believe that the alkyl chains

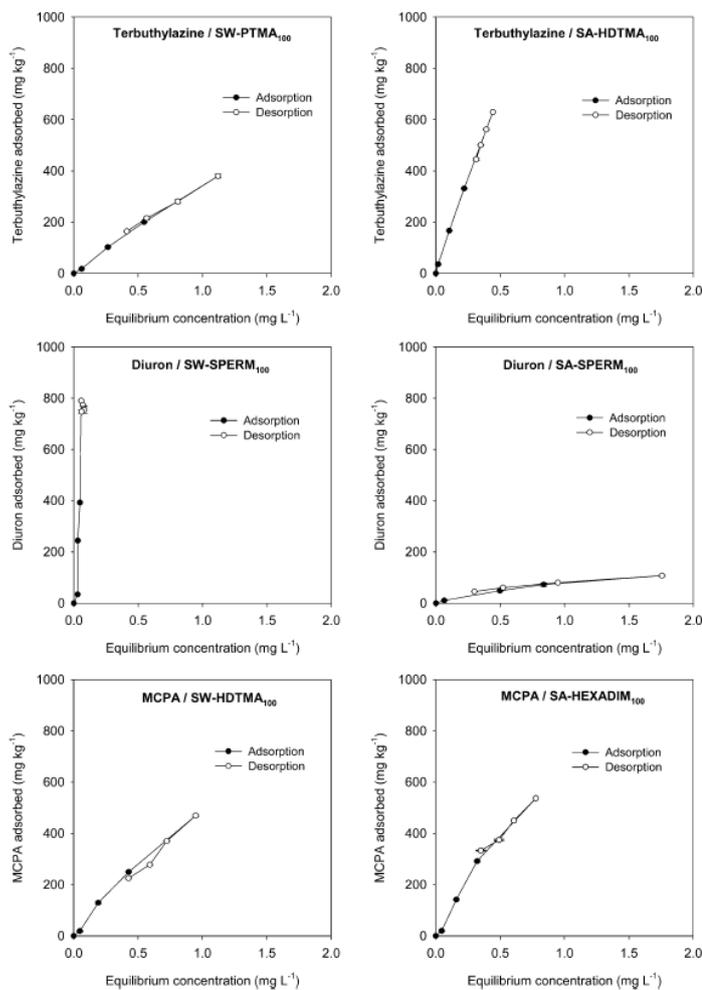


Figure 7. Adsorption-desorption isotherms of terbutylazine, diuron, and MCPA on selected samples.

of spermine probably contributed to stabilize the interaction of diuron with spermine-exchanged SWy-2 because tyramine (also containing an NH_3^+ group) did not provide SWy-2 with such a high affinity for diuron. Independent of the operating mechanism, our results illustrate how the chemical characteristics of the organic cation represent a major factor in determining the performance of organoclays as adsorbents of the assayed herbicides.

The low adsorption of MCPA by most SWy-2 samples (Figure 5) is related to the anionic character of this herbicide at the pH of the equilibrated suspensions ($\text{pH} > 5$). Only HDTMA, when incorporated at 100% of the CEC of the clay mineral, provided SWy-2 with some affinity for MCPA, but this effect was considerably less than that observed after the incorporation of HDTMA cations in the high-charge montmo-

rillonite SAz-1 (Figures 5 and 6). This is because the paraffinic structure of SA-HDTMA₁₀₀ provides a better medium for the adsorption of MCPA than the bilayer structure of SW-HDTMA₁₀₀. These results are very similar to those previously reported for the adsorption of other anionic pesticides by SWy-2 and SAz-1 exchanged with HDTMA cations (17, 27, 28).

Desorption isotherms of terbutylazine, diuron, and MCPA on selected adsorbents were obtained, and in general, a reversible behavior was observed (Figure 7). Nevertheless, it should be noted that cases of very high adsorption, such as the adsorption of diuron by SW-SPERM₁₀₀, resulted in ill-defined desorption isotherms because the very low solution concentrations complicated the desorption analysis (29). The observed reversible behavior of most of our systems would be advantageous in terms of recyclability of the adsorbent once used for water decon-

tamination and also from the point of view of using the adsorbents as supports in the design of slow release formulations of the assayed herbicides (13).

In summary, modification of the montmorillonites SWy-2 and SAZ-1 with certain organic cations rendered organoclays with excellent affinities for terbuthylazine, diuron, and MCPA. For instance, all three herbicides displayed very strong affinities for SAZ-1 exchanged with HDTMA cations, particularly when HDTMA was incorporated at 100% of the CEC of the clay mineral. Terbuthylazine and diuron also displayed very strong affinities for SWy-2 exchanged with L-carnitine and spermine, respectively. These adsorbents could therefore find application in the removal of the assayed herbicides from contaminated water or as potential supports for the development of slow release formulations of the assayed herbicides, with the purpose of attenuating their environmental impact once applied to soil. The general reversible adsorption-desorption behavior observed for our systems appears to be an interesting property in terms of recyclability of the adsorbents and also from the point of view of the potential use of the adsorbents as supports for the slow release of herbicides.

ABBREVIATIONS USED

MCPA, 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid; FTIR, Fourier-transform infrared; HPLC, high performance liquid chromatography; CAR, L-carnitine; SPERM, spermine; HEXADIM, hexadimethrine, TYRAM, tyramine; PTMA, phenyltrimethylammonium; HDTMA, hexadecyltrimethylammonium; SWy-2, Wyoming montmorillonite; SAZ-1, Arizona montmorillonite; CEC, cation exchange capacity.

ACKNOWLEDGMENT

We thank F. Bruna for his help in obtaining the thermal analysis data.

LITERATURE CITED

- Albarrán, A.; Celis, R.; Hermosin, M. C.; López-Piñero, A.; Ortega-Calvo, J. J.; Cornejo, J. Effects of solid olive-mill waste addition to soil on sorption, degradation and leaching of the herbicide simazine. *Soil Use Manag.* **2003**, *19*, 150–156.
- Santiago-Mora, R.; Martín-Laurent, F.; de Prado, R.; Franco, A. R. Degradation of simazine by microorganisms isolated from soils of Spanish olive fields. *Pest Manag. Sci.* **2005**, *61*, 917–921.
- Gerstl, Z.; Nasser, A.; Mingelgrin, U. Controlled release of pesticides into soils from clay-polymer formulations. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 3797–3802.
- Boyd, S. A.; Shaobai, S.; Lee, J. F.; Mortland, M. M. Pentachlorophenol sorption by organo-clays. *Clays Clay Miner.* **1988**, *36*, 125–130.
- González-Pradas, E.; Villafranca-Sánchez, M.; Gallego-Campo, A.; Ureña-Amate, D.; Fernández-Pérez, M. Removal of atrazine from aqueous solution by natural and activated bentonite. *J. Environ. Qual.* **1997**, *26*, 1288–1291.
- Aguer, J. P.; Hermosin, M. C.; Calderón, M. J.; Cornejo, J. Fenuron sorption by homoionic natural and modified smectites. *J. Environ. Sci. Health, Part B* **2000**, *35*, 279–296.
- Cox, L.; Celis, R.; Hermosin, M. C.; Cornejo, J. Natural soil colloids to retard simazine and 2,4-D leaching in soil. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 93–99.
- Celis, R.; Hermosin, M. C.; Carrizosa, M. J.; Cornejo, J. Inorganic and organic clays as carriers for controlled release of the herbicide hexazinone. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 2324–2330.
- Celis, R.; Hermosin, M. C.; Cornejo, J. Heavy metal adsorption by functionalized clays. *Environ. Sci. Technol.* **2000**, *34*, 4593–4599.
- Lagaly, G. Pesticide-clay interactions and formulations. *Appl. Clay Sci.* **2001**, *18*, 205–209.
- Rehab, A.; Akeleh, A.; Agag, T.; Shalaby, N. Preparation and characterization of polyurethane-organoclay nanocomposites. *Polym. Compos.* **2007**, *28*, 108–115.
- Hermosin, M. C.; Cornejo, J. Binding mechanism of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid by organoclays. *J. Environ. Qual.* **1993**, *22*, 325–331.
- Celis, R.; Koskinen, W. C.; Hermosin, M. C.; Ulibarri, M. A.; Cornejo, J. Triadimefon interactions with organoclays and organohydrotalcites. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **2000**, *64*, 36–43.
- Sanchez-Martin, M. J.; Rodriguez-Cruz, M. S.; Andrades, M. S.; Sanchez-Camazano, M. J. Efficiency of different clay minerals modified with a cationic surfactant in the adsorption of pesticides: influence of clay type and pesticide hydrophobicity. *Appl. Clay Sci.* **2006**, *31*, 216–228.
- Jaynes, W. F.; Boyd, S. A. Clay mineral type and organic compound sorption by hexadecyltrimethylammonium exchanged clays. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **1991**, *55*, 43–48.
- Cruz-Guzmán, M.; Celis, R.; Hermosin, M. C.; Cornejo, J. Adsorption of the herbicide simazine by montmorillonite modified with natural organic cations. *Environ. Sci. Technol.* **2004**, *38*, 180–186.
- Cruz-Guzmán, M.; Celis, R.; Hermosin, M. C.; Koskinen, W. C.; Cornejo, J. Adsorption of pesticides from water by functionalized organobentonites. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 7502–7511.
- El-Nahhal, Y.; Nir, S.; Serban, C.; Rabinovitch, O.; Rubin, B. Montmorillonite-phenyltrimethylammonium yields environmentally improved formulations of hydrophobic herbicides. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 4791–4801.
- Hermosin, M. C.; Calderón, M. J.; Aguer, J. P.; Cornejo, J. Organoclays for controlled release of the herbicide fenuron. *Pest Manag. Sci.* **2001**, *57*, 803–809.
- Theng, B. K. G.; Greenland, D. J.; Quirk, J. P. Adsorption of alkylammonium cations by montmorillonite. *Clay Miner.* **1967**, *7*, 1–17.
- Bellamy, L. J. *The Infrared Spectra of Complex Molecules*, 3rd ed; Chapman & Hall: London, 1975; Vol. I.
- Yariv, S. The role of charcoal on DTA curves of organo-clay complexes: an overview. *Appl. Clay Sci.* **2004**, *24*, 225–236.
- Xi, Y.; Ding, Z.; He, H.; Frost, R. L. Structure of organoclays: an X-ray diffraction and thermogravimetric analysis study. *J. Colloid Interface Sci.* **2004**, *277*, 116–120.
- Lagaly, G. Layer charge heterogeneity in vermiculites. *Clays Clay Miner.* **1982**, *30*, 215–222.
- Roberts, M. G.; Li, H.; Teppen, B.; Boyd, S. A. Sorption of nitroaromatics by ammonium- and organic ammonium-exchanged smectite: shifts from adsorption/complexation to a partition-dominated process. *Clays Clay Miner.* **2006**, *54*, 426–434.
- Jaynes, W. F.; Boyd, S. A. Hydrophobicity of siloxane surfaces in smectites as revealed by aromatic hydrocarbon adsorption from water. *Clays Clay Miner.* **1991**, *39*, 428–436.
- Celis, R.; Koskinen, W. C.; Cecchi, A. M.; Bresnahan, G. A.; Carrisoza, M. J.; Ulibarri, M. A.; Pavlovic, I.; Hermosin, M. C. Sorption of the ionisable pesticide imazamox by organo-clays and organohydrotalcites. *J. Environ. Sci. Health, Part B* **1999**, *34*, 929–941.
- Cruz-Guzmán, M. Estudio de Coloides Naturales y Modificados como Adsorbentes para la Reducción de la Contaminación de Suelos y Aguas. Ph.D. Thesis, University of Seville, Spain, 2004.
- Barriuso, E.; Laird, D. A.; Koskinen, W. C.; Dowdy, R. H. Atrazine desorption from smectites. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **1994**, *58*, 1632–1638.

JF070709Q

Alegría Cabrera¹
 Carmen Trigo¹
 Lucía Cox¹
 Rafael Celis¹
 Juan Cornejo¹

¹Instituto de Recursos Naturales y
 Agrobiología de Sevilla (IRNAS), CSIC,
 Sevilla, Spain.

Research Article

A Comparative Study of the Use of Organoclay-Based Formulations and Organic Amendment to Reduce the Leaching of the Herbicide MCPA in Soil

MCPA (4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid) is an acidic herbicide widely used on olive crops in Spain. Due to its anionic form at natural soil pH, there is high risk of leaching and groundwater contamination by the use of this herbicide. The aim of this work was to study the effects of organoclay-based formulations of MCPA and olive oil waste amendment on MCPA leaching in a sandy loam soil. For this purpose, batch adsorption and column leaching studies were performed. The organoclays used to prepare the clay-based formulations of MCPA were obtained by treating Wyoming montmorillonite (SWy-2) and Arizona montmorillonite (SAz-1) with an amount of hexadecyltrimethylammonium (HDTMA) cation equal to 100% of the CEC of the montmorillonites. The organic residue used in this study was a solid waste from olive oil production (olive oil waste, OOW). The soil was amended with the organic residue at the rate of 10% (w/w). Batch release and column leaching studies indicated that organoclay-based formulations of MCPA reduced the release rate and the leaching of the herbicide as compared to the use of a conventional formulation containing the herbicide in an immediately available form. The increase in soil organic matter of the soil upon amendment with the organic residue also resulted in greater adsorption and reduced leaching of MCPA in the soil. Accordingly, both the use of organoclay-based formulations and the amendment of soil with OOW are proposed as efficient strategies to reduce extensive leaching losses associated with the application of MCPA in high-risk scenarios, such as Mediterranean olive groves.

Keywords: Herbicide leaching; MCPA; Olive oil waste; Organoclays; Soil

Received: July 17, 2008; *revised:* September 10, 2008; *accepted:* October 1, 2008

DOI: 10.1002/clean.200800159

1 Introduction

Surface and groundwater contamination by herbicides used in olive groves in Spain and other Mediterranean countries has become a serious issue, and has led authorities to prohibit or restrict the application of widely used active ingredients, e.g., simazine, diuron, terbutylazine, or MCPA [1]. In olive groves, conditions that favor offsite movement of the applied herbicides predominate. Soil texture, pronounced slopes, and climatic conditions favor losses of herbicide by leaching and runoff processes. To compensate for such losses, herbicides need to be applied in concentrations greatly exceeding those strictly required for weed control, and the excessive quantities added increase the risk of surface and groundwater pol-

lution. In this context, there is a need to develop strategies directed to preventing water pollution by herbicides applied to olive groves, particularly in high-risk scenarios such as Mediterranean areas [2].

The use of slow release formulations has been demonstrated to be an efficient strategy to reduce the environmental impact of soil-applied pesticides. Beneficial effects related to the use of slow release formulations include reduced mobility of the active ingredient, reduction in the amount of chemical required for pest control, savings in manpower and energy from the reduction of the number of applications required in comparison to conventional formulations, increased safety for the pesticide applicator, and a general decrease in non-target effects [3]. Organoclays, i.e., natural clay minerals with their original inorganic exchange cations replaced with organic cations, have been shown to be very good adsorbents for different classes of pesticides, and therefore, have been proposed as carriers for the design of slow release formulations of pesticides [4–7].

Soils of low organic carbon content have a low capacity for retarding pesticide mobility [8], since soil organic matter is the primary adsorbent for pesticides and adsorption is one of the main processes reducing the level of pesticide leaching in soil [9]. Organic amendments can be used to modify the surfaces of soils and subsurface

Correspondence: Prof. J. Cornejo, Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla (IRNAS), CSIC, Avenida Reina Mercedes 10, Apartado 1052, 41080 Sevilla, Spain.
 E-mail: cornejo@irmase.csic.es

Abbreviations: HDTMA, Hexadecyltrimethylammonium; MCPA, 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid; OOW, Olive oil waste; SA-HDTMA, HDTMA-treated Arizona montmorillonite; SW-HDTMA, HDTMA-treated Wyoming montmorillonite

materials, promoting adsorption and reducing groundwater contamination by pesticides [10, 11]. Furthermore, the addition of organic amendments modifies soil chemical and biological conditions, which can affect degradation and, in some cases, accelerate this process [11–13], reducing the total amount of chemical potentially available for leaching. The new technologies for olive-oil extraction generate a solid residue rich in organic matter. This olive oil waste (OOW) is generated in great amounts in Spain (4,000,000 Mg/year), and represents a major environmental problem. Soil incorporation of OOW has been shown to increase fertility and control erosion [14, 15], but also to reduce pesticide leaching [16].

In this work, batch and column leaching experiments were designed to assess and compare the ability of organoclay-based formulations and the application of OOW to soil to reduce the leaching of the herbicide MCPA in a Mediterranean sandy loam soil. MCPA was selected since it is a highly mobile herbicide commonly used in high risk scenarios of surface and groundwater contamination, such as Mediterranean olive groves.

2 Materials and Methods

2.1 Herbicide

Analytical grade MCPA (purity = 98.9%) from Riedel-de Haën (Germany) was used to prepare the clay-based formulations of the herbicide, the initial herbicide solutions used in the adsorption experiments, and the external standards for herbicide analysis. Commercial MCPA, amine salt 60% soluble concentrate (SL) from Tratamientos Guadalquivir S.L. (Spain), was used as a reference standard formulation in the release and leaching experiments.

2.2 Soil and Organic Amendment

The soil used in the experiments was a sandy loam soil (0–20 cm) with 73% sand, 7% silt and 20% clay sampled from an experimental olive field located in Seville (Spain). It contained 1.0% CaCO₃ and 1.62% organic matter. The pH measured in a 1:2 (w/w) soil:deionized water suspension was 8.2. The organic amendment used was a fresh, uncomposted olive oil waste (OOW). The properties of this organic waste are: pH 5.8, 93.2% organic matter, 25 g/kg dissolved organic carbon, and a C/N ratio of 18.3. The soil was amended in the laboratory with OOW at the rate of 10% (w/w).

2.3 Organoclays and Organoclay-Based Formulations of MCPA

The organoclays used in this work, i.e., SWHDTMA and SAHDTMA, were prepared by treating Na-rich SWy-2 Wyoming montmorillonite and Ca-rich SAz-1 Arizona montmorillonite with an ethanol/

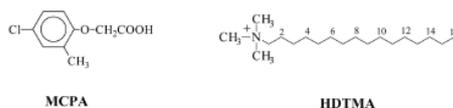


Figure 1. Chemical structures of MCPA and HDTMA.

water (50:50) solution containing an amount of hexadecyltrimethylammonium (HDTMA) cation, Fig. 1, as the chloride salt, equal to the cation exchange capacity (CEC) of the montmorillonites [6]. The CEC of SWy-2 and SAz-1 are 74.6 and 120 cmol/kg, respectively. Additional physicochemical properties of SWy-2 and SAz-1 can be found in van Olphen and Fripiat [17]. The suspensions were shaken for 24 h, centrifuged, washed with distilled water until Cl⁻-free, and then lyophilized. Some characteristics of the resultant organoclays are given in Tab. 1. The percentage of the CEC occupied by HDTMA cations (OCIS) was calculated from the N-content of the samples, determined by elemental analysis. The basal spacing values, d_{001} , were measured on air-dried oriented specimens in a Siemens D5000 diffractometer using CuK α radiation.

The organoclay-based formulations of MCPA were prepared by treating 400 mg of organoclay (SW-HDTMA or SA-HDTMA) with 160 mL of an aqueous solution of MCPA. The concentration of MCPA in solution was 600 mg/L for SW-HDTMA and 200 mg/L for SA-HDTMA, in order to achieve similar herbicide content in both formulations. Extractions with a 60:40 methanol:diluted H₃PO₄ (pH = 2) mixture revealed that the final amounts of MCPA adsorbed on SWHDTMA and SAHDTMA were 6.5 and 5.6%, respectively.

2.4 Batch Adsorption Isotherms

Adsorption isotherms of MCPA on the organoclays and on unamended and amended soil were obtained by the batch equilibration procedure. MCPA adsorption isotherms on the organoclays were obtained by shaking suspensions containing 20 mg of organoclay and 8 mL of MCPA aqueous solutions with initial herbicide concentrations ranging between 0.1 and 2 mg/L at 20 ± 2 °C for 24 h. MCPA adsorption isotherms on unamended and amended soil were obtained in a similar manner by equilibrating 5 g of soil with 10 mL of MCPA solutions with initial herbicide concentrations ranging between 1 and 10 mg/L. After equilibration, the suspensions were centrifuged and 4 mL of the supernatant solutions was removed for analysis. The herbicide concentration in the supernatant solutions, C_e , was determined by high-performance liquid chromatography (HPLC) as described below. The amount of herbicide adsorbed in the soil and the organoclays, C_s , was calculated from the difference between the initial and the equilibrium solution concentrations.

Table 1. Some characteristics of the organoclays used as adsorbents of MCPA.

Organoclay	Montmorillonite	Organic cation	OCIS ^a	d_{001} ^b (Å)
SW-HDTMA	SWy-2	Hexadecyltrimethylammonium	93	18.0
SA-HDTMA	SAz-1	Hexadecyltrimethylammonium	100	24.0

^a Organic cation saturation: percentage of the CEC of the montmorillonites compensated by HDTMA cations (calculated from the N content of the organoclays)

^b d_{001} : basal spacing value for air-dried oriented specimens.

2.5 Kinetics of MCPA Release from the Organoclay-Based Formulations

Ten milligrams of organoclay-based formulations of MCPA were added to 250 mL of distilled water in glass bottles sealed with screw caps. At selected times, the bottles were hand-shaken, allowed to settle for 10 min, and then 3 mL of the supernatant solution was removed, filtered, and analyzed by HPLC to determine the MCPA concentration. The aqueous concentrations of MCPA expected assuming complete release of MCPA from SW-HDTMA and SA-HDTMA were 2.6 and 2.2 mg/L, respectively. These concentrations would be at the high end in comparison to those used in the batch adsorption isotherms. The release kinetics of MCPA from the standard commercial formulation was also measured for comparison purposes.

2.6 Column Leaching Experiment

Leaching was studied in glass columns of length 30 cm and i.d. 3.1 cm. The top 5 cm was filled with sea sand and the bottom 5 cm with sea sand plus glass wool, to prevent losses of soil during the experiment. The other 20 cm was hand packed with air-dried soil, either unamended or amended with OOW at a rate of 10%, which was then saturated with deionized water from the top, and allowed to drain for 24 h. The calculated pore volume of the columns after saturation was ca. 60 mL. The amount of MCPA corresponding to an application rate of 2 kg/ha (0.15 mg a.i.) was applied to the top of duplicate unamended soil columns either as organoclay-based formulations or as the commercial standard formulation. In a separate set of experiments, the commercial standard formulation of MCPA was added to the top of duplicate columns filled with either unamended or OOW-amended soil. Daily, 15 mL of deionized water was added to the top of the columns, the leachates were collected, and the concentration of MCPA in the leachates was determined by HPLC.

2.7 Herbicide Analysis

The herbicide MCPA was analyzed by HPLC using a Waters 600E chromatograph coupled to a Waters 996 diode-array detector. The analytical conditions were: Novapak C18 column (150 mm length · 3.9 mm i.d.), eluent mixture, 60:40 methanol:diluted H_3PO_4 (pH = 2) at a flow rate of 1 mL/min, 25 μ L injection volume, and UV detection at 230 nm. External calibration curves with standard solutions between 0.1 and 10 mg/L were used in the calculations.

3 Results and Discussion

3.1 Characteristics of the Organoclays

The amounts of hexadecyltrimethylammonium (HDTMA) present in the organoclays, Tab. 1, were calculated from the N-content of the samples, and were found to be close to the amounts of organic cation added during the synthesis. This reflects the success of the exchange reaction, as expected from the high affinity of montmorillonites for large alkylammonium cations such as HDTMA [18]. The basal spacing values, d_{001} , of air-dried oriented specimens of the organoclays, Tab. 1, indicated that the arrangement of HDTMA cations in the interlayers of SWy-2 and SAz-1 is dependent on the surface charge density of the montmorillonite. Thus, HDTMA formed

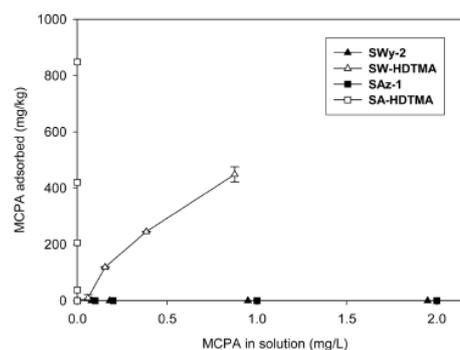


Figure 2. Adsorption isotherms of MCPA on organoclays (SW-HDTMA and SA-HDTMA) and unmodified clays (SWy-2 and SAz-1). Data were extracted from Celis et al. [2].

horizontal bilayers in the low-charge montmorillonite SWy-2 ($d_{001} \approx 18 \text{ \AA}$), whereas it formed a paraffinic structure, with vertical arrangement, in the high-charge montmorillonite SAz-1 ($d_{001} > 22 \text{ \AA}$) [19, 20]. Previous work has shown that large organic cations, e.g., HDTMA are strongly retained in the interlayers of montmorillonites. Solvents do not significantly displace the organic cation from the clay, and the structure is stable in the presence of high concentrations of metal cations [18].

3.2 Adsorption of MCPA on the Organoclays and Release from the Organoclay-Based Formulations

The organoclays used in this work (SW-HDTMA and SA-HDTMA) were selected on the basis of a preliminary adsorption-desorption study revealing their high affinity for the herbicide MCPA, see Fig. 2, and the low hysteresis of the adsorption-desorption isotherm found for SW-HDTMA, which are desirable features for the use of clays as supports for the slow release of pesticides [2]. In contrast, adsorption of MCPA by the untreated clays (SWy-2 and SAz-1) was negligible due to repulsions between the herbicide and the negatively charged clay surfaces, see Fig. 2. Replacement of the original inorganic exchange cations of SWy-2 and SAz-1 by HDTMA cations changes the nature of the montmorillonite surfaces from hydrophilic to hydrophobic, increasing their affinity for the herbicide MCPA. This behavior has also been observed for other acidic pesticides, such as 2,4-D, dicamba or imazamox [21–23]. The higher affinity of SA-HDTMA for MCPA compared to that displayed by SW-HDTMA can be explained by the paraffinic ($d_{001} > 22 \text{ \AA}$) structure resulting from incorporation of HDTMA cations in SAz-1, which creates a wide interlayer organic phase with a strong affinity for herbicides [2].

The release kinetics of MCPA into water from formulations prepared by preadsorbing the herbicide on SW-HDTMA and SA-HDTMA, are shown in Fig. 3. In contrast to the reference standard formulation, which released 100% of the herbicide instantaneously, the organoclay-based formulations of MCPA displayed slow release properties in water. The initial amount of MCPA released by SW-

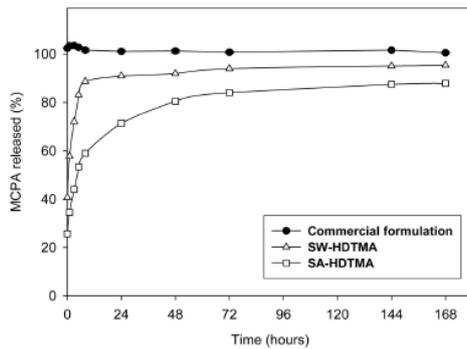


Figure 3. Release kinetics of MCPA into water from organoclay-based formulations and from a reference standard commercial formulation.

HDTMA was 41%, whereas the final amount of MCPA released by this organoclay was 95% after 168 h. For SA-HDTMA, the initial release was 26%, whereas the final release was 88% after 168 h. Both the release rate and the total amount of herbicide released at the end of the experiment was less for SA-HDTMA compared to SW-HDTMA, which is consistent with the different affinities of the organoclays for the herbicide, see Fig. 2. Since different rates and extents of MCPA occurred depending on the nature of the adsorbent, the possibility exists to select the most suitable organoclay to achieve the desired release behavior of MCPA.

3.3 Effect of the Organic Amendment on the Adsorption of MCPA by the Soil

The adsorption isotherms of MCPA on unamended soil and soil amended with OOW are shown in Fig. 4. Adsorption isotherms were fitted to the Freundlich equation and adsorption coefficients were calculated, see Fig. 4. MCPA adsorption by the unamended soil was low, due to the anionic character of the herbicide. The organic amendment (OOW) increased considerably the adsorption capacity of the soil for the herbicide MCPA, see Fig. 4, which can be attributed to the increase in organic matter content of the soil upon amendment (from 1.6 to 4.3%). Similar results were observed in a previous study with the anionic herbicide clopyralid and a soil amended with olive-mill wastewater [11].

3.4 Column Leaching Experiments

The effects of formulation and OOW addition on the breakthrough curves (BTCs) of MCPA in soil columns are shown in Fig. 5. Both the application of the herbicide as organoclay complexes on unamended soil and the amendment of the soil with the organic residue clearly resulted in lower MCPA concentration in leachates, flattening of the BTCs, and a lower total amount of herbicide leached compared to the application of the commercial formulation to unamended soil columns. The application of organoclay-based formulations of MCPA also resulted in the shifting of the maximum concentration peak of the BTC to larger water volumes compared to the commercial formulation.

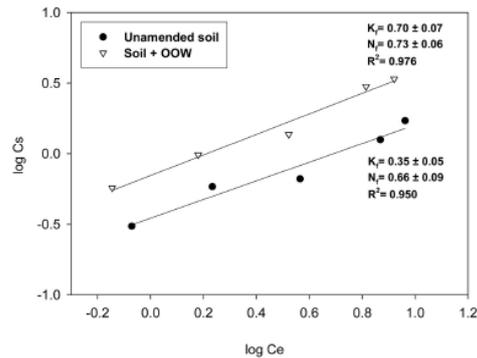


Figure 4. Freundlich adsorption isotherms of MCPA on unamended soil and soil amended with olive oil waste (OOW). Freundlich adsorption coefficients for each isotherm are included in the graph.

Regarding the effect of formulation, the maximum concentration of MCPA in leachates decreased in the order: commercial > SW-HDTMA > SA-HDTMA, which is in accordance with the affinity of the organoclays for the herbicide and the herbicide release rates observed in the batch release experiments, see Figs. 2 and 3. A very interesting feature from Fig. 5 is that for the organoclay-based formulations of MCPA, especially for SA-HDTMA, the presence of the herbicide in the leachates remained moderate after larger volumes of water added, as compared to the commercial formulation, demonstrating the slow release behavior of the formulations.

The organic amendment, OOW, also reduced the level of MCPA leaching and led to moderate concentrations of MCPA in leachates, as can be seen from the cumulative and relative BTCs, see Fig. 5, even though the maximum of the BTC occurred at the same time in unamended and amended soil and the appearance of MCPA in leachates occurred slightly earlier in amended soil. The latter observation can be attributed to the very high content in dissolved organic carbon (DOC, 25 g/kg) of the OOW, which could have initially favored leaching by formation of soluble DOC-MCPA complexes. Nevertheless, the total amount of MCPA leached from amended soil columns was much less than that leached from unamended soil, as a result of the increase in the adsorption capacity of the soil upon amendment with the organic residue.

4 Concluding Remarks

The results of this work show that both the use of organoclay-based formulations and the amendment of soil with olive oil waste (OOW) can be efficient strategies to reduce extensive leaching losses associated with the application of highly mobile herbicides, such as MCPA, in high-risk scenarios, such as Mediterranean olive groves. The reduced release rate of MCPA from organoclay-based formulations, compared to its immediate release from conventional commercial formulations, results in lower herbicide concentration in leachates and lower total amount of herbicide leached from soil columns. The enhanced adsorption of MCPA provided by the addition of OOW to soil also resulted in reduced herbicide leaching, and OOW addition to soil would have the added value of being an alter-

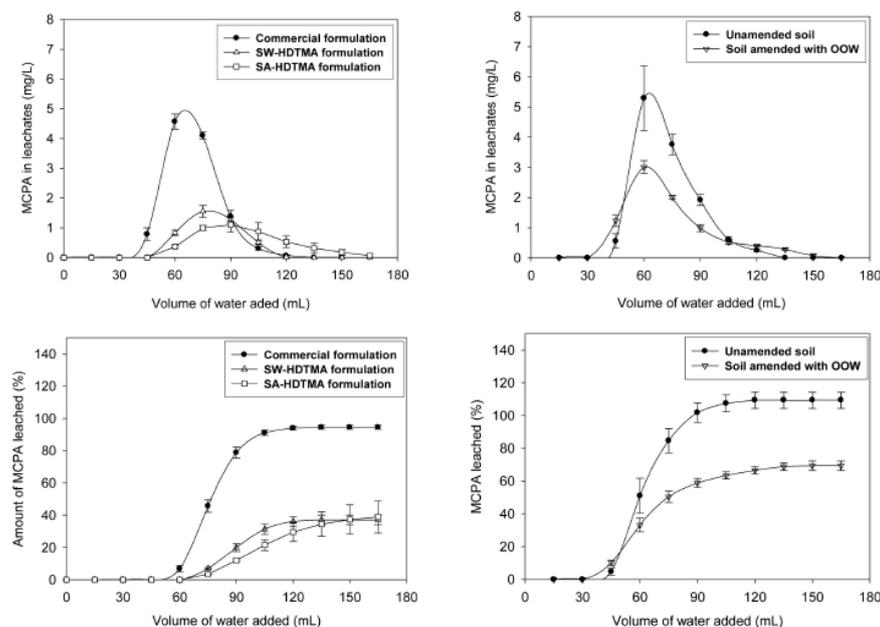


Figure 5. Relative (top) and cumulative (bottom) breakthrough curves of MCPA in soil columns as affected by formulation and organic amendment addition. The effect of formulation was studied on unamended soil, whereas the effect of OOW addition was studied using the commercial formulation of MCPA.

native for OOW disposal. However, when using this practice, the possibility of an enhanced initial leaching, due to the presence of dissolved organic carbon in the organic residue, should also be considered.

Acknowledgments

This work has been financed by the Spanish Ministry of Education and Science (MEC/FEDER) through the projects AGL2007-65771-C02-01 and AGL2008-04031-C02-01, and by Junta de Andalucía through the projects P06-AGR-1565 and P07-AGR-03077. The authors wish to thank Tratamientos Guadalquivir S.L. for kindly supplying the commercial formulation of MCPA. Carmen Trigo and Alegria Cabrera also thank the Spanish Ministry of Education and Science for their FPI fellowships.

References

- [1] R. Santiago-Mora, F. Martin-Laurent, R. de Prado, A. R. Franco, Degradation of simazine by microorganisms isolated from soils of Spanish olive fields, *Pest Manage. Sci.* **2005**, *61*, 917.
- [2] R. Celis et al., Selective modification of clay minerals for the adsorption of herbicides widely used in olive groves, *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 6650.
- [3] Z. Gerstl, A. Nasser, U. Mingelgrin, Controlled release of pesticides into soils from clay-polymer formulations, *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 3797.
- [4] Y. El-Nahhal, S. Nir, L. Margulies, B. Rubin, Reduction of photodegradation and volatilization of herbicides in organo-clay formulations, *Appl. Clay Sci.* **1999**, *14*, 105.
- [5] M. C. Hermosin, M. J. Calderón, J. P. Aguer, J. Cornejo, Organoclays for controlled release of the herbicide fenuron, *Pest Manage. Sci.* **2001**, *57*, 803.
- [6] R. Celis, M. C. Hermosin, M. J. Carrizosa, J. Cornejo, Inorganic and organic clays as carriers for controlled release of the herbicide hexazinone, *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 2324.
- [7] I. Cornejo et al., Use of modified montmorillonites to reduce herbicide leaching in sports turf surfaces: Laboratory and field experiments, *Appl. Clay Sci.*, in press. DOI: 10.1016/j.clay.2008.01.008.
- [8] L. Guo, T. J. Bicki, T. D. Hinesly, A. S. Felsot, Effect of carbon-rich waste materials on movement and sorption of atrazine in a sandy, coarse-textured soil, *Environ. Toxicol. Chem.* **1991**, *10*, 1273.
- [9] C. T. Chiou, in *Reactions and Movement of Organic Chemicals in Soils*, SSSA Special Publication No. 22, Madison, WI **1989**, p. 1.
- [10] E. Barriuso, S. Houot, C. Serra-Wittling, Influence of compost addition to soil on the behavior of herbicides, *Pestic. Sci.* **1996**, *49*, 65.
- [11] I. Cox et al., Porosity and herbicide leaching in soils amended with olive-mill waste water, *Agric. Ecosys. Environ.* **1997**, *65*, 151.
- [12] E. Topp, L. Tessier, E. G. Gregorich, Dairy manure incorporation stimulates rapid atrazine mineralization in an agricultural soil, *Can. J. Soil Sci.* **1996**, *76*, 403.

- [13] J. Gan, S. R. Yates, S. Papiernik, D. Crowley, Application of organic amendments to reduce volatile pesticide emissions from soil, *Environ. Sci. Technol.* **1998**, *32*, 3094.
- [14] G. Brunetti, C. Plaza, N. Senesi, Olive pomace amendment in Mediterranean conditions: Effect on soil and humic acid properties and wheat (*Triticum turgidum* L.) yield, *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 6730.
- [15] A. López-Piñeiro, J. Fernández, J. M. Rato Nunes, A. García, Response of soil and wheat crop to the application of two-phase olive mill waste to Mediterranean agricultural soils, *Soil Sci.* **2006**, *171*, 728.
- [16] A. Cabrera et al., Fate of diuron and terbuthylazine in soils amended with two-phase olive oil mill waste, *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 4828.
- [17] H. van Olphen, J. J. Fripiat, *Data Handbook for Clay Minerals and Other Non-Metallic Minerals*, Pergamon Press, Oxford **1979**.
- [18] A. Moronta, in *Clay Surfaces: Fundamentals and Applications* (Eds: F. Wypych, K. G. Satyanarayana), Elsevier, Amsterdam **2004**, p. 321.
- [19] G. Lagaly, Layer charge heterogeneity in vermiculites, *Clays Clay Miner.* **1982**, *30*, 215.
- [20] W. F. Jaynes, S. A. Boyd, Clay mineral type and organic compound sorption by hexadecyltrimethylammonium exchanged clays, *Soil Sci. Soc. Am. J.* **1991**, *55*, 43.
- [21] M. C. Hermosín, J. Cornejo, Binding mechanism of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid by organoclays, *J. Environ. Qual.* **1993**, *22*, 325.
- [22] H. Zhao, W. F. Jaynes, G. F. Vance, Sorption of the ionizable organic compound, dicamba (3,6-dichloro-2-methoxy benzoic acid), by organoclays, *Chemosphere* **1996**, *33*, 2089.
- [23] R. Celis et al., Sorption of the ionizable pesticide imazamox by organoclays and organohydrotalcites, *J. Environ. Sci. Health, Part B* **1999**, *34*, 929.

Organoclay-Based Formulations to Reduce the Environmental Impact of the Herbicide Diuron in Olive Groves

C. Trigo
R. Celis*
M. C. Hermosín
J. Cornejo

Instituto de Recursos Naturales
y Agrobiología de Sevilla (IRNAS)
CSIC
Avenida Reina Mercedes 10
P.O. Box 1052
41080 Sevilla, Spain

Ground and surface water contamination caused by undesirable transport losses of herbicides commonly applied to olive (*Olea Europaea*) groves in Spain and other Mediterranean countries is demanding strategies to reduce the environmental impact of such herbicides. In this work, organoclay-based formulations of a herbicide widely applied to olive groves, diuron [3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethyl urea], were prepared by preadsorbing the herbicide on three organoclays. Then, the ability of the organoclay-based formulations to reduce the herbicide release rate and leaching potential in two soils as compared to a standard commercial formulation of the herbicide was assessed. The organoclays were obtained by treating Wyoming montmorillonite (SWy-2) and Arizona montmorillonite (SAz-1) with an amount of spermine (SPERM) or hexadecyltrimethylammonium (HDTMA) cations equal to 100% of the cation exchange capacity of the montmorillonites. Batch release and column leaching tests indicated that the organoclay-based formulations of diuron made the release of the herbicide slower and reduced its leaching potential in soils, as compared with a standard commercial formulation containing the herbicide in a readily available form. Soil incubation experiments revealed that the persistence of the herbicide applied to soil as organoclay-based formulations was only slightly prolonged compared with the herbicide applied in a readily available form, and that most herbicide in the formulations was ultimately available for degradation. The use of organoclay-based formulations is proposed as a strategy to reduce extensive transport losses associated with the application of diuron in high-risk scenarios, such as Mediterranean olive groves.

Ground and surface water contamination by herbicides used in olive groves in Spain and other Mediterranean countries has become a serious issue. In Spain, several cases of contamination of drinking water bodies by such herbicides have occurred in the last few years, affecting the drinking water supply of many towns and greatly increasing the water purification costs. This has led authorities to prohibit or restrict the application of widely used active ingredients, such as simazine, diuron, terbuthylazine, or MCPA (Santiago-Mora et al., 2005). In olive groves, soil texture, pronounced slopes, and climatic conditions favor losses of the applied herbicides by leaching and runoff processes (Celis et al., 2007). To compensate for such losses, herbicides need to be applied in concentrations exceeding those strictly required for weed control, and the number of applications needs often to be increased. The excessive quantities of herbicide added increase the risk of surface and ground water pollution. In this context, there is a need to develop strategies directed to preventing water

pollution by herbicides applied to olive groves, particularly in high-risk scenarios such as Mediterranean areas (Celis et al., 2007).

The use of slow release formulations has been proposed as an efficient strategy to reduce the environmental impact of soil-applied pesticides. Beneficial effects related to the use of slow release formulations include reduced mobility of the active ingredient, reduction in the amount of chemical required for pest control, savings in manpower and energy by reducing the number of applications required in comparison with conventional formulations, increased safety for the pesticide applicator, and a general decrease in nontarget effects (Gerstl et al., 1998). Organoclays, that is, natural clay minerals with their original inorganic exchange cations replaced with organic cations, have been proven to be very good adsorbents for different classes of pesticides and, accordingly, have been proposed as carriers for the design of slow release formulations of pesticides (El-Nahhal et al., 2001; Hermosín et al., 2001; Prost and Yaron, 2001; Lagaly, 2001; Carrizosa et al., 2003; Cornejo et al., 2008). The organic cations most commonly used for the preparation of organoclays are synthetic, quaternary ammonium ions of the general form $[(CH_3)_3NR]^+$ or $[(CH_3)_2NR_2]^+$, where R is an aromatic or aliphatic hydrocarbon (Jaynes and Boyd, 1991). Nevertheless, the modification of clay minerals with naturally occurring organic cations has recently been pointed out as particularly interesting to reduce concern about the incorporation of these materials into soil and aquatic environments for practical applications (Cruz-Guzmán et al., 2004, 2005).

In this work, batch, incubation, and column leaching experiments were designed to assess the behavior in soil of organoclay-based formulations of a herbicide widely applied to olive groves:

Soil Sci. Soc. Am. J. 73:1652-1657
doi:10.2136/sssaj2008.0349
Received 30 Oct. 2008.

*Corresponding author (rcelis@irnase.csic.es).
© Soil Science Society of America
677 S. Segoe Rd. Madison WI 53711 USA

All rights reserved. No part of this periodical may be reproduced or transmitted in any form or by any means, electronic or mechanical, including photocopying, recording, or any information storage and retrieval system, without permission in writing from the publisher. Permission for printing and for reprinting the material contained herein has been obtained by the publisher.

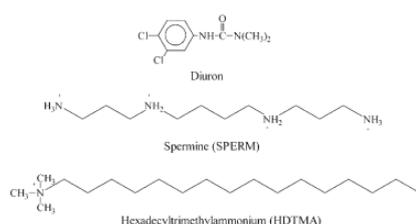


Fig. 1. Molecular structures of diuron, spermine, and hexadecyltrimethylammonium.

diuron. In a previous paper, a number of organoclays prepared by modification of two montmorillonites (SWy-2 and SAz-1) with different natural and synthetic organic cations were tested as adsorbents of diuron (Celis et al., 2007). Spermine (SPERM) and HDTMA cations were found to be those providing the montmorillonites with the highest affinity for this herbicide. Here, SPERM- and HDTMA-montmorillonites were selected to prepare organoclay-based formulations of diuron, comparing their release, persistence and leaching behavior with that of a reference standard commercial formulation containing the herbicide in a readily available form. Two soils from southern Spain were selected for the study, as representatives of those typically used for olive growing in Mediterranean areas. Previous research has shown that the type of formulation can strongly influence the release and leaching behavior of the herbicide diuron in soils (Cotterill et al., 1996; Fernández-Pérez et al., 1999; Chaplain et al., 2001).

MATERIALS AND METHODS

Herbicide and Soils

Diuron [3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethyl urea] (Fig. 1) is a phenylurea herbicide widely used for selective weed control in crops such as olive groves, asparagus, citrus, cotton, pineapple, sugarcane, etc. at 0.6 to 4.8 kg ha⁻¹ (Worthing and Hance, 1991). It has molecular weight 233.1 g mol⁻¹ and water solubility about 42 mg L⁻¹ at 27°C (Worthing and Hance, 1991). Pure analytical diuron (purity > 98%) from Sigma-Aldrich (Spain) was used to prepare the external standards for herbicide analysis, the initial herbicide solutions used in adsorption-desorption experiments, and the organoclay-based formulations of the herbicide. Commercial diuron (Diuron 80 WDG, 80% water-dispersible granules) from Comercial Química Massó S.A. (Spain) was used as a reference standard formulation in the release, incubation, and column leaching experiments.

The two soils used in the incubation and column leaching tests were sampled from experimental olive fields located in Seville (Spain). The soils were sampled from the top 0- to 20-cm layer, air-dried, and sieved (2 mm) before use. The main physicochemical characteristics of the soils are summarized in Table 1. Soil texture was determined by the hydrometer method, whereas the organic C and carbonate contents were determined by dichromate oxidation and by the pressure calcimeter method, respectively. The pH of the soils was measured in a 1:2 (w/w) soil/deionized water suspension.

Table 1. Physicochemical characteristics of the soils used.

Soil	Soil texture	Sand	Silt	Clay	%		pH
					CaCO ₃	Organic C	
Soil 1	Sandy clay loam	63	16	21	16.9	1.39	8.5
Soil 2	Sandy loam	83	7	10	6.5	0.71	8.4

Organoclays and Organoclay-based Formulations of Diuron

The organoclays used in this work (SW-SPERM, SW-HDTMA, and SA-HDTMA) were selected on the basis of a previous study that indicated their potential suitability for the preparation of slow release formulations of diuron (Celis et al., 2007). For the preparation of the organoclays, SWy-2 Na-rich Wyoming montmorillonite and SAz-1 Ca-rich Arizona montmorillonite from The Clay Minerals Society (Purdue University) were modified with HDTMA or SPERM cations (Sigma-Aldrich, Spain) (Fig. 1) through ion-exchange reactions, as described in Celis et al. (2007). Briefly, solutions containing an amount of organic cation corresponding to 100% of the cation exchange capacity of the montmorillonites were added to 1 g of SWy-2 or SAz-1. The suspensions were shaken for 24 h, centrifuged, washed with distilled water, and then freeze-dried. Some characteristics of the organoclays are given in Table 2.

Organoclay-based formulations of diuron were prepared by preadsorbing the herbicide on the organoclays. For this purpose, 100 mg of each organoclay (SW-SPERM, SW-HDTMA, or SA-HDTMA) were treated with 160 mL of an aqueous solution containing 40 mg L⁻¹ of diuron. After treatment, the suspensions were shaken at 20 ± 2°C for 24 h, filtered (pore size = 0.45 µm), and the resultant solids were air-dried and ground in an agate mortar. The recovery of solids was >80%. Preliminary experiments revealed that with this procedure the organoclays became saturated with the herbicide, so that no further adsorption could be achieved. The amount of diuron adsorbed on the organoclays was indirectly calculated by difference between the amount of herbicide added and the amount remaining in solution after filtration, and also by direct extraction (24 h end-over-end shaking) of 5 mg of the organoclay-diuron complexes with 10 mL of methanol.

Adsorption-Desorption Experiments

Adsorption-desorption isotherms of diuron on the organoclays (SW-HDTMA, SW-SPERM, and SA-HDTMA) were obtained by the batch equilibration procedure. Duplicate 20 mg adsorbent samples were equilibrated with 8 mL of herbicide initial solutions ($C_{in} = 0.1, 0.2, 1, \text{ and } 2 \text{ mg L}^{-1}$) by shaking mechanically at 20 ± 2°C for 24 h. After equilibration, the suspensions were centrifuged and 4 mL of the supernatant solutions were removed for analysis. The herbicide concentration in the supernatant solutions was determined by high performance liquid chromatography (HPLC) as described below. The amount of herbicide

Table 2. Some characteristics of the organoclays.

Organoclay	Montmorillonite	Organic cation	OCIS†	d ₀₀₁ ‡
			— % —	— Å —
SW-SPERM	SWy-2	Spermine	96	13.0
SW-HDTMA	SWy-2	Hexadecyltrimethylammonium	93	18.0
SA-HDTMA	SAz-1	Hexadecyltrimethylammonium	101	24.0

† Organic cation saturation: percentage of the cation exchange capacity of SWy-2 (76.4 cmolc kg⁻¹) or SAz-1 (120 cmolc kg⁻¹) compensated by organic cations (calculated from the N content of the samples).

‡ Basal spacing values for air-dried oriented specimens.

adsorbed was calculated from the difference between the initial and the equilibrium solution concentrations. Desorption was measured immediately after adsorption from the highest equilibrium point of the adsorption isotherm, that is, that corresponding to the initial concentration 2 mg L^{-1} . The 4 mL of supernatant removed for the adsorption analysis were replaced with 4 mL of distilled water. After shaking at $20 \pm 2^\circ\text{C}$ for 24 h, the suspensions were centrifuged, and the herbicide concentration was determined in the supernatant. This desorption procedure was repeated three times.

Batch Release Kinetics

Aliquots containing 0.5 mg of diuron (active ingredient, a.i.), either as organoclay-based formulations or as the reference standard commercial formulation, were added to 250 mL of distilled water in glass bottles sealed with screw caps. At selected times (0–144 h), the bottles were hand-shaken, allowed to settle for 10 min, and then 3 mL of the supernatant solution were removed, filtered, and analyzed by HPLC to determine the aqueous concentration of diuron. The expected herbicide concentration assuming complete release of diuron from the formulations was 2 mg L^{-1} . The herbicide release kinetics was obtained in duplicate.

Incubation Experiment

The dissipation curves of diuron in the soils were obtained by means of an incubation experiment in which the soils (600 g) were spiked with diuron at a concentration of 1.7 mg kg^{-1} air-dried soil, following a spiking protocol based on that proposed by Brinch et al. (2002). Briefly, a subsample of 25% of the air-dried and sieved soil (150 g) was wetted with 140 mL distilled water and then spiked with the herbicide (1 mg a.i.) either as organoclay-based formulations or as the reference standard commercial formulation. The spiked 150 g soil aliquot was thoroughly homogenized, and then the remaining 75% of the soil (450 g) was mixed with the spiked soil subsample by adding sequentially three portions of 150 g of unspiked soil. The spiked soils were incubated in glass jars at room temperature for 91 d. The moisture content was maintained at a constant level (25%) throughout the experiment by adding distilled water as necessary. The soils were sampled periodically and frozen until analyzed. Diuron was extracted by shaking 5 g of duplicate soil samples with 10 mL of methanol for 24 h and the extracts were analyzed by HPLC. A preliminary experiment showed that this extraction procedure recovered > 95% of the diuron freshly applied to the soils.

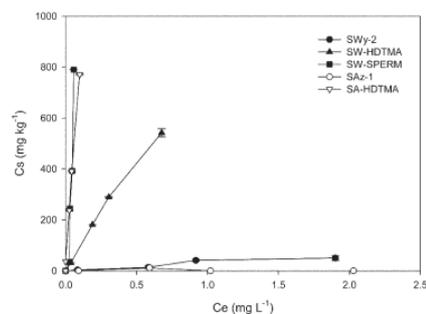


Fig. 2. Diuron adsorption isotherms on untreated clays (SWy-2 and SAz-1) and organoclays.

Leaching Experiment

Leaching was studied in 30 cm length \times 3.1 cm internal diameter glass columns. The top 5 cm were filled with sea sand and the bottom 5 cm with sea sand plus glass wool, to prevent losses of soil during the experiment. The other 20 cm were hand packed with air-dried soil, then saturated with deionized water and allowed to drain for 24 h. The calculated pore volume of the columns after saturation was $62.7 \pm 0.5 \text{ mL}$ for Soil 1 and $58.5 \pm 0.5 \text{ mL}$ for Soil 2. The amount of diuron corresponding to an application rate of 2 kg ha^{-1} (0.15 mg a.i.) was applied to the top of duplicate soil columns either as organoclay-based formulations or as the reference standard commercial formulation. To facilitate the application of the solids, 15 mL of water were used. Daily, 15 mL of deionized water were added to the top of the columns, the leachates were collected, and the concentration of diuron in the leachates was determined by HPLC. At the end of the leaching experiment (i.e., after 76 d for Soil 1 and 64 d for Soil 2), soil samples of approximately 40 g were taken from different depths of the columns (0- to 5-, 5- to 10-, 10- to 15-, and 15- to 20-cm depth) and extracted once with 100 mL of methanol by shaking mechanically at $20 \pm 2^\circ\text{C}$ for 24 h. The suspensions were centrifuged (30 min at $3000 \times g$), filtered, and analyzed by HPLC to determine the amount of diuron at different depths of the soil columns. All leaching experiments were conducted in triplicate.

Analysis of Diuron

Diuron was determined by HPLC using a Waters 600E chromatograph coupled to a Waters 996 diode-array detector. The following chromatographic conditions were used: Novapak C18 column (150 mm length \times 3.9 mm i.d.) (Waters), acetonitrile/water (40:60) eluent mixture at a flow rate of 1 mL min^{-1} , 25 μL injection volume, and UV detector at 250 nm. External calibration curves with standard solutions of diuron between 0.1 and 2 mg L^{-1} were used in the calculations.

RESULTS AND DISCUSSION

Organoclay-based Formulations of Diuron

The organoclays, SW-SPERM, SW-HDTMA, and SA-HDTMA, were selected on the basis of a previous study that revealed their high affinity for the herbicide diuron (Fig. 2) and the reversibility of the adsorption–desorption process. A detailed discussion of the adsorption–desorption of diuron by different organoclays, including those selected for the present study, can be found in Celis et al. (2007). Replacement of the original inorganic exchange cations of SWy-2 and SAz-1 by SPERM and HDTMA cations changes the nature of the montmorillonite surfaces from hydrophilic to hydrophobic, greatly increasing their affinity for diuron. Hydrogen bonding between the C=O group of diuron and the $-\text{NH}_3^+/-\text{NH}_2^+$ groups of SPERM and hydrophobic interactions between the herbicide and the alkyl chains of both SPERM and HDTMA were proposed to explain the high affinity of diuron by these organoclays (Celis et al., 2007). In addition, the reversibility of the adsorption–desorption of diuron by these organoclays was pointed out as a particularly interesting property in terms of the potential use of the adsorbents as supports for the preparation of slow release formulations (Celis et al., 2007).

Organoclay-based formulations of diuron were prepared by preadsorbing the herbicide on the organoclays using a concentrated aqueous solution of the herbicide (40 mg L^{-1}), as described in the *Materials and Methods* section. The amounts of diuron in the formulations calculated by difference between the amount

Table 3. Herbicide content of the organoclay-based formulations of diuron as determined by indirect and direct methods.

Formulation	Diuron content (%)	
	Indirect method	Direct method
SW-SPERM/Diuron	1.66 ± 0.01†	1.43 ± 0.01
SW-HDTMA/Diuron	1.03 ± 0.01	0.92 ± 0.02
SA-HDTMA/Diuron	3.23 ± 0.01	2.82 ± 0.03

† Mean ± standard error.

of herbicide added and that not adsorbed by the organoclays were found to be similar to those calculated by direct extraction of the formulations with methanol (Table 3). Considering the amounts extractable with mild organic solvents, such as methanol, as estimates of potentially available herbicide (Hance et al., 1977; Cox and Walker, 1999; Barriuso et al., 2004), our results indicate that most diuron in the formulations is in a potentially available form. This is in contrast to previously proposed diuron formulations, in which a significant amount of herbicide tended to remain in formulation granules and was more resistant to release (Fernández-Pérez et al., 1999).

Batch Release Kinetics

The release kinetics of diuron into water from the organoclay-based formulations under static conditions is compared in Fig. 3 with the release pattern of diuron from the reference standard commercial formulation. In contrast to the standard commercial formulation, which released 100% of the herbicide almost instantaneously, the organoclay-based formulations of diuron displayed slow release properties in water. The initial amount of diuron released into water by the organoclays ranged between 9 and 24%, whereas the final amount of diuron released ($t = 144$ h) under the static conditions used in the experiment ranged between 42 and 83%. The total amount of herbicide released at the end of the experiment was less for SA-HDTMA and SW-SPERM compared with SW-HDTMA, which is consistent with the different affinities of the organoclays for the herbicide observed in the batch adsorption study (Fig. 2). Because different rates and extents of diuron occurred depending on the type of organoclay, the possibility exists to select the most suitable organoclay to achieve the desired release behavior of diuron.

Incubation Experiment

Dissipation curves for diuron in two soils after application of the herbicide either as a standard commercial formulation or as complexes with the organoclays SW-SPERM and SA-HDTMA are shown in Fig. 4. The sigmoidal shape of the dissipation curves are typical of biodegradation of compounds utilized as microbial growth substrate (Kearney et al., 1997). According to Fig. 4, the half-life of diuron in the soils ranges between about 35 and 55 d, depending on the soil and formulation type. These values are in accordance with those previously reported for the soil persistence of diuron (Worthing and Hance, 1991; Giacomazzi and Cochet, 2004).

In general, degradation of diuron in Soil 2 occurred faster than in Soil 1, despite Soil 2 contained less organic matter and presumably less microbial activity than Soil 1. This result may be indicative of a greater bioavailability of the herbicide in the low organic matter, coarse textured soil (Soil 2). On the other hand, the effect of formulation on the persistence of diuron in the two soils was small. The persistence of the herbicide applied

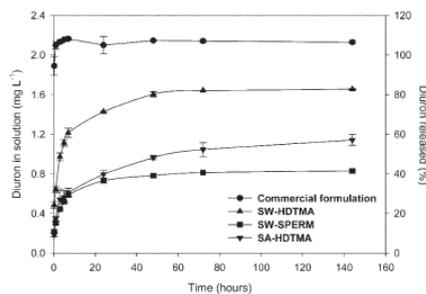


Fig. 3. Diuron release kinetics into water from the commercial and organoclay-based formulations.

as organoclay-based formulations was only slightly longer compared with the persistence of the herbicide applied in a readily available (commercial) form. It is also worthy to note that the residual amounts of diuron extracted at the end of the incubation experiment ($t = 91$ d) were very low (<5% of the amount applied) and very similar for all formulations tested. This indicated that most herbicide in the formulations was ultimately available for degradation.

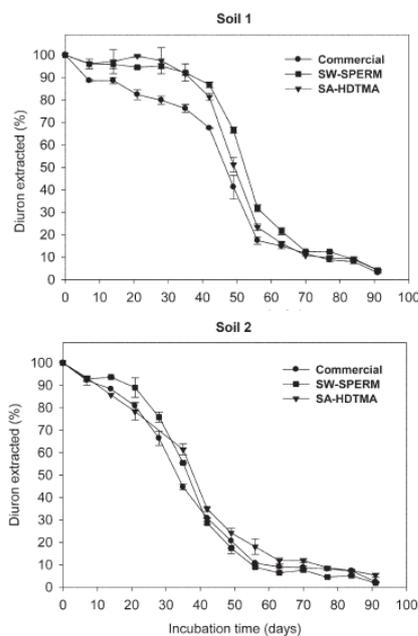


Fig. 4. Dissipation curves for diuron applied to soils as commercial and organoclay-based formulations.

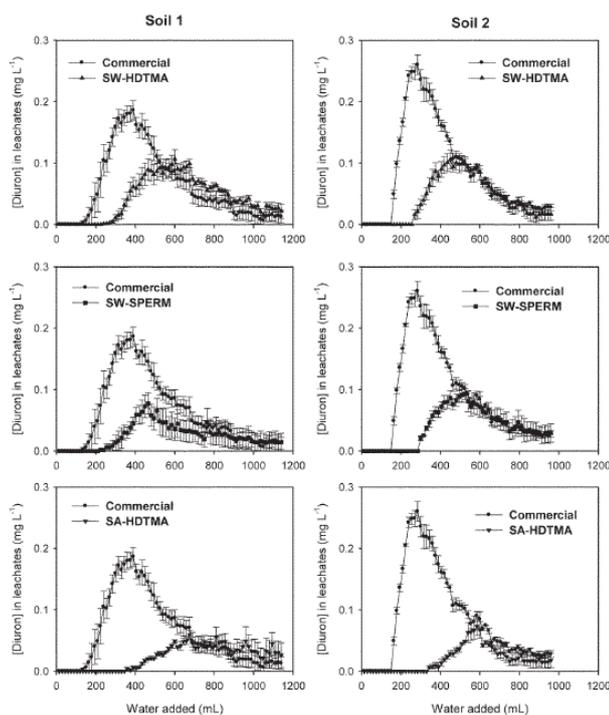


Fig. 5. Breakthrough curves (BTCs) of diuron applied to soil columns, soil 1 (left) and soil 2 (right), as commercial and organoclay-based formulations.

Column Leaching Experiment

Breakthrough curves (BTCs) of diuron applied to soil columns as the reference standard commercial formulation and as organoclay-based formulations are shown in Fig. 5. For both soils, the application of diuron as organoclay-based formulations resulted in lower herbicide concentrations in leachates, flattening of the BTCs, and shifting of the maximum concentration peak to larger volumes of water added as compared with the standard commercial formulation (Fig. 5). The total amount of diuron leached from the soil columns were also significantly reduced by the application of diuron as organoclay formulations (Table 4). In general, these effects

were more pronounced for SA-HDTMA and SW-SPERM than for SW-HDTMA, which is in accordance with the adsorption and release behavior observed in the batch experiments (Fig. 2 and 3).

Leaching of diuron through Soil 2 occurred faster and with greater leachate concentrations than through Soil 1, particularly when the herbicide was applied as standard commercial formulation (Fig. 5). The low organic matter content and coarse texture of Soil 2 (Table 1) should have resulted in reduced retention of the herbicide by this soil, thus favoring leaching. Rapid leaching of diuron through Soil 2 can explain that the amounts of diuron extracted from the soil columns at the end of the leaching experiment were small compared with Soil 1 (Table 4, Fig. 6). Nonetheless, the shorter persistence of the herbicide in Soil 2 (Fig. 4) could have also contributed to the low residual amounts of diuron found in this soil.

The amount of diuron not recovered during the column leaching experiment (Table 4) can be attributed to degradation of the herbicide within the soil column and/or to irreversible adsorption to the soil or organoclay particles, but taking into account the duration of the column leaching experiment (64–76 d) and the dissipation patterns of diuron (Fig. 4), we believe that much of the herbicide not recovered should correspond to herbicide degraded within the soil column. It is interesting to note that, assuming the amounts not recovered (Table 4) being due to degradation of diuron during the leaching experiment, degradation of the herbicide within the soil columns was in general enhanced by the use of the organoclays. Presumably, the slow release of diuron from the organoclays increased the residence time of the herbicide within the soil column, favoring its degradation.

CONCLUSIONS

Batch, incubation, and column leaching tests were designed to characterize the release, persistence, and mobility of organoclay-based formulations of the herbicide diuron in two Spanish soils dedicated to olive growing. The organoclay-based formula-

Table 4. Total amounts of diuron leached, extracted from the soil columns, and not recovered at the end of the leaching experiment and maximum herbicide concentration found in leachates.

Formulation	Soil 1				Soil 2			
	Commercial	SW-SPERM	SW-HDTMA	SA-HDTMA	Commercial	SW-SPERM	SW-HDTMA	SA-HDTMA
Maximum concentration, mg L ⁻¹	0.19 ± 0.02†	0.09 ± 0.02	0.11 ± 0.02	0.06 ± 0.01	0.26 ± 0.02	0.09 ± 0.01	0.11 ± 0.02	0.07 ± 0.02
Leached, %	42 ± 5	16 ± 8	28 ± 3	15 ± 4	52 ± 1	22 ± 1	24 ± 1	11 ± 1
Extracted from soil, %	14 ± 5	20 ± 8	27 ± 5	25 ± 1	10 ± 1	10 ± 2	5 ± 3	7 ± 5
Not recovered, %	44	64	45	60	38	68	71	82

† Mean ± standard error.

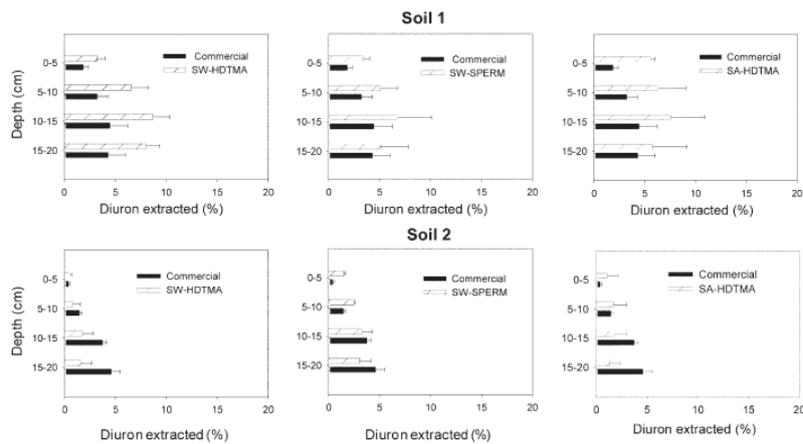


Fig. 6. Diuron extracted from different depths of the soil columns at the end of the leaching experiment.

tions of the herbicide were effective in retarding the release of the herbicide into aqueous solution, thereby reducing the leaching of the herbicide through the soils, compared with a standard commercial formulation containing the herbicide in a readily available form. Incubation experiments indicated that the dissipation pattern of diuron in the soils for the herbicide applied as organo-clay-based formulations was very similar to that of the herbicide applied in the commercial form, and that most of the herbicide in the formulations was ultimately available for degradation. The results indicate that organo-clay-based formulations can be useful to reduce extensive transport losses associated with the application of diuron in high-risk scenarios, such as Mediterranean olive groves, with little effect on its degradation pattern. Additional research would be needed to demonstrate that the bioavailability of diuron in these formulations is high enough to achieve adequate weed control and to demonstrate if their performance under real field conditions matches the potential shown in the laboratory.

ACKNOWLEDGMENTS

This work has been financed by the Spanish Ministry of Education and Science, with FEDER funds, through the projects AGL2005-05063-C02-01 and AGL2008-04031-C02-01. C. Trigo also thanks the Spanish Ministry of Education and Science for her FPI fellowship (ref. BES-2006-14099).

REFERENCES

- Barriuso, E., W.C. Koskinen, and M.J. Sadowsky. 2004. Solvent extraction characterization of bioavailability of atrazine residues in soils. *J. Agric. Food Chem.* 52:6552-6556.
- Brinch, U.C., F. Elzund, and C.S. Jacobsen. 2002. Method for spiking soil samples with organic compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:1808-1816.
- Carrizosa, M.J., M.C. Hermosin, W.C. Koskinen, and J. Cornejo. 2003. Use of organosmectites to reduce leaching losses of acidic herbicides. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 67:511-517.
- Celis, R., C. Trigo, G. Facenda, M.C. Hermosin, and J. Cornejo. 2007. Selective modification of clay minerals for the adsorption of herbicides widely used in olive groves. *J. Agric. Food Chem.* 55:6650-6658.
- Chaplain, V., E. Barriuso, J.C. Dur, and C. Vergner. 2001. Influence of the formulation on the sorption and the mobility of diuron in soil. *Bull. Environ. Toxicol.* 66:664-670.

- Cornejo, L., R. Celis, C. Domínguez, M.C. Hermosin, and J. Cornejo. 2008. Use of modified montmorillonites to reduce herbicide leaching in sports turf surfaces: Laboratory and field experiments. *Appl. Clay Sci.* 42:284-291.
- Cotterill, J.V., R.M. Wilkins, and E.T. da Silva. 1996. Controlled release of diuron granules based on a lignin matrix system. *J. Control. Release* 40:133-142.
- Cox, L., and A. Walker. 1999. Studies on time-dependent sorption of linuron and isoproturon in soils. *Chemosphere* 38:2707-2718.
- Cruz-Guzmán, M., R. Celis, M.C. Hermosin, and J. Cornejo. 2004. Adsorption of the herbicide simazine by montmorillonite modified with natural organic cations. *Environ. Sci. Technol.* 38:180-186.
- Cruz-Guzmán, M., R. Celis, M.C. Hermosin, W.C. Koskinen, and J. Cornejo. 2005. Adsorption of pesticides from water by functionalized organobentonites. *J. Agric. Food Chem.* 53:7502-7511.
- El-Nahhal, Y., S. Nir, C. Serban, O. Rabinovitz, and B. Rubín. 2001. Organo-clay formulation of acetochlor for reduced movement in soil. *J. Agric. Food Chem.* 49:5364-5371.
- Fernández-Pérez, M., M. Villafranca-Sánchez, E. González-Pradas, and F. Flores-Céspedes. 1999. Controlled release of diuron from an alginate-bentonite formulation: Water release kinetics and soil mobility study. *J. Agric. Food Chem.* 47:791-798.
- Genstl, Z., A. Nasser, and U. Mingelgrin. 1998. Controlled release of pesticides into soils from clay-polymer formulations. *J. Agric. Food Chem.* 46:3797-3802.
- Giacomazzi, S., and N. Cochet. 2004. Environmental impact of diuron transformation: A review. *Chemosphere* 56:1021-1032.
- Hance, R.J., P.D. Smith, and E.G. Cotterill. 1977. The effect of age on the availability of linuron and simazine residues in soil. *Weed Res.* 17:429-431.
- Hermosin, M.C., M.J. Calderón, J.P. Aguer, and J. Cornejo. 2001. Organoclays for controlled release of the herbicide fenuron. *Pest Manag. Sci.* 57:803-809.
- Jaynes, W.F., and S.A. Boyd. 1991. Clay mineral type and organic compound sorption by hexadecyltrimethylammonium exchanged clays. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 55:43-48.
- Kearney, P.C., D.R. Shelton, and W.C. Koskinen. 1997. Soil chemistry of pesticides. p. 419-451. In M. Howe-Grant (ed.) *Encyclopedia of chemical technology*. 4th ed. Vol. 22. John Wiley & Sons, New York.
- Lagaly, G. 2001. Pesticide-clay interactions and formulations. *Appl. Clay Sci.* 18:205-209.
- Prost, R., and B. Yaron. 2001. Use of modified clays for controlling soil environmental quality. *Soil Sci.* 166:880-895.
- Santiago-Mora, R., F. Martín-Laurent, R. De Prado, and A.R. Franco. 2005. Degradation of simazine by microorganisms isolated from soils of Spanish olive fields. *Pest Manag. Sci.* 61:917-921.
- Worthing, C.R., and R.J. Hance. 1991. *The pesticide manual*. British Crop Protection Council, Surrey, UK.