

Resumen

En la presente Tesis Doctoral se han desarrollado Formulaciones de Liberación Controlada (FLCs) de herbicidas mediante la solubilización de los herbicidas Mesotriona, Metribuzina y Flufenacet en surfactantes como el Ethomeen T/15, Berol 048, Berol 266 y con mezclas de estos surfactantes con un surfactante biodegradable sintetizado en nuestros laboratorios derivado de sales de amonio cuaternario denominado MBA-12. Posteriormente se adsorbió sobre el mineral de arcilla Montmorillonita. Estas formulaciones se caracterizaron por diferentes técnicas como Difracción de Rayos X, Infrarrojos y análisis elemental.

El complejo micela-herbicida-mineral de la arcilla, forma una formulación de liberación controlada del ingrediente activo que permite una reducción de la lixiviación. En el caso de los herbicidas Mesotriona y Flufenacet se obtuvieron bajos porcentajes de lixiviación a niveles más profundos del suelo en comparación con el producto técnico o la formulación comercial. El estudio de bioactividad corroboró los datos obtenidos en los experimentos de lixiviación, siendo las Formulación de liberación controlada más bioactivas en las capas más superficiales del suelo. Así mismo se comprobó la efectividad de la formulación MS/ET15 (13,3%) en ensayos de campo donde la formulación comercial lixivió a mayores profundidades del suelo y la Formulación de liberación controlada se mantuvo ejerciendo su acción en la planta.

El uso de sistemas herbicida/surfactante/mineral de arcilla basados en micelas mixtas de surfactantes comerciales y surfactantes sintetizados dieron lugar a formulaciones de liberación controlada con un alto porcentaje de ingrediente activo. Experimentos de liberación in vitro dieron liberaciones más lentas en comparación con el producto técnico y los experimentos de lixiviación y bioeficacia corroboraron los resultados no movilizándose el herbicida a capas más profundas del suelo y siendo bioactivos en la superficie del suelo.

Las Formulaciones de liberación controlada de herbicidas elaboradas en esta memoria cumplen con los objetivos descritos previamente, suponiendo una mejora en la formulaciones de estos herbicidas ya existentes en el mercado. Al modificarse la liberación se evitaría una posible contaminación por pérdidas por lixiviación a capas más profundas del suelo o aguas subterráneas aumentando la efectividad en el cultivo al quedar más tiempo retenida en el mismo.



CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



Instituto de
Recursos Naturales
y Agrobiología
de Sevilla



MATERIALES NANOESTRUCTURADOS EN EL DISEÑO DE FORMULACIONES DE LIBERACIÓN CONTROLADA DE HERBICIDAS

Memoria que presenta María Eulalia Gómez-Pantoja Cabezas para optar al título de Doctor por la Universidad de Sevilla.

Sevilla, Octubre de 2015.

Fdo: **María Eulalia Gómez-Pantoja Cabezas**



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA

Dra. María Luisa González Rodríguez, directora del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica,

CERTIFICA: Que la Licenciada María Eulalia Gómez-Pantoja Cabezas ha realizado bajo la dirección de los doctores D. Tomás Undabeytia López y D^a Esmeralda Morillo González el trabajo titulado "*Materiales nanoestructurados en el diseño de formulaciones de liberación controlada de herbicidas*" para optar al título de Doctor por la Universidad de Sevilla, cumpliendo los requisitos de la legislación vigente.

Firmado:

Dra. María Luisa González Rodríguez

Sevilla, Octubre 2015

MATERIALES NANOESTRUCTURADOS EN EL DISEÑO DE FORMULACIONES DE LIBERACIÓN CONTROLADA DE HERBICIDAS

Visado en Sevilla, Octubre 2015

LOS DIRECTORES



Dr. D. Tomás Undabeytia López
Investigador Científico CSIC



Dra. D^a. Esmeralda Morillo González
Investigadora Científica CSIC

EL TUTOR

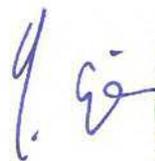


Dr. José Ignacio Pérez Martínez
Profesor Contratado Doctor, Universidad de Sevilla



PROFESOR DOCTOR D. JOSÉ ENRIQUE FERNÁNDEZ LUQUE, DIRECTOR DEL INSTITUTO DE RECURSOS NATURALES Y AGROBIOLOGÍA DE SEVILLA DEL CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

Certifica: Que la presente Memoria de Investigación titulada ***“Materiales nanoestructurados en el diseño de formulaciones de liberación controlada de herbicidas”***, presentada por D^a María Eulalia Gómez-Pantoja Cabezas para optar al título de Doctor por la Universidad de Sevilla, ha sido realizada en el Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, bajo la dirección de los Drs. D. Tomás Undabeytia López y D^a Esmeralda Morillo González, reuniendo todas las condiciones exigidas a los trabajos de Tesis Doctorales.




Para que conste y a petición de la interesada, firma el presente en Sevilla, Octubre de 2015.

El trabajo de investigación que ha dado lugar a la presente memoria se ha realizado durante el periodo de disfrute de un contrato predoctoral asociado a un proyecto del Plan Nacional (CTM2009-07425) cuyo título es “Formulaciones de herbicidas basadas en minerales de arcilla y tensioactivos respetuosos con el medioambiente”.



TOMÁS UNDABEYTIA LÓPEZ, Doctor en Ciencias Químicas e Investigador Científico del Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla del Consejo Superior de Investigaciones Científicas,

ESMERALDA MORILLO GONZÁLEZ, Doctora en Ciencias Químicas e Investigadora Científica del Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla del Consejo Superior de Investigaciones Científicas,

Certifican: Que la presente Memoria de Investigación titulada "*MATERIALES NANOESTRUCTURADOS EN EL DISEÑO DE FORMULACIONES DE LIBERACIÓN CONTROLADA DE HERBICIDAS*", presentada por D^a María Eulalia Gómez-Pantoja Cabezas para optar al título de Doctor por la Universidad de Sevilla, ha sido realizado bajo su dirección y reúne los requisitos necesarios para su juicio y calificación.

Para que conste y a petición de la interesada, firman el presente en Sevilla, Octubre de 2015.



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA

JOSÉ IGNACIO PÉREZ MARTÍNEZ, Doctor en Farmacia y Profesor Contratado Doctor del Dpto. de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Universidad de Sevilla

Certifica: Que la presente Memoria de Investigación titulada ***"MATERIALES NANOESTRUCTURADOS EN EL DISEÑO DE FORMULACIONES DE LIBERACIÓN CONTROLADA DE HERBICIDAS"***, presentada por D^a María Eulalia Gómez-Pantoja Cabezas para optar al título de Doctor por la Universidad de Sevilla, está bajo su tutela y reúne los requisitos necesarios para su juicio y calificación.

Para que conste y a petición de la interesada, firma el presente en Sevilla, Octubre de 2015.

Agradecimientos

Me gustaría expresar mi sincero agradecimiento a todas aquellas personas que de manera directa o indirecta han colaborado en la realización del presente trabajo.

A mis directores de tesis, D. Tomás Undabeytia López y a D^a Esmeralda Morillo González por haberme dado la oportunidad de desarrollar este trabajo con paciencia, dedicación y esfuerzo.

A los doctores D^a Celia Maqueda Porras, D. Jaime Villaverde Capellán, D. Fernando Madrid Díaz y M^a del Carmen Florido Fernández, por su ayuda y sugerencias durante la realización de esta Tesis.

Al departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla y en especial al profesor José Ramón Moyano Méndez por su ayuda y brindada todos estos años.

A profesor D. José Ignacio Pérez Martínez por aceptar la tutoría de la presente Memoria.

A los profesores Shlomo Nir, Yael Mishael y Uri Shuali por su hospitalidad durante mi estancia en la Universidad Hebrea de Jerusalén y ayuda desinteresada en la discusión, modelización de datos.

A la profesora Heike Knicker del Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología por su ayuda en la ejecución e interpretación de los espectros de Resonancia Magnética Nuclear.

A la profesora Ana Paula Zaderenko de la Universidad Pablo de Olavide por su ayuda brindada en la síntesis de surfactantes.

A la dirección del Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla por las facilidades prestadas para llevar a cabo este trabajo, y a todo su personal por prestarme su ayuda siempre que lo he necesitado.

Al Centro de Investigación, Tecnología e Innovación de la Universidad de Sevilla (CITIUS), especialmente a los servicios de Microanálisis y Caracterización funcional.

A mis compañeros de laboratorio y que me han acompañado durante todos estos años (Irene, Isa, José Luis, Marian, Marina, María Fernanda, Carmen, Miriam y Rosa).

A mi familia y amigos por su apoyo incondicional todos estos años especialmente a mis padres, Luis y M^a Eulalia, a mis hermanos, M^a Paz y Luis, mi cuñado Alejandro y a mis suegros Federico y M^a Paz.

A Álvaro por su cariño, comprensión y apoyo incondicional que han facilitado la finalización de esta memoria.

A mis abuelos.

Índice

INDICE	I
INDICE DE TABLAS	IV
INDICE DE FIGURAS	V
ABREVIATURAS	IX
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 PLAGUICIDAS	3
1.1.1. Herbicidas	4
1.1.1.1. Comportamiento de los herbicidas en suelos	7
1.1.1.2. Problemática ambiental derivada de uso de Herbicidas	13
1.2. FORMULACIONES DE LIBERACIÓN CONTROLADA (FLCs) EN AGRICULTURA	15
1.2.1. FLCs basadas en minerales de la arcilla	18
1.3. SURFACTANTES	23
1.3.1. Propiedades de los surfactantes	24
1.3.2. Clasificación	30
1.3.3. Aplicaciones de los surfactantes	32
1.3.4. Comportamiento de los surfactantes en el sistema suelo-agua	33
2. OBJETIVOS	35
3. MATERIALES Y MÉTODOS	39
3.1. MATERIALES	41
3.1.1. Herbicidas	41
3.1.2. Mineral de la arcilla	43

Indice

3.1.3. Surfactantes	44
3.1.4. Suelos	45
3.2. MÉTODOS	46
3.2.1. Síntesis y caracterización de surfactantes de amonio cuaternario	46
3.2.2. Estudios de los parámetros estructurales de los surfactantes	48
3.2.3. Análisis de los herbicidas en solución	50
3.2.4. Estudios de solubilización de herbicidas en presencia de surfactantes	52
3.2.5. Adsorción de los surfactantes en minerales de la arcilla	53
3.2.6. Adsorción de herbicidas en minerales de la arcilla	54
3.2.7. Preparación de formulaciones herbicida-surfactante-montmorillonita	54
3.2.8. Caracterización de las Formulaciones	55
3.2.9. Experimentos de liberación in vitro	57
3.2.10. Caracterización de los suelos	57
3.2.11. Estudios de adsorción-desorción de herbicidas en suelos	60
3.2.12. Estudios de lixiviación y bioactividad de herbicidas en suelos	61
3.2.13. Experimentos de campo	63
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	67
4.1. CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LOS SUELOS	69
4.2. FORMULACIONES DE LIBERACIÓN CONTROLADA BASADAS EN MONTMORILLONITA Y SURFACTANTES COMERCIALES	72
4.2.1. Propiedades interfaciales de los surfactantes	72
4.2.2. Adsorción de los surfactantes comerciales en montmorillonita	74
4.2.3. Adsorción de los herbicidas en montmorillonita	87

4.2.4. Solubilidad de herbicidas en los surfactantes comerciales	87
4.2.5. Preparación de FLCs herbicidas-surfactantes comerciales-montmorillonita	91
4.2.6. Caracterización de las FLCs herbicidas-surfactantes comerciales-montmorillonita	94
4.2.7. Comportamiento de las FLCs herbicidas-surfactantes comerciales-montmorillonita en el sistema suelo-agua	103
4.2.7.1. Estudios de liberación in vitro	103
4.2.7.2. Estudios de adsorción-desorción de Flufenacet en suelos	106
4.2.7.3. Estudios de lixiviación y bioactividad de Flufenacet y sus formulaciones en suelo	112
4.2.7.4. Estudios de lixiviación y bioactividad de formulaciones de Mesotriona basadas en surfactantes comerciales en suelo	122
4.2.7.5. Experimentos de campo.	123
4.3. FORMULACIONES DE LIBERACIÓN CONTROLADA BASADAS EN MONTMORILLONITA Y MEZCLA DE SURFACTANTES COMERCIALES Y SINTETIZADOS.	128
4.3.1. Adsorción de surfactantes sintetizados biodegradables MBA-12 y MBE-12 en montmorillonita	128
4.3.2. Solubilidad de Mesotriona en micelas mixtas de surfactantes	131
4.3.2.1. Relación entre solubilización y la concentración micelar crítica (cmc)	131
4.3.2.2. Relación entre solubilización y carga micelar	136
4.3.3. Preparación de FLCs herbicida-micelas mixtas de surfactantes- montmorillonita	139
4.3.4. Caracterización de las FLCs herbicidas-micelas mixtas-montmorillonita	140
4.3.5. Comportamiento de las FLCs herbicidas-micelas mixtas-montmorillonita en el sistema suelo-agua	143
4.3.5.1. Estudios de liberación in vitro.	143
4.3.5.2. Estudios de lixiviación y bioactividad de la FLC de Mesotriona basada en micelas mixtas y montmorillonita	145
5. CONCLUSIONES	149
6. BIBLIOGRAFÍA	155

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. CMCs para diferentes surfactantes con igual parte polar (Katagi, 2008)	26
Tabla 1.2. Cálculo de los volúmenes de los grupos metilo y metileno (Reiss-Husson y Luzzati, 1964)	28
Tabla 1.3. Morfologías de las micelas según el parámetro de empaquetamiento g	30
Tabla 3.1. Propiedades de los surfactantes comerciales: nº carbonos de la fracción hidrofóbica (R), unidades del grupo óxido de etileno, R-CH ₂ -CH ₂ -O-R, (EO), concentración micelar crítica (CMC), balance hidrófilo-lipófilo (HBL) y peso molecular (PM)	44
Tabla 3.2. Algunas propiedades de los surfactantes sintetizados: peso molecular (PM) concentración micelar crítica (CMC), área por molécula de surfactante (A), parámetro de empaquetamiento crítico (g) (Pisárcik, 2006)	45
Tabla 3.3. Condiciones empleadas en el análisis de herbicidas en HPLC-UV	51
Tabla 3.4. Condiciones empleadas en el análisis de Mesotriona en HPLC-MS	51
Tabla 4.1. Características de los suelos originales usados	69
Tabla 4.2. Mineralogía de la fracción arcilla de los suelos ¹	70
Tabla 4.3. Distribución relativa de carbono (%) en suelos expresado como porcentaje de carbono orgánico total	71
Tabla 4.4. Propiedades de los surfactantes: nº de carbonos de la fracción hidrofóbica n_c , número de unidades de óxidos de etileno (EO), concentración micelar crítica (CMC), balance hidrófilo-lipófilo (HLB), peso molecular (PM), máxima concentración en superficie (Γ_{max}), área mínima ocupada por molécula (a_{min}) y parámetro de empaquetamiento crítico de las micelas (g)	73
Tabla 4.5. Coeficientes de enlace de los surfactantes en Montmorillonita calculado a partir de la ecuación de Langmuir-Scatchard y valores RMSE	75
Tabla 4.6. Eficacia solubilizante (S_w^*/S_w), relación de solubilización molar (MSR) y coeficientes de distribución micela-agua ($\log K_{mc}$).	90
Tabla 4.7. Representación de la nomenclatura de las diferentes FLCs y las concentraciones usadas para su elaboración (g L ⁻¹) así como los porcentajes de ingrediente activo teórico calculados (Scacchard) y experimental de los herbicidas Mesotriona, Metribuzina y Flufenacet.	93
Tabla 4.8. Valores de los parámetros de las ecuaciones empíricas y $t_{1/2}$ correspondientes al estudio de liberación de ingrediente activo para las FLCs de Mesotriona, Metribuzina y Flufenacet	106
Tabla 4.9. Parámetros de la ecuación de Freundlich y valores de K_{OC} obtenidos de las isothermas de adsorción de FLF en los suelos	107
Tabla 4.10. Porcentajes de desorción (%D) de FLF y coeficientes de histéresis (H) en suelos, en función de la concentración inicial usada.	109
Tabla 4.11. Distribución de Mesotriona a lo largo del perfil del suelo, tras 10, 30 y 180 días de tratamiento, expresada como porcentaje de la cantidad total aplicada	125

Tabla 4.12. Rendimiento de maíz según la formulación de Mesotriona empleada	127
Tabla 4.13. Solubilización de MS en función de la concentración de surfactante(s) usado(s) en sistemas individuales y mixtos así como el contenido de MS tras su adsorción en la arcilla. La concentración de arcilla usada era 4,44 g/L.	132
Tabla 4.14. Valores de C_{12} teórico, según la ecuación de Clint, y de X_1^M y β^M de mezclas equimolares de surfactantes ($\alpha = 0.5$) usando el método de Rubingh a 25°C. ^{1,2}	135
Tabla 4.15. Valores de los parámetros de la ecuación de Ritger-Peppas correspondientes al estudio de liberación de Mesotriona de FLC basadas en micelas mixtas y Montmorillonita.	145

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Diagrama de la evolución de los herbicidas en suelos	7
Figura 1.2. Efecto de la concentración de herbicida en función del tiempo desde formulaciones convencionales y de liberación lenta (extraído y modificado de Scher, 1999)	17
Figura 1.3. Estructuras atómicas básicas de los minerales de arcilla. a) unidad tetraédrica, b) unidad octaédrica	18
Figura 1.4. Representación de una molécula de surfactante. a) Corresponde a la “cabeza” polar hidrófila y b) a la cadena alquílica hidrófoba	24
Figura 1.5. Disposición de las moléculas de surfactante en solución acuosa en función de su concentración (Katagi, 2008)	25
Figura 1.6. Mecanismo de adsorción-desorción de un sustrato en suelo en presencia de surfactante. K_m , contante de partición micela-sustrato; K_{mon} , constante de asociación monómero-sustrato; K_d , constante de adsorción del sustrato en el suelo (Katagi, 2008)	34
Figura 3.1. Estructura química de Metribuzina	41
Figura 3.1. Estructura química de Metribuzina	42
Figura 3.3. Estructura química dFlufenacet	43
Figura 3.4. Estructura química de los surfactantes Ethomeen y Berol	44
Figura 3.5. Estructura química general de los surfactantes sintetizados: a) MBA-n; b) MBE-n. Siendo m el número de átomos de carbono de la cadena alquílica	45
Figura 3.6. Esquema de la reacción de síntesis de los surfactantes de amonio cuaternario	47
Figura 3.7. Promedio quincenal de precipitación (mm de lluvia) y temperatura máxima, media y mínima (°C) de marzo a septiembre 2012	65
Figura 3.8. Cantidad quincenal de agua aportada al cultivo de maíz de marzo a septiembre 2012	65
Figura 3.9. Plano del diseño de experimento de campo. T: Suelo control; FC: Suelo tratado con la formulación comercial; FLC: Suelo tratado con la formulación de liberación controlada	66
Figura 4.1. Espectros de RMN ^{13}C CPMAS en estado sólido de suelos	71
Figura 4.2. Gráfica de la tensión superficial frente al logaritmo de la concentración de surfactante (γ)	72
Figura 4.3. Isotermas de adsorción de los surfactantes B048, B266 y ET15 a diferentes concentraciones en Montmorillonita (SWy-2) a una concentración de $1,6 \text{ g L}^{-1}$	75
Figura 4.4. Difractogramas de Rayos X de los complejos B2666/SWy-2: a) Swy-2, b) B266/Swy-2: $0,8 \text{ g L}^{-1}$, c) B266/SWy-2: 1 g L^{-1} , d) B266/SWy-2: 14 g L^{-1}	76
Figura 4.5. Difractogramas de Rayos X de los complejos B048/Swy-2: a) SWy-2; b) B048/Swy-2: $0,5 \text{ g L}^{-1}$, c) B048/SWy-2: 2 g L^{-1} , d) B048/SWy-2: 10 g L^{-1}	77
Figura 4.6. Difractogramas de Rayos X del complejo ET15/SWy-2: a) SWy-2; b) ET15/Swy-2: $0,1 \text{ g L}^{-1}$, c) ET15/SWy-2: $0,6 \text{ g L}^{-1}$, d) ET15/SWy-2: 1 g L^{-1}	79
Figura 4.7. Espectro de absorción por FT-IR del complejo los complejos B266/Swy-2: a) Swy-2, b)	82

B266, c) B266/SWy-2: 0,8 g L ⁻¹ , d) B266/SWy-2: 1 g L ⁻¹ , e) B266/SWy-2: 14 g L ⁻¹	
Figura 4.8. Espectro de absorción por FT-IR del complejo los complejos B048/SWy-2: a) Swy-2, b) B048, c) B048/SWy-2: 0,5 g L ⁻¹ , d) B048/SWy-2: 2 g L ⁻¹ , e) B048/SWy-2: 10 g L ⁻¹	84
Figura 4.9. Espectros de absorción por FT-IR de los complejos ET15/SWy-2: a) Swy-2, b) ET15, c) ET15/SWy-2: 0,1 g L ⁻¹ , d) ET15/SWy-2: 0,6 g L ⁻¹ , e) ET15/SWy-2: 1 g L ⁻¹	85
Figura 4.10. Isotermas de adsorción de los diferentes herbicidas Mesotriona, Metribuzina y Flufenacet a diferentes concentraciones en montmorillonita (1,6 g L ⁻¹).	88
Figura 4.11. Diagramas de solubilidad de los sistemas surfactante/herbicida usados para la realización de FLCs. a) Mesotriona, b) Metribuzina, c) Flufenacet.	89
Figura 4.12. Difractogramas de rayos X de las FLC de a) montmorillonita (SWy-2); b) Complejo ET15/SWy-2 proporción 12/10; c) Formulación MS/ET15 (3,99/12/10)	95
Figura 4.13. Difractogramas de Rayos X de la Formulación FLF/B048, así como el complejo Arcilla-B048: a) Arcilla SWy-2; b) Complejo SWy-2/B048; c) Formulación FLF/B048	96
Figura.4.14. Difractogramas de Rayos X de la Formulación FLF/ET15 así como el complejo Arcilla-ET15: a) Swy-2; b) Complejo SWy-2/ET15; c) Formulación FLF/ET15	97
Figura 4.15. Forma tautomérica ceto-enol de Mesotriona	98
Figura 4.16. Dímero ceto-enol entre las formas tautoméricas del herbicida Mesotriona	98
Figura 4.17. Espectros por IR de la formulación MS/ET15 3,99/12/10: a) Montmorillonita Swy-2, b) ET15, c) Mesotriona, d) ET15/SWy-2 12/10, d) MS/ET15 3,99/12/10	99
Figura 4.18. Espectros por IR de la formulación FLF/B048: a) Montmorillonita Swy-2, b) B048, c) Flufenacet, d) B048/SWy-2 e) FLF/B048	101
Figura 4.19. Espectros por IR de la formulación FLF/ET15: a) Montmorillonita Swy-2, b) ET15, c) Flufenacet, d) ET15/SWy-2, e) FLF/ET15	102
Figura 4.20. Porcentajes de Mesotriona Liberada en agua desde las diferentes formulaciones tanto técnico como FLCs (% acumulado)	103
Figura 4.21. Porcentajes de Metribuzina Liberada en agua desde las diferentes formulaciones tanto técnico como FLCs (% acumulado)	104
Figura 4.22. Porcentajes de Flufenacet Liberado en agua desde las diferentes formulaciones tanto técnico como FLCs (% acumulado)	105
Figura 4.23. Isotermas de adsorción de FLF en los Suelos AL, CR, LB, LT	107
Figura 4.24. Isotermas de adsorción de FLF en los minerales de arcilla más representativos presentes en los suelos bajo estudio. (Realizadas a una concentración de 1,6 g L ⁻¹ de arcilla)	108
Figura 4.25. Isoterma de adsorción-desorción de FLF en suelos AL, CR, LB y LT a diferentes concentraciones	110
Figura 4.26. Porcentajes de FLF retenidos tras 84 (a) y 168 (b) mm de lluvia en columnas del suelo AL en función de la profundidad en experimentos de lixiviación. Las barras verticales son errores estándares	113

Indice

Figura 4.27. Actividad herbicida en los anillos de las columnas de suelo AL de FLF tras 84 (a) y 168 (b) mm de lluvia. Las barras verticales son errores estándares	114
Figura 4.28. Porcentajes de FLF retenidos tras 84 (a) y 168 (b) mm de lluvia en columnas de suelo de LT en función de la profundidad en experimentos de lixiviación. Las barras verticales son errores estándares.	116
Figura 4.29. Actividad herbicida en los anillos de las columnas de suelo LT de FLF tras 84 (a) y 168 (b) mm de lluvia. Las barras verticales son errores estándares.	117
Figura 4.30. Porcentajes de FLF retenidos tras 84 (a) y 168 (b) mm de lluvia en columnas de suelo de CR en función de la profundidad en experimentos de lixiviación, Las barras verticales son errores estándares.	118
Figura 4.31. Actividad herbicida en los anillos de las columnas de suelo CR de FLF tras 84 (a) y 168 (b) mm de lluvia. Las barras verticales son errores estándares.	121
Figura 4.32. Efecto de las formulaciones utilizadas basadas en Flufenacet: a) Tiara 60 [®] ; b) FLF/ET15; c) FLFL/B048, en los diferentes anillos de la columna de suelo CR sobre el crecimiento de la mala hierba <i>Setaria Viridis</i> respecto al control sin herbicida.	120
Figura 4.33. a) Porcentajes de Mesotriona retenidos tras 70 mm de lluvia en columnas de suelos en función de la profundidad en experimentos de lixiviación; .b) Actividad herbicida de Mesotriona en los anillos de las columnas del suelo CR tras 70 mm de lluvia	123
Figura 4.34. Aspecto del cultivo el día que se aplicó el tratamiento con la FC de Mesotriona y la formulación MS/ET15 (3,99/12/10), 37 días después de la siembra	123
Figura 4.35. Aspecto del cultivo 25 días después del tratamiento con la formulación comercial (FC) de Mesotriona y la formulación de liberación controlada MS/ET15 (3,99/12/10) (FLC) en comparación con la parcela control	124
Figura 4.36. Distribución de Mesotriona tras el tratamiento con la FC y la formulación MS/ET15 (3,99/12/10) en función de la profundidad del suelo después de 10, 30 y 180 días de tratamiento.	125
Figura 4.37. Isotermas de adsorción de los surfactantes MBA-12 y MBE-12 a diferentes concentraciones en Montmorillonita (SWy-2) a una concentración 1,6 g L ⁻¹ de arcilla.	128
Figura 4.38. Difractogramas de Rayos X a diferentes recubrimientos del surfactante MBE-12 a) SWy-2; b) MBE-12 0,04 mmol g ⁻¹ ; c) MBE-12 0,5 mmol g ⁻¹	130
Figura 4.39. Difractogramas de Rayos X a diferentes recubrimientos del surfactante MBA-12: a) SWy-2; b) MBA-12 0,2 mmol g ⁻¹ ; c) MBA-12 1,74 mmol g ⁻¹	131
Figura 4.40. Gráfica de la tensión superficial (γ) frente al logaritmo de la concentración de surfactante MBA-12 y Surfactantes Mixtos MBA-12/ET15; MBA-12/B266 y MBA-12/B048	134
Figura 4.41. Diagramas de tamaño micelar (●) frente a potencial Zeta (■) de diferentes relaciones molales del surfactante MBA-12: MBA-12/ET15; MBA-12/B048, MBA-12/B266	138

Figura 4.42. Difractograma de Rayos X de la formulación B266MBA-12MS: a) B266MBA-12/SWy-2; c) B266MBA-12/MS/SWy-2	140
Figura 4.43. Espectros por IR de la formulación B266MBA-12MS: a) Montmorillonita Swy-2, b) MS, c) B266, d) MBA-12, e) B266MBA12; f) B266MBA-12MS	142
Figura 4.44. Porcentajes de Mesotriona Liberada en agua desde las diferentes formulaciones tanto comercial como FLC (% acumulado)	144
Figura 4.45. Porcentajes de Mesotriona retenidos tras 70 mm de lluvia en columnas de suelo CR en función de la profundidad en experimentos de lixiviación	146
Figura 4.46. Actividad herbicida de Mesotriona a diferentes profundidades de las columnas del suelo CR tras 70 mm de lluvia	147

ABREVIATURAS

AL	<i>Suelo de Alájar</i>
B048	<i>Surfactante Berol 048</i>
B266	<i>Surfactante Berol 266</i>
CMC	<i>Concentración micelar crítica del surfactante</i>
CR	<i>Suelo de Coria</i>
DRX	<i>Difracción de Rayos X</i>
EO	<i>Unidades de óxidos de etileno</i>
ET15	<i>Surfactante Ethomeen T15</i>
FC	<i>Formulación comercial</i>
FLF	<i>Flufenacet</i>
FLC	<i>Formulación de liberación controlada</i>
HLB	<i>Balance hidrofílico-lipofílico</i>
<i>i.a.</i>	<i>Ingrediente activo</i>
LB	<i>Suelo de Lebrija</i>
LT	<i>Suelo de las Torres</i>
MS	<i>Mesotriona</i>
MZ	<i>Metribuzina</i>
PM	<i>Peso molecular</i>
a_{min}	<i>Área mínima que ocupa la cabeza polar del surfactante</i>
<i>g</i>	<i>Parámetro de empaquetamiento crítico</i>
K_f	<i>Coefficiente de la ecuación de Freundlich que indica la capacidad de adsorción</i>
K_{mc}	<i>Coefficiente de distribución del herbicida entre las micelas del surfactante y la fase acuosa</i>
K_{ls}	<i>Coefficiente de enlace de la ecuación de Langmuir-Scatchard</i>

K_{sv}	<i>Constante de Stern-Volmer</i>
MSR	<i>Relación molar de solubilización</i>
N_{agg}	<i>Número de agregación</i>
n_c	<i>Número de carbonos en la fracción hidrofóbica del surfactante</i>
S_w^*/S_w	<i>Incremento de solubilidad de un herbicida por acción de un surfactante</i>
SWγ-2	<i>Montmorillonita Sódica de Wyoming 2</i>
β^M	<i>Parámetro empírico del modelo de aproximación de Rubingh</i>
γ	<i>Tensión superficial</i>
Γ_{max}	<i>Máxima concentración de surfactante en la superficie de la interfase</i>
ζ	<i>Potencial Zeta</i>

Introducción

1.1. PLAGUICIDAS

Los plaguicidas son sustancias que se usan para combatir los parásitos tanto de cultivos como del ganado, animales domésticos y el hombre. Por lo general, los productos que nos ofrece la industria tienen una pureza entre el 75-98%, el resto, suelen ser impurezas de la síntesis y fabricación. El producto puro no se suele aplicar de manera directa en la agricultura, por tanto, se usarán diferentes formas o formulaciones que contienen estas sustancias más diluidas y están, por lo general, sostenidas en una matriz sólida o un disolvente líquido con una serie de coadyuvantes que van a optimizar su acción.

El producto fitosanitario o plaguicida se define, según la Organización Mundial de la Salud (OMS) cualquier sustancia o mezclas de sustancias, de carácter orgánico o inorgánico, que está destinada a combatir insectos, ácaros, roedores y otras especies indeseables de plantas y animales que son perjudiciales para el hombre o que interfieren de cualquier otra forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, producción de alimentos, productos agrícolas, madera y productos de madera o alimentos para animales, también aquellos que pueden administrarse a los animales para combatir insectos arácnidos u otras plagas en o sobre sus cuerpos. El término plaguicida incluye también los siguientes tipos de sustancias: reguladores del crecimiento de las plantas, defoliantes, desecantes, agentes para reducir la densidad de la fruta, agentes para evitar la caída prematura de la fruta y sustancias aplicadas a los cultivos antes o después de la cosecha, para proteger el producto contra el deterioro, durante el almacenamiento y transporte. Los pesticidas deben reunir una serie de características para que puedan ser usados, tales como:

- **Efectividad** en la destrucción de la plaga contra la que se aplica.
- **Selectividad** en su acción sobre su objetivo, en cuyo caso no puede perjudicar la flora o fauna beneficiosa.
- **Economía**, proporcionando mayores beneficios que los gastos que ocasiona su uso.
- **Seguridad**, en el sentido de no suponer un peligro para la salud del hombre ni de los animales domésticos, ni representar una elevada toxicidad.
- **Estabilidad** durante el tiempo necesario para el desarrollo de su acción.
- Posibilidad de **formulación** a los efectos de aplicabilidad, estabilidad y efectividad.

En función del criterio usado, son varias las posibilidades de clasificación de los plaguicidas. Estos criterios pueden ser peligrosidad, forma de acción, especie sobre la que actúan y naturaleza del plaguicida.

Introducción

Atendiendo a su peligrosidad, los plaguicidas pueden ser muy tóxicos, tóxicos, nocivos, irritantes, explosivos, cancerígenos, mutagénicos, y peligrosos para el medio ambiente. Si se atiende a la forma en que actúan pueden ser plaguicidas de contacto, en los que la acción tiene lugar a través del contacto directo con la planta. Sistémicos, en los que es “ingerido” por la planta e incorporado a la savia que lo distribuye. Por último, otros plaguicidas actúan al incorporarse a la planta por “inhalación”. Según a la especie sobre la que actúan, los plaguicidas pueden ser acaricidas, bactericidas, fungicidas, herbicidas, insecticidas, nematocidas, rodenticidas, o predadoras, entre otros. La acción de estos últimos es la de inhibir el desarrollo de microorganismos.

De todas las posibles clasificaciones, tal vez, la más interesante desde el punto de vista de esta memoria es la realizada en base a la naturaleza del plaguicida, en la que se aceptan tres grandes grupos: plaguicidas inorgánicos, orgánicos y biológicos.

Bajo la denominación de plaguicidas inorgánicos, se engloban aquellos que son derivados de arsénico, azufre, cobre, flúor, cianhídrico y aceites minerales. Dentro de los plaguicidas orgánicos se encuentran varios tipos: organoclorados, organofosforados, carbamatos, tiocarbamatos, derivados de urea y triazinas y derivados vegetales, como nicotina, roterona o piretrinas. Finalmente, en el grupo de los plaguicidas biológicos encontramos los reguladores del crecimiento, fitohormonas, atrayentes, repelentes y depredadores de la plaga que se combate.

Dado que esta Memoria se centra en el estudio de una determinada serie de herbicidas, se va a hacer, a continuación una breve introducción de los parásitos a los que van dirigidos estos herbicidas, las malas hierbas, así como la necesidad de eliminarlas.

1.1.1. Herbicidas

El concepto de “mala hierba” es algo difuso ya que botánicamente no existe tal término. Nos referimos a mala hierba cuando se quiere hablar de una planta que es “mala” porque dificulta el crecimiento de otras que se pretende que crezcan en un cultivo determinado. Las malas hierbas van a “robar” nutrientes, luz, agua y aire del medio, en detrimento de las plantas cultivadas. De hecho, existen cultivos que en diferentes lugares geográficos, pueden ser considerados como malas hierbas e incluso se pueden considerar como malas hierbas a plantas de la misma familia y género, y diferente especie.

Las malas hierbas, a diferencia de las cultivadas, tienen un crecimiento bastante superior y absorben parte de los abonos aportados al campo de cultivos, especialmente los llamados nitratos. Además absorben parte del agua de riego, siendo ésta un factor importante en el crecimiento de la planta cultivada ya que es el medio de transporte de nutrientes, por medio de la raíz, a la planta. Una disminución del transporte retrasará la llegada de nutrientes a la raíz de la planta y por tanto un retraso en el desarrollo de ésta debido a una menor asimilación clorofílica, y producción de materia de síntesis.

Otro factor indispensable en el crecimiento de una planta es la luz. Ésta va a intervenir de manera activa en el metabolismo de la planta, por tanto, una disminución de la luz va a implicar un retraso en el crecimiento y rendimiento de los cultivos. La planta en respuesta a una disminución de la luz va a alargar el tallo, que quedará más delgado, va a perder su color y se vuelve clorótico.

Esta competencia existente entre la planta cultivada y la mala hierba va a originar un alto coste tanto en la producción de una cosecha, ya que no tendrá el rendimiento deseado ni los productos serán de la calidad demandada, como en el cuidado de esos cultivos, ya que precisan de un laboreo especial porque dificultan la recolección de la planta objeto de cultivo. Para evitar esta serie de problemas, se usan los denominados herbicidas que combaten estas plagas favoreciendo el rendimiento de los cultivos y su estabilidad. También tienen otras aplicaciones que no son estrictamente agrarias, tales como limpieza de los linderos de las vías férreas, de las zonas bajas de los tendidos eléctricos o mantenimiento de los cortafuegos libres de vegetación.

Sin embargo, existen efectos adversos, ya que no suelen ser todo lo específicos que se desea y esto se traduce en que pueden dañar, además de las malas hierbas, al propio cultivo. Esto ha hecho que la industria centre sus investigaciones desde el S. XIX (con la utilización del sulfato de cobre para el control de las malas hierbas en cereales) en la síntesis de herbicidas selectivos y precisos, lo cual explica el amplio abanico de estos productos para ajustarse de mejor manera a las necesidades de cada cultivo.

Actualmente los herbicidas utilizados son muy aceptados por su selectividad, ya que permiten una destrucción de las malas hierbas sin afectar a los cultivos y son muy eficaces, lo que permite que se pueda usar una dosificación muy pequeña que va a repercutir directamente en menores costes de producción. Pero no se debe olvidar que la dosificación de un herbicida es esencial en su aplicación, ya que si no se hace correctamente, no se eliminaría la maleza si

Introducción

estuviera infradosificado, y por el contrario, si hubiera un exceso en su dosificación, se podría acabar con el cultivo.

Los herbicidas se pueden clasificar atendiendo a una serie de criterios como:

- a) Estructura Química: por lo general se clasifican por familias de acuerdo con cierta similitud en su estructura química y grupos funcionales activos, por ejemplo: ácidos fenoxiacéticos, cloroacetamidas, imidazolinonas, piridazinonas, etc. (Ware y Whitacre, 2004).
- b) Modo de Acción: pueden ser no selectivos o totales si destruyen toda la vegetación indiscriminadamente o selectivos si destruyen malas hierbas de los cultivos sin afectar a lo demás (Mallory-Smith y Retzinger, 2003)
- c) Métodos de Aplicación: existen herbicidas de presembrado, se aplican antes de la siembra; preemergencia si se aplican después o al mismo tiempo de la siembra pero antes de que el cultivo emerja del suelo y de post-emergencia, si se usan sobre el cultivo que ya ha emergido y más o menos desarrollado. El mismo herbicida puede ser de presembrado y preemergente, o preemergente y post-emergente, o ambos casos a la vez según las condiciones de aplicación, dosis, cultivo, etc.
- d) Forma de actuar en la planta: pueden ser de contacto (traslocación), que destruyen la planta por contacto directo, y residuales (superficie), que se aplican en el suelo antes de que nazcan las plantas o cuando estas están germinando, que al ser absorbidos por las raíces de la plántula o semilla destruyen la planta. Hay muchos herbicidas que pueden actuar por contacto o como residuales en las hierbas poco crecidas.
- e) Según el modo de moverse en la planta o traslocación se pueden clasificar en herbicidas que pueden traslocarse a través del xilema (aploplásticos), floema (simplásticos), por ambos (traslocación ambivalente o total) o que no pueden traslocarse (de contacto).

El uso constante de un herbicida determinado sobre un cultivo, puede conducir, a la larga, a un cambio de la flora adventicia. Cuando actúa el herbicida sobre las “malas hierbas” y no sobre

otras, hace que éstas últimas invadan el terreno más o menos lentamente, de forma que en un tiempo, las hierbas dominantes dejarán de tener importancia y cederán su sitio a otras en las que el herbicida usual es menos efectivo. Este problema se puede resolver cambiando de herbicida o bien usando una mezcla hecha con otro herbicida que sí sea efectivo sobre la flora dominante.

1.1.1.1. Comportamiento de los herbicidas en suelos

Se pueden dar diferentes vías por las que un herbicida puede estar presente en el suelo. La primera sería por aplicación directa al suelo, a la parte aérea de la planta, arrastre por la lluvia o el viento, restos vegetales, arrastre de restos suspendidos en la atmósfera. Cabe destacar las dos primeras vías ya que son las principales causas de la presencia de herbicidas en suelo ya que no todo el herbicida alcanza a la planta y por tanto, el resto se deposita en la superficie del suelo. En menor medida, se puede producir por arrastre de la lluvia o por el viento. Por último, pero en menor proporción, pueden proceder de restos vegetales que quedan en el suelo al recolectar el cultivo o que se han desprendido durante el tratamiento.

Una vez en el suelo, los herbicidas entran en un ecosistema dinámico y están sometidos a una serie de procesos que determinan su comportamiento. El herbicida se va a distribuir entre las diferentes fases del ambiente y su distribución va a depender tanto de las propiedades del herbicida como de las diferentes fases (Figura 1.1).

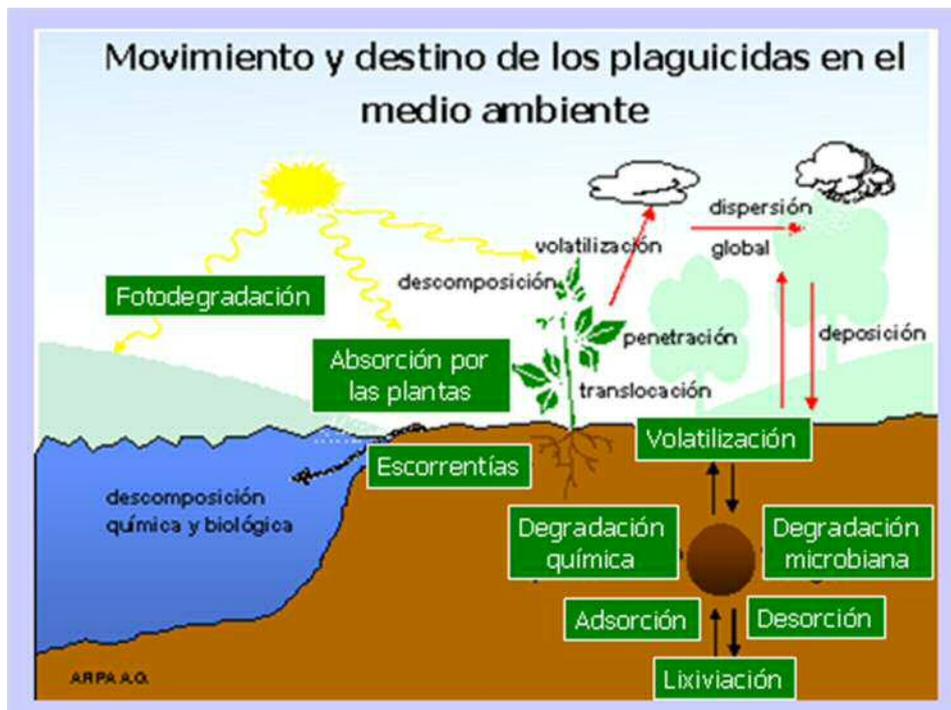


Figura 1.1. Diagrama de la evolución de los herbicidas en suelos

Introducción

La interacción herbicida-suelo-planta es bastante compleja ya que dependerá de muchos factores como edáficos, climatológicos, propiedades de los mismos herbicidas, como solubilidad, y de las mismas especies vegetales. Los procesos de la dinámica de los herbicidas en suelos pueden englobarse en: procesos de transferencia, que hacen referencia a que el herbicida es movilizado de un medio a otro sin experimentar ningún tipo de transformación, y procesos de transformación, en los que el herbicida se transforma o degrada en otros compuestos, que pueden ser de igual, mayor o menor toxicidad.

Dentro de los procesos de transferencia se encuentran los fenómenos de Adsorción-Desorción. Éstos son los procesos más importantes ya que van a condicionar directa o indirectamente la magnitud de los demás procesos.

La adsorción se define como cualquier cambio en la concentración de una sustancia en una interfase que es diferente del seno de la fase original (solución, gas, sólido). La adsorción determinará si el herbicida es persistente o no, si va a ser transportado a lo largo del perfil del suelo convirtiéndose en un contaminante (especialmente para aguas subterráneas) y también, si va a ser eficaz o no (Wauchope y col., 2002).

El sistema suelo es un sistema complejo, estando formado por muchas fases que incluyen sólidos, partículas coloidales, solución del suelo, solutos, tales como nutrientes, otras sustancias orgánicas naturales presentes o gases, como CO₂ y O₂.

Existe una variedad de mecanismos de adsorción que son posibles dependiendo de las propiedades químicas y físicas del herbicida. Los herbicidas iónicos son adsorbidos por los coloides del suelo mediante fuerzas coulombicas dependiendo de su carga iónica. En concreto, los herbicidas catiónicos se adsorben por reacciones de intercambio catiónico, las especies aniónicas son repelidas por los coloides del suelo cargados negativamente y atraídas hacia los cargados positivamente. Por otra parte, los herbicidas aniónicos fosforados se complejarán con los coloides del suelo por intercambio de ligando y por reacciones de precipitación. Por último, los herbicidas que se presentan en forma molecular se unen a los coloides del suelo por enlaces de hidrógeno, complejos de transferencia de carga, por fuerzas de Van der Waals, de London o Debye y aquellos que son altamente apolares, por enlaces hidrofóbicos (Wauchope y col., 2002; Kudsk y Streibig, 2003).

Los diferentes mecanismos de adsorción dan lugar a diferentes tipos de isothermas de adsorción (Calvet, 1989). Las isothermas servirán para caracterizar el comportamiento de

herbicidas en suelo y ayudan a determinar la cantidad de herbicida adsorbido por cantidad prefijada de sustancia adsorbente (García-Torres y Fernández-Quintanilla, 1991).

Se pueden establecer cuatro tipos diferentes de isotermas:

- Isoterma tipo S: presentan una pendiente inicial baja que aumenta con la adsorción y vuelve a disminuir a adsorción alta. Sugiere una afinidad de la superficie por el adsorbato menor que la de la solución, probablemente debido a competencia entre el adsorbato y el disolvente.
- Isoterma tipo L: indican una afinidad relativamente alta de la superficie por el adsorbato, que disminuye al aumentar la adsorción como consecuencia de una disminución en la superficie disponible, de aquí que la pendiente vaya disminuyendo con la adsorción hasta alcanzar un valor constante.
- Isoterma tipo H: son un caso extremo de la curva tipo L, con una pendiente inicial muy grande, sugiriendo una afinidad muy alta.
- Isotermas tipo C: presentan una pendiente constante hasta alcanzar la adsorción máxima posible, y son debidas a una distribución constante del adsorbato entre la interfase y la solución.

La desorción es el proceso inverso a la adsorción. Esta puede ser total (adsorción reversible) o puede no serlo en gran medida (adsorción parcialmente irreversible). Las diferencias entre las isotermas de adsorción y desorción obtenidas para un mismo soluto es lo que se denomina histéresis, ésta es la cantidad de soluto que queda retenido por el adsorbente en los procesos de desorción y es diferente de la esperada de acuerdo con su isoterma de adsorción, para una concentración de equilibrio dada.

Los procesos de adsorción-desorción no sólo están influenciados por la naturaleza físico-química de los herbicidas, sino también por otra serie de factores suelo-dependientes (Sánchez-Martín y col., 2006; Rodríguez-Cruz y col., 2006). Entre estos factores cabe destacar la humedad, la temperatura, el pH, el contenido en minerales y materia orgánica del suelo (Wauchope y col., 2002; Zhuojing y col., 2002; Rodríguez-Cruz y col., 2007).

Introducción

Otros procesos de transferencia serían la absorción, exudación y retención por las plantas, donde, la absorción consiste en la penetración de agua o sustancias sólidas, líquidas o gaseosas disueltas en ella, en las plantas. Puede realizarse por las raíces o por las hojas. La exudación es la salida de líquido de los órganos de las plantas en condiciones patológicas al ser lesionados. La retención de herbicidas por las plantas depende de las propiedades del herbicida (Ashton y Crafts, 1981; Gutiérrez y Arregui, 2000) tanto para la maleza, como para plantas de interés agrícola. Herbicidas como el 2,4-D tienen una solubilidad acuosa de moderada a alta y son muy móviles tanto fuera como dentro de las plantas, mientras que herbicidas de dinitroanilina son muy insolubles y muy inmóviles en plantas. Normalmente, la cantidad de un herbicida móvil absorbido y retenido por la planta alcanza un 5-10% de la cantidad aplicada total. Por otro lado, existen herbicidas que pueden ser exudados o metabolizados por las plantas, aunque el grado en el que lo hacen depende, entre otros factores, del tipo de herbicida. Por ejemplo, se ha visto que tanto alacloro como metolacloro son rápidamente metabolizados en maíz y sus metabolitos se han localizado tanto en la parte aérea de la planta como en las raíces (Al-Khatib y col., 2002); mientras que otros herbicidas como la Simazina son más rápidamente degradados en el suelo que por las plantas (García-Torres y Fernández-Quintanilla, 1991).

La lixiviación entra también dentro de los procesos de transferencia, también denominada como percolación o flujo de masas, es un proceso frecuente de transporte de los herbicidas a lo largo del perfil del suelo, que puede tener lugar tanto si el herbicida está en solución como en fase sólida (por arrastre mecánico o lavado del mismo), debido a la influencia del agua, tanto de riego como de lluvia (Carter, 2000). Los procesos de movimiento de masas y de difusión están implicados en ambos casos (Hartley y Graham-Bryce, 1980; Taboada y col., 1994). Según el herbicida implicado bajo las mismas condiciones ambientales, la cantidad de herbicida que aparece en el lixiviado puede ser desde no detectable hasta alcanzar más del 90%. La capacidad de lixiviación bajo las mismas condiciones puede disminuir en el orden bromacilo> atrazina> simazina> terbumetona> terbutilazina> diurón> trifluralina (Gómez de Barreda y col., 1993). Por tanto, las propiedades físico-químicas de un herbicida determinan su tendencia a lixiviar. Las más importantes serían su capacidad de adsorción (K_d) y su vida media (t_{50}) en suelos. Éstas dos propiedades determinan la movilidad y la persistencia (Carter, 2000). Si se combinasen, se puede determinar el índice GUS, "Groundwater Ubiquity Score" (Gustafson, 1989). Este índice junto con otros índices pueden resultar muy útiles para comparar la movilidad relativa entre herbicidas sin referirse al uso o sitio específico (Wauchope y col., 2002).

Lo deseable sería encontrar un uno por ciento o menos del herbicida con sus metabolitos a una profundidad de 90 cm en el suelo al final de la estación bajo condiciones de campo. Sin embargo, dicho porcentaje, puede aumentar considerablemente bajo ciertas circunstancias (Carter, 2000), como sería el caso de suelos en los que el agua se moviliza rápidamente a través de fisuras, macroporos o grietas (Carter, 1999). Los factores a tener en cuenta son las características físico-químicas del suelo (Andrades y col., 2001; Rodríguez-Cruz y col., 2007), la frecuencia e intensidad de la lluvia y el riego (Morillo y col., 2000; Undabeytia y col., 2000a), la solubilidad del plaguicida y posibilidad de adsorción del plaguicida en los coloides del suelo (Andrades y col., 2004).

Existen otros procesos de transformación no menos importantes como:

- **Difusión:** es el proceso por el cual el plaguicida es transportado en el suelo como resultado de un movimiento molecular al azar, causado por la energía térmica de las moléculas. A causa de ello, hay un movimiento neto de posiciones de alta concentración a otras de menor concentración, y su importancia depende fundamentalmente de su solubilidad y de la presión de vapor del plaguicida. Los factores más influyentes en la difusión de los herbicidas en el suelo son: la solubilidad, la temperatura, la humedad y porosidad del suelo, la presión de vapor y el grado de adsorción del plaguicida.
- **Volatilización:** es un proceso frecuente en el movimiento y desaparición de herbicidas en el suelo, que consiste en el flujo del compuesto hacia la fase aire y supone uno de los mecanismos de pérdida de masa hacia la atmósfera. La volatilidad potencial está relacionada con su presión de vapor, pero la volatilidad efectiva depende, además de la temperatura, de la composición del suelo, el contenido en agua, la naturaleza del plaguicida y el grado de adsorción. Se ha visto que las mayores pérdidas por volatilización se producen en residuos localizados a nivel superficial y con suelos húmedos (Carter, 2000).
- **Erosión o arrastre:** al estar los herbicidas tan íntimamente ligados a las partículas del suelo, ya sea por adsorción sobre las mismas o por simple mezcla, estas partículas pueden actuar como portadores del plaguicidas sobre la superficie del suelo cuando son movidas de un lugar a otro por el agua o el aire, mediante el proceso de erosión (Cheng, 1990).

Introducción

Por último, entre los procesos de transformación, cabe señalar la degradación química y microbiológica. Éstas están íntimamente ligadas entre sí siendo difícil establecer independencia entre ellas, por lo que se suele denominar degradación bioquímica. Así como la degradación química procede principalmente de reacciones de hidrólisis, oxidación y reducción, pudiéndose dar también isomerización, deshalogenación, desalquilación, reacciones de dismutación y reacciones con radicales libres (Blumhorst y Weber, 1992; Smith y Aubin, 1993), la degradación microbiológica es quizás el mecanismo de descomposición de herbicidas más importante, en el que las bacterias, algas y hongos del suelo los descomponen y los usan como fuente de alimentos y energía para su crecimiento (Bending y col., 2007).

La descomposición bioquímica de los herbicidas depende principalmente de la estructura química de la molécula, frecuencia y cantidad de aplicación, presencia de otros plaguicidas y de las condiciones del sistema suelo tales como composición, humedad, aireación, sustancias catalizadoras, biodisponibilidad de fósforo y nitrógeno, y tipo de microorganismos presentes (Al-Khatib y col., 2002; Bending y col., 2007; Bending y Rodríguez-Cruz, 2007). En este sentido, se ha visto que el aumento de la temperatura, humedad y materia orgánica estimula la degradación microbiológica de muchos herbicidas, como por ejemplo la atrazina o el alacloro (Sonon y Schwab, 2004; Navarro y col., 2004). Asimismo, en algunos casos se observa que solo una parte de la molécula puede ser degradada y usada como fuente de carbono y energía para el crecimiento microbiano. En el mejor de los casos se puede alcanzar la degradación completa del herbicida. Alternativamente se pueden formar productos intermedios de mayor o menor toxicidad que podrían ser transformados por otras cadenas microbianas. Bajo ciertas condiciones estos productos intermedios pueden adsorberse fuertemente al suelo y de esta forma acumularse por largos períodos de tiempo o alcanzar ambientes sensibles como el subsuelo o el agua subterránea (Fournier y col., 1997).

La degradación fotoquímica consiste en la degradación no biológica de herbicidas mediante la luz solar. La luz ultravioleta induce una gran variedad de reacciones tales como oxidación, reducción, hidrólisis e isomerización de muchos herbicidas, que incluyen ácidos fenoxiacéticos como 2,4-D, fenilureas como monurón, amidas tales como CDAA, dinitroamidas como la trifluralina, ácidos benzoicos como dicamba, carbamatos como profan, herbicidas fenólicos como DNOC, triazoles como aminotriazol (Katagi, 2004). La cantidad de herbicida fotodegradado depende a su vez del método de aplicación, su tiempo de exposición al sol, del grado de adsorción del plaguicida en el suelo, presencia de catalizadores fotoquímicos, pH del

suelo y grado de aireación del mismo. La degradación puede alcanzar desde un bajo porcentaje para un herbicida que se incorpora al suelo, hasta más de un 90% para un herbicida acuático.

Dentro de la fotólisis se pueden diferenciar dos tipos: fotólisis directa y fotólisis indirecta. En el primer caso se trata de herbicidas que absorben la luz ultravioleta dentro del espectro de radiación solar (≥ 290 nm). La fotólisis indirecta tiene lugar cuando la energía de la radiación solar es absorbida por otros compuestos que luego transmiten dicha energía a la molécula del herbicida, o bien dan lugar a nuevas especies reactivas (peróxidos, radicales OH, etc.) que atacan a las moléculas del herbicida (Undabeytia y col., 2000b; Gutiérrez y Arregui, 2000).

En los primeros milímetros del suelo tiene más relevancia la fotólisis directa que es donde llega la radiación solar, además de en la superficie de las plantas, y también en ecosistemas acuáticos, donde los herbicidas pueden ser transportados en disolución o bien adsorbidos en la materia orgánica particulada. La radiación solar UV de mínima longitud de onda que llega a la superficie terrestre es aproximadamente de 286 nm, siendo fundamentalmente la radiación responsable de los procesos de fotólisis la comprendida en el rango de 300-380 nm (Katagi, 2004).

1.1.1.2. Problemática ambiental derivada del uso de herbicidas

Debido al aumento demográfico a escala mundial, en los últimos años se ha tendido hacia una agricultura productivista, ya que las plantas constituyen la principal fuente de alimentos en el mundo. Este aumento de la productividad se ha realizado con la difusión de nuevas variedades de cultivo de alto rendimiento, unido a nuevas prácticas agrícolas que utilizan grandes cantidades de fertilizantes y plaguicidas, así como tractores y otra maquinaria pesada. Los beneficios alcanzados por esta mejora agrícola son indiscutibles, pero han surgido diversos problemas entre los que destacan los daños ambientales generados, tales como la erosión del suelo, la salinización y el anegamiento de suelos muy irrigados, el agotamiento de acuíferos, deforestación, etc., y la contaminación del medio ambiente por el uso excesivo de plaguicidas.

El uso de plaguicidas es totalmente imprescindible ya que las plantas son susceptibles de sufrir aproximadamente unas 100.000 enfermedades, causadas por agentes muy variados.

El Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente lleva a cabo la Estadística de Comercialización de Productos Fitosanitarios a través de la “encuesta de comercialización de Productos Fitosanitarios”, encuesta que se basa en el conocimiento de las sustancias activas comercializadas dentro del marco nacional por las empresas titulares de dichos productos. Los

Introducción

Porcentajes de las principales categorías de fitosanitarios consumidos a nivel nacional en el año 2012 según el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente fueron:

- 42,94% Fungicidas y bactericidas
- 18,72% Herbicidas
- 11,04% Insecticidas y acaricidas
- 23,74% Otros

La Estadística de Comercialización de Productos Fitosanitarios es considerada una herramienta fundamental dentro del Plan de Acción Nacional para el uso sostenible de productos Fitosanitarios (PAN) desarrollado de acuerdo al Real Decreto 1311/2012, 4 de Septiembre, que establece el marco político para alcanzar un uso sostenible y transpone el ordenamiento jurídico interno Directiva 2009/128/CEE, 21 de Octubre de 2009 la acción comunitaria para un uso sostenible de plaguicidas.

En Europa, durante el año 2009, se consumieron 61771 toneladas de productos para la protección de plantas (Anexo III del Reglamento (CE) 1185/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo de 25 de Noviembre de 2009 relativo a las estadísticas de plaguicidas). De esta cantidad un 41,34% responde a fungicidas y un 22,05% a herbicidas.

Hay que tener en cuenta que cuando se aplica todo el plaguicida (o herbicida incidiendo en nuestro particular interés), este no alcanza su objetivo, y cuando alcanza la superficie del suelo, puede sufrir una serie de procesos, como se ha dicho anteriormente tales como degradación química y/o biológica, fotodescomposición, y pérdidas por escorrentías y lixiviación a lo largo del perfil del suelo. Esto último puede producir tres efectos: (i) aumento de la actividad residual del herbicida, ya que la actividad microbiana responsable de la degradación de la mayoría de los herbicidas decrece con la profundidad; (ii) reducción de la concentración del herbicida en la parte superior del suelo por debajo de los umbrales necesarios para el control de las malas hierbas, y acumulación excesiva en la zona raíz del cultivo a niveles que pongan en peligro la seguridad del mismo; (iii) el agua que se infiltra en el suelo puede transportar herbicidas a través y por debajo de la zona raíz, pudiendo alcanzar y contaminar aguas subterráneas.

Esto ha conducido a la aparición de una serie de iniciativas y a la adopción de ciertas medidas para preservar el medio ambiente de los efectos adversos provocados por los plaguicidas. El Parlamento Europeo y el Consejo adoptaron el 21 de octubre de 2009 dos actos legislativos que modificaron profundamente la normativa en materia de comercialización y utilización de productos fitosanitarios atendiendo a lo establecido en el VI Programa Comunitario de Acción Medioambiental. Estos actos son el Reglamento (CE) nº 1107/2009 relativo a la

comercialización de productos fitosanitarios y la Directiva 2009/128/CE por la que se establece el marco de la actuación comunitaria que tiene que adoptar cada Estado Miembro para conseguir un uso sostenible de los plaguicidas. Como consecuencia, España en el R.D. 1311/2012 estableció su Plan Nacional de actuación para conseguir un uso sostenible de los plaguicidas disminuyendo los riesgos humanos y medioambientales, y fomentando el uso de la Gestión Integrada de plagas y los métodos no químicos.

Por otro lado, el Reglamento (CE) nº396/2005 marca el límite máximo de residuos (LMR) de plaguicidas en alimentos y piensos de origen vegetal y animal, y la Directiva 2000/60/CE establece un marco para la protección de las aguas superficiales continentales, las aguas de transición, las aguas costeras y las aguas subterráneas.

No obstante todo lo anterior, hay que reconocer que los plaguicidas, en general, y los herbicidas, en particular, contribuyen significativamente al sostenimiento y protección de cultivos, siendo indispensables para la agricultura moderna. Sin embargo, a pesar de los beneficios de los herbicidas, en la sociedad hay una urgente necesidad de optimizar su uso, no sólo en respuesta a la normativa sobre LMR en alimentos y aguas, o sobre contaminación medioambiental, sino también para asegurar que los herbicidas se mantendrán como una herramienta efectiva y valiosa para los agricultores en el futuro (Kudsk y Streibig, 2003).

1.2. FORMULACIONES DE LIBERACIÓN CONTROLADA EN AGRICULTURA

Como se ha comentado anteriormente, un plaguicida no se va a aplicar nunca como tal, necesita ser formulado combinándolo con otros productos para así mantener su efectividad durante su uso y almacenamiento. Este nuevo producto es denominado como “formulación comercial” y tiene como objetivo:

1. Obtener una alta eficacia biológica que se mantenga el tiempo necesario en el cultivo para controlar las malas hierbas.
2. Reducir la utilización de solventes y/o seleccionar solventes que no sean tóxicos.
3. Minimizar o anular efectos adversos sobre los organismos que no sean objeto de su acción.
4. Asegurar su utilización por parte de los usuarios.
5. Ampliar el espectro de aplicación de los plaguicidas.

6. Ser estables física y químicamente en el tiempo y a su vez compatibles con otras formulaciones que pudieran estar presentes en los sistemas de mezclado de los equipos de aplicación.

En base a esta serie de objetivos, surge la necesidad de crear una formulación que ofrezca todos estos beneficios y además sea más económica.

La tendencia que ha tenido los últimos 40 años la industria agroquímica ha sido desarrollar nuevas formulaciones de herbicidas que eviten la sobredosisificación debido a la pérdida de ingrediente activo como consecuencia de los diferentes procesos de degradación y transporte que hacen que los plaguicidas y fertilizantes tengan más difícil alcanzar su objetivo en el cultivo.

Como alternativa a los sistemas de aplicación de herbicidas convencionales nacen las formulaciones de liberación controlada (FLC) de plaguicidas. El uso de este tipo de formulaciones van a disminuir el riesgo en su uso aumentando la seguridad, tanto del trabajador como del consumidor, siendo formulaciones más eficientes donde se minimiza al máximo la pérdida de materia activa.

La liberación controlada (LC) se puede definir como una técnica o método en el que el agente químico activo está disponible para un producto específico a una velocidad y con una duración, diseñados para lograr el efecto pretendido (Scher, 1999). La LC tiene su máximo exponente en la industria farmacéutica usándose en diferentes formas farmacéuticas para la liberación de fármacos de manera controlada en el organismo ya sea para principios activos de difícil dosificación o para disminuir la posología de los mismos.

La tendencia actual de esta técnica es el diseño de formulaciones de liberación controlada en cosmética e industria alimentaria. El desarrollo de estos productos en el sector agroquímico está siendo una solución a los problemas de eficacia de aplicación y contaminación medioambiental derivada del uso de plaguicidas.

Como puede verse en la Figura 1.2, la tasa de ingrediente activo (*i.a.*) liberado desde las formulaciones convencionales está relacionada generalmente de forma exponencial con la cantidad (o concentración) del mismo que se encuentra en la formulación. Esto significa que la concentración en el medioambiente debe ser inicialmente muy alta (resultando tóxica la mayoría de las veces) y decrece rápidamente a niveles bajos e inefectivos. El diseño de formulaciones de liberación controlada de plaguicidas tiene como finalidad el mantener por un mayor tiempo el umbral de concentración de ingrediente activo para el control de la plaga en el suelo o planta

mediante su liberación a la velocidad adecuada, reduciendo de esta forma su nivel en el medioambiente porque son necesarias cantidades inferiores o menores aplicaciones para conseguir el efecto biológico deseado.

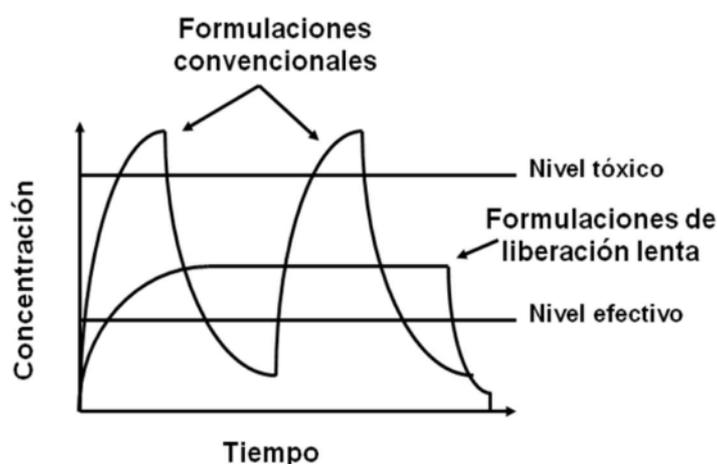


Figura 1.2. Efecto de la concentración de herbicida en función del tiempo desde formulaciones convencionales y de liberación lenta (extraído y modificado de Scher, 1999)

El objetivo principal de la liberación controlada no es otro que controlar la liberación de ingredientes activos de la formulación, facilitar su disponibilidad al objetivo específico a una concentración deseada, y mantener mayor eficacia biológica. Los sistemas de LC no tienen como finalidad aumentar la persistencia de los herbicidas en relación a los sistemas convencionales sino controlar la liberación del ingrediente activo para hacerlo más disponible en el momento más oportuno para la protección del cultivo, por otra parte, se intenta hacer un producto menos contaminante disminuyendo el gasto de materia activa.

Se han desarrollado numerosos sistemas de liberación controlada mediante recubrimiento y microencapsulación de plaguicidas empleando distintas técnicas tales como atomización, encapsulación en reactores anulares, coacervación compleja, coacervación orgánica, polimerización interfacial, recubrimiento en lecho fluido, evaporación del disolvente, recubrimiento en discos giratorios, etc. (Hirech y col., 2003; Sopeña y col., 2005, 2007a, 2007b, 2009; Piccolo y col., 2006; El-Bahri y Taverdet, 2007).

Según el tamaño de la partícula final obtenida, las formulaciones de liberación controlada pueden dividirse en microcápsulas, micropartículas y gránulos, aunque no hay que olvidar que existen otras formulaciones en las que se emplean sustancias soportes con diversas formas (láminas, tubos, films, etc.) (Arshady, 1999). Las microcápsulas son partículas entre 1 y 100 micras

compuestas por una pared o cubierta y un núcleo que es la molécula de plaguicida. Las micropartículas y los gránulos están compuestos por una sustancia matriz en la que el plaguicida está uniformemente disuelto o disperso. Se diferencian en el tamaño de ambas, ya que las micropartículas se encuentran entre 1 y 100 micras y los gránulos entre 0,1 y 2 mm.

1.2.1. Formulaciones de Liberación controlada basadas en minerales de la arcilla

Minerales de la arcilla

Los minerales de la arcilla son los componentes de la fracción arcilla del suelo (< 2,0 mm) más importantes desde el punto de vista de la adsorción junto con la materia orgánica del suelo no solo por su abundancia en los suelos, sino por presentar altos valores de superficie específica y capacidad de cambio, así como por poseer en su mayoría una apreciable superficie interna, que en el caso particular de la montmorillonita, es accesible a moléculas orgánicas de gran tamaño (Theng 1974)

Los minerales de la arcilla también se han usado en formulaciones de liberación controlada para mejorar la acción de la formulación base. También conocidos como silicatos laminares, están formados por un amplio grupo de minerales de composición química diferente pero de dimensiones de celda unidad muy parecida. La red atómica de los minerales de arcilla se puede considerar formada por dos tipos de unidades estructurales:

- Tetraedros SiO_4 : comparten tres de sus tres vértices (Figura 1.3.a.)
- Dos planos de Oxígenos o Hidroxilos entre los iones Al^{3+} , Fe^{3+} , Mg^{2+} , etc. que se encuentran ocupando los intersticios en coordinación octaédrica (Figura 1.3.b.).

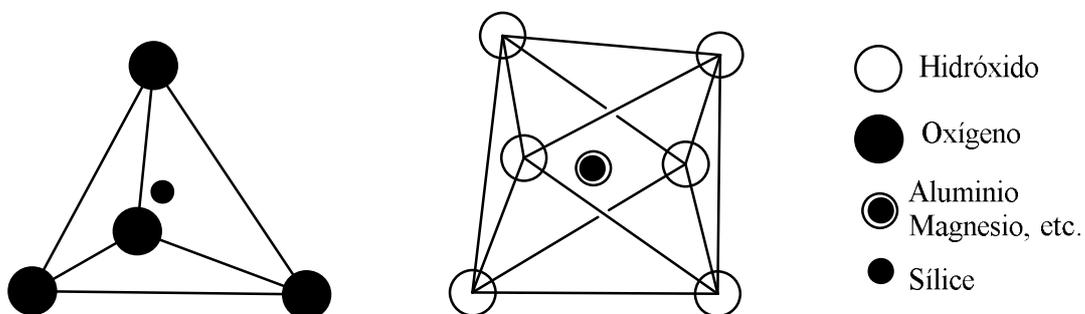


Figura 1.3. Estructuras atómicas básicas de los minerales de arcilla. a) unidad tetraédrica, b) unidad octaédrica

Los distintos minerales de la arcilla difieren de la naturaleza, disposición y modo de cómo se ordenan ambos tipos de unidades estructurales en la lámina elemental. Esta condensación puede realizarse de las siguientes formas:

- a) En proporción 1:1, dando lugar a los minerales de la arcilla de la fórmula general $M_{2-3}Si_2O_5(OH)_4$, llamados del tipo 1:1. Dentro de este grupo las especies dioctaédricas o subgrupo de la caolinita ha sido la más estudiada en cuanto a interacción con compuestos orgánicos se refiere, pues el subgrupo de la serpentina no ha recibido mucha atención en este sentido.
- b) En proporción 2:1, estando la capa de octaedros situada entre dos de tetraedros y de fórmula general $M_{2-3}Si_4O_{10}(OH)_2$, llamados minerales del tipo 2:1. Las Esmectitas octaédricas y especialmente la Montmorillonita son los minerales de este grupo más estudiados en relación a los fenómenos de adsorción de especies orgánicas. También la vermiculita es otro mineral de este grupo que puede adsorber compuestos orgánicos en su espacio interlaminar.
- c) De forma que se unen cuatro capas, resultando un mineral en el que unidades del tipo 2:1 alternan con planos de $M(OH)_{2-3}$ en el que los M^{2+} o M^{3+} están coordinados octaédricamente.

En estas estructuras se pueden dar sustituciones isomórficas del Si^{4+} y/o de $M^{2+}/^{3+}$ por cationes de tamaño similar pero de carga generalmente más baja. Según el número de cationes sustituidos resultarán minerales de carga superficial diferente. Esta deficiencia de carga positiva puede ser equilibrada mediante la incorporación de cationes, sean o no cambiables. Las capas de octaedros pueden ser de dos tipos diferentes según los huecos de coordinación seis estén ocupados totalmente por cationes, dando lugar a los minerales trioctaédricos, o que solamente lo estén dos de cada tres huecos, originándose entonces los minerales dioctaédricos.

Hay otros minerales de la arcilla llamados minerales fibrosos como son la sepiolita y la paligorskita o atapulguita, formadas por láminas del tipo 2:1 situadas en cadenas o bandas y unidas entre sí a través de iones oxígeno, dejando entre las mismas canales en dirección del eje a.

En la fracción arcilla de algunos suelos (volcánicos, especialmente) existen minerales no cristalinos y altamente desordenados que se designan con el nombre genérico de alófanas. Están formados por tetraedros $(Si, Al)(O, OH)_4$ unidos al azar con octaedros $Al(OH)_6$.

Introducción

Otros componentes minerales de la fracción arcilla del suelo son los óxidos e hidróxidos de silicio, aluminio, hierro y otros elementos en estado cristalino o amorfo cuyas estructuras no son bien conocidas. La superficie de estos minerales es pequeña en estado cristalino, aunque llega a ser importante en estado amorfo, presentando además carga positiva, por lo que su capacidad de cambio aniónico puede ser alta.

Montmorillonita

A continuación se describen las características más destacadas, según los objetivos programados en este trabajo del mineral de la arcilla usado. Se trata de mineral de la arcilla de tipo 2:1: Montmorillonita.

La lámina de la montmorillonita está compuesta por dos capas de tetraedros silicio-oxígeno, entre las cuales hay otra de octaedros Al-O-OH resultando un espesor de 9,1 Å. En esta capa existen sustituciones isomórficas de Si^{4+} por Al^{3+} en coordinación cuatro, aunque poco abundantes, y de Al^{3+} por Mg^{2+} , Fe^{2+} , etc., en coordinación seis, resultando un exceso de carga negativa en las láminas que se compensa:

- a) Por entrada de nuevos cationes en coordinación seis hasta determinada proporción.
- b) Por sustitución de oxígeno por hidroxilos.
- c) Por entrada de cationes cambiables en los espacios interlaminares.

En el espacio interlaminar se adsorbe también agua que se encuentra hidratando a los cationes de cambio, dependiendo la proporción de agua de la humedad del ambiente y de la naturaleza del catión.

El agua interlaminar del sólido cristalino existente en la montmorillonita juega un papel importantísimo en la interacción de minerales de la arcilla con compuestos orgánicos, especialmente con compuestos no cargados. El agua puede producir en la montmorillonita tres tipos de hinchamiento, obteniéndose los siguientes estados del sistema arcilla-agua: sólido cristalino, en el que la fuerza interlaminar de tipo repulsivo corresponde a la de hidratación del catión, y la atractiva, a la electrostática; pasta-gel, en la que la fuerza repulsiva se halla en la interacción de láminas dobles difusas, y la atractiva es la electrostática de fricción, enlaces entre bordes: sol-gel, en donde las fuerzas repulsivas son la interacción de láminas dobles difusas y la agitación térmica y las atractivas son enlaces borde-cara y borde-borde (Norrish, 1972). Estas posibilidades de hinchamiento permiten que en el espacio interlaminar de la montmorillonita pueda entrar una amplia variedad de compuestos orgánicos, independientemente del tamaño que éstos tengan.

El gran poder adsorbente de la montmorillonita, frente a otros minerales de la arcilla se debe también a su alta superficie específica ($600-800 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$) y a su elevada capacidad de cambio catiónico ($0,8-150 \text{ meq } 100\text{g}^{-1}$), lo cual permite que este mineral forme complejos interlaminares con una amplia variedad de compuestos orgánicos (Theng, 1974) dando lugar a un cambio en el valor de su espaciado basal así como carga neta de la arcilla, en el caso de que éstos tengan carga o apantallen las cargas del mineral.

En lo que respecta al uso de minerales de la arcilla para la preparación de formulaciones de liberación controlada de plaguicidas, Flores-Céspedes y col., (2007) y Fernández-Pérez (2007) observaron que la liberación del plaguicida de gránulos de alginato depende de la solubilidad del plaguicida atrapado, pero el perfil de liberación se puede modificar mediante la adición de minerales de arcilla en el proceso de gelificación. La montmorillonita es usada para retardar la liberación de diferentes herbicidas en formulaciones de liberación controlada basadas en alginato, debido a la adsorción del herbicida en la superficie del mineral de la arcilla, mientras que la presencia de otros minerales tales como caolinita y atapulgita producen un efecto barrera en la liberación del herbicida (Gerstl y col., 1998). Se han diseñado formulaciones basadas en minerales de la arcilla para la fotoestabilización de plaguicidas. Se ha observado que tras 96 h de irradiación, una formulación montmorillonita-trifluralina retiene el 75% de su actividad frente al 30% de la trifluralina libre (Margulies y col., 1992).

Los minerales de la arcilla se usan también como soportes en formulaciones de organoarcillas de plaguicidas con el fin de reducir su percolación, fotodegradación y volatilización (Margulies y col., 1994; Undabeytia y col., 2000b; El-Nahhal y col., 2001; Celis y col., 2007).

La mayoría de los estudios se han focalizado en el uso de montmorillonita modificada mediante adsorción previa de cationes orgánicos monovalentes que cambian la naturaleza de la superficie de la arcilla de hidrofílica a hidrofóbica (Andrades y col., 2004). La magnitud de estas interacciones justificaba el diferente grado de adsorción del herbicida sobre la arcilla con diferentes cargas del mismo catión orgánico (Nir y col., 2000).

Otra aproximación desarrollada para la preparación de formulaciones de liberación lenta consiste en la combinación de vesículas (o micelas) con minerales de la arcilla (Nir y col., 2006). Se han diseñado formulaciones para herbicidas aniónicos mediante su encapsulación en micelas o vesículas catiónicas formadas por cationes de alquilamonio con cadenas alquílicas largas, las cuales se adsorben por interacciones electrostáticas en montmorillonita (Undabeytia y col., 2003; Undabeytia y col., 2004). Se ha observado que una formulación óptima vesicular (o micelar)-

Introducción

arcilla de herbicidas aniónicos en la que una gran fracción del herbicida sea adsorbida por el complejo micelas (o vesículas)-arcilla, sólo puede obtenerse para determinadas relaciones vesículas (o micelas)-arcilla, de forma que la mayoría de las vesículas o micelas se adsorban sin sufrir una descomposición prematura. La descomposición de las micelas o vesículas resultaría en la liberación a la solución de moléculas aniónicas de herbicidas unidas, que a su vez no se adsorben sobre las láminas de carga permanente de la arcilla y de forma ineficaz sobre aquellas láminas en las que estén adsorbidos los monómeros (Mishael y col., 2002a; Undabeytia y col., 2004). Las formulaciones arcilla-vesículas (micelas) desarrolladas con herbicidas pertenecientes a la familia de las sulfonilureas reducían varias veces la cantidad de herbicida lixiviada y aumentaban la actividad biológica en la capa superior del suelo. Las dosis de aplicación de estas formulaciones pueden ser bastante inferiores que las de las formulaciones comerciales (Mishael y col., 2002b; 2003; Undabeytia y col., 2003).

En el presente estudio, nos centraremos en los minerales de arcilla como sistema matricial. Las arcillas poseen propiedades únicas, como su elevada superficie específica asociada a su pequeño tamaño de partícula, bajo coste, y su presencia en la mayoría de suelos y sedimentos. 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 de dichos herbicidas y controlar la desorción una vez añadidos al medio ambiente. Las características del mineral de la arcilla, la cantidad y naturaleza de los cationes interlaminares, la relación arcilla-herbicida y el procedimiento seguido para preparar la formulación afectan a la interacción del herbicida con el adsorbente y el grado de liberación (Carrizosa y col., 2003).

Recientemente, se han producido importantes hallazgos utilizando minerales de la arcilla que consisten en la preparación de arcillas orgánicas de bajo costo y biodegradables. El estudio realizado por Mallakpour y Dinari (2011) está basado en la preparación y caracterización de nuevas arcillas orgánicas usando aminoácidos naturales y cloisita- Na^+ . Seis tipos de aminoácidos se usaron para modificar Cloisita- Na^+ con el objetivo de crear nuevas organoarcillas. Los resultados mostraron que se produjo un aumento en el espacio interlaminar de las organoarcillas. Por otro lado, también mejora la miscibilidad, además, el uso de aminoácidos proporciona una tecnología limpia y favorable para el medio ambiente. Algunos ejemplos de FLCs con minerales de arcilla son los siguientes:

- La encapsulación del ingrediente activo en vesículas de fosfatidilcolina de herbicidas hidrofóbicos y su adsorción sobre montmorillonita. Dichas formulaciones muestran una significativa reducción de la lixiviación y una elevada bioactividad en las capas

superficiales del suelo. Además es capaz de prolongar la actividad del herbicida disminuyendo las pérdidas por disipación (Undabeytia y col., 2011).

- La haloisita, una arcilla natural, se usa para prolongar el efecto de los tratamientos fungicidas de dithianón y oxiclورو de cobre en árboles frutales. Como consecuencia a la adición de la arcilla, se reduce la solubilidad del fungicida en el medio acuoso, permitiendo un mayor efecto residual (Silva, 2013).
- El estudio de mecanismos de adsorción/desorción del plaguicida etofumesato sobre arcillas y organoarcillas para dilucidar el impacto de las propiedades estructurales y químicas de las arcillas en las interacciones arcilla-plaguicidas en medio acuoso. Tomando como grupo representativo cinco montmorilonitas comerciales, se estudiaron: Montmorillonita (MMT) sódica natural, organoarcilla modificada con alquilamonio apolares y grupos OH disponibles y tres MMTs con cationes interlaminares de alquilamonio muy apolares. Los resultados proporcionaron importantes avances, como lo demuestran las propiedades de liberación lenta de los complejos de arcilla orgánica-etofumesato en comparación con la formulación comercial (Chevillard y col., 2012)

Un aspecto importante para el desarrollo de sistemas de liberación controlada es la biodegradabilidad de los productos usados para la encapsulación. Un ejemplo de FLCs en herbicidas es una nueva formulación que combina gluten de trigo, MMTs y el herbicida etofumesato, diseñada por Chevillard y col., (2012). Dicha formulación tiene como objetivo evaluar el uso potencial de nanoarcillas para la modulación de propiedades de transferencia de modelos agentes activos en polímeros (*biosourced*). Tras el estudio, las formulaciones son eficaces tanto en la reducción de la lixiviación del herbicida en el suelo (sobre todo con la presencia de MMTs), como en la reducción de la germinación en los bioensayos. Esto permite que dicho herbicida tenga mayor biodisponibilidad, y como consecuencia mejore la eficacia en la inhibición de la germinación de semillas, siendo menos propensos a la lixiviación y a la fotodegradación.

1.3. SURFACTANTES

Debido a la baja solubilidad en agua de los plaguicidas puros es necesaria la utilización de adyuvantes tales como surfactantes que ayudan a solubilizar o dispersar el i.a. para su correcta manipulación. Además, en el presente estudio se usaron como un componente más de la

formulación con el objetivo de cambiar las propiedades superficiales de los minerales de la arcilla con objeto de conseguir una adsorción y liberación idóneas del plaguicida.

Los surfactantes, también conocidos por tensioactivos son moléculas anfifílicas, también conocidas como anfipáticas, que poseen propiedades diferentes en dos regiones independientes de la molécula, ya que por lo general poseen una región hidrófila y otra hidrófoba. Esta característica les confiere la propiedad de reducir la tensión superficial en la interfase de un sistema de dos fases por ejemplo, los sistemas aceite-agua y aire-agua (Aulton, 2004) La función de estas sustancias en estos sistemas es incrementar la solubilidad en agua de compuestos orgánicos insolubles en ésta (Gautam y Tyagi, 2006).

La molécula de surfactante básicamente posee un grupo polar (hidrofílico), también denominado “cabeza” polar, al ser la parte más voluminosa de la molécula, y un grupo apolar (hidrófobo o lipófilo) que corresponde con una cadena alquílica larga, también denominado como “cola”, debido a su longitud (Figura 1.4). Esta característica estructural dota a estas sustancias la propiedad de ser anfifílicas (Katagi, 2008).

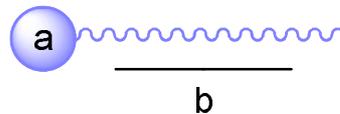


Figura 1.4. Representación de una molécula de surfactante. a) Corresponde a la “cabeza” polar hidrófila y b) a la cadena alquílica hidrófoba

La molécula de tensioactivo en solución se orienta de diferentes maneras según la polaridad del disolvente. La doble afinidad de esta molécula le obliga a migrar a la superficie del líquido dejando sumergido el grupo hidrófilo o hidrófobo. Esta disposición en la superficie puede variar según la concentración de surfactante que haya en el interior de la disolución.

1.3.1. Propiedades de los surfactantes

La naturaleza anfifílica dota a los surfactantes de una serie de propiedades que van a definir sus múltiples aplicaciones. A continuación se nombran las propiedades más importantes (Jiménez y col., 2010; Pedraza, 2009).

Concentración micelar Crítica (CMC)

Una molécula de surfactante se disuelve en agua como monómero a bajas concentraciones, pero éste tiende a agregarse como micela a medida que va aumentando su concentración en solución (Figura 1.5). La concentración de surfactante a la que se alcanza la mínima tensión superficial se denomina concentración micelar crítica (CMC), la cual se puede definir también como la concentración por debajo de la cual las moléculas de surfactante se orientarán formando agregados espontáneos denominados micelas (Fendler y Fendler, 1975).

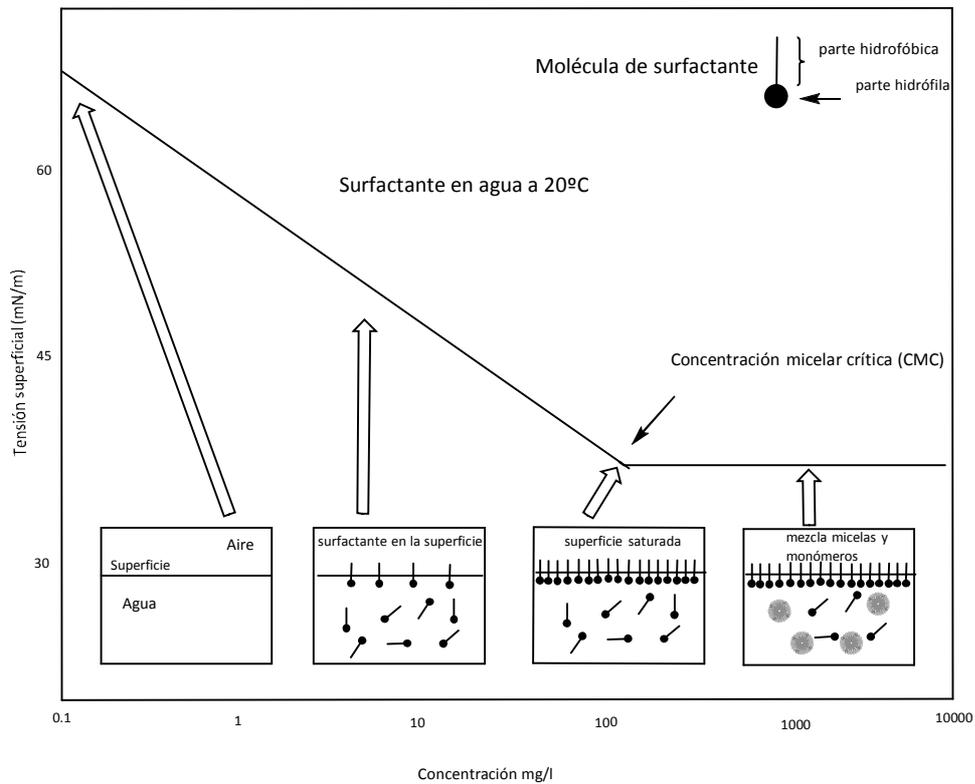


Figura 1.5. Disposición de las moléculas de surfactante en solución acuosa en función de su concentración (Katagi, 2008)

Una unidad monomérica de surfactante difunde rápidamente a las micelas y las abandona a un ritmo mucho más rápido, por tanto, debido a éste efecto, las micelas se pueden considerar como una pseudofase, ya que están en continua formación y deformación, y por ello, también se les denomina como un sistema coloidal dinámico (Katagi, 2008).

La CMC es un parámetro característico de cada surfactante. Existen varios parámetros que harán que ésta varíe dependiendo de qué surfactante se trate. Por ejemplo dependiendo de

Introducción

la naturaleza iónica, la CMC para mezcla de surfactantes no iónicos y mixtos es mucho menor para los surfactantes iónicos, siempre que su hidrofobicidad sea similar. Esto se debe a que las interacciones electrostáticas repulsivas entre los grupos hidrófilos cargados es menor por interacción de los surfactantes no iónicos, lo que favorece el proceso de agregación.

El tamaño de la cadena alquílica también va a influir en el valor de la CMC de diferentes surfactantes ya que una cadena alquílica larga va a disminuir el valor de la CMC para un surfactante con la misma parte polar, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Log}_{cmc} = A - B n_c \quad (1)$$

donde A y B son constantes determinadas empíricamente para cada tipo de tensioactivo, denominadas también como Constantes de Klevens (Rosen, 2004). Este efecto se demuestra a continuación (Tabla 1.1), donde se exponen los valores de CMC para diferentes surfactantes con igual parte hidrófila y diferente longitud de cadena alquílica (Fendler y Fendler, 1975).

Tabla 1.1. CMCs para diferentes surfactantes con igual parte polar (Katagi, 2008)

Surfactante	Estructura Química	CMC (mg/l)
DTMA-Br	$\text{C}_{10}\text{H}_{21}\text{N}^+(\text{CH}_3)_3 \text{Br}^-$	$1,82 \times 10^{-4}$
DDTMA-Br	$\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{N}^+(\text{CH}_3)_3 \text{Br}^-$	$4,62 \times 10^{-3}$
TDTMA-Br	$\text{C}_{14}\text{H}_{29}\text{N}^+(\text{CH}_3)_3 \text{Br}^-$	$1,18 \times 10^{-3}$
HDTMA-Br	$\text{C}_{16}\text{H}_{33}\text{N}^+(\text{CH}_3)_3 \text{Br}^-$	$0,33 \times 10^{-3}$

Otro factor que afecta al valor final de la CMC de los tensioactivos es la fuerza iónica de la solución. La presencia de fuerza iónica origina una disminución de la CMC y un aumento en el número de agregación (n_a) (ver apartado siguiente). Este efecto es mucho mayor en tensioactivos iónicos, ya que al aumentar la fuerza iónica disminuyen las fuerzas repulsivas entre los grupos polares cargados, lo que va a favorecer la agregación de moléculas de surfactante.

La CMC de los tensioactivos no iónicos y anfóteros disminuye en presencia de sales por la disminución de la solubilidad de la región hidrófoba del compuesto en solución acuosa. Por el contrario, la adición de disolventes orgánicos a disoluciones acuosas de tensioactivos aumenta el

valor de la CMC, que puede ser debido tanto a un incremento de la hidratación del grupo hidrófilo como consecuencia de la ruptura de la estructura del agua, como a una disminución de la constante dieléctrica de la disolución acuosa, que implica un aumento de las fuerzas electroestáticas repulsivas entre los grupos polares del tensioactivo, y consecuentemente, un aumento en su solubilidad (Rosen M, 2004).

Número de agregación (N_a)

El número de agregación (N_a) indica el promedio de moléculas de surfactante que está formando una micela. Los agregados micelares están conformados de 20 a 100 monómeros, con un radio aproximado de 1,5-30 Å. El modelo físico para una micela consiste en una configuración esférica (Hartley, 1936). Esta propiedad es muy importante en distintos campos de la investigación (biorrecuperación, tratamiento de agua por ultrafiltración micelar, etc.), ya que se puede estimar el radio intermicelar de tensioactivos y así determinar la capacidad que tiene un surfactante de solubilizar compuestos orgánicos insolubles en agua (Zhou y col., 2011).

Balance Hidrofílico-Lipofílico (HLB)

El balance hidrofílico-lipofílico (HLB), es un valor que representa la capacidad de un surfactante para emulsionar de manera estable en sistemas agua-aceite o aceite-agua (Griffin, 1949). Se expresa mediante la siguiente fórmula:

$$HLB = 20 (M_h/M) \quad (2)$$

donde M_h y M son el peso molecular de la parte hidrofílica de la molécula y de la molécula completa de surfactante respectivamente. Un valor alto o bajo de HLB significa que el tensioactivo es hidrófobo o hidrofílico (Knowles, 1998, 1995; Hess y Foy, 2000). Los tensioactivos que tienen un valor de HLB cercano a 1 indican que éste forma emulsiones estables en sistemas agua-aceite (W/O), por otra parte, valores de HLB cercanos a 20 indican que se forman emulsiones estables en sistemas aceite-agua (O/W) (Knowles, 2001).

Punto de nube

La temperatura es un factor muy importante porque influye directamente en la solubilidad de los surfactantes en agua, principalmente en surfactantes no iónicos. Este efecto es conocido como punto de nube o "cloud point" (PN) y es la temperatura a la cual el tensioactivo pierde su solubilidad en una solución acuosa presentando la solución un aspecto turbio.

Introducción

Al aumentar la temperatura, la solubilidad de los surfactantes disminuye. Ello es debido a que las moléculas no solubles rompen el equilibrio que existe entre las moléculas disueltas formándose superagregados, lo que implica un cambio de fase y de ahí la turbidez de la solución, siendo este efecto reversible (Shinoda y Arai, 1964).

El PN de un surfactante se puede modificar al añadir a la solución NaCl o alguna otra sal lo que produce un aumento del mismo; por el contrario, si se añade urea el PN disminuirá (véase efecto de la fuerza iónica en CMC).

Geometría de las micelas (g)

En solución las moléculas de surfactante se van a agrupar formando micelas. Estas micelas serán tan variadas en morfología o tamaño dependiendo de la estructura del tensioactivo así como de la longitud de la cadena alquílica del mismo (Tanford, 1972). Este hecho es importante ya que según sea la forma y tamaño de las micelas se pueden explicar efectos tales como su comportamiento en solución.

Para poder hacer una estimación de la geometría y el tamaño de las micelas es necesario conocer una serie de valores como el volumen que ocupa la cadena lipofílica dentro del núcleo carbonado de la micela (Reiss-Husson y Luzzati, 1964), para lo cual es necesario conocer los volúmenes para los grupos metilo y metileno de la misma (Tabla 1.2):

Tabla 1.2. Cálculo de los volúmenes de los grupos metilo y metileno (Reiss-Husson y Luzzati, 1964)

Grupo metilo (CH₃)	$v_{CH_3} = 1,2044 \times 10^{-4} T + 0,05118$
Grupo metileno (CH₂)	$v_{CH_2} = 1,8347 \times 10^{-5} T + 0,02652$

A partir de estos volúmenes se desarrollan una serie de fórmulas para calcular el volumen (v) de una molécula específica de surfactante a temperatura cercana a la ambiente y la Longitud máxima (l_{max}) de las cadenas dentro del núcleo hidrocarbonado (Tanford, 1972).

Los diferentes tipos de micelas también van a depender del número máximo de cadenas hidrocarbonadas por micela (N); el área por cadena hidrocarbonada (S) y el radio del núcleo hidrocarbonado (r_0); se explican a continuación (Tanford, 1972; Pasquali y col., 2005):

Micelas Esféricas: El radio (r_0) del núcleo hidrófobo de una micela esférica no puede exceder la longitud máxima (l_{max}) y el número máximo de cadenas hidrocarbonadas por micela (N) es únicamente determinado por cada valor de n_c , que es la cantidad de átomos de carbono de la cadena hidrocarbonada, mediante la combinación de las ecuaciones 3 y 4.

Micelas Elipsoidales: Las micelas pueden tomar dos formas: elipsoide oblato y elipsoide prolato. El elipsoide oblato es el cuerpo que se obtiene al hacer girar una elipse alrededor de su eje menor y el elipsoide prolato es aquel que se obtiene al rotar una elipse alrededor de su eje mayor. Esta forma surge al incorporar a una micela gran cantidad de cadenas hidrocarbonadas, por tanto, habrá una distorsión de su forma.

Micelas Cilíndricas: Las moléculas del surfactante se orientan con la parte hidrófila hacia afuera en la superficie de un cilindro y la hidrófoba hacia el interior del mismo. El diámetro es igual al doble del largo máximo de la molécula, mientras que el largo es indefinido. Estos cilindros se pueden empaquetar de manera hexagonal cuando hay un aumento de la concentración de surfactante en el medio.

Micelas Vermiformes: Se pueden formar estructuras similares a las cilíndricas pero onduladas con conformación vermicular (gusano). Estas micelas suelen ser largas y flexibles con longitudes que llegan al micrómetro, se pueden enredar entre sí y dota a la dispersión de características viscoelásticas.

Bicapas: Es un tipo de agrupación del surfactante denominada laminar. Está formada por una doble capa de moléculas de una sustancia anfifílica, con la parte lipófila hacia el interior y la hidrófila hacia el exterior de la lámina (Okahata y Kunitake, 1979).

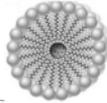
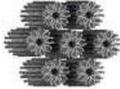
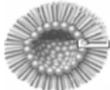
Vesículas: son estructuras esféricas que contienen bicapas de sustancias anfifílicas y un núcleo acuoso. Pueden ser unilaminares o multilaminares según el número de bicapas que contienen.

Micelas Tubulares: Es un modelo de bicapas arrolladas en cilindros que a su vez forman un empaquetamiento hexagonal en las que el agua ocupa el interior y el exterior de las bicapas.

Parámetro de Empaquetamiento Crítico (g)

El parámetro de empaquetamiento crítico (g) permite correlacionar la estructura del tensioactivo con la morfología del agregado formado en condiciones experimentales bien definidas (Engberts y Hoekstra, 1995; Pisàrcik y col., 2006). Cada tipo de agregado simple nos dará un valor de N (Tabla 1.3).

Tabla 1.3. Morfologías de las micelas según el parámetro de empaquetamiento g

Parámetro (g)	Morfología del Agregado
$g < 1/3$	 Esférico
$1/3 < g < 1/2$	 Vermiforme
$1/2 < g < 1$	 Vesícula
$g = 1$	 Bicapa
$g > 1$	 Micelas Inversas

1.3.2. Clasificación

Los tensioactivos se pueden clasificar según su origen: Naturales (biosurfactantes) o sintéticos. La mayoría de los surfactantes comercializados son sintetizados a partir de derivados del petróleo (Nitschke y Pastore, 2002). Existe otra clasificación atendiendo a la naturaleza del grupo hidrófilo (carga eléctrica): no iónicos, aniónicos, catiónicos, anfóteros y variantes de estos grupos anteriores.

Tensioactivos Aniónicos: poseen uno o varios grupos funcionales que se ionizan en disolución acuosa generando aniones responsables de su actividad superficial. Grupos funcionales: ej. sulfonatos o sulfato de sodio son dos de los surfactantes aniónicos más utilizados en la industria como el lauril sulfato sódico y el dodecil bencen sulfonato sódico.

Tensioactivos Catiónicos: poseen uno o varios grupos funcionales que se ionizan en disolución acuosa generando cationes. De los más importantes son los derivados de las sales de alquilamonio.

Tensioactivos no Iónicos: compuestos que no se disocian en solución acuosa. Su solubilidad en medio acuoso se debe a la presencia de grupos $-OH$ que forman puentes de hidrógeno con las moléculas de agua. Suelen ser los alcoholes grasos etoxilados y alquil poliglucósidos. De los más importantes en la industria cabe destacar las series del Tritón y el Tergitol.

Tensioactivos Anfóteros: poseen uno o más grupos funcionales que pueden ionizarse en solución acuosa dando un carácter aniónico y catiónico según condiciones del medio. El principal factor inductor es el pH. Para estos tensioactivos puede definirse un punto isoeléctrico. Por ejemplo en este grupo se encuentran los aminoácidos.

Se podrían añadir a esta clasificación los tensioactivos mixtos, entre ellos los cataniónicos. Estos están formados por la mezcla de un surfactante catiónico y uno aniónico (Kaler y col., 1989), así como, los denominados géminis que se caracterizan por poseer más de una parte hidrófoba y más de un grupo hidrófilo que le permite tener una mayor actividad superficial en contacto.

Los surfactantes mixtos actualmente tienen una función relevante en las aplicaciones técnicas de los mismos ya que al mejorar las propiedades interfaciales de los surfactantes (decrece la CMC, y aumenta la actividad superficial), permiten mejorar las propiedades reológicas respecto a los surfactantes iniciales (Fernandes y col., 2010). Estos surfactantes son una mezcla de dos surfactantes de diferente naturaleza iónica, por ejemplo los cataniónicos (catiónico y aniónico) (Holland y Rubingh, 1991). En este trabajo, nos centraremos en las mezclas formadas por surfactantes catiónico-no iónico y catiónico-catiónico.

Cuando se mezclan dos surfactantes en una solución acuosa, la mayoría de las propiedades fisicoquímicas de éstos cambian respecto a las iniciales de los surfactantes por separado. Este efecto se denomina *Sinergismo* (Khan y Marques, 2000). El efecto sinérgico va a afectar fundamentalmente a la CMC, la cual va a disminuir respecto a las CMCs de los surfactantes que la conforman por separado (Hao y Hoffmann, 2004).

Las vesículas mixtas están constituidas por la mezcla equimolar de dos tensioactivos, por ejemplo uno catiónico y otro no iónico. Su formación ocurre espontáneamente y pueden obtenerse a partir de una gran variedad de surfactantes.

La mezcla no equimolar de surfactantes implica la formación de micelas en solución de diferentes formas y tamaños (Kaler y col., 1989). El complejo formado por los dos surfactantes puede poseer o no carga neta, esto va a depender del grupo polar que conforman el catión y el anión de los dos surfactantes de partida (Tondre y Caillet, 2001).

La mezcla equimolar de estos surfactantes puede conducir a la formación de un pseudo-sistema con 3 fases, originado por la disminución de la CMC, donde estarán en equilibrio en un mismo sistema (Fernandes y col, 2010):

Introducción

- Micelas de gran tamaño.
- Vesículas.
- Sólido precipitado disperso en el líquido.

Esta fase puede ser modificada manipulando parámetros como la variación de la estequiometría de los surfactantes catiónico/no iónico, pH, cambio de la temperatura o adición de una sal (Marques, 2000).

Las vesículas que se forman son bicapas de tamaño coloidal variable, esto hace que su aplicación y uso sea el transporte de sustratos como fármacos, liberación de genes así como otro tipo de materias activas como los plaguicidas (Brito y col., 2006). Las aplicaciones de estos sistemas se deben fundamentalmente a la particularidad de que las vesículas se forman espontáneamente y la estabilidad de estos sistemas, comparado con otros sistemas vesiculares lipídicos, es bastante alta (Khurana y col., 2010).

1.3.3. Aplicaciones de los surfactantes

Las aplicaciones de los surfactantes son amplísimas y su uso se extiende a todo tipo de industria. Sus propiedades dotan a estos compuestos de gran versatilidad, usándose en productos farmacéuticos, detergentes, operaciones con metales, flotación, alimentación, pinturas y en agricultura e industria agroalimentaria (Salaguer y Fernández, 2004).

En la industria farmacéutica los surfactantes son utilizados a menudo como emulsionantes, solubilizantes, estabilizantes de la suspensión o humectantes. Por lo general, no se pueden considerar como excipientes “inertes” ya que han demostrado aumentar, disminuir o no tener efecto sobre el paso de los fármacos a través de las membranas biológicas (Aulton, 2004).

Las aplicaciones medioambientales también son muy diversas, sobre todo en la agricultura e industria agroalimentaria. Los productos fitosanitarios se pulverizan en modo de aerosol, por tanto, tienen que estar formulados mediante el uso de tensioactivos. Además facilitan su aplicación, ya que sirven para modificar las propiedades de los plaguicidas aumentando la solubilidad inicial de los mismos. También tienen aplicación en los productos alimenticios permitiendo un acabado agradable tras su procesado (Salaguer y Fernández, 2004).

La aplicación en el campo de los fitosanitarios es muy interesante ya que permiten modificar la humectación del fitosanitario aumentándola y así permitir formar una pequeña capa de producto sobre la superficie de la planta, incrementando el área de actividad. Su utilidad se centra en dos efectos: aumento de la solubilidad de los plaguicidas en agua para su mejor formulación y su efecto sobre la aplicación en la planta aumentando su área de acción (Salaguer y Fernández, 2004). Éstos complejos formados por surfactante y plaguicida pueden además fijarse a un soporte como por ejemplo una arcilla que actúan como soporte o matriz inerte de liberación controlada (Maqueda y col., 2009a, 2009b). En este caso además de un aumento en la solubilidad del herbicida va a permitir la entrada del mismo en el espacio interlaminar de la arcilla, efecto que por sí solo no ocurriría debido a las diferentes propiedades fisicoquímicas y de carga que presentan tanto la arcilla como los plaguicidas (Polubesoba y col., 2003).

En los últimos años son muchos los trabajos que estudian la contaminación que producen los surfactantes en el medioambiente, por tanto, y cada vez más, se están investigando nuevas formulaciones para disminuir la contaminación, usando surfactantes biodegradables y respetuosos con el medioambiente (Undabeytia y col., 2011, 2012).

1.3.4. Comportamiento de los surfactantes en el sistema suelo-agua

Los surfactantes y concretamente, las micelas, así como su unidad monomérica, se van a comportar de manera diferente según el sistema en el que se encuentren. Los surfactantes, aplicados directamente al suelo van a sufrir una primera partición entre la matriz del suelo y el agua intersticial del mismo. Algunos de ellos pueden modificar la infiltración de agua y la humectación del suelo. Dependiendo de la concentración en la que se encuentre el surfactante en cuestión, las moléculas pueden ser adsorbidas en el suelo de diferentes maneras: como monómero, hemimicela o admicela. También se pueden encontrar disueltas en el agua intersticial del suelo ya sea como monómero o como micela (Figura 1.6) (Edwards y col., 1994).

El suelo es una matriz heterogénea, cuyos componentes coloidales más importantes en la adsorción de surfactantes son los minerales de arcilla y las sustancias húmicas. Como es sabido, la superficie de los minerales de arcilla está cargada negativamente debido a las sustituciones isomórficas en las capas de aluminosilicatos, y las sustancias húmicas son heteropolímeros y bencenos polisustituidos con varios grupos funcionales como grupos hidroxilos y carboxilos, por tanto, las interacciones que caben esperar entre las moléculas de tensioactivo y las matrices del suelo se clasifican básicamente, en fuerzas electrostáticas e hidrofóbicas. Por lo que la naturaleza

Introducción

hidrófoba e hidrófila del surfactante así como las características del suelo, en cuanto a materia orgánica y el contenido de arcilla, van a controlar la adsorción de los mismos en el suelo (Chevallard y col., 2012).

Dependiendo de la naturaleza del suelo y del surfactante, las isothermas de adsorción se pueden ajustar a diversos modelos y ecuaciones:

Isoterma Lineal: $\frac{X}{m} = k_d * C_w$ (3)

Isoterma de Freundlich: $\frac{X}{m} = k_f * C_w^{1/n}$ (4)

Isoterma de Langmuir: $\frac{X}{m} = \left(\frac{X}{m}\right)_{max} * k_L * C_w / (1 + K_L * C_w)$ (5)

donde x es la cantidad de sorbato adsorbida (surfactante o herbicida), m masa de adsorbente (suelo), C_w concentración del adsorbato en la fase acuosa en el equilibrio, n es la constante, K_d es el coeficiente de adsorción, K_f y K_L son las constantes de adsorción de Freundlich y Langmuir respectivamente; $1/n$ indica la linealidad de las isothermas de Freundlich, y $(x/m)_{max}$ es la máxima concentración de adsorbato en la fase adsorbente.

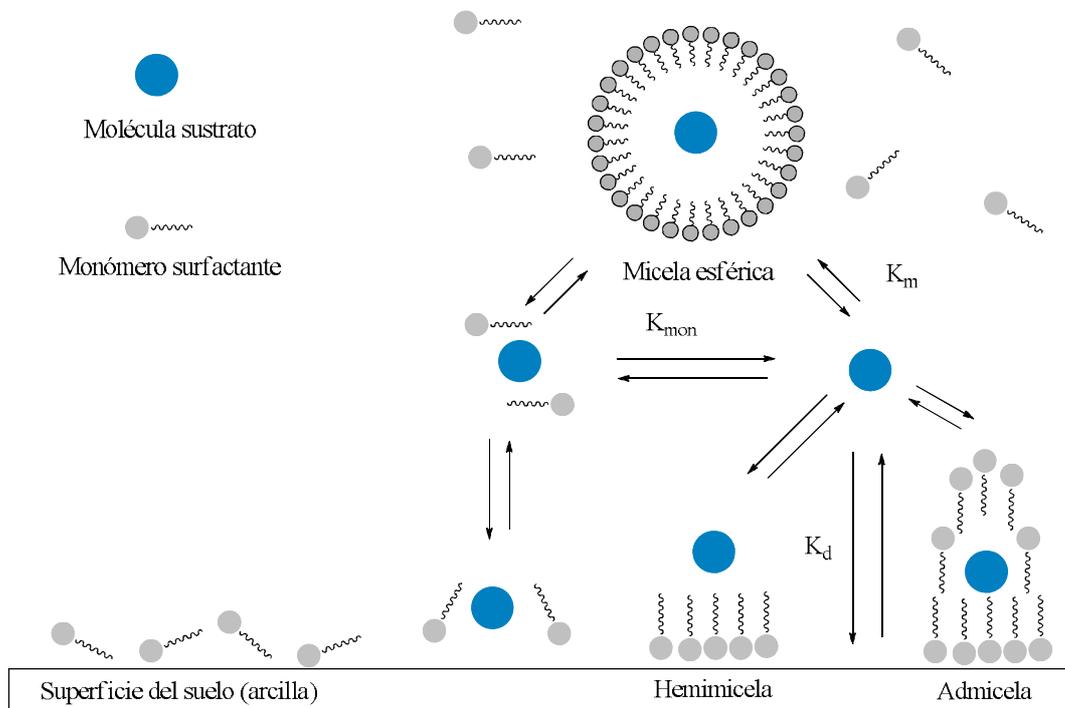


Figura 1.6. Mecanismo de adsorción-desorción de un sustrato en suelo en presencia de surfactante. K_m , constante de partición micela-sustrato; K_{mon} , constante de asociación monómero-sustrato; K_d , constante de adsorción del sustrato en el suelo (Katagi, 2008)

Objetivos

En la presente Tesis Doctoral se pretende desarrollar Formulaciones de Liberación Controlada (FLCs) de herbicidas mediante la solubilización de los mismos en surfactantes no iónicos tales como Berol 048 y Berol 266, y con surfactantes catiónicos tales como Ethomeen T/15 y algunos sintetizados en nuestros laboratorios derivados de sales de amonio cuaternario, denominados MBA-12 y MBE-12, y la posterior adsorción de las micelas de los surfactantes cargadas con los distintos herbicidas en un mineral de la arcilla, una montmorillonita sódica.

En la presente Tesis Doctoral se han elegido los herbicidas Mesotriona, Flufenacet y Metribuzina dado que presentan problemas de pérdidas por lixiviación en suelos, existiendo constancia de contaminación de aguas superficiales y subterráneas por dichos herbicidas. Los surfactantes seleccionados actuarían como agentes solubilizantes, incrementando enormemente la solubilidad de estos herbicidas mediante la incorporación de las moléculas de los mismos dentro de las micelas de surfactantes formadas en solución. Se espera que la posterior adsorción de las micelas cargadas con los herbicidas en el mineral de la arcilla seleccionado propicie un aumento en la adsorción de mismos, de manera que los distintos complejos micela-herbicida-mineral de la arcilla se comporten como formulaciones de liberación controlada del ingrediente activo. Ello permitiría reducir la lixiviación del mismo en comparación con el producto técnico o la formulación comercial. Al mismo tiempo cabe esperar que estas formulaciones preparadas presenten igual o mejor eficacia biológica en la capa superior del suelo.

En concreto, EL mineral elegido presenta propiedades superficiales que permiten la adsorción tanto de los surfactantes no iónicos (Berol 048 y Berol 266) como catiónicos (Ethomeen T/15, MBA-12 y MBE-15). El mineral de arcilla montmorillonita es un material aprobado y considerado de mínimo riesgo toxicológico por la Agencia de Protección Medioambiental de Estados Unidos (USEPA), y los surfactantes catiónicos de síntesis son biodegradables y por ende respetuosos con el medioambiente.

Teniendo en cuenta lo anterior, los objetivos específicos serán los siguientes:

- Elaboración de FLCs de herbicidas pertenecientes a distintas familias mediante la incorporación de los mismos en micelas simples y micelas mixtas de surfactantes y posterior adsorción de los mismos en el mineral de la arcilla montmorillonita, previa optimización de los procesos de preparación de dichas formulaciones, con el objeto de conseguir la máxima cantidad de ingrediente activo y un control eficaz en la liberación del mismo.

Objetivos

- Caracterización físico-química de las FLCs obtenidas, a fin de determinar los mecanismos de interacción responsables en la formación de dichas formulaciones.
- Influencia de las propiedades físico-químicas de suelos en la adsorción-desorción del herbicida flufenacet, para así poder relacionar la eficacia de las formulaciones en su comportamiento en suelos.
- Evaluación del comportamiento de las formulaciones preparadas frente a formulaciones comerciales en suelos: estudios de lixiviación, biodisponibilidad en suelos y ensayos de campo

Materiales y Métodos

3.1. MATERIALES

3.1.1. Herbicidas

Metribuzina

Se ha utilizado Metribuzina técnica (93%). Metribuzina es un herbicida que pertenece a la familia química de las triazinas. Su nombre IUPAC es 4-amino-6-(1,1-dimetiletil)-3-(metiltio)-1,2,4-triazin-5(4H)-ona, su fórmula empírica es $C_8H_{14}N_4OS$, y su peso molecular: $214,29 \text{ g mol}^{-1}$. Su estructura química se representa en la Figura 3.1:

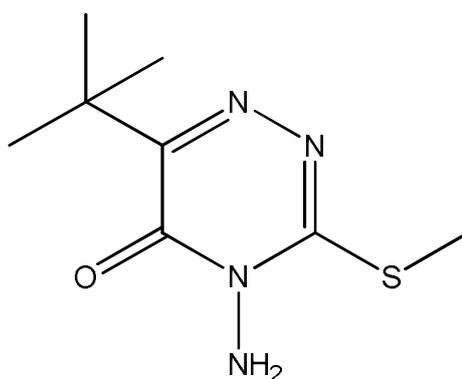


Figura 3.1. Estructura química de Metribuzina

Metribuzina es un sólido blanco cristalino, su punto de fusión es de 125°C . Presenta una solubilidad en agua muy alta de 1100 mg L^{-1} , y al mismo tiempo una solubilidad, también alta, en disolventes orgánicos, por ejemplo: benceno (200 g L^{-1}), etanol (200 g L^{-1}), tolueno ($50\text{-}100 \text{ g L}^{-1}$). Su pKa es 1 a 25°C . En cuanto a su comportamiento en suelos, se adsorbe de forma moderada en la mayoría de ellos, con una alta afinidad por la materia orgánica, y con menor afinidad por los minerales de arcilla, siendo probable la contaminación de las aguas subterráneas cuando el suelo tiene poco contenido de ambos. La adsorción disminuye al aumentar el pH del suelo. El mecanismo principal de disipación en el suelo es mediante degradación microbiana, siendo ésta más rápida en condiciones aerobias y a altas temperaturas. Es estable frente a hidrólisis no microbiana a pH entre 5 y 9 (25°C).

El herbicida es aplicado en pre-emergencia y post-emergencia temprana. Controla monocotiledóneas y dicotiledóneas anuales. Se aplica en cultivos de alfalfa, caña de azúcar, cebada de ciclo largo, espárrago, gladiolo, patata, tomate y trigo de ciclo largo (Liñan, 2011).

Mesotriona

Se ha utilizado Mesotriona técnica (96,7%). Mesotriona es un herbicida que pertenece a la familia química de las benzoilciclohexano-1,3-dionas. Su nombre IUPAC es 2-(4-metil-2-nitrobenzoil) ciclohexano-1,3-diona, su fórmula empírica es $C_{14}H_{13}NO_7S$ y su peso molecular $339,32 \text{ g mol}^{-1}$. Su estructura química se representa en la siguiente Figura:

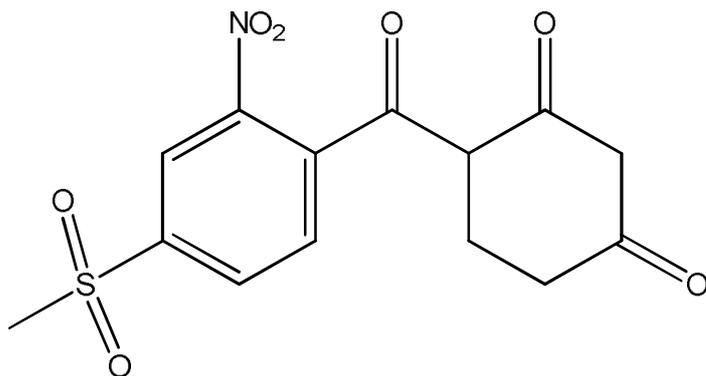


Figura 3.2. Estructura química de Mesotriona

Mesotriona presenta un aspecto cristalino amarillento, tiene un punto de fusión de $165,3^{\circ}\text{C}$ y tiene una solubilidad en agua de 160 mg L^{-1} . Es soluble en disolventes orgánicos, presentando una mayor solubilidad en acetonitrilo (117 g L^{-1}) y acetona ($93,3 \text{ g L}^{-1}$). Su pKa es de 3,12 a 25°C . En suelos ácidos es fuertemente adsorbida por la materia orgánica. En suelos básicos o neutros la adsorción es más débil. Se degrada rápidamente por acción microbiana. En suelos con pH entre 4,6 y 7,7 y un contenido de materia orgánica entre 0,6% y 3,6% su vida media es de unos 9 días. Es un herbicida selectivo de maíz con actividad pre y post-emergencia (Liñán, 2011).

Flufenacet

Se ha utilizado Flufenacet técnico (99,9%). Pertenece a la familia de las oxiacetamidas. Su nombre IUPAC es 4'-fluoro-N-isopropyl-2-[5-(trifluoromethyl)-1,3,4-thiadiazol-2-yloxy]acetanilide, la fórmula empírica es $C_{14}H_{13}F_4N_3O_2S$, y el peso molecular $363,34 \text{ g mol}^{-1}$. Presenta la siguiente estructura química:

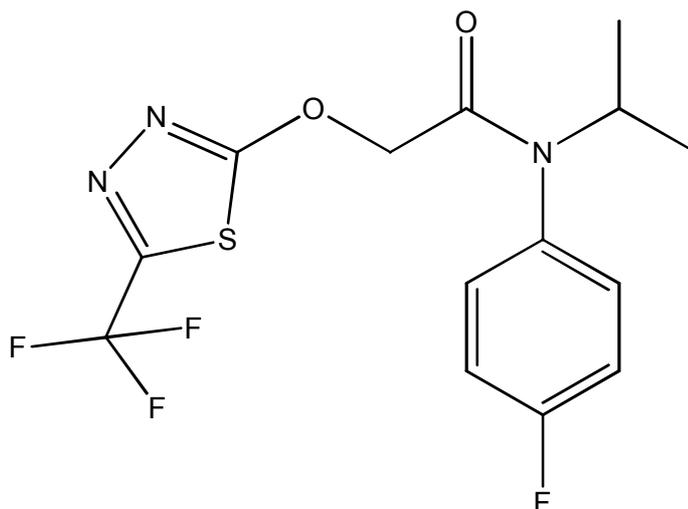


Figura 3.3. Estructura química de Flufenacet

Flufenacet es un sólido blanco, cristalino, tiene un punto de fusión de 76°C y presenta una solubilidad en agua de 56 mg L⁻¹. En los disolventes orgánicos que mayor solubilidad presenta son: acetonitrilo (>200 g L⁻¹) y acetona (>200 g L⁻¹).

En el suelo se metaboliza con una vida media de 33,8 días; es estable a la fotólisis. En medio anaerobio es relativamente estable con una vida media de 240 días. En gran variedad de suelos, Flufenacet y sus productos de degradación se clasifican desde muy móviles a móviles. Se degrada rápidamente en el suelo y apenas se han detectado residuos a 1,2 m de profundidad, y en aguas subterráneas a concentraciones <0'0001 mg/l. Se usa como herbicida de pre y post-emergencia contra gramíneas anuales y algunas dicotiledóneas.

3.1.2. Mineral de la arcilla

El mineral de arcilla empleado en el presente estudio para la preparación de las formulaciones es una montmorillonita estándar (SWy-2) procedente de Wyoming. Para experimentos complementarios se han usado una Caolinita (KGa-1) procedente de Georgia, suministradas por The Source Clays Repository (The Clay Minerals Society, Columbia, EEUU) y una Illita de Illinois suministrada por la Wad's Natural Science Establishment. Las capacidades de cambio catiónicas fueron de 0,8 mmol g⁻¹ para SWy-2, 0,02 mmol g⁻¹ para KGa-1 y 0,17 mmol g⁻¹ para Illita.

3.1.3. Surfactantes

Se han utilizado diferentes surfactantes atendiendo a su estructura química. Entre ellos se encuentran dos alcoholes etoxilados no iónicos (Berol 048 y Berol 266) y un surfactante etoxilado de aminas grasas anfotérico (Ethomeen T/15). Fueron proporcionados por los Laboratorios Compi y Jove SA (Barcelona). Su estructura química así como sus propiedades químicas y superficiales se muestran en la Figura 3.4 y la Tabla 3.1.

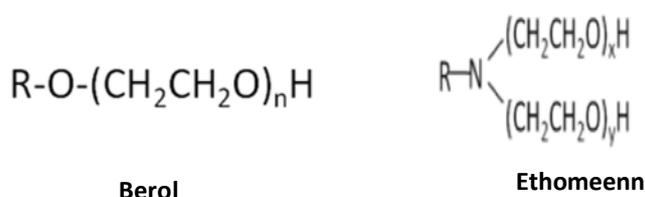


Figura 3.4. Estructura química de los surfactantes Ethomeen y Berol

Tabla 3.1. Propiedades de los surfactantes comerciales: nº carbonos de la fracción hidrofóbica (R), unidades del grupo óxido de etileno, R-CH₂-CH₂-O-R, (EO), concentración micelar crítica (CMC), balance hidrófilo-lipófilo (HLB) y peso molecular (PM)

Surfactantes	R	EO	CMC (mM)	HLB	PM (g mol ⁻¹)	pKa
Berol 048	C ₁₃	10	0,156	13,5	640	-
Berol 266	C ₉₋₁₁	5,5	0,075	12,1	400	-
Ethomeen T/15	C ₁₇	5	0,042	9,2	480	8,5

También han sido sintetizados surfactantes catiónicos biodegradables (Pisárcik, 2006), obteniéndose dos moléculas con igual cadena alquílica y diferente grupo funcional denominadas MBA-12 y MBE-12

Son surfactantes derivados de amonio cuaternario con una cadena alquílica de 12 átomos de carbono y un grupo éster o amida como grupo funcional. Sus fórmulas se presentan en la Figura 3.5 y sus propiedades en la tabla 3.2.

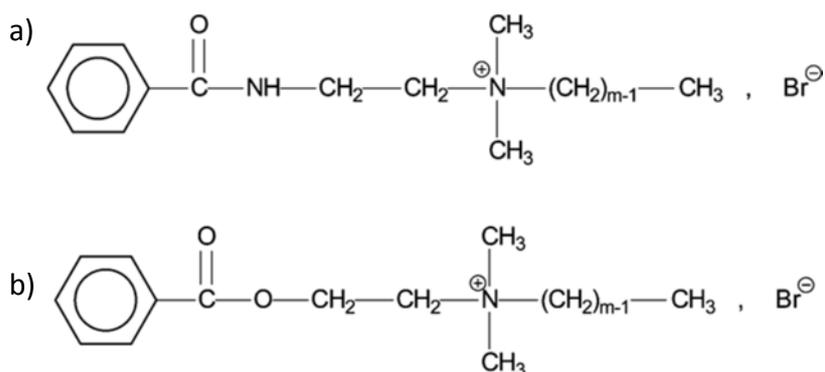


Figura 3.5. Estructura química general de los surfactantes sintetizados: a) MBA-n; b) MBE-n. Siendo n el número de átomos de carbono de la cadena alquílica

Tabla 3.2. Algunas propiedades de los surfactantes sintetizados: peso molecular (PM) concentración micelar crítica (CMC), área por molécula de surfactante (A), parámetro de empaquetamiento crítico (g) (Pisárcik, 2006)

Nombre	PM (g mol ⁻¹)	CMC (mM)	A (nm ²)	g
MBE-12	442,47	2,31	0,78	0,178
MBA-12	441,49	4,06	1,58	0,088

3.1.4. Suelos

Se han utilizado cuatro suelos procedentes del sur de España y tomados del horizonte superficial (0-20 cm), secados al aire y pasados por un tamiz de luz de malla de 2 mm para realizar los experimentos.

Alájar (AL) es un suelo con textura franco limosa, situado en la carretera de Fuenteheridos dirección Alájar, localidades que pertenecen a la provincia de Huelva. La vegetación natural es la encina y el alcornocal, y la de uso agrícola es el olivar. Sus características más relevantes son su color rojizo, limoso, estructura grumosa media y muy porosa.

Coria (CR) es un suelo con textura franco arcillo arenosa, situado en la finca experimental “La Hampa”, ubicada en Coria del Río (Sevilla), perteneciente al Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla (IRNAS-CSIC). Las muestras fueron tomadas de una zona de olivar. Su

característica más relevante es la textura gruesa (arena) que presenta.

Lebrija (LB) es un suelo con textura arcillosa, situado en la zona de las marismas del Guadalquivir, en el término Municipal de Lebrija (Sevilla). La vegetación natural es inexistente porque todo el suelo está cultivado de cereales, remolacha, algodón, girasol y tomate. La característica más relevante de este suelo es su alto contenido en arcilla y por tanto, su tendencia al encharcamiento. Esto hace necesario un buen sistema de drenaje en este tipo de suelo.

Las Torres (LT) es un suelo con textura franca, situado en el valle del río Guadalquivir, en la finca experimental “Las Torres”, ubicada en Alcalá del Río (Sevilla) y perteneciente al Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera “Las Torres-Tomejil” (Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural, Junta de Andalucía). Las muestras fueron tomadas del cultivo de melocotonero ecológico.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Síntesis y caracterización de surfactantes de amonio cuaternario

Algunos de los surfactantes utilizados en la realización de esta memoria fueron sintetizados dado su interés como moléculas biodegradables. Estos surfactantes se sintetizaron según Pisárcik (2006), con algunas modificaciones para optimizar las reacciones de síntesis.

La síntesis consta de dos reacciones y el esquema principal se representa en la Figura 3.6. La primera de ellas es una reacción de sustitución de primer orden (SN_1), donde los reactivos principales son Cloruro de Benzoilo (reactivo 1) y Dimetilaminoetanol (DMAE) o Dimetilaminoetanolamina (DMAEA) (reactivo 2), según el grupo funcional que se quiera obtener en la molécula de surfactante. Es una reacción equimolar y se lleva a cabo en medio Diclorometano (DCM), a una proporción 1:2 (reactivos- disolvente).

En el proceso de adición de los reactivos, se va añadiendo muy poco a poco el reactivo 1 sobre la amina o el alcohol disuelto en DCM, siendo un proceso muy exotérmico con liberación de Ácido clorhídrico (HCl), se lleva a cabo a 0°C en baño de hielo.

La segunda fase de la síntesis es la adición de la cadena alquílica a la parte polar de la molécula sintetizada anteriormente. Es una reacción de sustitución nucleófila de segundo orden (SN_2). Al contrario que la anterior reacción ocurre muy lentamente y no es exotérmica, por tanto, se realiza a temperatura ambiente. Debido a que es una reacción muy lenta se precisa de la

adición de un catalizador (18-Crown), ésta es la modificación que se ha hecho respecto a la reacción descrita por Pisárcik (2006).

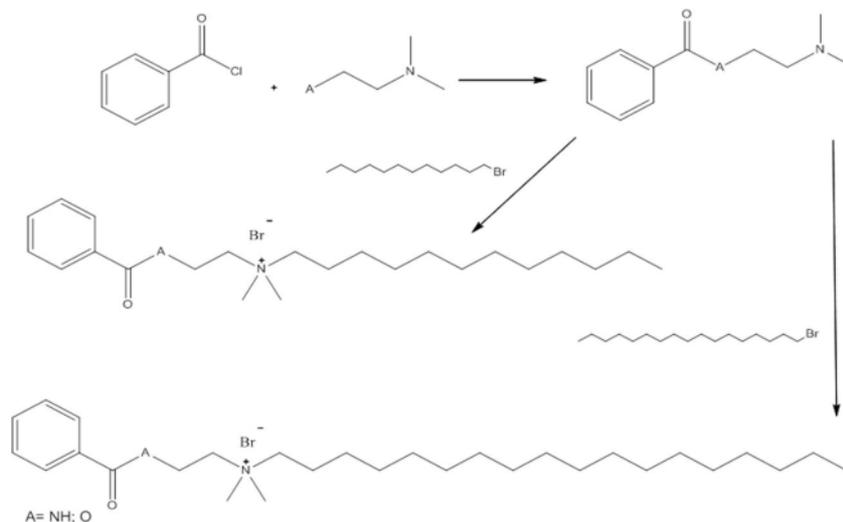


Figura 3.6. Esquema de la reacción de síntesis de los surfactantes de amonio cuaternario

El producto de síntesis obtenido de la primera reacción, al que se denominará MBA, si su grupo funcional es amida, o MBE, si su grupo funcional es éster, se hará reaccionar con un bromuro de alquilo, en este caso bromododecano para cadenas alquílicas de 12 átomos de carbono en una proporción 1:1.

El medio de reacción es dimetilformamida seca (DMF), el resto de reactivos son:

- 18-Crown (actuará como catalizador a una cantidad catalítica del 1% del reactivo limitante)
- Carbonato potásico (2,3 equivalentes del reactivo limitante).

La reacción tendrá lugar de 48-72 horas.

Finalizado el tiempo de reacción, se procesará el producto obtenido en la misma primero evaporando el disolvente, y a continuación se disolverá en acetato de etilo. La eliminación de los restos de otros reactivos en el medio de reacción se hace con una disolución sulfato sódico anhidro al 10% y posteriormente con una disolución a saturación de NaCl (Brine).

El proceso final de la síntesis es la purificación mediante cristalización del surfactante en una mezcla acetonitrilo-metanol, en el que aparecerá un sólido blanco cristalino con un punto de

fusión aproximado de 135°C-160°C, dependiendo de la pureza del producto obtenido. Los surfactantes sintetizados son biodegradables tal y como demostró Pisárcik (2006).

Los surfactantes se caracterizaron mediante resonancia magnética nuclear de protones (¹H RMN), utilizando un espectrómetro Bruker AV-300, operando a unas frecuencias de 300 MHz. La temperatura fue de 300 K (27 °C). Las soluciones de las muestras se prepararon en un disolvente aprótico (DMSO-d6).

3.2.2. Estudios de los parámetros estructurales de los surfactantes

Concentración micelar crítica de los surfactantes (CMC)

La determinación experimental de la concentración micelar crítica de cada surfactante se realizó mediante medidas de la tensión superficial (γ). Éstas se efectuaron con un tensiómetro *LAUDA TD 3* mediante el método del anillo Du Nuoy, termostalizando previamente en un baño los surfactantes a una temperatura constante de 25° C. Antes de cada experimento, se calibró el instrumental y se comprobó con la medida de la tensión superficial del agua destilada (72 mN m⁻¹). El anillo se limpió con etanol y se flameó después de cada medida con la ayuda de un mechero *Bunsen*. Para cada medición se realizaron al menos cinco lecturas y se calculó el valor promedio.

Número de agregación

El número de agregación (N_{agg}) se determinó con un espectrofluorímetro *Hitachi F-2500*, provisto de una celda termostáticamente controlada y equipado con un dispositivo de agitación magnética. El método consistió en la excitación y el posterior registro de la intensidad de emisión de una sonda fluorescente (pireno), incorporada a las micelas, que se inhibió progresivamente con la incorporación de concentraciones crecientes de cloruro de dodecilpiridinio (CyPCI). La longitud de onda de excitación para el pireno fue 335 nm y el espectro de emisión se recogió entre 350 y 550 nm. Los experimentos se analizaron mediante la ecuación de Tachiya:

$$\ln\left(\frac{I_0}{I_1}\right) = \frac{N_{agg} [C_Q]}{C_s - CMC} \quad (6)$$

donde, I_0 e I_1 representan la intensidad de fluorescencia del primer pico de emisión del pireno (374 nm) en ausencia y presencia del inhibidor (CyPCI), respectivamente; C_Q indica la concentración de CyPCI (10-100 μ M). C_s y CMC la concentración total (3 mM) y concentración micelar crítica del surfactante.

De los datos anteriores de inhibición de fluorescencia (quenching), se evaluó el grado de interacción de las mezclas binarias de surfactantes mediante la determinación de la constante de velocidad de quenching de primer orden, la constante de Stern-Volmer (K_{sv}), a través de la siguiente expresión:

$$\frac{I_0}{I_1} = 1 + K_{sv} C_Q \quad (7)$$

Cuanto mayor sea el valor de la constante K_{sv} , mayor será el ambiente hidrofóbico en el que se encuentran pireno y CyPCI, debido a la mayor solubilidad de ambos en la micela y el consiguiente aumento en quenching.

Parámetro de empaquetamiento crítico (g)

Las distintas formas en la que se agregan las moléculas de surfactante en medio acuoso, es de gran importancia para estimar el incremento de solubilidad de los principios activos que se incorporarán en su interior. Israelachvili y col. (1976) las determinaron definiendo el parámetro de empaquetamiento crítico (g):

$$g = \frac{v}{a_{min} l} \quad (8)$$

donde v es el volumen ocupado en el agregado por la cadena hidrocarbonada (parte lipofílica), l la longitud de la cadena cuando está totalmente extendida, y a_{min} el área mínima que ocupa la cabeza polar de una molécula de surfactante en la interfase aire/solución.

Con el fin de obtener el parámetro de empaquetamiento (g), el cálculo de los valores de volumen (v) y longitud (l) de la cadena hidrocarbonada de la molécula de surfactante se llevó a cabo siguiendo las fórmulas de Tanford (1973):

$$v = 27,3 + 26,9 n_C (\text{Å}^3) \quad (9)$$

$$l = 1,5 + 1,265 n_C (\text{Å}) \quad (10)$$

n_C indica el número de átomos de carbono que contiene la cadena hidrocarbonada.

El área a_{min} se calcula a través de las medidas de la tensión superficial (γ) en función de la concentración del surfactante a valores por debajo de la CMC, utilizando la ecuación de adsorción de Gibbs:

$$\Gamma_{max} = \frac{-1}{2,303 n R T} \left(\frac{\partial \gamma}{\partial \log C} \right)_T \quad (11)$$

$$a_{min} = \frac{10^{18}}{N_A \Gamma_{max}} \quad (12)$$

donde, Γ_{max} es la concentración máxima de surfactante que admite la superficie o concentración de saturación, N_A es el número de Avogadro, R es la constante universal de los gases, T es la temperatura absoluta, γ es la tensión superficial, C es la concentración de surfactante, y n representa el número de especies en la interfase cuya concentración superficial cambia con la concentración.

3.2.3. Análisis de los herbicidas en solución

La concentración de los herbicidas se determinó por cromatografía líquida de alta resolución con detector ultravioleta (HPLC-UV) o detector de espectrometría de masas (HPLC-MS).

EN HPLC-UV se empleó un cromatógrafo HPLC compacto Shimadzu (LC-2010A HT), con una columna Kromasil C15 de fase reversa (15 x 0,40 cm) suministrada por Teknokroma S.A. (Barcelona, España), a una temperatura de horno de 30°C. Para la adquisición y manejo de los datos se empleó el software Shimadzu LC solution Chromatography Data System. Las condiciones empleadas para los diferentes herbicidas se muestran en la tabla 3.3.

En HPLC-MS se empleó un cromatógrafo de la marca Agilent (1290 Infinity) compuesto por un detector triple cuádruplo con trampa lineal de iones (ABSCIEX 3200 QTRAP) y una columna Zorbax Eclipse XDB-C18 (150 x 3 mm I.D., con empaquetamiento de 3,5 mm) a 30°C de temperatura. Para la adquisición y manejo de los datos se empleó el software Analyst. En la Tabla 3.4 se muestran las condiciones empleadas para el herbicida Mesotriona.

Tabla 3.3. Condiciones empleadas en el análisis de herbicidas en HPLC-UV

HPLC-UV			
Modo	Isocrático		
Herbicida	Metribuzina	Flufenacet	Mesotriona
Longitud de onda (nm)	230	256	225
Tiempo de retención (min)	3,05	4,02	3,5
Flujo (ml min ⁻¹)	1		
Vol. De inyección (μl)	100		
Fase móvil	metanol:agua 60:40	acetonitrilo:agua 50:50	acetonitrilo:agua 40:60; 0,1% H ₃ PO ₄

Tabla 3.4. Condiciones empleadas en el análisis de Mesotriona en HPLC-MS

HPLC-MS	
Modo	Gradiente
Herbicida	Mesotriona
Longitud de onda (nm)	254
Tiempo de retención (min)	7,5
Flujo (ml min ⁻¹)	0,3
Vol. De inyección (μl)	10
Fase Móvil	Fase A. Agua+ 0,1% ácido fórmico Fase B. Acetonitrilo
Rampa	0-0,25 min (5% Fase B) 0,25-1,25 min (30% Fase B) 1,25-10,25 min (80% Fase B) 10,25-10,50 min (5% Fase B)

Se utilizaron las medidas HPLC-MS para obtener los resultados en los experimentos de lixiviación y estudios de campo.

3.2.4. Estudios de solubilización de herbicidas en presencia de surfactantes

Estudio de los Sistemas simples

Los estudios del aumento de la solubilidad de los herbicidas en presencia de un sólo surfactante se realizaron por duplicado y en viales de vidrio, añadiendo un exceso de herbicida a 10 mL de solución de surfactante a concentraciones de 0 a 50 mM. Las suspensiones se agitaron a 25°C durante siete días y se dejaron reposar 24 h. A continuación se extrajo el sobrenadante y se analizó en el HPLC-UV obteniendo a partir de estos datos las curvas de solubilidad.

El incremento de solubilidad de los herbicidas por el uso de surfactantes se determinó con la relación:

$$S_w^*/S_w \quad (13)$$

donde, S_w^* es la solubilidad del herbicida a una determinada concentración de surfactante, y S_w es la solubilidad del herbicida en agua. La eficacia de solubilización de un contaminante a través de la formación de micelas en solución puede estimarse mediante la relación molar de solubilización (MSR) y el coeficiente de distribución K_{mc} . MSR es la relación de los moles de herbicida solubilizado respecto a los moles de surfactante presentes como micelas, y se obtiene a partir de la pendiente de la curva de solubilidad por encima de la CMC. La K_{mc} , que describe la distribución del herbicida entre las micelas de surfactante y la fase acuosa, se calcula con la siguiente ecuación:

$$K_{mc} = X_m/X_a \quad (14)$$

donde, X_m es la fracción molar del herbicida en las micelas y X_a es la fracción molar del herbicida en la fase acuosa.

$$X_m = \frac{MSR}{MSR + 1} \quad (15)$$

y X_a a partir de la expresión:

$$X_a = C_{CMC} V_w \quad (16)$$

donde, C_{CMC} es la concentración del herbicida a la CMC del surfactante, y V_w es el volumen molar del agua.

Estudios de los sistemas mixtos

Diagramas de solubilidad de herbicida en Sistemas de micelas mixtas

Se usaron disoluciones de 3 mM y 6 mM de cada surfactante (MBA12, Berol 266, Berol 048 y Ethomeen T15), se añadió una cantidad fija de herbicida Mesotriona, a las mezclas a fracción molar $X_i = 0,5$, de las concentraciones 3mM y 6 mM al estar por encima y por debajo de la CMC del MBA 12. Pasado 7 días en agitación, se determinó la concentración de herbicida disuelta en la mezcla de surfactantes. Posteriormente se extrajeron 5 mL de sobrenadante y se añadió arcilla a concentración $4,44 \text{ g L}^{-1}$ se dejó 24h en agitación y se determinó mediante análisis elemental la cantidad de herbicida adsorbido en la arcilla.

Medida del Potencial Zeta (Sistemas de Micelas Mixtas)

Las mezclas de surfactantes fueron disueltas a diferente fracción molar (X_i) para el estudio de las micelas mixtas, a concentraciones por encima de la CMC de cada surfactante. Las muestras se dejaron reposar durante una hora y se utilizaron unos mililitros de dispersión para la medida. La temperatura de las muestras fue de $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ y el potencial zeta (ξ) se midió usando un *Zetasizer Nanosystem* (Malvern Instruments, Southborough, MA). Por último, se dedujo a partir de la movilidad de partículas usando la aproximación de Smoluchowski.

3.2.5. Adsorción de los surfactantes en minerales de arcilla

La adsorción de surfactante en la arcilla se llevó a cabo en viales de cristal, todo por duplicado, mezclando 15 mL de solución de surfactante, cuya concentración se incrementó dependiendo de la CMC de cada surfactante hasta 20 g L^{-1} y se añadieron 24 mg de arcilla montmorillonita. La concentración de arcilla en el vial fue de $1,6 \text{ g L}^{-1}$. Después de estar en agitación durante 24 h a 20°C , la suspensión se centrifugó a 12000 rpm durante 10 minutos. Se realizaron experimentos preliminares, usando disoluciones de surfactante solo, para determinar las condiciones necesarias para la centrifugación evitando que las moléculas de surfactantes precipitasen. Los pellets se congelaron y liofilizaron. La concentración de surfactante en los pellets se determinó mediante análisis elemental de carbono (ver apartado de caracterización de las formulaciones).

Las isothermas de adsorción de los surfactantes en montmorillonita se modelizaron a partir de la ecuación de Freundlich que permite una descripción matemática de la adsorción de los solutos presentes en una fase líquida (o disolución acuosa) sobre la fase sólida del suelo. La Ecuación de Freundlich es una ecuación empírica que ha sido usada para describir tanto la adsorción como la desorción de plaguicidas en suelos en sistemas acuosos multicomponentes:

$$C_s = K_f * C_e^n \quad (17)$$

donde C_s es la cantidad de herbicida adsorbido por el suelo; K_f es una constante que refleja la capacidad de adsorción; C_e es la concentración del herbicida en solución, y n es una constante relacionada con la intensidad de enlace y con la curvatura que presenta la isoterma.

3.2.6. Adsorción de herbicidas en minerales de arcilla

La adsorción de los herbicidas en los minerales de arcilla se realizó mezclando 15 mL de solución de herbicida, a concentraciones que llegaban hasta 20 mg L⁻¹ para Mesotriona, Flufenacet y Metribuzina, con la montmorillonita a una concentración de 1,6 g L⁻¹. Las suspensiones se dejaron en agitación durante 24 h a 20°C y se centrifugaron a 12000 rpm durante 10 minutos, se filtraron y se midió el sobrenadante en HPLC-UV. Se realizaron isothermas de adsorción de Flufenacet con los minerales de arcilla Illita y Caolinita con las mismas condiciones anteriores para completar los estudios de adsorción-desorción. Las isothermas de adsorción de los herbicidas en montmorillonita se modelizaron usando también la ecuación de Freundlich.

3.2.7. Preparación de formulaciones herbicida-surfactante-montmorillonita

Para la preparación de las formulaciones, en primer lugar, se disolvió el herbicida con el surfactante, para formar las micelas que contendrían al herbicida y que a su vez aumentarían su solubilidad. Posteriormente se añadió la montmorillonita para que las micelas se adsorbieran en su superficie. Después de agitar durante 24h las suspensiones, éstas se centrifugaron a 12.000 rpm durante 10 min retirando el sobrenadante. Por último, se liofilizaron los pellets y se micronizaron delicadamente, en un mortero de ágata, obteniéndose las diferentes formulaciones.

Las concentraciones de herbicidas y surfactantes a emplear para la preparación de las formulaciones se determinaron de los diagramas de solubilidad de los herbicidas con los surfactantes, y de la adsorción correspondiente del surfactante en montmorillonita. Para ello se calculó en primer lugar la concentración de surfactante adsorbida para determinadas relaciones arcilla/surfactante, mediante el uso del coeficiente de enlace determinado previamente del ajuste de los datos de las isothermas de adsorción del surfactante usando la ecuación de Langmuir-Scatchard, la cual se enuncia a continuación:

$$\alpha = (L_0 - L)/L = R_0 K_{IS} / (1 + K_{IS}L) \quad (18)$$

donde R_0 equivale a la concentración de los sitios de adsorción disponibles en la montmorillonita, K_{IS} es el coeficiente de enlace, L_0 y L denotan las concentraciones molares del total de moléculas de herbicida añadidas y de las que quedan libres, respectivamente, y α es la proporción entre las moléculas de herbicidas adsorbidas y libres.

Una vez determinada la concentración de surfactante y arcilla a emplear de forma que la mayor parte del surfactante fuera adsorbida, se estimó la cantidad máxima de herbicida solubilizada para dicha concentración de surfactante atendiendo a los diagramas de solubilidad. Establecida de esta forma la relación de concentración herbicida/surfactante/arcilla a usar, se determinó la concentración teórica de *i.a.* que estaría presente en cada formulación, considerándose que:

1. Existe la misma relación de proporcionalidad entre el herbicida presente en las micelas en solución y el de las micelas adsorbidas en la superficie de la arcilla.
2. La concentración en solución de herbicida en ausencia de surfactantes era sustraída de las cantidades solubilizadas en presencia de surfactantes. Así, se calculó la cantidad de herbicida en la formulación mediante multiplicación de la cantidad de herbicida en las micelas por la fracción calculada de micelas adsorbidas.

3.2.8. Caracterización de las formulaciones

Determinación de carga o contenido de herbicida

La cantidad de herbicida presente en las formulaciones se determinó por análisis elemental de nitrógeno para las formulaciones que contenían los surfactantes B048 y B266, y por análisis elemental de azufre para las formulaciones que contenían ET/15. Para su medida se

Materiales y Métodos

empleó el Microanalizador elemental CHNS, con sistema de detección de Micro TruSpec de LECO, modelo CHNS 932. La técnica consistió en la completa oxidación de la muestra mediante una combustión con oxígeno puro a una temperatura variable entre 100 y 1000°C. Los diferentes productos de combustión CO₂, H₂O y SO₂, se cuantificaron posteriormente mediante celda de infrarrojo, mientras que en el caso de N₂ se hizo con una celda de conductividad térmica. La cantidad de muestra utilizada en cada análisis fue del orden de 1 mg. Era necesario que la muestra estuviese finamente dividida y fuese homogénea para obtener resultados repetitivos y representativos.

Determinación de la eficacia de encapsulación de las formulaciones de liberación controlada

La eficacia de encapsulación (EE) se calcula a partir de la relación entre el herbicida encapsulado y el teórico o en disposición de ser encapsulado, a partir de la expresión:

$$EE(\%) = \frac{C_e}{C_t} \times 100 \quad (19)$$

donde, C_t es la cantidad teórica de herbicida y C_e corresponde a la cantidad de herbicida encapsulado. C_e se obtiene a partir de los datos obtenidos mediante análisis elemental (apartado 3.2.8.).

Espectroscopía de Infrarrojos con transformada de Fourier (FTIR)

Se registraron espectros de infrarrojos de las distintas muestras a estudiar en pastillas de KBr (2% de muestra en peso), usando un espectrofotómetro *Jasco FT/IR (modelo 6300)*, en el rango de 4000 a 700 cm⁻¹. La resolución fue 2 cm⁻¹ y el detector TGS. Se acumularon 50 barridos para cada muestra para mejorar la relación señal-ruido. El software utilizado fue *Spectra Manager v 2., Spectra Analysis v. 2.07.00., Jasco Corporation.*

Difracción de Rayos X (DRX)

Se realizó la difracción de rayos X sobre portamuestras de cristal tras la liofilización de los sólidos obtenidos en los experimentos de adsorción. La difracción de estas muestras se realizó a bajos ángulos (2θ 1-2°C) en un equipo Philips X'Pert (modelo Anton Paar HTK) y a mayores ángulos (2θ 2-10°C) en un difractómetro Siemens (modelo D5000).

3.2.9. Experimentos de liberación in vitro

El estudio de la cinética de liberación *in vitro* del herbicida técnico y de las formulaciones herbicida-surfactante-montmorillonita seleccionadas se realizó en un aparato de disolución automática con paletas rotatorias (*Sotax AT7 Smart*, Teknokroma) a una velocidad de 50 rpm y una temperatura de 25°C.

La concentración de *i.a.* del herbicida utilizado en la liberación de las formulaciones fue 10 mg L⁻¹. Se adicionaron primero 490 mL de agua desionizada en cada vaso de liberación y a continuación se sumergió una bolsa de diálisis que contenía en 10 mL de agua 5 mg de *i.a.* Se tomaron muestras del herbicida liberado a intervalos de tiempo de 0 a 96 horas, se filtraron a través de membranas 0,2 µm *PTFE* y se analizaron los datos por HPCL-UV.

Para obtener las curvas de liberación de *i.a.* de cada formulación se representaron los datos en forma de porcentaje acumulado de *i.a.* frente al tiempo en horas. Los perfiles de liberación del producto técnico y de las formulaciones herbicida-surfactante-montmorillonita se compararon gráficamente para cada uno de los herbicidas estudiados. Se analizó la cinética de liberación del herbicida ajustando los datos al modelo generalizado de Ritger y Peppas (1987):

$$\frac{M_t}{M_0} = K_1 t^n \quad (20)$$

donde M_t es la cantidad de herbicida liberado de las formulaciones al tiempo t , M_0 es la cantidad total inicial del herbicida en el sistema, K es una constante que incorpora características del sistema reticular macromolecular y del plaguicida y n es el exponente de difusión que indica el mecanismo de liberación y transporte. Es de notar que esta expresión tiene validez para un intervalo de tiempo limitado ya que no puede extenderse a infinitos valores de t .

3.2.10. Caracterización de los suelos

Antes de proceder a los diferentes análisis fisicoquímicos las muestras de suelo se secaron a temperatura ambiente, se separaron las piedras y se rompieron los agregados con un rodillo. Las muestras preparadas se pasaron por un tamiz con luz de malla de 2 mm.

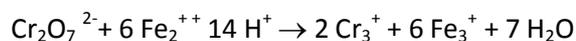
Materiales y Métodos

Para la caracterización físico-química de los suelos, se analizó el pH, la distribución del tamaño de partícula y el contenido y mineralogía de la fracción arcilla, contenido de carbonatos, materia orgánica, óxidos amorfos y capacidad de cambio catiónico.

Determinación del pH. El método utilizado ha sido el propuesto por Guitian y Carballas (1976), mediante la medida en pasta con una relación suelo/solución 1:2,5.

Determinación de carbonatos. El suelo es tratado con HCl y el volumen de CO₂ desprendido fue medido a través de un calcímetro Bernard. Los resultados se expresan en porcentaje de CaCO₃ sobre suelo.

Determinación del contenido en materia orgánica (MO). Suponiendo que la materia orgánica contiene el 58% de C, se ha utilizado 1,724 como factor de conversión de carbono orgánico total a materia orgánica, de acuerdo con Jackson (1982). Teniendo en cuenta esto, para la determinación de este parámetro se ha determinado previamente el contenido de carbono orgánico total. Para ello el método seguido ha sido el basado en la técnica descrita por Walkey y Black (1934), que consiste en la oxidación de la materia orgánica con dicromato potásico en presencia de ácido sulfúrico y posterior valoración del dicromato no reducido con sal de Mohr (valoración por retroceso), según la reacción:



Para ello se tomaron 2 g de muestra de suelo, finamente pulverizada y secada en una estufa a 60°C durante 24 h. La muestra una vez pesada se introdujo en un matraz erlenmeyer de 500 mL y se le agregaron 10 mL de K₂Cr₂O₇ 1N, sometiéndose posteriormente a agitación suave hasta que todo el suelo se hubo empapado de esta solución. A continuación se agregaron 20 mL de ácido sulfúrico concentrado con agitación suave durante 30 segundos, al cabo de los cuales se dejó en reposo durante 30 minutos. Después se añadieron 200 mL de agua desmineralizada y se enfrió hasta temperatura ambiente. Se añadieron 10 mL de ácido fosfórico concentrado seguido de 1 mL de difenilamina (2,5 g de producto disuelto en 20 mL de agua y 100 mL de ácido sulfúrico concentrado). Nuevamente se enfrió a temperatura ambiente e inmediatamente se procedió a valorar el exceso de dicromato no reducido mediante solución de sal de Mohr 0,5 N.

Caracterización de la materia orgánica por RMN. Es necesario eliminar la fracción mineral y los elementos paramagnéticos (Fe, Al) para poder medir las muestras por RMN y obtener espectros de buena calidad. Antes de realizar la desmineralización con HF al 10% ha de eliminarse también

el carbonato de calcio presente en las muestras, dado que se pueden formar fluoruros de calcio insolubles que podrían afectar a las medidas. La eliminación de los carbonatos se realizó mediante la adición de HCl 1N a las muestras y posterior centrifugación. Este procedimiento se repitió varias veces hasta que la adición de HCl dejó de producir burbujas. Se añadió la disolución de HF al 10% a las muestras y se agitaron vigorosamente, centrifugando y desechando con cuidado el sobrenadante. El procedimiento se repitió 4 veces. Una vez terminado, fue necesario lavar el precipitado varias veces, hasta llegar a pH 5 aproximadamente, procediendo luego a la liofilización de la muestra antes de las medidas de RMN.

La espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de ^{13}C se llevó a cabo en un espectrómetro de alta resolución Bruker Avance III HD NMR 400 MHz, que trabaja a una frecuencia de resonancia de 100 MHz para los núcleos de ^{13}C . Las muestras, una vez molidas y homogeneizadas, se colocaron en rotores de Zr de 4 mm de diámetro con tapa KEL-F. Se aplicó la técnica de polarización cruzada bajo giro de ángulo mágico (magic angle spinning, CPMAS) a una velocidad de 14 kHz. El pulso de ^1H se aplicó en rampa durante un 1 ms para evitar la pérdida de intensidad de señal en regiones de interés debido a la relajación de los spines durante el tiempo de contacto Hartmann-Hahn. Los desplazamientos químicos de ^{13}C se calibraron respecto a tetrametilsilano (0 ppm) con glicina (176.04 ppm). Aproximadamente entre 10.000 y 20.000 scans se acumularon para cada una de las muestras estudiadas, dependiendo del contenido en C. Se aplicó un tiempo de espera entre pulsos (pulse delay) de 500 ms. La asignación de las regiones de desplazamiento químico típicas en los espectros de las muestras de suelo con grupos de C se realizó según Knicker y col. (2005). Las distribuciones de las intensidades de ^{13}C se obtuvieron mediante una rutina de integración con el software MestReNova 7 (de la Rosa y col., 2014).

Determinación de la granulometría. Se realizó de acuerdo con la metodología descrita por Gee y Bauder (1986), usando hexametáfosfato sódico como agente dispersante. Las fracciones de arena gruesa (2-0,2 mm) y fina (0,2-0,02 mm) se determinaron por tamizado en húmedo y posterior pesada. Las fracciones limo (0,02 mm-2 μm) y arcilla (<2 μm) se determinaron a partir de las lecturas obtenidas con un hidrómetro Bouyoucos.

Determinación de hierro, aluminio y manganeso totales y amorfos . Los óxidos totales de hierro, aluminio y manganeso se determinaron a partir de una muestra de suelo de 2g al que se le añadieron 40 ml de una disolución de citrato sódico 0,3M y 5ml de una disolución NaHCO_3 1M se calentaron en un baño entre 75-80 $^\circ\text{C}$, una vez alcanzada la temperatura se añadieron 1g de Ditionito y se mantuvieron en agitación. Se repitió este paso 3 veces dejando 15 minutos para que se produzca la digestión en agitación a 75 $^\circ\text{C}$. Finalmente se añadieron 5 ml de NaCl saturado

a temperatura ambiente y si fuera necesario 10ml de acetona, se agitaron y centrifugaron las muestras 5 min a 3000rpm. Los sobrenadantes se analizaron mediante absorción atómica. Se han extraído el hierro, aluminio y manganeso amorfos presentes en los suelos siguiendo el método propuesto por McKeague y col. (1971). Se emplearon 0,75 g de muestra dispersada en 30 mL de solución tampón oxálico-oxalato amónico a pH 3, agitándose durante 4 h en oscuridad. El hierro y el aluminio amorfos se determinaron por absorción atómica expresando los valores como óxidos.

Determinación de la mineralogía de la fracción arcilla. Se molió la fracción arcilla de los distintos suelos en un mortero de ágata, utilizando posteriormente un portamuestras de carga lateral para el estudio por difracción de rayos X (DRX) de los preparados de polvo. Los difractogramas correspondientes se realizaron en un aparato Siemens modelo Kristaloflex D-501, equipado con un contador de centelleo y unidad discriminadora. La radiación empleada fue la del Cu α , utilizando un filtro de níquel. La estimación semicuantitativa de los minerales de la arcilla a partir de los diagramas de rayos X se realizó de acuerdo con los métodos propuestos por Galán y Martín-Vivaldi (1973), Stokke y Carson (1973) y Galán y Espinosa de los Monteros (1947).

Determinación del Volumen de Poro (Capacidad de Campo). Se utiliza un anillo de 10 cm, que con el suelo fresco ya tamizado se llena hasta alcanzar aproximadamente 6 cm de altura. Previamente se pesan los anillos preparados para medir la capacidad de campo (se cierra una parte con lienzo). Una vez rellenos con los suelos se introducen en un recipiente con agua. Cuando el agua llega hasta la superficie del suelo se saca del vaso y se deja escurrir hasta que deja de gotear. Una vez deje de gotear se seca un poco para retirar el exceso de agua del lienzo y se pesa el anillo. La diferencia de peso de la columna con el suelo mojado y la columna con el suelo seco (se considera $\rho = 1 \text{ g cm}^{-3}$) será el volumen de poro.

Determinación de la capacidad de cambio catiónico (CCC) de los suelos. Para ello 2 g de suelo se lavaron varias veces con etanol para eliminar sales. Posteriormente se trataron con 25 mL de acetato amónico a pH 7 durante 24 h, recogándose el sobrenadante y volviendo a repetir el proceso 3 veces más. En la solución recogida se midió Na, K, Ca y Mg. La muestra sólida se lavó cuatro veces con etanol para eliminar el exceso de amonio, se secó a 40°C y se destiló el suelo para determinar el contenido en amonio.

3.2.11. Estudios de adsorción-desorción de herbicidas en suelos

La adsorción del herbicida Flufenacet en suelo se realizó poniendo en contacto 10 g de suelo con 10 mL de disoluciones del herbicida durante 24 h a 20°C. El rango de concentraciones

iniciales fue 1, 3, 5, 7, 10 y 15 mg L⁻¹. Tras el periodo de agitación se centrifugaron las suspensiones y se realizaron desorciones mediante la retirada de la mitad del sobrenadante, que fue reemplazado por agua destilada, dejándose durante otras 24 h en agitación y operando como en el proceso de adsorción. Se realizaron dos pasos más consecutivos de desorción.

Las isothermas de adsorción y desorción se ajustaron a la ecuación de Freundlich previamente comentada en la introducción y se determinaron los parámetros correspondientes. En los procesos de desorción, se calculó un índice que sirve para cuantificar el fenómeno de histéresis, el coeficiente H, que se define como la razón entre los valores de n obtenidos de las isothermas de adsorción y desorción

$$H = n_a/n_d \quad (21)$$

3.2.12. Estudios de lixiviación y bioactividad de herbicidas en suelos

Formulaciones de Flufenacet. Se cortaron tubos de metacrilato de 3 cm de diámetro en secciones de 4 y 8 cm, y tres unidades de 4 cm se pegaron junto con una unidad de 8 cm en uno de los extremos para construir una columna de 20 cm. La columna se cubrió en el extremo opuesto a la unidad de 8 cm con una malla de nylon de 1 mm junto con una capa fina de lana de vidrio (0,5 g) para sujetar firmemente el suelo en la columna. Se empaquetaron los suelos CR (164 g), AL (114 g) y LT (154 g) desde la parte superior de la columna creándose una columna de suelo de 16 cm que se podía separar fácilmente en segmentos de 4 cm al final del experimento. Se tomó un volumen de la suspensión de la formulación comercial y cantidades variables según el contenido i.a. de las FLCs para obtener una dosis de 2 kg i.a. ha⁻¹, y se esparcieron uniformemente en la superficie del suelo. Los experimentos de columna de suelo se realizaron por triplicado. Se añadió agua destilada equivalente a 84 mm de lluvia (60 mL) y 168 mm de lluvia (120mL) desde la parte superior de la columna en dos y cuatro porciones respectivamente, dejando al suelo equilibrar durante 4 h tras la adición y 24 h tras la adición final. Los lixiviados se recogieron en volúmenes de 5 mL y se analizó el herbicida mediante HPLC-UV.

Cada columna de suelo se separó en segmentos de 4 cm al final del experimento de lixiviación. Por duplicado, 2 g de suelo se secaron a 100°C durante 24 h para determinar la humedad de cada segmento de suelo. La cantidad de herbicida que permanecía en cada segmento se extrajo por duplicado mediante agitación de 5 g de suelo con 10 mL de acetonitrilo durante 24 h. Se centrifugaron las suspensiones, se filtraron y por último, se analizó el herbicida por HPLC.

Materiales y Métodos

Se usó un bioensayo para calcular la actividad residual de los herbicidas en los anillos de las columnas de suelo. Se plantaron por sextuplicado 7 semillas de *Setaria viridis* en vasos que contenían 15 g de suelo de cada segmento para cada formulación, y se irrigaron diariamente durante 2 semanas. La bioactividad de las formulaciones se determinó midiendo la reducción del tamaño de la planta respecto al control.

Formulaciones de Mesotriona. La eficacia de la reducción en la lixiviación de las formulaciones preparadas frente al producto comercial se determinó mediante experimentos de movilidad en columnas del suelo CR.

Se cortaron tubos de PVC de 10 cm de diámetro en secciones de 3 y 8 cm, y tres unidades de 3 cm se pegaron junto con una unidad de 8 cm en uno de los extremos para construir una columna de 17 cm. La columna se cubrió en el extremo opuesto a la unidad de 8 cm con una malla de nylon de 1 mm junto con una capa fina de lana de vidrio (4,0 g) para sujetar firmemente el suelo en la columna. Se empaquetó el suelo CR (1,3 Kg), desde la parte superior, creándose una columna de suelo de 12 cm que se podía separar fácilmente en segmentos de 3 cm al final del experimento. Se esparcieron uniformemente en la superficie del suelo 3 ml de suspensión de la Formulación comercial y de las FLCs a una dosis de 0,1 Kg i.a. ha⁻¹ para Mesotriona. Los experimentos en columnas de suelo se realizaron por triplicado. Se añadió agua destilada equivalente a 70 mm de lluvia desde la parte superior de la columna en dos porciones, dejando el suelo equilibrar durante 24 h entre cada adición. Cada columna de suelo se separó en segmentos de 3 cm. Por duplicado, 2 g de suelo se secaron a 100°C durante 24 h para determinar la humedad en cada segmento de suelo. La cantidad de herbicida que permaneció en cada segmento se extrajo por triplicado mediante agitación de 5 g de suelo con 10 mL de acetonitrilo durante 24 h. Se centrifugaron las suspensiones y se analizó el herbicida por HPLC-MS.

Se usó un bioensayo para calcular la actividad residual de los herbicidas en los anillos de las columnas de suelo. Se plantaron 5 semillas de girasol (*Helianthus annuus*) en vasos que contenían 40 g de suelo de cada segmento para cada formulación, y se irrigaron diariamente durante 2 semanas. La bioactividad de las formulaciones se determinó midiendo el efecto blanqueante sobre las plantas de girasol así como la reducción en peso fresco por brote con respecto al control.

Se evaluó la medida del efecto blanqueante sobre las plantas de girasol después de 10-15 días. La intensidad del blanqueo se determinó midiendo el contenido de clorofila de las plantas, y se calculó el porcentaje de inhibición comparándolo con el contenido en clorofila de la muestra

control, la cual no recibió ningún tratamiento. La clorofila se determinó cortando los tallos en pequeños trozos y extrayendo la clorofila con 12 ml de N,N-dimetilformamida (DMF) durante 48 horas y el contenido de clorofila fue medido por espectroscopía visible a 664 y 647 nm, relacionando la absorbancia de la clorofila extraída con el peso neto de los tallos. El experimento fue llevado a cabo por triplicado. Para el cálculo de la clorofila total se aplicaron las siguientes fórmulas (Moran, 1982):

$$Cl_{total} (\mu\text{g/g}) = \frac{(Cl_a + Cl_b) \times V(\text{mL})}{P (\text{g})} \quad (22)$$

$$Cl_a (\mu\text{g/mL}) = 12,64 \cdot Abs_{664} - 2,99 \cdot Abs_{647} \quad (23)$$

$$Cl_b (\mu\text{g/mL}) = 23,26 \cdot Abs_{647} - 5,60 \cdot Abs_{664} \quad (24)$$

donde, Cl_{total} es la clorofila total, P es el peso de la plantas, V es el volumen de DMF utilizado (12 mL), Cl_a y Cl_b son las clorofilas de tipo a y b, respectivamente. La clorofila b se diferencia de la clorofila a solamente por estar sustituido el grupo metilo ($-\text{CH}^3$) del carbono 3 en el segundo anillo pirrónico, por un grupo aldehído ($-\text{CHO}$). Esta diferencia es suficiente para causar un cambio notable en la coloración como también en el espectro de absorción de esta molécula.

3.2.13. Experimentos de campo

Los experimentos de campo se llevaron a cabo para evaluar la eficacia de control de malezas por el herbicida Mesotriona aplicado en postemergencia, tanto como FC como la formulación MS/ET15 (3,99/12/10), en un cultivo de maíz. Se realizó en la campaña 2011/2012 en una finca que se ubica en el Término Municipal de Lebrija (Sevilla, España) (36° 55' N, 6° 04' O). La finca es totalmente simétrica, de unos 250 x 500 m (12,5 ha) y nivelada con una pendiente del 1 por 1000. Cuenta con un sistema de drenaje cada 5 m, haciendo que toda el agua sobrante vaya a un canal secundario que a su vez se comunica con el canal primario que desagua en el río Guadalquivir. El suelo del experimento corresponde al suelo denominado LB.

Como labores previas al cultivo de maíz (*Zea mays L.*), objeto de nuestro estudio, el campo fue arado con un subsolador a una profundidad de 15-20 cm, después de la recolección del cultivo anterior (trigo), seguido de arado de disco y, por último, se preparó para la siembra con un pase de rodillo.

Materiales y Métodos

El maíz fue sembrado el 6 de marzo 2012 con una sembradora *John Deere serie 1700*, a 4 cm de profundidad, 75 cm de distancia entre líneas, y 14 cm de distancia entre plantas. El abonado de fondo se efectuó en el momento de la siembra, a 300 Kg ha⁻¹ de fórmula completa NPK (8-24-8). Posteriormente, a los 30 y 42 días después de la siembra, se realizó un reabono con urea (46%) (100 Kg ha⁻¹) y nitrato amónico (33,5%) (100 Kg ha⁻¹). Al mismo tiempo de la siembra del maíz, se sembraron semillas de girasol entre los líneas del cultivo de cada parcela, con objeto de tener seguridad de la presencia de malas hierbas de hoja ancha en cada una de ellas, hecho que suele suceder cuando en cultivos anteriores a maíz se ha sembrado girasol.

El primer riego o riego de nascencia se realizó por aspersión el 13 marzo de 2012, con una distancia entre aspersores de 12 y 13,5 m aportando una cantidad de agua de 72 mm para llevar el suelo a capacidad de campo. El resto de aporte hídrico se efectuó con riego por goteo, desde mediados de mayo hasta mediados de julio, aportando una cantidad de agua de 48 mm/semana repartida en 2 riegos semanales. A partir de mediados de julio y hasta mediados de agosto la frecuencia de riego cambia a días alternos, esto genera unos turnos de 3 y 4 riegos semanales y por tanto, una aportación de agua de 36 y 48 mm/semana, respectivamente. El aporte total de agua de riego al cultivo fue 672 mm.

En la Figura 3.7 se presentan las precipitaciones y las temperaturas máximas, medias y mínimas desde la siembra (marzo) del maíz hasta su recolección (septiembre). Los valores fueron registrados y tomados de la Estación Agroclimática Lebrija I, próxima a la finca, y perteneciente a la Red de Estaciones Meteorológicas automáticas instaladas por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

En esta gráfica se observa que la lluvia es escasa en la época de cultivo, con intervalos de períodos secos, y que las temperaturas presentan un aumento notable en la primera quincena de mayo. Por este motivo, y debido a las necesidades fenológicas del maíz, empieza a regarse de manera periódica desde mediados de mayo hasta mediados de agosto. La cantidad de agua acumulada aportada al suelo, por las precipitaciones y por el riego, a los 10, 30 y 180 días después del tratamiento herbicida fue de 2,6 mm, 33,8 mm y 709,8 mm, respectivamente. En la Figura 3.8 se representa la cantidad de agua añadida, cada 15 días, a lo largo del período del cultivo por la precipitación, por el riego y el total incorporado.

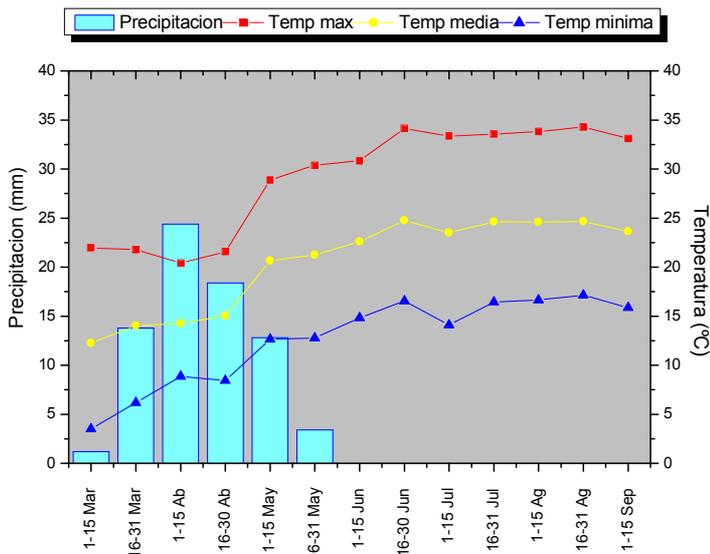


Figura 3.7. Promedio quincenal de precipitación (mm de lluvia) y temperatura máxima, media y mínima (°C) de marzo a septiembre 2012

El diseño establecido fue de bloques al azar con cuatro repeticiones (Figura 3.9). Cada unidad experimental consistió en una superficie de 13,5 m² (6 m x 2,25 m). Los tratamientos bajo estudio, una FC de Mesotriona (*Callisto*[®]) y una FLC Mesotriona-surfactante-montmorillonita (MS/ET15 3,99/12/10), ambas a la dosis de campo recomendada (0,1 Kg ha⁻¹), se aplicaron el 12 de abril de 2012. También se reservaron 4 parcelas como control en las que no se aplicó ningún tratamiento con Mesotriona.

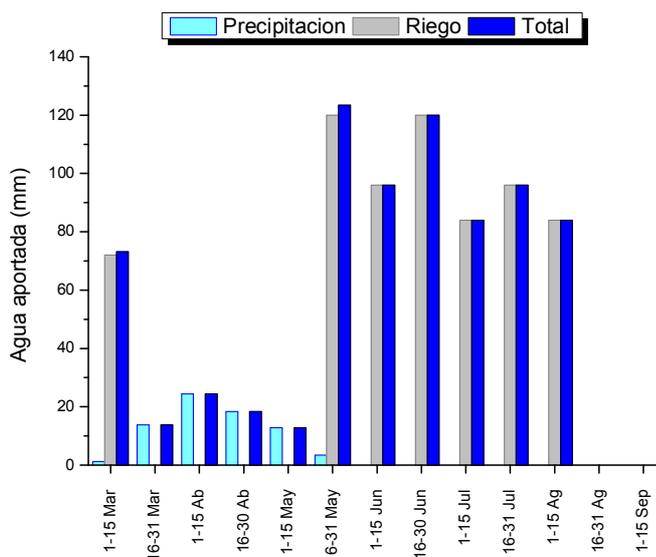


Figura 3.8. Cantidad quincenal de agua aportada al cultivo de maíz de marzo a septiembre 2012

Materiales y Métodos

A determinados tiempos tras la aplicación de las formulaciones (10, 30 y 180 días), se tomaron muestras de suelo de cada parcela a diferentes profundidades (0 a 10, 10 a 20 y 20 a 30 cm) usando una sonda pequeña (*auger probe*).

La cantidad de Mesotriona a cada profundidad se extrajo por triplicado poniendo en contacto 20 g de suelo y 10 mL de HCl (0,01M) durante 24 h bajo agitación continua. Se centrifugaron las suspensiones y se analizó en el sobrenadante la concentración de herbicida por HPLC-MS. Al final del experimento, el 6 de septiembre de 2012, se cosecharon las plantas de maíz y se evaluó la influencia de Mesotriona en el rendimiento del cultivo mediante el peso del grano en fresco.

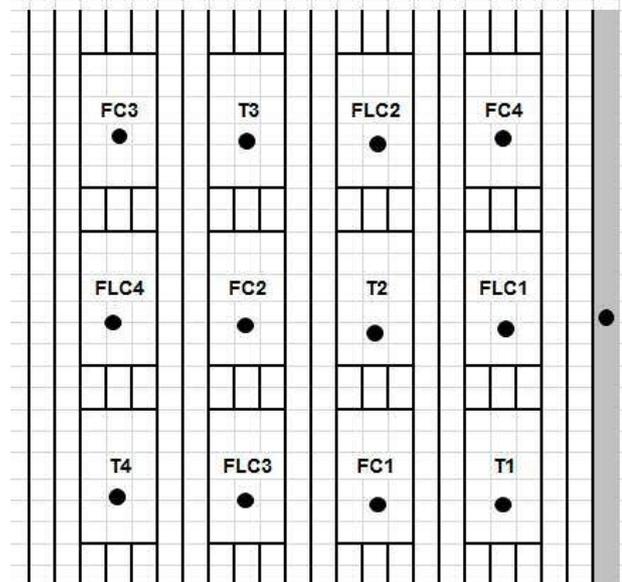


Figura 3.9. Plano del diseño de experimento de campo. T: Suelo control; FC: Suelo tratado con la formulación comercial; FLC: Suelo tratado con la formulación de liberación controlada

Resultados y Discusión

4.1. CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LOS SUELOS

Los suelos estudiados tienen características muy diversas. Sus propiedades físico-químicas se muestran en la Tabla 4.1. Así el suelo AL es un suelo ácido que presenta un bajo contenido en carbonatos y altas concentraciones de óxidos amorfos de Fe, Al y Mn. Debido a su importante contenido en óxidos de Fe y Al de este suelo, se determinó el porcentaje de óxidos amorfos presentes en todos los suelos, ya que su reactividad difiere bastante de la esperada para los óxidos bien cristalizados. El suelo AL es el que presentaba el mayor contenido de óxidos amorfos, siendo estos muy minoritarios en el resto de suelos. Los suelos CR, LB, y LT son suelos básicos con bajo contenido en MO y alto contenido en carbonatos. El suelo AL destaca por ser el que contiene mayor proporción en MO seguido de LT, LB y CR. En cuanto a la textura hay que destacar la alta fracción fina (limo+arcilla) del suelo LB, que tiene un 98,4% frente al más bajo, CR, con valor del 41,1%, mientras que en los suelos AL y LT fue intermedia con un 70% aproximadamente. Atendiendo a la textura de los mismos, el suelo AL es franco-limoso, CR es francoarcilloarenoso, LB es arcilloso y LT es franco.

Una estimación semicuantitativa de los minerales de arcilla presentes en la fracción arcilla de los suelos mostró el predominio de illita y caolinita (Tabla 4.2). Además, en el suelo LB está presente esmectita, probablemente responsable de su mayor CIC (25,4 $\text{cmol}_c \text{kg}^{-1}$). En el suelo LT está presente vermiculita y en los suelos AL y CR clorita. En el suelo AL se detectó la presencia de goethita, lepidocrocita y maghemita.

Tabla 4.1. Características de los suelos originales usados

	AL	LT	LB	CR
MO (%)	3,40	1,30	1,10	1,00
CIC ($\text{cmol}_c \text{kg}^{-1}$)	19,9	14,9	25,4	13,2
Carbonatos (%)	1,60	21,8	19,0	17,0
pH	6,20	8,20	7,60	8,70
Arena (%)	24,2	28,5	1,60	58,9
Limo (%)	59,4	45,8	28,3	19,4
Arcilla (%)	16,4	25,7	70,1	21,7
Fe ₂ O ₃ total (g kg^{-1})	60,4	7,00	4,60	6,40
Fe ₂ O ₃ amorfo (g kg^{-1})	5,20	0,50	0,80	0,20
Al ₂ O ₃ total (g kg^{-1})	10,6	1,50	2,70	0,60
Al ₂ O ₃ amorfo (g kg^{-1})	3,70	1,00	2,20	0,20
MnO total (g kg^{-1})	25,3	0,40	0,50	0,30
MnO amorfo (g kg^{-1})	10,1	<0,1	<0,1	<0,1

Tabla 4.2. Mineralogía de la fracción arcilla de los suelos¹

Suelo	S%	I%	K%	V%	Cl%	Q%	F%
AL	-	20	20	-	40	20	-
LT	-	70	15	15	-	-	-
LB	15	75	10	-	-	-	-
CR	-	70	5	-	15	10	-

¹S: esmectita, I: ilita, K: caolinita, V: vermiculita, Cl: clorita, Q: cuarzo, F: feldespato.

En los cuatro suelos la caracterización de la materia orgánica se realizó mediante espectroscopia de RMN de ¹³C (Figura 4.1). Los espectros de todos los suelos eran muy similares, mostrando una señal a 174 ppm, asignada a grupos carboxílicos y al C de amida, y a 188 ppm del grupo carbonilo de ligninas, péptidos y otros productos de degradación. Se observaron señales alifáticas típicas a 22 y 27 ppm debido a grupos metilo y a metilenos terminales, respectivamente, de la cutina y suberina, lípidos y cadenas laterales de aminoácidos. Los hidratos de carbono son la fuente de las señales entre 60-110 ppm. La degradación de las unidades de lignina dio señales entre 140-160 ppm debido a O-C arílico y a 56 ppm de C unido a grupo metoxilos. Esta última puede ser solapada por señales de N-C alquílico en péptidos. Las unidades de lignina también fueron responsables de la señal en el suelo AL a 115 ppm asignada a C bencénico protonado en la posición orto/para con respecto al O-C arílico, no observándose en los otros suelos, probablemente debido a su pH básico. Este suelo también dio señales a 126 y 134 ppm, que se debieron a carbono aromático, en parte derivado de ligninas y taninos. Los espectros fueron analizados por división en 7 regiones de desplazamiento químico principales que se asocian a diferentes unidades predominantes (Knicker, 2011). La proporción de las diferentes unidades funcionales se expresó como porcentaje respecto al carbono orgánico total (Tabla 4.3).

El análisis de la distribución de carbono mostró una mayor cantidad de carbono derivada de grupos no polares en el suelo AL (regiones 0-45 y 110-140 ppm). El índice de polaridad (R) que representa la relación entre los grupos polares y no polares se calculó de acuerdo con la siguiente expresión (Abelmann y col., 2005):

$$R = \frac{(C \text{ carbonilo} + O - C \text{ alquílico} + O - C \text{ arílico})}{(C/H - C \text{ arílico} + C \text{ alquílico})} \quad (25)$$

Los valores de R fueron 0,91 en AL, 1,50 en LT, 1,02 en LB y, 1,48 en CR respectivamente.

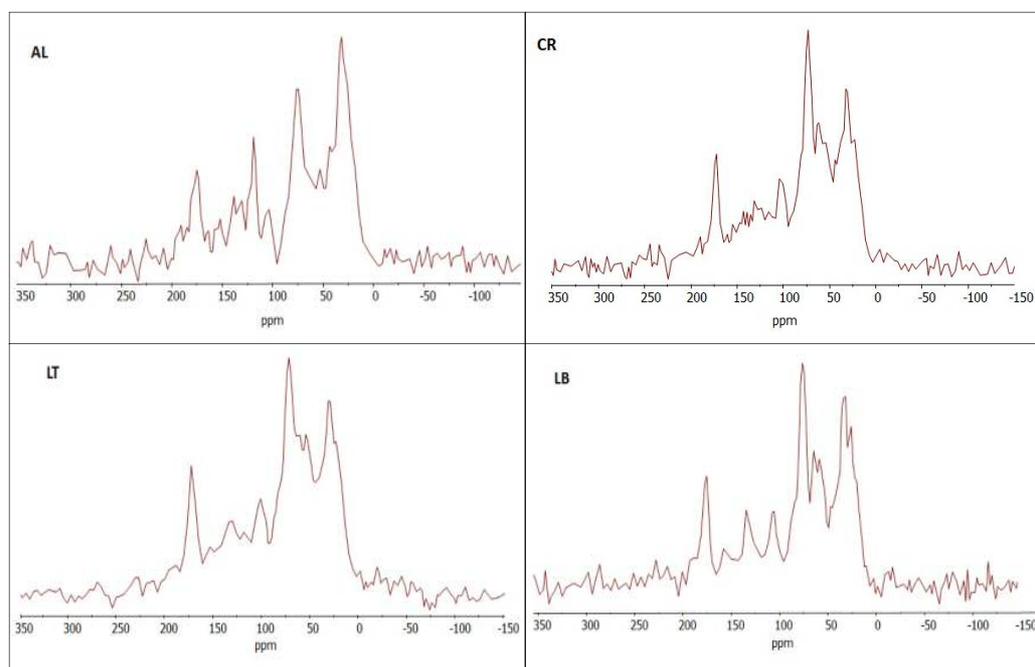


Figura 4.1. Espectros de RMN ¹³C CP-MAS en estado sólido de suelos

Tabla 4.3. Distribución relativa de carbono (%) en suelos expresado como porcentaje de carbono orgánico total

Área de desplazamiento químico (ppm)	AL	LT	LB	CR	Asignación
0-45	36,3	26,2	30,8	26,3	C-alquílico
45-60	8,9	11,9	11,1	11,5	O-C alquílico, N-C alquílico
60-90	20,8	24,7	24,6	25,9	O-C alquílico
90-110	4,7	8,1	7,2	8,2	O-C alquílico, C/H-C arílico
110-140	13,7	10,6	9,5	10,7	C/H-C arílico
140-160	3,8	5,3	4,3	5,4	O-C arílico
160-225	11,9	13,3	12,4	12,1	C carbonilo

4.2. FORMULACIONES DE LIBERACIÓN CONTROLADA BASADAS EN MONTMORILLONITA Y SURFACTANTES COMERCIALES

4.2.1. Propiedades interfaciales de los surfactantes

La relación entre la tensión superficial (γ) y el logaritmo de la concentración de los distintos surfactantes en solución acuosa se muestran en la Figura 4.2.

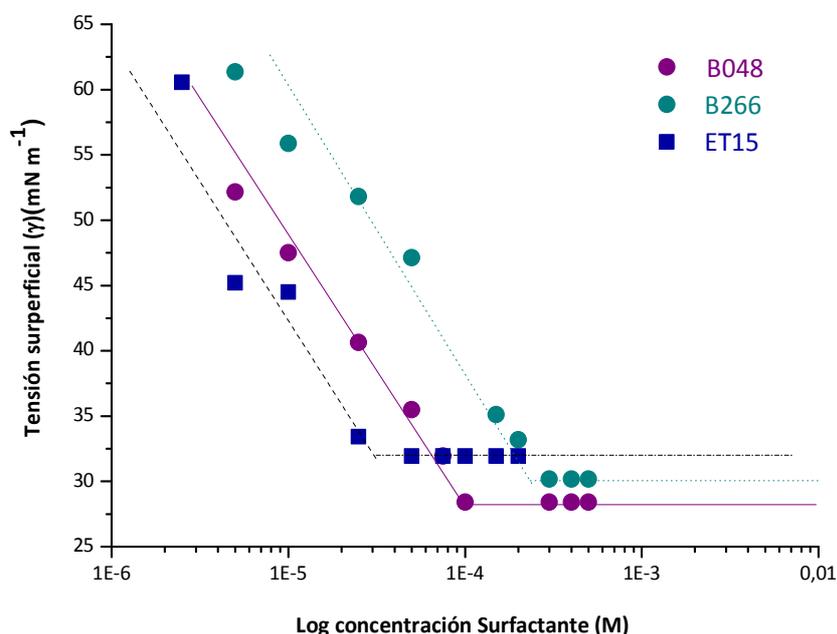


Figura 4.2. Gráfica de la tensión superficial (γ) frente al logaritmo de la concentración de surfactante

Los valores de la concentración máxima de surfactante que admite la superficie de la solución en la interfase (Γ_{max}), el área mínima que ocupa la cabeza polar de un surfactante (a_{min}) y el parámetro de empaquetamiento crítico (g) de cada surfactante (ecuaciones 9, 10 y 6), obtenidos a partir de la representación de la tensión superficial (γ) frente al logaritmo de la concentración de surfactante ($\log C$) (Figura 4.2), se encuentran en la Tabla 4.4.

El valor de g calculado indica la formación de agregados esféricos en solución para el surfactante B048 y ET15, y cilíndricos para B266 (Galán-Jiménez y col., 2014). Debido a que se trata de surfactantes comunes de cadena simple, la relación v/l es una constante independiente de la longitud de la cadena y equivalente a un valor de $0,21 \text{ nm}^2$. Por tanto, el valor de g está

intensamente condicionado por el área a_{min} , y además tienen una relación inversa, es decir, a mayor valor de a_{min} menor valor de g (ecuación 6).

Tabla 4.4. Propiedades de los surfactantes: nº de carbonos de la fracción hidrofóbica n_C , número de unidades de óxidos de etileno (EO), concentración micelar crítica (CMC), balance hidrófilo-lipófilo (HLB), peso molecular (PM), máxima concentración en superficie (Γ_{max}), área mínima ocupada por molécula (a_{min}) y parámetro de empaquetamiento crítico de las micelas (g)

	Berol 048	Berol 266	Ethomeen T/15
n_C	C ₁₃	C ₁₀	C ₁₇
EO	10	5,5	5
CMC (M)	1,26 10 ⁻⁴	3,74 10 ⁻⁴	2,74 10 ⁻⁵
HLB	13,5	12,1	9,2
PM (g mol ⁻¹)	640	400	480
Γ_{max} 10 ⁶ (mol m ⁻²)	2,57	3,41	1,60
a_{min} (nm ²)	0,65	0,49	1,04
g	0,32	0,43	0,20

Las moléculas de ET15 se protonan en solución, y por tanto, hay un incremento en la repulsión de las cabezas polares del surfactante en las micelas, lo que explica el alto valor de a_{min} observado y la formación de esferas. En el caso de los surfactantes etoxilados no iónicos (B048 y B266), la repulsión entre los grupos polares es mayor cuanto mayor es el número de unidades de óxidos de etileno (EO) en la molécula del surfactante (Tabla 4.4). Por tanto el valor de a_{min} será alto y el valor de g lo suficientemente pequeño para formar micelas esféricas, en el caso del B048 (10 unidades EO). Para un número pequeño de EO (5,5), como en el B266, la repulsión entre las partes polares disminuye con la consecuente disminución de a_{min} y el incremento en los valores de g , por lo que las micelas se dispondrían en forma cilíndrica. Sin embargo, Nagarajan (2002) demostró que la longitud de la cadena hidrocarbonada también influye en el tamaño y forma de los agregados en equilibrio. Este autor verificó que cuando se obtiene un valor g de 0,42 y la cadena hidrocarbonada contiene más de 10 átomos de carbono, es lo suficientemente larga para formar micelas cilíndricas. En cambio, si con el mismo valor de g la longitud de la cadena hidrocarbonada es menor o igual de 10 átomos de carbono, como el caso del B266, se obtienen micelas globulares.

Las micelas globulares pueden ser tanto micelas esféricas como elipsoidales. Según Galán-Jiménez y col. (2014), el número de agregación (N_{agg}) determinado fue 62 para B048 y 58 para B266, estando bastante cerca de los valores teóricos calculados para micelas esféricas (65) y micelas elipsoidales (60). En el ET15, el N_{agg} experimental fue 40, siendo éste más

pequeño que el obtenido con los surfactantes catiónicos, con similares cadenas alquílicas pero diferentes grupos polares (Mata y col., 2005).

4.2.2. Adsorción de los surfactantes comerciales en montmorillonita

La adsorción de los diferentes surfactantes en la Montmorillonita (Figura 4.3) parece estar correlacionada con el tipo de surfactante, donde se observó una mayor adsorción por parte del ET15 que en B048 y B266. Las isotermas de adsorción que presentan todos los surfactantes en Montmorillonita corresponden al tipo H y son indicativas de una alta afinidad del soluto por el mineral de la arcilla. Debido a la estructura de la montmorillonita, esta interacción tiene lugar mediante puentes de hidrógeno entre las unidades etoxiladas del surfactante y la superficie de la arcilla, pero interacciones adicionales entre las cadenas alquílicas mejorarían la estabilidad del sistema.

En el caso de la adsorción de surfactantes no iónicos en arcillas, como B048 y B266, ésta se ha explicado mediante la formación de puentes de hidrógeno con los átomos de oxígeno de la superficie del silicato, por unión con los cationes interlaminares a través de puentes de hidrógeno con agua, por coordinación directa o interacción dipolo-dipolo con los cationes intercambiables, o por fuerzas de Van der Waals entre cadenas alquílicas del surfactante y las áreas superficiales de la arcilla con baja densidad de carga (Backhaus y col., 2001; Sonon y Thompson, 2005; Deng y col., 2006).

La isoterma del surfactante ET15, es igualmente de tipo H. Al tratarse de un surfactante de tipo catiónico (protonado a pH de equilibrio), se producirán interacciones más fuertes de tipo electrostático entre el grupo polar del surfactante y la superficie de la arcilla. Este tipo de interacción es más fuerte, lo que le dará mayor estabilidad al sistema.

Se realizó una aproximación modelizando la adsorción de los surfactantes con la ecuación de Langmuir-Scatchard. Con esta aproximación se obtuvo el coeficiente de enlace (K_{LS}) para cada surfactante, lo que permitió predecir su adsorción para distintas relaciones surfactante/arcilla necesarias para la posterior elaboración de las FLCs (Tabla 4.5). La validez de este enfoque ha sido ampliamente demostrada por Sánchez-Verdejo y col. (2008). Según el trabajo de Nir y col. (2000), solo se usó un parámetro de ajuste para la modelización de las isotermas de adsorción usando la ecuación de Langmuir-Scatchard, el coeficiente K_{LS} . En la determinación de estos coeficientes, la concentración de los sitios de adsorción en montmorillonita (R_0) fue elegida

como la mayor cantidad adsorbida de cada surfactante (Figura 4.3). El ajuste fue razonablemente bueno, con valores bajos del valor cuadrático medio (RMSE).

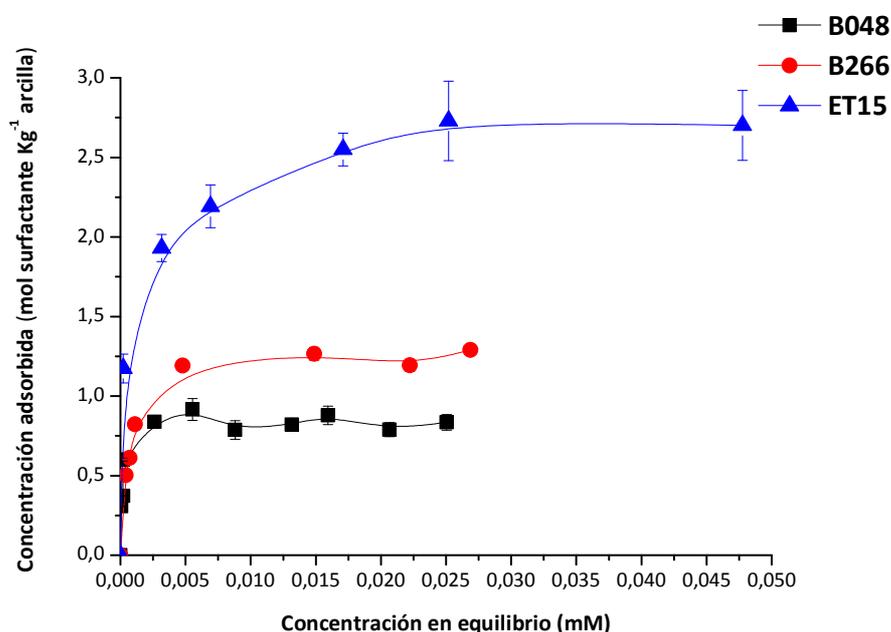


Figura 4.3. Isothermas de adsorción de los surfactantes B048, B266 y ET15 a diferentes concentraciones en Montmorillonita (SWy-2) a una concentración de 1,6 g L⁻¹

Tabla 4.5. Coeficientes de enlace de los surfactantes en Montmorillonita calculado a partir de la ecuación de Langmuir-Scatchard y valores RMSE

Surfactante	Coefficiente de enlace (M ⁻¹)	RMSE (mol Kg ⁻¹)
Berol 048	6000	0,027
Berol 266	1200	0,084
Ethomeen T/15	12000	0,063

Caracterización de los complejos entre surfactantes comerciales y montmorillonita

Difracción de Rayos X. Se caracterizaron tanto la arcilla como los diferentes complejos formados para la elaboración de las formulaciones de liberación controlada (FLCs). Las Figuras 4.4, 4.5 y 4.6 muestran los difractogramas de Rayos X de Montmorillonita (SWy-2) tratada con diferentes concentraciones de los surfactantes utilizados para el desarrollo de las FLCs. En la Figura 4.4.a se presenta el difractograma de la arcilla SWy-2 sin tratar, con un espaciado basal de 1,22 nm y con difracciones a 0,60 y 0,31 que se intuyen como segundo y cuarto órdenes superiores del mismo.

En las Figuras 4.4.b y 4.4.c. se presentan los difractogramas correspondientes a los complejos surfactante/arcilla B048/SWy-2 con dos cargas distintas del surfactante: $0,6 \text{ mmol g}^{-1}$ ($< \text{CCC de SWy-2}$) y $0,87 \text{ mmol g}^{-1}$ (similar a la CCC de la arcilla), que corresponden a los puntos de la isoterma de adsorción de concentración inicial de surfactante de $0,5$ y 10 g L^{-1} , respectivamente. En este complejo no ha sido posible conseguir una carga de surfactante superior a la CCC de la arcilla. Con ambas cargas los difractogramas presentan una difracción $d(001)$ con un espaciado basal de $1,78 \text{ nm}$, con sus correspondientes órdenes superiores bien definidos a $0,89$, $0,59$ y $0,45 \text{ nm}$.

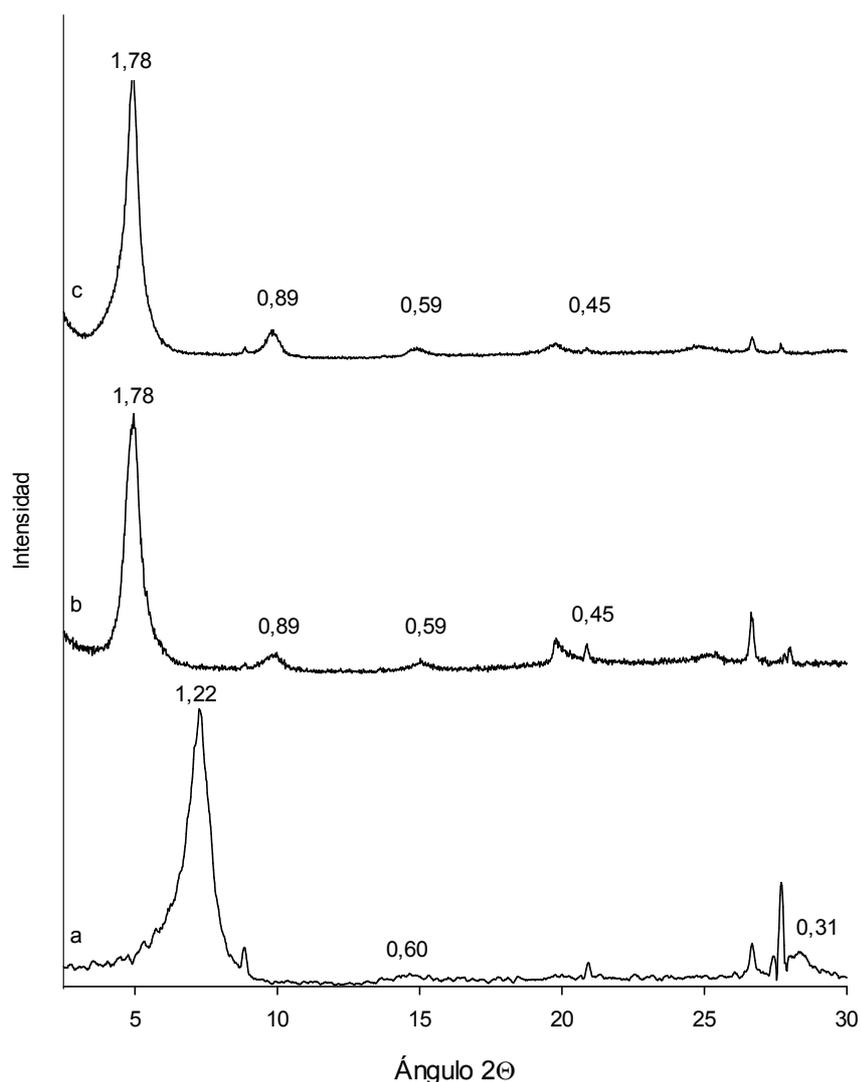


Figura 4.4. Difractogramas de Rayos X de los complejos B048/Swy-2: a) SWy-2; b) B048/Swy-2: $0,5 \text{ g L}^{-1}$, c) B048/SWy-2: 10 g L^{-1}

Asimismo, en la Figura 4.5 se muestran los difractogramas correspondientes al complejo B266/SWy-2. En este caso el espaciado basal de 1,22 nm de la arcilla también aumenta hasta 1,76 nm para todas las cargas de surfactante empleadas: 0,61 mmol g⁻¹ (<CCC), 0,82 mmol g⁻¹ (similar a la CCC) y 1,19 mmol g⁻¹ (> CCC) (correspondientes a los puntos de adsorción de concentración inicial de surfactante de 0,8, 1,0 y 14 g L⁻¹). Se observan también otras difracciones correspondientes a varios órdenes $d(00l)$ de dicho espaciado interlaminar (0,88, 0,59, 0,45, 0,35 nm).

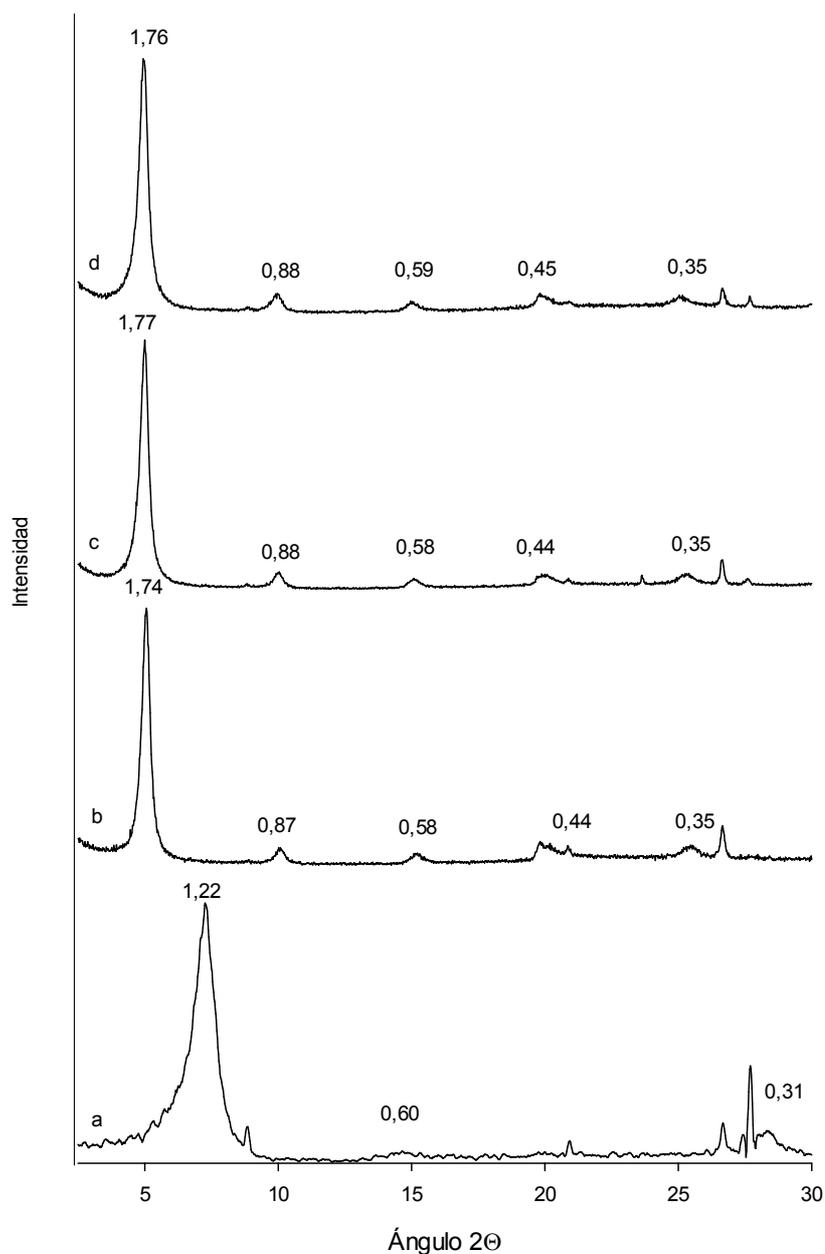


Figura 4.5. Difractogramas de Rayos X de los complejos B266/SWy-2: a) Swy-2, b) B266/Swy-2: 0,8 g L⁻¹, c) B266/SWy-2: 1 g L⁻¹, d) B266/SWy-2: 14 g L⁻¹

En ambos casos la adsorción de dichos surfactantes no iónicos provoca una intercalación de los mismos en el espacio interlaminar de la montmorillonita, indicando que ha habido interacción con dicha superficie (Pereira y col., 2012). La expansión observada para ambos surfactantes es similar a la expansión conseguida con glicerol (Deng y col., 2003) donde solo una bicapa de moléculas de glicerol daban lugar a un espaciado basal $d(001)$ de la montmorillonita de aproximadamente 1,8 nm. Por ello los complejos B048/SWy-2 y B266/SWy-2 también se asocian con una bicapa formada por monómeros de surfactante en paralelo al plano basal de la arcilla. Los órdenes de difracción superiores que se observan en los difractogramas de ambos complejos sugieren una regularidad de los surfactantes en el espacio interlaminar de la arcilla. El hecho de que el espaciado $d(001)$ no aumente a pesar de aumentar la cantidad adsorbida indica que los surfactantes no desarrollan una estructura micelar en el espacio interlaminar de la montmorillonita, y además implica que estos surfactantes no se orientan verticalmente o de forma inclinada con respecto a las láminas del silicato.

Pero la interacción entre surfactante y montmorillonita puede que no se restrinja solo al espacio interlaminar de la misma, sino que también pueden estar adsorbidos sobre su superficie externa debido a interacciones hidrofóbicas entre las cadenas alifáticas de los surfactantes ya adsorbidos, y cuyos segmentos hidrofóbicos tenderán a situarse hacia afuera de los láminas del silicato alejándose de las moléculas de hidratación que permanezcan en el espacio interlaminar. Esta puede ser la razón de que se consiga una adsorción del surfactante B266 por encima de la CCC de la arcilla. El hecho de que la parte hidrofóbica de los surfactantes se extienda hacia los bordes de las láminas de arcilla alejándose de la zona interlaminar hidratada provocará que se incremente la hidrofobicidad de la superficie del mineral.

Asimismo, los difractogramas correspondientes al complejo ET15/SWy-2 se muestran en la Figura 4.6. El espaciado interlaminar de la arcilla aumenta hasta 1,44 nm (Figura 4.6.b) cuando la cantidad de surfactante adsorbida fue 0,5 mmol g⁻¹ (< CCC y correspondiente al punto de adsorción de concentración inicial 0,1 g L⁻¹). Se observan el tercer y cuarto órdenes superiores a 0,48 y 0,36 nm aunque no bien definidos. Este espaciado basal podría corresponder a la adsorción en la interlámina de una monocapa de moléculas de ET15 situadas de forma paralela a las láminas del silicato. Cuando la cantidad adsorbida fue similar a la CCC (0,84 mmol g⁻¹, correspondiente al punto de adsorción de concentración inicial 0,6 g L⁻¹), el espaciado interlaminar aumentó hasta 1,72 nm (Figura 4.6.c), apareciendo también sus correspondientes órdenes superiores (0,87, 0,58, 0,43 Y 0,35 nm) aunque no bien definidos.

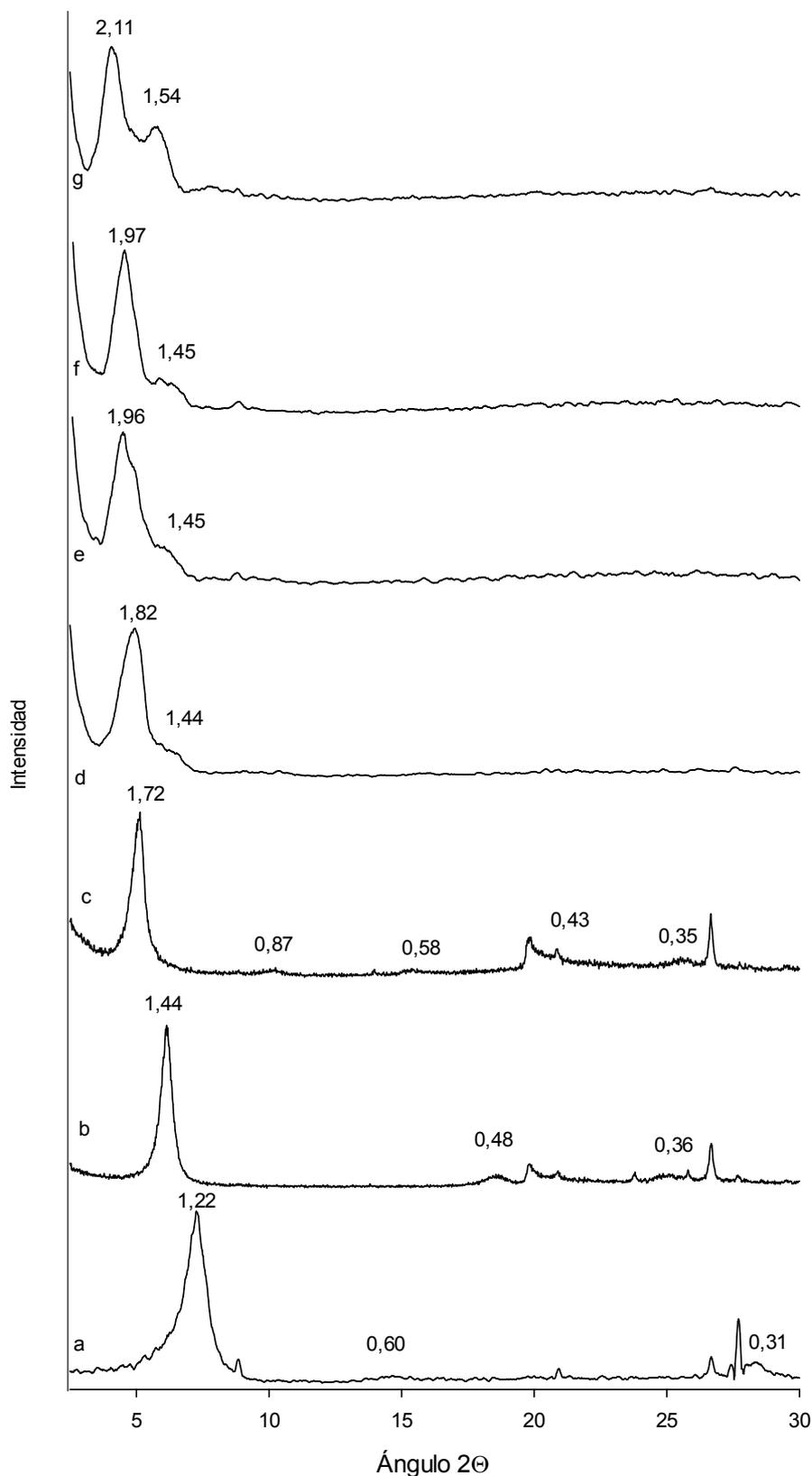


Figura 4.6. Difractogramas de Rayos X del complejo ET15/SWy-2: a) SWy-2; b) ET15/Swy-2: 0,1 g L⁻¹, c) ET15/SWy-2: 0,6 g L⁻¹, d) ET15/SWy-2: 1 g L⁻¹, e) ET15/SWy-2: 3 g L⁻¹, f) ET15/SWy-2: 5 g L⁻¹, g) ET15/SWy-2: 10 g L⁻¹

En este caso el espaciado se correspondería con una bicapa de moléculas del surfactante. Al seguir aumentando la concentración de surfactante adsorbido a 1,11 mmol g⁻¹ (>CCC pero todavía sin haberse alcanzado el plateau, y correspondiente al punto de adsorción de concentración inicial de surfactante de 1 g L⁻¹) el espaciado basal incrementó hasta los 1,82 nm (Figura 4.6.d), pero aparece ensanchado y con un hombro que se observa sobre 1,44 nm, lo que parece indicar que la disposición de las moléculas de ET15 parece estar modificándose, y ello se confirma al estudiar los DRXs correspondientes a concentraciones adsorbidas que ya sí se encuentran en el plateau de adsorción (correspondientes a los puntos de adsorción de concentración inicial de surfactante 5, 5 y 10 g L⁻¹). Bajo estas condiciones de adsorción el espaciado basal experimenta un gran aumento, llegándose a alcanzar los 2,11 nm (Figura 4.6.g), que se podría corresponder con una disposición pseudotrimolecular de las moléculas de surfactante, aunque también estaría de acuerdo con una disposición tipo parafina (Mermut y Lagaly, 2001). Además aparece otra difracción a 1,54 nm que podría deberse de nuevo a una disposición de monocapa de las moléculas de ET15 en ciertas láminas de la montmorillonita SWy-2 que tengan una menor carga (la heterogeneidad de cargas en la montmorillonita SWy-2 ha sido demostrada entre otros por Ammar y col., 2014), y que se encontrarían colapsadas impidiendo adsorción de nuevas moléculas de surfactante. Esta fracción sería muy minoritaria.

Otra razón podría ser que al estar tratando la arcilla con una cantidad tan alta de surfactante, la adsorción más rápida tiene lugar en las partes más externas de las láminas, llegando a ser su disposición de tipo parafínico, haciendo más difícil la difusión de nuevas moléculas de surfactante hacia las zonas más profundas de las láminas, y quedando por tanto en ellas una pequeña cantidad de las mismas que se disponen como monocapas de forma paralela a la lámina.

Espectroscopía de absorción FT-IR. Las medidas obtenidas mediante espectroscopía de infrarrojos pueden proveer información sobre las interacciones moleculares que están teniendo lugar en los sistemas surfactante-arcilla. Se caracterizaron tanto, la arcilla y los surfactantes, así como los diferentes complejos surfactante/arcilla obtenidos a tres concentraciones de surfactante: por encima y por debajo de la CCC e igual a la CCC de la montmorillonita (tomadas de la isoterma de adsorción). En las Figuras 4.7-4.9, se muestran los espectros de la arcilla (SWy-2), y los diferentes complejos surfactante/arcilla así como los surfactantes por separado.

Las bandas de absorción en el espectro de infrarrojos de la montmorillonita (Figura 4.7.a) se asignan de la siguiente manera: la banda a 3629 cm⁻¹ se debe a la vibración de tensión de los grupos OH coordinados con los cationes octaédricos, principalmente los cationes Al³⁺. Las

bandas a 3427 y 1640 cm^{-1} corresponden a las vibraciones de tensión y flexión respectivamente del agua de la región interlaminar. Por otro lado, las vibraciones Si-O-Si produjeron las bandas a 1116 y 1044 cm^{-1} , fuera y dentro del plano respectivamente (Ezquerro y col., 2015). A bajas frecuencias se encuentran bastantes señales asociadas a modos de vibración de flexión de metales minoritarios como Mg e Fe: 914 cm^{-1} (AlAlOH) y 881 cm^{-1} (AlFeOH) (Frost y Rintoul, 1996).

En las Figuras 4.7 y 4.8 se representan los espectros de infrarrojos de los complejos formados por los surfactantes no iónicos (B048/SWy-2 y B266/SWy-2), que al igual que en el caso anterior se analizaron a diferentes cargas de surfactante en la arcilla, así como los surfactantes en solitario. En este caso concreto al ser surfactantes no iónicos de la misma familia (Beroles) se esperan interacciones del mismo tipo, por lo que se hará un análisis conjunto de los mismos.

En el espectro de los surfactantes en solitario, B266 y B048 (Figura 4.7 y 4.8 b) las bandas a 3500-3000 cm^{-1} y alrededor de 1640 cm^{-1} se asocian a las vibraciones de tensión y flexión del -OH del agua de hidratación de las moléculas de surfactante (del Hoyo y col., 2008). Las bandas que aparecen entre 3000 y 2800 cm^{-1} se asocian a la vibración de tensión de los enlaces C-H de los grupos -CH₂, y sus correspondientes vibraciones de flexión a 1461 cm^{-1} en el espectro de B266 y 1463 cm^{-1} en el de B048. Asimismo se observa una banda a 1350 cm^{-1} en B266 y 1352 cm^{-1} en B048 correspondiente a la vibración de flexión simétrica de aleteo (wagging) fuera del plano y sobre 1290- 1300 cm^{-1} correspondientes a vibraciones de torsión (twisting) de dichos grupos CH₂. Por otra parte, también se observa una banda ancha a 1120 cm^{-1} en B266 y a 1119 cm^{-1} en B048 que resulta de la unión de varias bandas relacionadas con vibraciones de tensión de los enlaces C-O-C de los grupos de óxido de etileno (EO) (Deng y col., 2006).

Los espectros de los complejos SWy-2-surfactante (Figuras 4.7.c-e y 4.8.c-d) muestran cambios en algunas bandas asociados a la interacción entre ambos. Los cambios más importantes se observan en las bandas correspondientes al agua de hidratación de la arcilla. Aunque gran parte del agua permanece en el espacio interlaminar, sí se observa una disminución en la frecuencia de vibración de la banda a 3427 cm^{-1} de la arcilla. En el caso del surfactante B266 (Fig. 4.7.c-e) esta disminuye hasta los 3415 cm^{-1} cuando la cantidad adsorbida era < CCC, volvió a disminuir su frecuencia hasta los 3376 cm^{-1} cuando lo adsorbido era similar a la CCC, y se mantuvo a 3370 cm^{-1} para cargas > CCC.

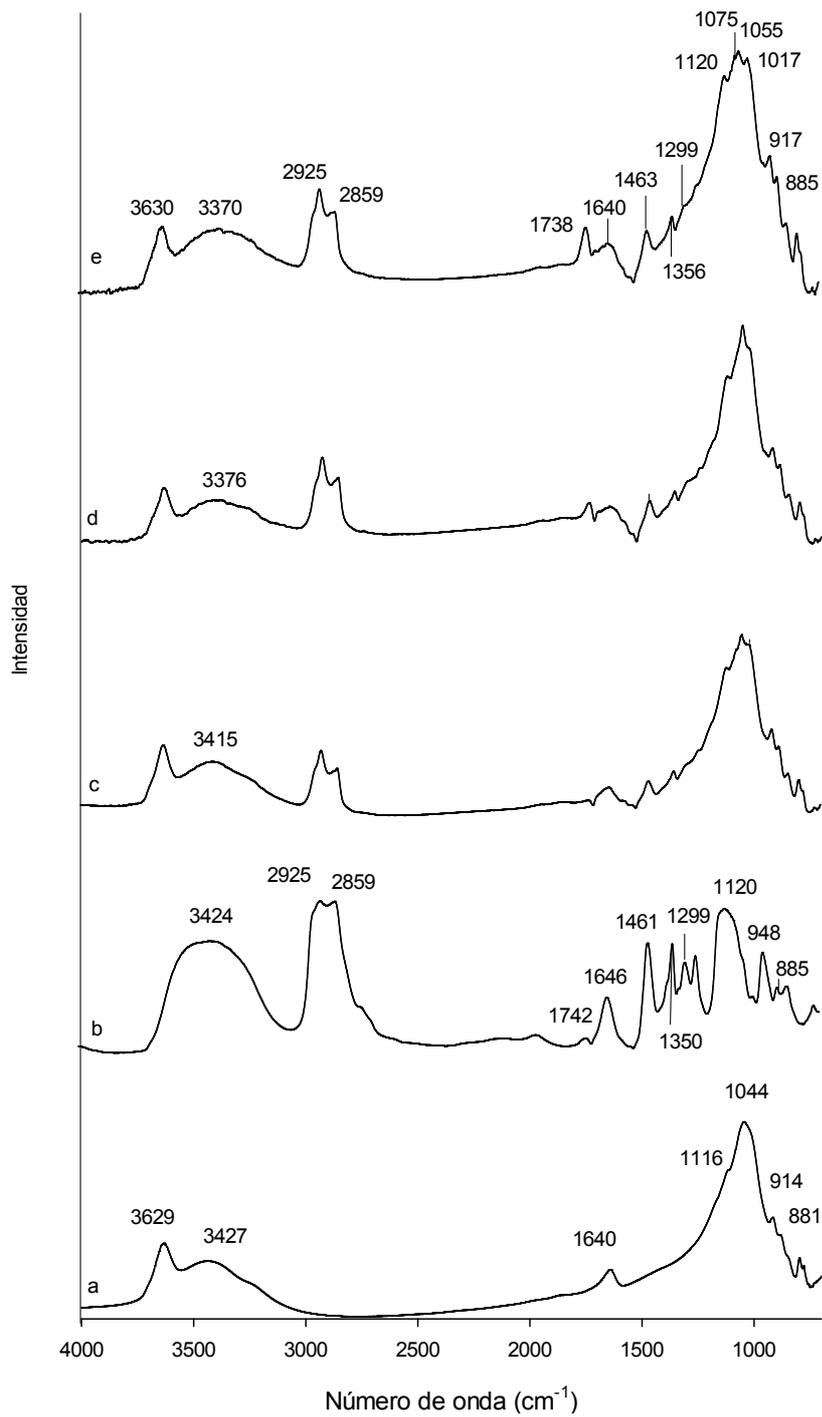


Figura 4.7. Espectro de absorción por FT-IR del complejo los complejos B266/SWy-2: a) Swy-2, b) B266, c) B266/SWy-2: 0,8 g L⁻¹, d) B266/SWy-2: 1 g L⁻¹, e) B266/SWy-2: 14 g L⁻¹

Ello indica claramente que el surfactante se introduce en el espacio interlamilar de la arcilla, tal como se demostró mediante difracción de rayos X con un aumento del espaciado basal desde 1,22 nm hasta 1,76, no desplazando completamente al agua de hidratación de los cationes inorgánicos pero sí obligándola a que sus moléculas se reordenen de una manera diferente, probablemente debido a que están participando en la interacción entre el surfactante y los cationes interlaminares a través de enlaces de H con las moléculas de agua que forman la esfera de hidratación de dichos cationes. La interacción a través de las moléculas de agua es más fuerte cuanto mayor es la carga del surfactante, y por ello el enlace O-H vibra a menores frecuencias.

B048/SWy-2. Además siguen observándose otras bandas de los surfactantes B266 y B048 que fueron anteriormente asignadas: sobre 1463 , 1356 y 1299 cm^{-1} . En el complejo de SWy-2 con B048 se observa además que las bandas correspondientes a vibraciones de tensión de los enlaces CH_2 que aparecen en el espectro del surfactante puro a 2952 y 2877 cm^{-1} , se resuelven en tres bandas mejor definidas tras complejarse con la arcilla: 2955, 2926 y 2877 cm^{-1} . Ello se interpreta como diferentes grados de interacción de los grupos CH_2 con la superficie de la arcilla (Aranda y Ruiz-Hitzky, 1992). Todo ello indica que estos surfactantes no-iónicos se encuentran adsorbidos en el espacio interlamilar del mineral de la arcilla.

En el caso del surfactante B048 (Fig. 4.8.c-d) la banda de tensión del agua interlamilar disminuye hasta los 3376 cm^{-1} cuando la cantidad adsorbida era $< \text{CCC}$, y prácticamente se mantiene (3385 cm^{-1}) cuando lo adsorbido era similar a la CCC (con B048 no pudieron obtenerse cargas del surfactante $> \text{CCC}$). La banda ancha a 1120 cm^{-1} que se observa en B266 y a 1119 cm^{-1} en B048 correspondiente a los grupos etoxilos podría verse alterada tras la adsorción en la montmorillonita si los átomos de oxígeno estuvieran envueltos en enlaces con la superficie de la arcilla. El problema es que aparece en la misma zona que la banda ancha de la montmorillonita correspondiente a la vibración de los enlaces Si-O-Si, quedando prácticamente solapada por esta última. Sin embargo, en el complejo se observa la banda a 1120 cm^{-1} sobre la banda ancha de la montmorillonita (que se ha desplazado hasta los 1055 cm^{-1}), y además aparecen otras bandas a menores frecuencias (1075 y 1017 cm^{-1}) que, de acuerdo con Deng y col. (2006), pueden ser atribuidas al surfactante adsorbido, indicando que los enlaces C-O están debilitados como consecuencia de dicha interacción. Bandas similares se observan también en el complejo

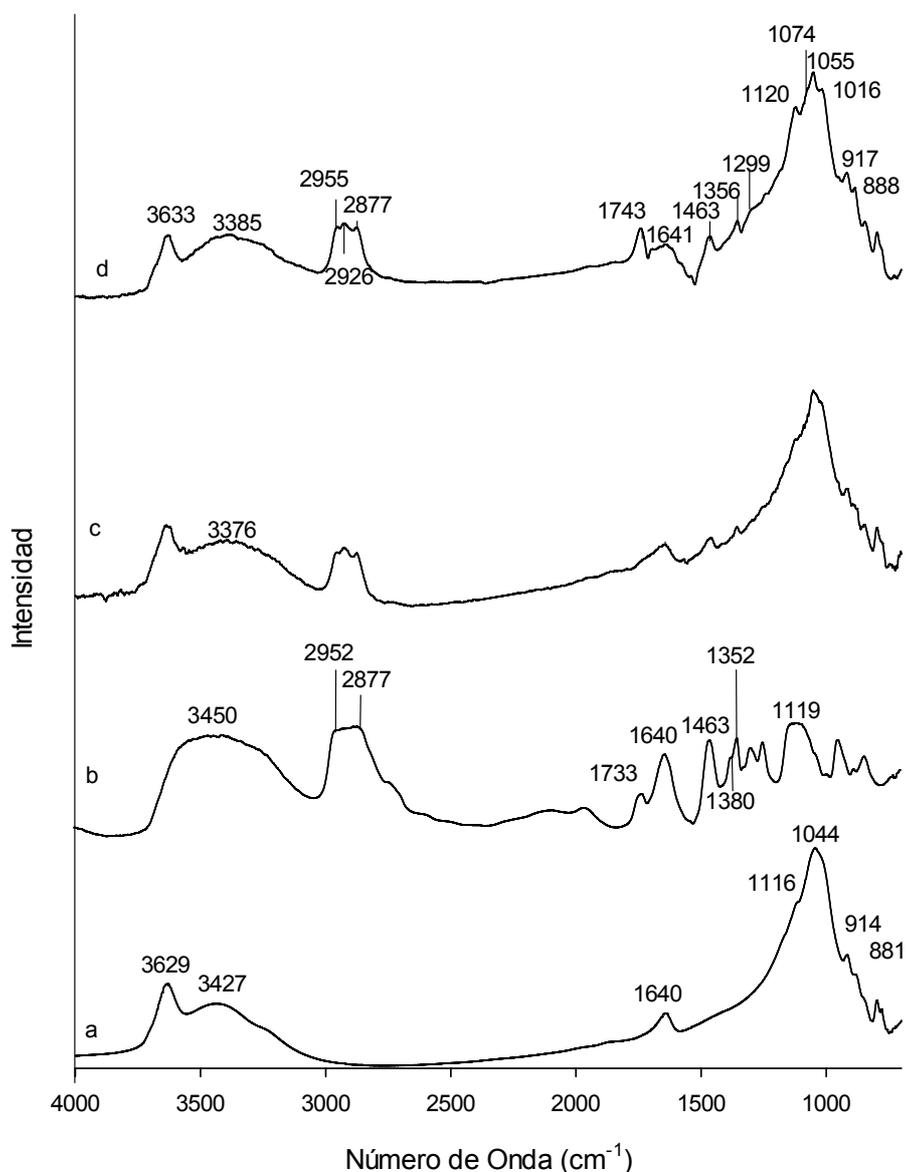


Figura 4.8. Espectro de absorción por FT-IR del complejo los complejos B048/Swy-2: a) Swy-2, b) B048, c) B048/Swy-2: 0,5 g L⁻¹, d) B048/Swy-2: 10 g L⁻¹

En el espectro FTIR del surfactante ET15 (Figura 4.9.b) se observan las bandas a 2924 y 2849 cm⁻¹ correspondientes a las vibraciones de tensión simétrica y asimétrica, respectivamente, de los enlaces C-H de los grupos -CH₂; la de flexión simétrica de los grupos -CH₂ a 1463 cm⁻¹; y por último, a 1355 cm⁻¹ la de flexión simétrica de aleteo de los grupos CH₂. Asimismo se observa una banda ancha que presenta 2 máximos a 1121 y 1069 cm⁻¹ pero que es el resultado de la unión de varias bandas relacionadas con vibraciones de tensión de los enlaces C-O-C de los grupos EO.

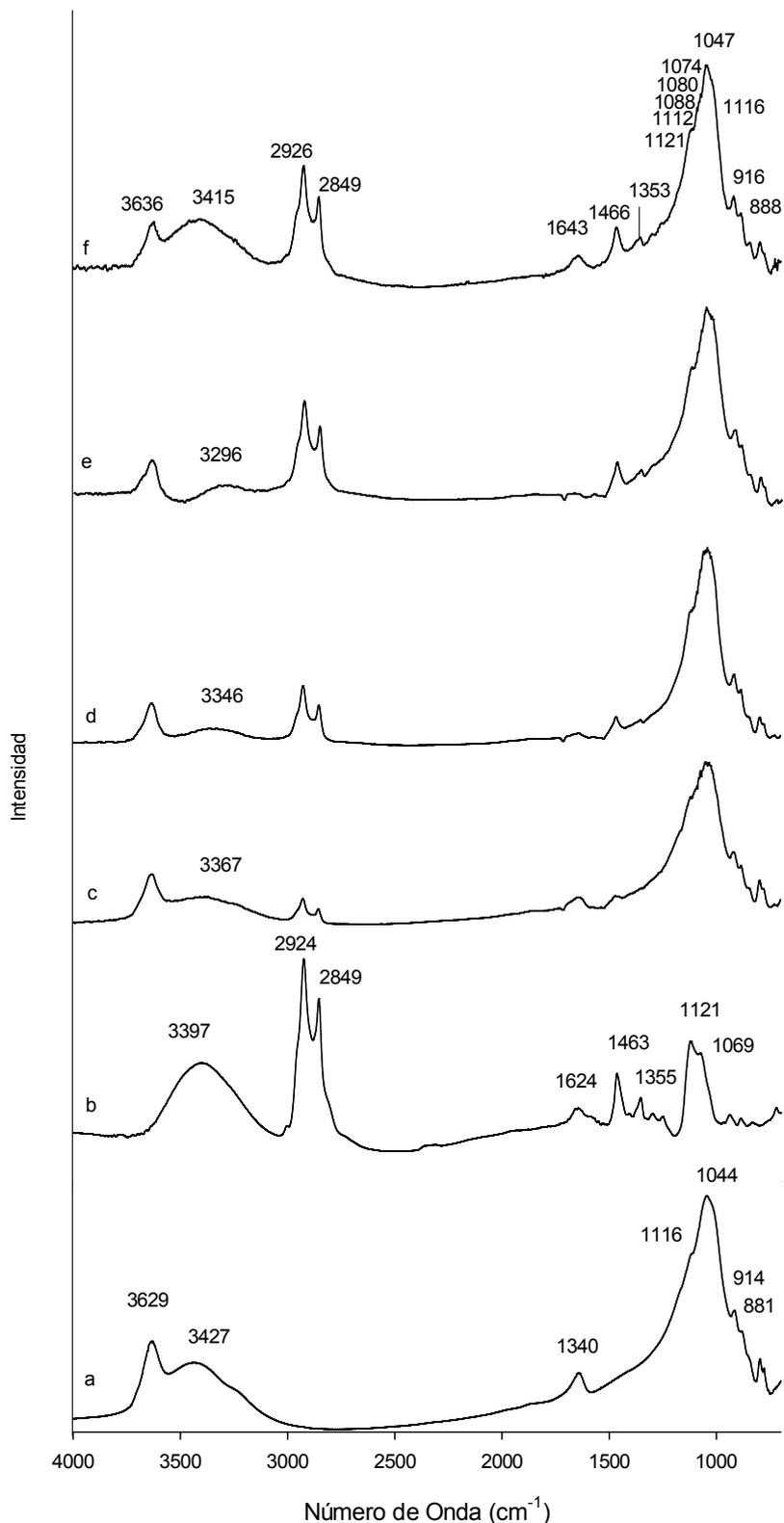


Figura 4.9. Espectros de absorción por FT-IR de los complejos ET15/Swy-2: a) Swy-2, b) ET15, c) ET15/Swy-2: 0,1 g L⁻¹, d) ET15/SWy-2: 0,6 g L⁻¹, e) ET15/SWy-2: 1 g L⁻¹, f) ET15/SWy-2: 10 g L⁻¹

En los espectros del complejo formado por ET15/SWy-2 para las distintas cargas de surfactante se observa de nuevo la disminución en la frecuencia de las bandas del agua de hidratación interlaminar, pero en este caso además su intensidad se va reduciendo a medida que aumenta la concentración de surfactante. La banda a 3427 se desplaza hasta 3267 cm^{-1} , 3346 y 3296 cm^{-1} al aumentar la carga del mismo hasta 0,5, 0,84 y 1,11 mol kg^{-1} , respectivamente (Figuras 4.9. c,d,e). Sin embargo, cuando la carga era de 2,77 mol kg^{-1} , que se alcanza en la zona del plateau (Figura 4.9.f), la cantidad de agua vuelve a aumentar en el espacio interlaminar, observándose no solo un aumento en el número de onda hasta los 3415 cm^{-1} y una mayor intensidad de esta banda y de la correspondiente banda de flexión a 1643 cm^{-1} .

Esta observación indica que el agua interlaminar de hidratación inicialmente contenida en la arcilla va siendo reducida en la organoarcilla, perdiéndose tanto más cuanto mayor es la cantidad de surfactante adsorbido, sobre todo cuando las moléculas de surfactante se disponen en forma de bicapa dando lugar a un espaciado de 1,72 nm. Debido a ello, las moléculas que permanecen están fuertemente implicadas en interacciones por puentes de agua con la cabeza polar del surfactante o interacciones ión-dipolo con los cationes inorgánicos interlaminares todavía presentes, ya que conforme se pierde la esfera de hidratación más externa de los mismos las moléculas de agua que permanecen se encuentran cada vez más directamente coordinadas al catión, y por tanto se encuentran distorsionadas formando dipolos que dan lugar a un desplazamiento de dicha banda hacia menores números de onda (Morillo y col., 1991). Es decir, en el caso de ET15, la entrada del surfactante en el espacio interlaminar adoptando una disposición en bicapa sí que ha dado lugar al desplazamiento de gran cantidad de agua de hidratación. Sin embargo, cuando la cantidad de ET15 adsorbida es aún mayor y se alcanza un espaciado de 2,11 nm y una conformación tipo parafina, vuelve a haber gran cantidad de agua en el espacio interlaminar.

Con respecto a las bandas del surfactante, se observa que la banda ancha en el ET15 puro que presentaba 2 máximos a 1121 y 1069 cm^{-1} (provenía de la unión de varias bandas relacionadas con vibraciones de tensión de los enlaces C-O-C de los grupos EO) tras adsorberse sobre la arcilla se observa claramente la aparición de varias bandas: 1120, 1112, 1089, 1080, 1074 y 1116 cm^{-1} , lo que de acuerdo con Deng y col. (2006) era indicativo de que la vibración de tensión de los enlaces C-O-C están siendo afectadas como consecuencia de la interacción de los grupos etoxilos con la superficie de la montmorillonita. Todas estas evidencias confirman la interacción entre los surfactantes usados para la elaboración de FLCs y el mineral de arcilla

montmorillonita, y que fue anteriormente observada en los resultados obtenidos a partir de las isotermas de adsorción y difracción de rayos X.

4.2.3. Adsorción de los herbicidas en montmorillonita

Se estudió el comportamiento de los diferentes sistemas Herbicida/arcilla mediante las isotermas de adsorción. En la Figura 4.10, se representan las isotermas de adsorción de los diferentes herbicidas objeto de estudio en montmorillonita.

En el herbicida Mesotriona se observa una isoterma de tipo L, lo que indica una afinidad alta entre la arcilla y el herbicida. Debido al carácter iónico de Mesotriona podemos decir que la adsorción en la arcilla puede darse por medio de diferentes mecanismos de adsorción en las posiciones de borde de la arcilla donde se sitúan los grupos -HO, la adsorción en la arcilla no estará favorecida a pesar de estar el herbicida ionizado en medio acuoso, ya que al tener la misma carga que la montmorillonita existe un efecto de repulsiones electrostática entre el herbicida y la arcilla. Las isotermas de Flufenacet y Metribuzina muestran mayor afinidad que el herbicida Mesotriona en la arcilla debido a su carácter hidrófobo, el tipo de interacciones responsables serían no electrostáticas como puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Wals o London.

4.2.4. Solubilidad de Herbicidas en los surfactantes comerciales

En la Figura 4.11 se representan los diagramas de solubilidad de los tres herbicidas en los surfactantes B048, B266 y ET15. La mejora de la solubilidad de los herbicidas está muy influenciada por las propiedades moleculares de los surfactantes (Tabla 4.4). Para una concentración de 50 mM la solubilidad de MS fue incrementada del orden de 37 veces para ET15 (Figura 4.11.a) esto puede ser debido a que la solubilización entre MS y ET15 ocurre mediante interacciones electrostáticas ya que el herbicida es un ácido débil ($pK_a = 3,12$) que permaneció como anión a pH de equilibrio (5,4) mientras que las moléculas de ET15 estaban protonadas ($pK_a = 8,5$). No ocurrió lo mismo para los surfactantes no iónicos, llegándose a solubilizar 0,8 mM para B266 y 1,1 mM para B048.

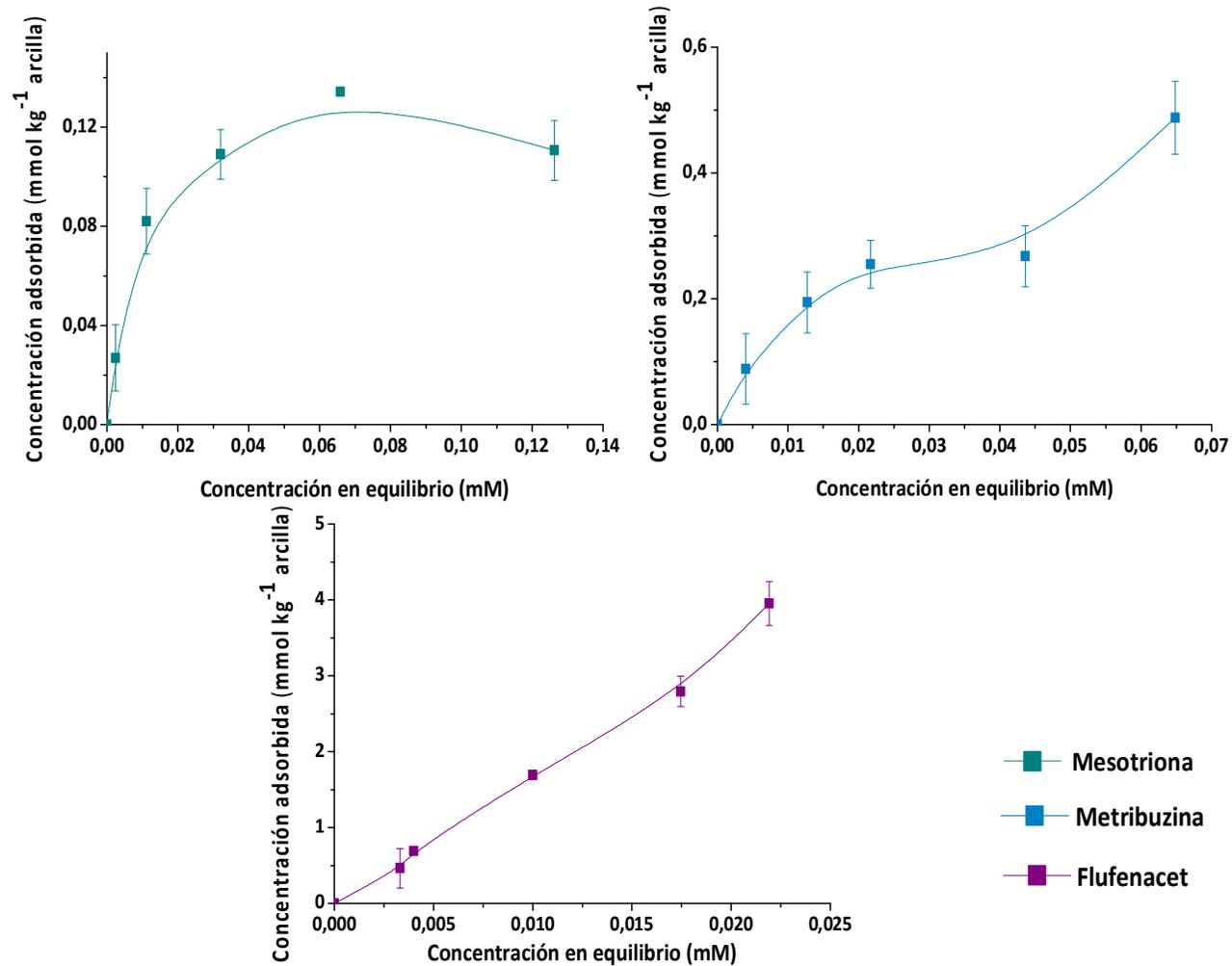


Figura 4.10. Isothermas de adsorción de los diferentes herbicidas Mesotriona, Metribuzina y Flufenacet a diferentes concentraciones en montmorillonita ($1,6 \text{ g L}^{-1}$)

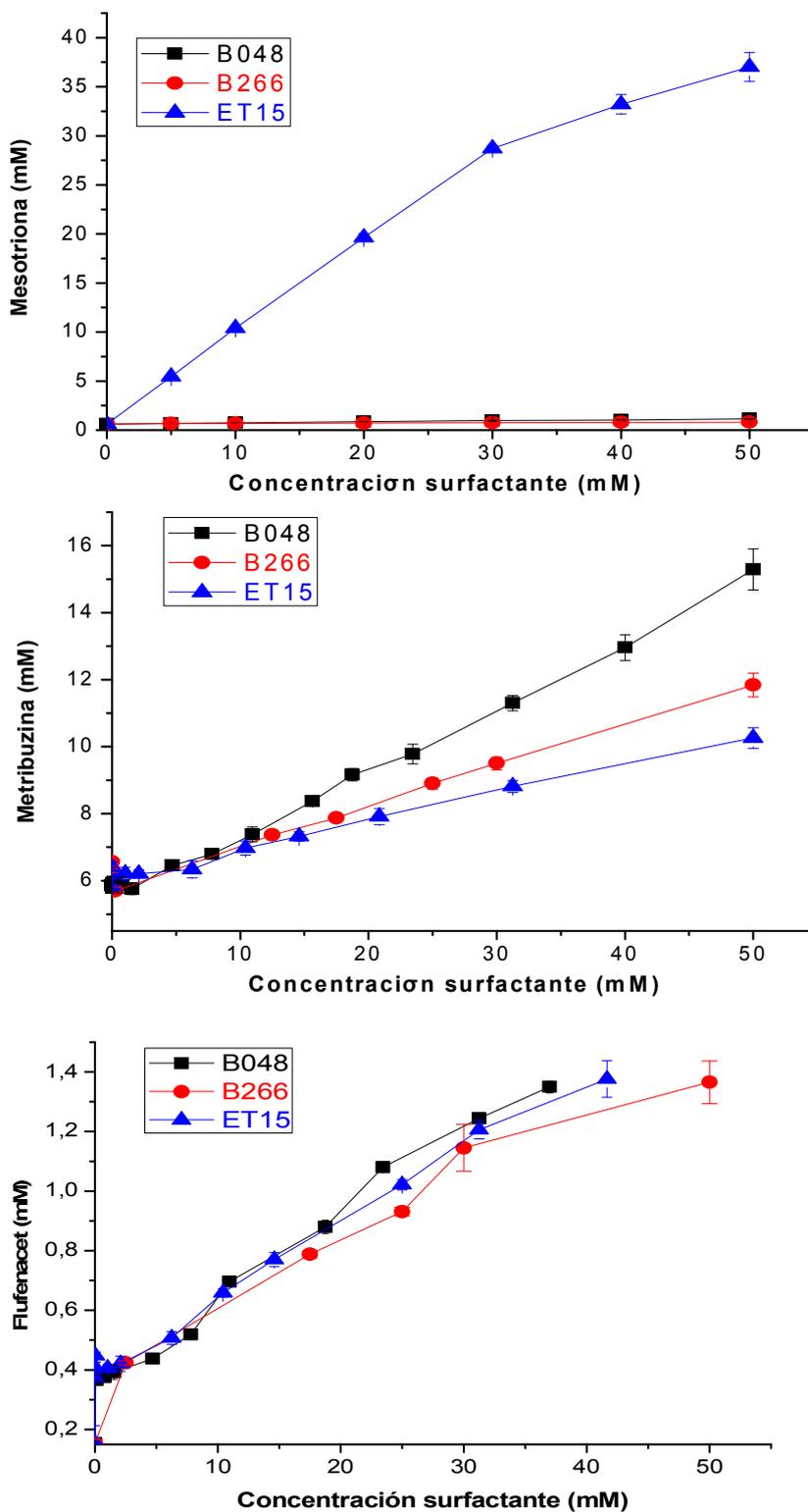


Figura 4.11. Diagramas de solubilidad de los sistemas surfactante/herbicida usados para la elaboración de FLCs. a) Mesotriona, b) Metribuzina, c) Flufenacet

EL herbicida MZ (Figura 4.11.b) solubiliza mayormente en los surfactantes no iónicos (B048 y B266). Los valores de incremento de solubilidad S_w^*/S_w fueron 2,6, 2,00 y 1,80 (Tabla 4.6) para B048, B266 y ET15 respectivamente, los bajos valores son debidos a la alta solubilidad de MZ en agua. Para FLF la solubilidad en los tres surfactantes fue muy similar viéndose aumentada hasta nueve veces respecto a su solubilidad inicial en agua (56 mg L^{-1}), el mayor incremento en la solubilidad se dio en el surfactante ET15, seguido de B266 y B048.

Tabla 4.6. Eficacia solubilizante (S_w^*/S_w), relación de solubilización molar (MSR) y coeficientes de distribución micela-agua ($\log K_{mc}$)

	Mesotriona			Metribuzina			Flufenacet		
	S_w^*/S_w	MSR	$\log K_{mc}$	S_w^*/S_w	MSR	$\log K_{mc}$	S_w^*/S_w	MSR	$\log K_{mc}$
B048	1,90	$1,05 \cdot 10^{-2}$	2,95	2,60	$1,88 \cdot 10^{-1}$	3,18	8,07	$1,75 \cdot 10^{-2}$	3,41
B266	1,30	$3,8 \cdot 10^{-3}$	2,60	2,00	$1,21 \cdot 10^{-1}$	3,02	8,86	$1,89 \cdot 10^{-2}$	3,39
ET15	61,7	$7,18 \cdot 10^{-1}$	4,69	1,80	$8,40 \cdot 10^{-2}$	2,84	8,93	$2,33 \cdot 10^{-2}$	3,49

1. Los errores de los parámetros S_w^*/S_w , MSR y $\log K_{mc}$ son $\pm 4\%$, $\pm 5\%$ y $\pm 1.5\%$, respectivamente.

La eficacia solubilizante de un surfactante para un soluto determinado mediante la formación de micelas puede calcularse a través de los valores de MSR. En la Tabla 4.6, se representan los valores de MSR para cada uno de los surfactantes con los herbicidas. Los valores de MSR obtenidos para Metribuzina con el surfactante ET15, B048 y B266 son muy similares. Para B048 y B266, la diferencia en la longitud de la cadena alquílica o el número de unidades de EO no tenían ningún efecto en los valores de MSR. Resultados similares se obtuvieron en la solubilidad de esteroides con alcoholes polioxietilados (Barri y El Eini, 1976) y nitrotoluenos en la serie de surfactantes Tergitol (Luning Prak, 2007). De acuerdo con Tokiwa (1968) y Luning Prak (2011), cuando el surfactante es más polar, más monómeros se unirán para formar las micelas, incrementándose la cantidad de soluto disuelto en las mismas. De acuerdo con esto el número de agregación (Galán-Jiménez y col., 2014) dio valores de 62 y 58 para B048 y B266, respectivamente. Por tanto, para una concentración de surfactante dado, el número de micelas es menor para el tensioactivo (B048) con lo cual, hay una disminución en la cantidad de soluto disuelto por mol de micela (valores de MSR), pero esto, se compensa con la mayor afinidad de las micelas de B266 por el soluto, que permiten que el valor de MSR se mantenga constante.

Debido al carácter hidrófobo de los herbicidas y Flufenacet su mecanismo de interacción dentro de las micelas se da mediante un mecanismo partición. Este mecanismo puede ser estimado comparando la solubilidad de ambas moléculas en las micelas, con la de una fase orgánica, como 1-octanol, debido a su semejanza con la estructura de surfactantes no iónicos (Kile y Chiou, 1989). Los valores de $\log K_{mc}$ fueron muy similares para Flufenacet a los de su valor de $\log K_{ow}$ (3,2) indicando que interacciones de tipo hidrófobas son las responsables de su solubilización y teniendo lugar por tanto su solubilización en el interior de las micelas. Sin embargo, con Metribuzina existe una gran desviación entre los valores de $\log K_{mc}$ con su valor de $\log K_{ow}$ (1,65) indicando que otras interacciones adicionales ocurrían en su solubilización. Así, con otros herbicidas de tipo polar como alacloro, se ha sugerido que se solubilizaba en la capa externa de las micelas (región empalizada) con los grupos polares orientados hacia las cadenas polares de etilénóxido y su parte hidrocarbonada orientada hacia el interior de las micelas (Xiarchos y Doulia, 2006). Undabeytia y col., (2011) propusieron un mecanismo similar en la encapsulación de Metribuzina con liposomas y que también tendría lugar en la solubilización de este herbicida con los beroles. Estos autores mostraron que el herbicida Metribuzina se solubilizaba a través de interacciones hidrofóbicas mediante las cadenas lipídicas, además de puentes de hidrógeno, entre el herbicida y las cabezas de grupos lipídicos.

Al contrario que ocurre con los herbicidas hidrofóbicos Metribuzina y Flufenacet, se obtuvieron valores altos de MSR y de $\log K_{mc}$ para Mesotriona y ET15. Sin embargo, la pendiente de la curva de solubilidad del herbicida Mesotriona cambia a partir de 30 mM de concentración de ET15 (Figura 4.11), indicando que una solubilización adicional del herbicida puede o bien cambiar la concentración micelar crítica (CMC) o bien la forma/tamaño o densidad de carga de las micelas. Probablemente, el incremento de la concentración de Mesotriona en las micelas disminuye en gran medida la densidad de carga positiva que había en un principio, produciéndose una menor afinidad del herbicida por las micelas. El cálculo de MSR tomando solo los puntos de solubilización antes de que se produzca este cambio de pendiente, dio un valor de MSR de $9,27 \cdot 10^{-1}$ con R^2 de 0,999, es decir, aproximadamente un mol del surfactante ET15 solubilizaba un mol de Mesotriona en las micelas.

4.2.5. Preparación de FLC herbicidas-surfactantes comerciales-montmorillonita

Las formulaciones herbicidas requieren la optimización de dos procesos:

- (i) Un aumento de la solubilidad de los herbicidas en las soluciones de tensioactivo.

- (ii) Una alta adsorción de las soluciones de los herbicidas encapsuladas en las moléculas de los surfactantes sobre la arcilla.

La nomenclatura utilizada para las diferentes FLCs (surfactante-herbicida-arcilla) sintetizadas se muestra en la Tabla 4.7, donde los primeros caracteres (2 ó 3) indican el herbicida utilizado en la misma (MS: Mesotriona; MZ: Metribuzina, FLF: Flufenacet.), seguido por los caracteres que indican el surfactante utilizado (B048: Berol 048; B266: Berol 266 y ET15: Ethomeen T/15) y por último la arcilla utilizada en este caso concreto Montmorillonita (SWy). el primer número indica la concentración de surfactante, el segundo la concentración de herbicida y el tercero la concentración de arcilla utilizada.

A partir de los parámetros obtenidos tras la modelización de las isothermas de adsorción, el estudio de la cantidad máxima de herbicida solubilizado por el surfactante y teniendo en cuenta la misma proporción entre el herbicida y el surfactante en solución con la de la arcilla, fueron determinadas las concentraciones de herbicida/arcilla/surfactante que se utilizaron en la preparación de las formulaciones.

La Tabla 4.7 muestra el porcentaje de *i.a.*, tanto calculado como experimental, para las mejores relaciones herbicida/arcilla/surfactante, estimadas a partir del coeficiente de enlace y de los diagramas de solubilidad. Las formulaciones se prepararon para los herbicidas Mesotriona, Metribuzina y Flufenacet. El diseño de formulaciones de Mesotriona con ET15 y Flufenacet con B048 alcanzó elevados contenidos de *i.a.*, >10% aproximadamente, mientras que se obtuvieron contenidos más pequeños para los diseños de Mesotriona con el B048, así como para las formulaciones de Metribuzina. En general, se puede concluir que los herbicidas Mesotriona y Flufenacet pueden ser utilizados de manera óptima para el diseño de formulaciones con varios surfactantes y en distintas proporciones herbicida/arcilla/surfactante, obteniendo altos contenidos de *i.a.*, factor relevante para las aplicaciones agrícolas. En contraste, el herbicida Metribuzina dio lugar a formulaciones con un contenido de *i.a.* muy bajo con todos los surfactantes seleccionados en este estudio, lo que puede estar relacionado con su relativamente alta solubilidad en agua, lo que implica que solo una pequeña fracción del mismo se encuentra en las micelas.

La Tabla 4.7 muestra también la validez de la aproximación usada para la obtención de formulaciones de herbicidas mediante el uso de las curvas de solubilidad y la determinación de los coeficientes de enlace de los surfactantes en la superficie de la arcilla.

Tabla 4.7. Representación de la nomenclatura de las diferentes FLCs y las concentraciones usadas para su elaboración (g L⁻¹) así como los porcentajes de ingrediente activo teórico calculados (Scacchard) y experimental de los herbicidas Mesotriona, Metribuzina y Flufenacet.

Herbicida	Surfactante	Nomenclatura	Conc. (g L ⁻¹)	i.a Teórico (%)	i.a. Experimental (%)	EE (%)
Mesotriona	Berol 048	MS/B048/SWy	0,93/0,1/1	6,1	4,8	78
			3,99/12/10	12,95	13,4	>100
	Ethomeen T/15	MS/ET15/SWy	2,25/7/7	12,65	10,9	86
			3,54/10/10	13,65	10	73
Metribuzina	Berol 048	MZ/B048/SWy	1,45/5/5	8,4	3	36
			1,38/3/3	13,23	2,7	21
	Berol 266	MZ/B266/SWy	1,62/5/5	11,66	3,63	31
			1,68/7/5	9,14	3,1	34
	Ethomeen T/15	MZ/ET15/SWy	1,49/5/5	13,5	4,4	33
			1,35/3/3	19,01	4,04	21
Flufenacet	Berol 048	FLF/B048/SWy-2	0,134/0,1/0,5	13,43	10,86	81
			0,134/0,1/0,1	19,72	17,72	90
	Ethomeen T/15	FLF/ET15/SWy-2	0,175/0,5/0,5	12,20	7,37	60
			0,152/1/0,5	7,34	7,98	>100

Existe muy buen acuerdo entre las cantidades predichas y experimentales para los herbicidas Flufenacet y Mesotriona, lo que facilita el diseño de las formulaciones (objetivo dirigido ahorrando costes y tiempo) e incluso, permitiendo predecir la viabilidad de formulaciones potenciales, es decir, la posibilidad o no de obtener con determinados sistemas surfactante/minerales de arcilla formulaciones con contenido de ingrediente activo alto.

4.2.6. Caracterización de las FLCs herbicidas-surfactantes comerciales-Montmorillonita

Las formulaciones de liberación controlada de los herbicidas MS, MZ y FLF fueron preparadas como se indicó en el capítulo anterior mediante el empleo de varias relaciones herbicida/surfactante/arcilla (Tabla 4.7). Los porcentajes de ingrediente activo (% i.a.) variaron entre 3 y 17,7%. El diseño de FLC con los herbicidas MS y FLF dieron altos porcentajes de i.a., dando los contenidos de i.a. más bajos las formulaciones elaboradas con B048 para Mesotriona (4,8%) y ET15 para Flufenacet (7,37%). En general, se puede decir que MS y FLF son dos herbicidas aptos para la elaboración de FLCs con diferentes surfactantes a diferentes concentraciones herbicida/surfactante/arcilla obteniendo altos contenidos de i.a., factor importante para su aplicación en la agricultura. Por el contrario MZ dio lugar a formulaciones con bajo contenido de i.a. debido a su alta solubilidad en agua lo que implica una baja carga de herbicida en el interior de las micelas. Las formulaciones seleccionadas para ser estudiadas por difracción de Rayos X y espectroscopía de infrarrojos fueron las que poseían un porcentaje mayor de eficacia de encapsulación y alto contenido de ingrediente activo de los herbicidas Mesotriona y Flufenacet.

Difracción de Rayos X (DRX). A partir del método descrito en el apartado 3.2.8 se realizaron espectros de difracción Rayos X de las diferentes FLCs y se compararon con los complejos surfactante/arcilla sin herbicida. En las Figuras 4.12-4.14 se muestran los difractogramas de las formulaciones: MS/ET15 (3,99/12/10), FLF/B048 (0,134/0,1/0,1) y FLF/ET15 (0,152/1/0,5) en las que se observan variaciones entre el difractograma del complejo y el de la formulación. El difractograma correspondiente a la formulación con Metribuzina no se muestra ya que no se observaron cambios entre la FLC y el complejo Swy-2/B048, que el que poseía mayor contenido de i.a. Partiendo de que el espaciado basal de la montmorillonita es de 1,22 nm, en la Figura 4.12.c se muestra el difractograma de la formulación de MS/ET15 (3,99/12/10), que presenta un espaciado de 3,5 nm.

La distribución parafínica de los monómeros de surfactante en el espacio interlaminar de la arcilla que se propuso anteriormente se ve forzada por la entrada de las moléculas de Mesotriona en dicho espacio interlaminar. En el difractograma se puede observar una difracción que corresponde al segundo orden a mayor ángulo a 1,77 nm. Existe un gran aumento del espaciado basal de 1,4 nm con respecto a la difracción a 2,10 del surfactante ET15 adsorbido en la montmorillonita (Figura 4.12.b) debido a la alta adsorción del herbicida que corresponde a 0,4 mmol g⁻¹, o sea, casi la mitad de la CCC de la SWy-2 (0,84 meq g⁻¹). La entrada de estas moléculas tendrá lugar en los huecos que deben existir entre las moléculas apolares del surfactante que son las que se disponen con una conformación parafínica, y entre las que se situaban moléculas de agua. Ello fuerza a que varía la disposición del surfactantes en el espacio interlaminar adoptando un mayor ángulo de inclinación con respecto a las láminas. Probablemente la adsorción del herbicida haya desplazado una parte de las moléculas de agua que estaban situadas en los huecos que se forman entre las cadenas apolares con la disposición tipo parafínica que se ha sugerido.

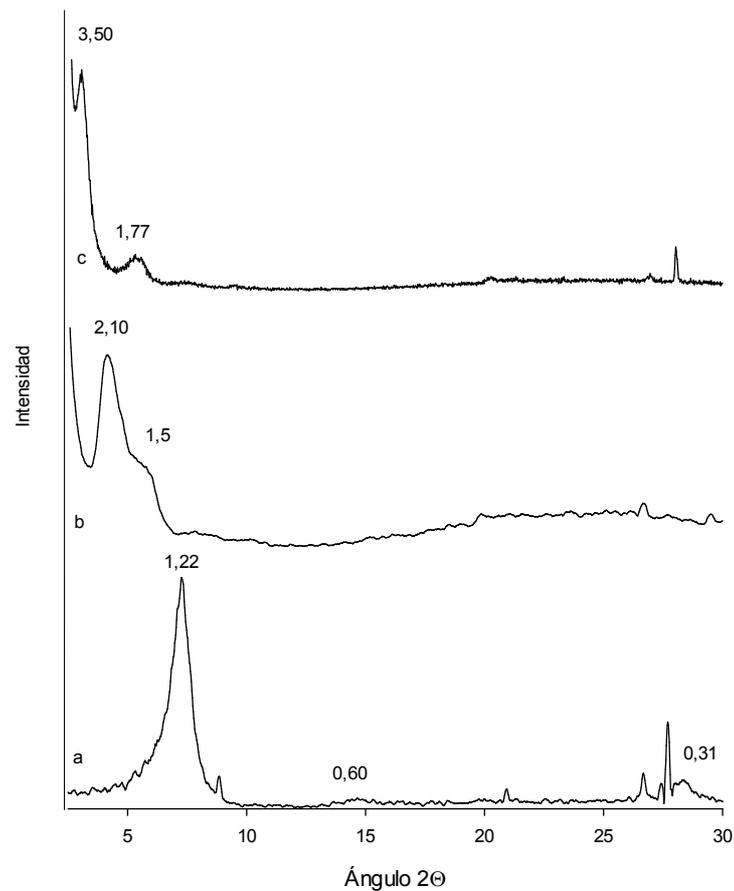


Figura 4.12. Difractogramas de difracción de Rayos X de la FLC MS/ET15; a) SWy-2, b) Complejo ET15/SWy-2; c) Formulación MS/ET15 (3,99/12/10)

En las Figuras 4.13 y 4.14 se muestran los difractogramas de dos FLCs de FLF y sus respectivos complejos surfactante/arcilla sin herbicida. En la Figura 4.13.c, se muestra el difractograma de rayos X de la formulación FLF/B048. En el complejo entre la montmorillonita y el surfactante B048, se obtuvo un espaciado basal de 1,78 nm que se asoció a una bicapa de monómeros B048 adsorbidos en el espacio interlaminar de la arcilla (Figura 4.13.b). En el difractograma de la FLC (Fig. 4.13.c) la difracción a 1,77 nm coincide con la del complejo no habiendo una variación significativa en el espaciado, por lo que el surfactante sigue manteniendo una conformación de bicapa paralela al plano basal aun estando presente el herbicida.

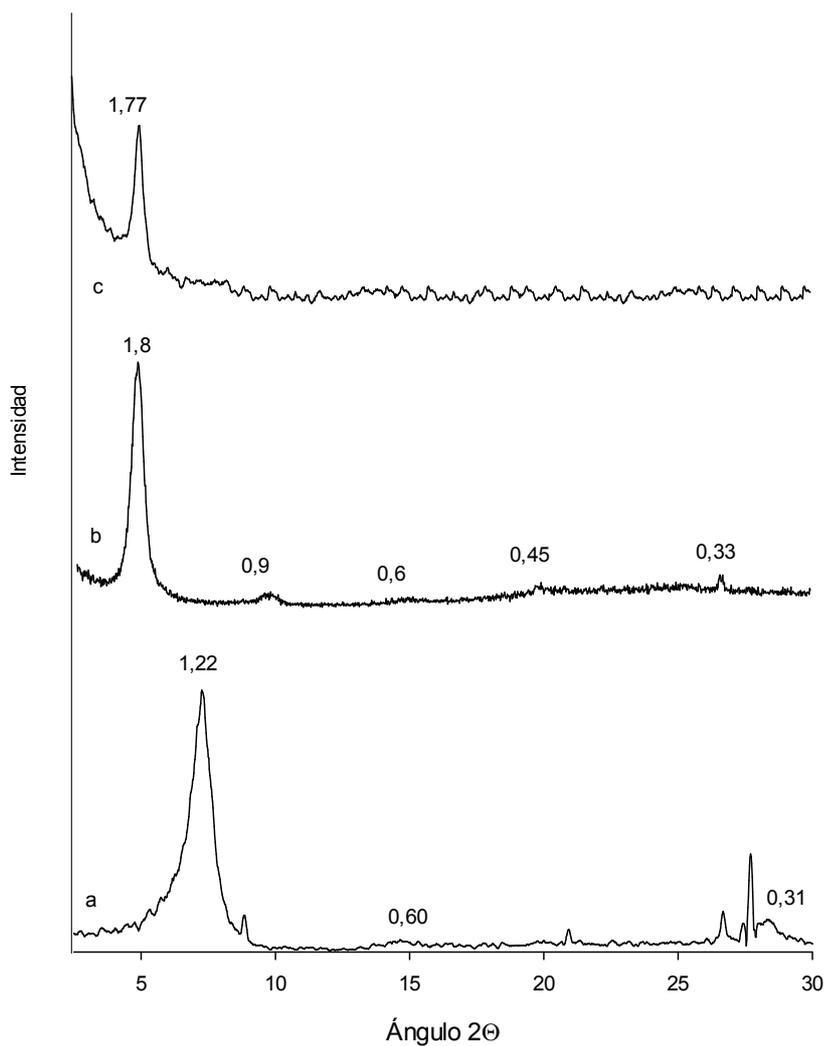


Figura 4.13. Difractogramas de Rayos X de la Formulaciones FLF/B048, así como el complejo Arcilla-B048: a) SWy-2; b) Complejo SWy-2/B048; c) Formulación FLF/B048

En la Figura 4.14, se representan los difractogramas de la FLC FLF/ET15 así como el complejo sin herbicida. En el difractograma de la formulación (Fig. 4.14.c) se observa un desplazamiento de la difracción respecto a la del complejo sin herbicida. La difracción a 1,54 nm tampoco muestra desplazamiento respecto al complejo. En este caso la adsorción de FLF fue de 0,22 mmol g⁻¹, un 26% de la CCC, pero no da lugar a que el espaciado interlamilar aumente, probablemente porque la entrada del herbicida ocupe posiciones en las que desplaza agua de hidratación, pero no se adsorbe una concentración suficiente como para forzar el aumento del espaciado basal.

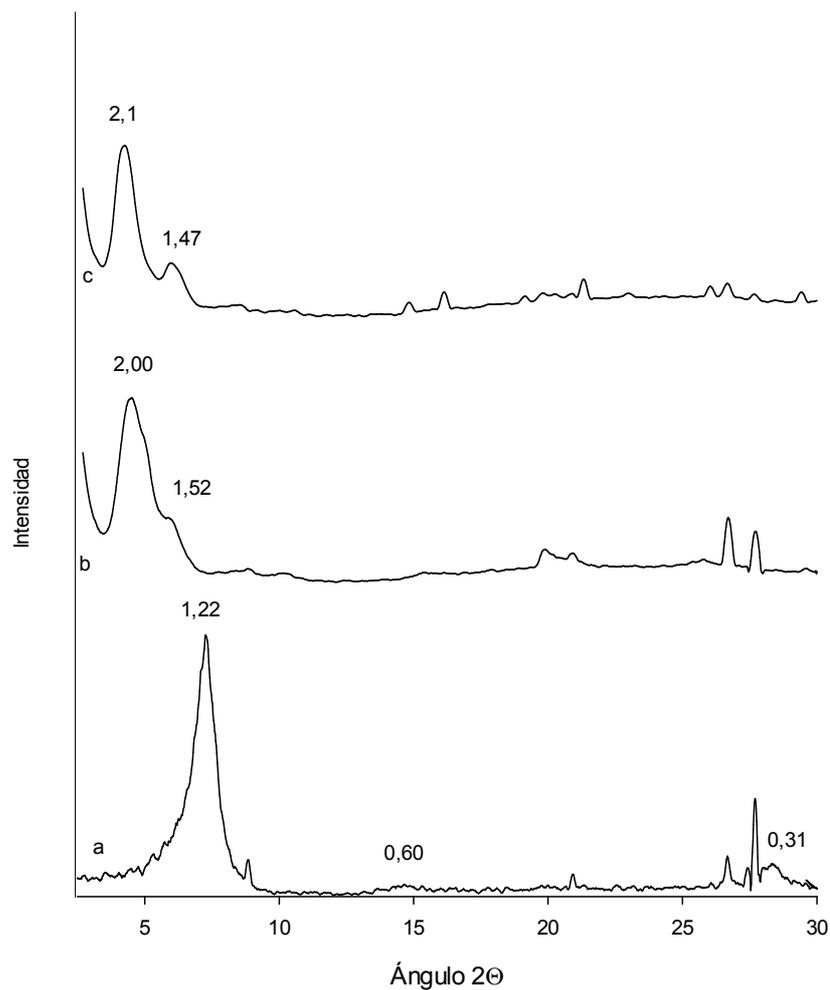


Figura.4.14. Difractogramas de Rayos X de la Formulaciones FLF/ET15 así como el complejo Arcilla-ET15: a) SWy-2; b) Complejo SWy-2/ET15; c) Formulación FLF/ET15

Espectroscopía de absorción FT-IR. Se examinaron las FLC seleccionadas mediante espectroscopía de infrarrojos para dilucidar las interacciones entre los herbicidas y los complejos montmorillonita/surfactante comercial, lo cual puede afectar a la velocidad de liberación del herbicida. Las regiones en el espectro de infrarrojos de la montmorillonita, y los surfactantes (ET15 y B048) y los complejos surfactante/SWy-2 fueron descritas en las Figuras 4.7-4.9.

Las bandas del espectro del complejo SWy-2/ET15 a 2926 y 2854 cm^{-1} fueron descritas al comentar la Figura 4.7. El herbicida Mesotriona puede existir en dos formas tautoméricas, ceto y enol asociadas al anillo de ciclohexanodiona (Figura 4.15). Los grupos carbonilo de una molécula de Mesotriona en la forma ceto interactúan con el grupo -OH de la forma enol de otra molécula herbicida, formando dímeros ceto-enol (Figura 4.16) (Takasuka y col., 1996).

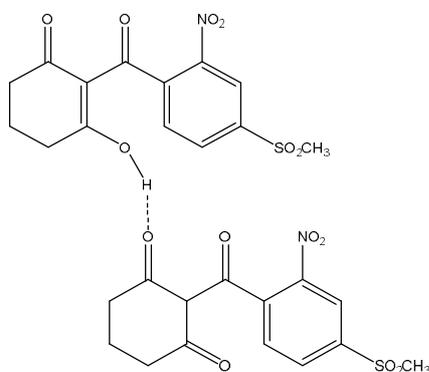


Figura 4.15. Forma tautomérica ceto-enol de la Mesotriona

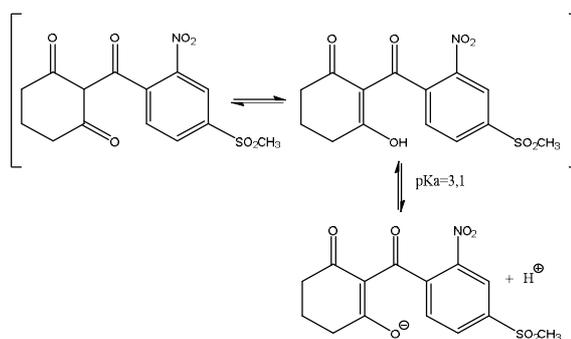


Figura 4.16. Dímero ceto-enol entre las formas tautoméricas del herbicida Mesotriona

En el espectro de infrarrojos de Mesotriona (Figura 4.17.c), las bandas de adsorción a 1601 y 1562 cm^{-1} se asocian a las vibraciones de elongación del hidrógeno unido al grupo carbonilo. Otras bandas de absorción notables se obtuvieron a 1660 cm^{-1} debido a la elongación de grupos carbonilos de cetonas (Rouchaud y col., 2000). También a 1532 cm^{-1} y a 1353 cm^{-1} debido a vibraciones de elongación simétrica y asimétrica de los grupos NO_2 , respectivamente.

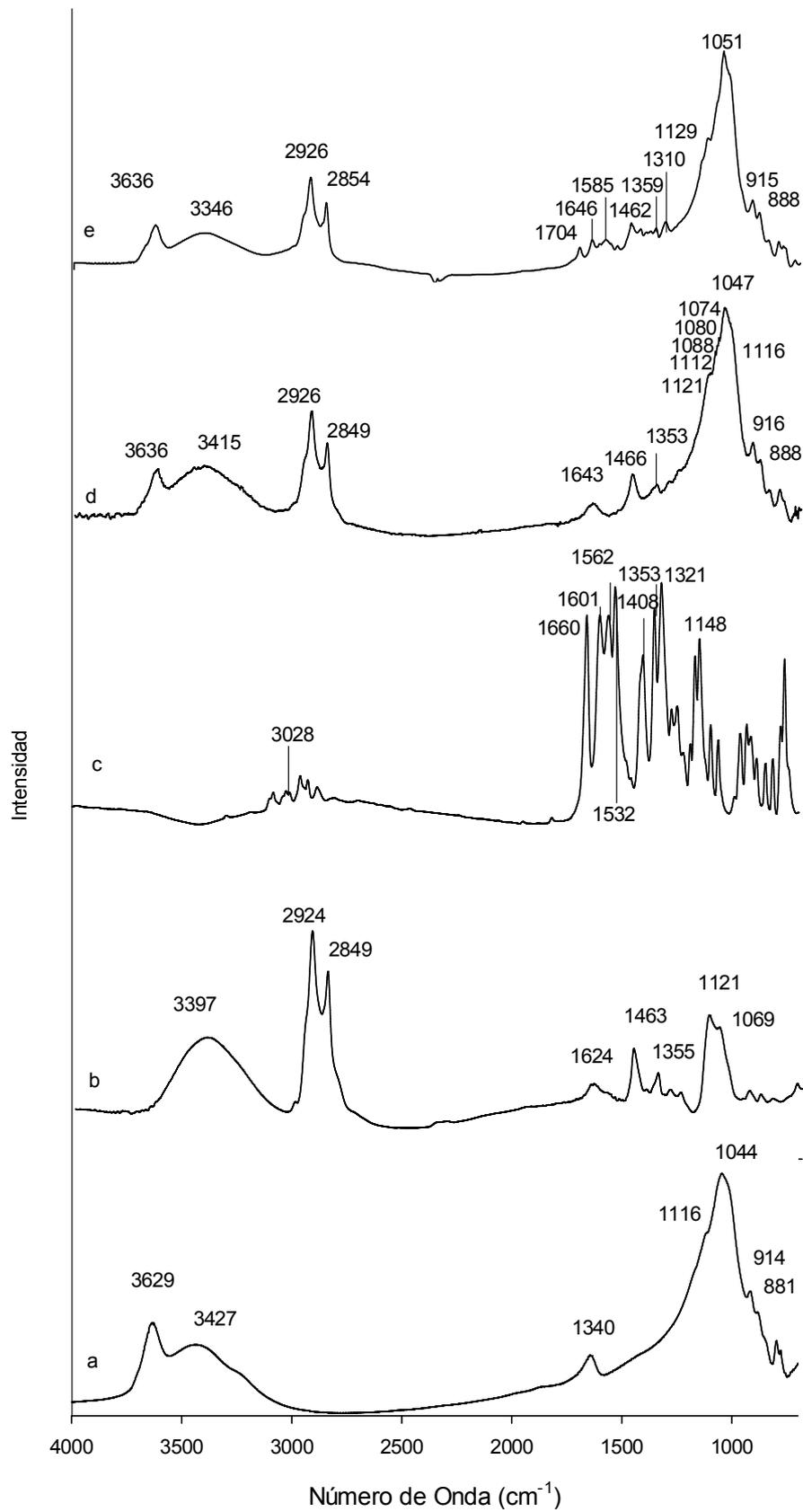


Figura 4.17. Espectros por FTIR de la formulación MS/ET15 3,99/12/10: a) Montmorillonita Swy-2, b) ET15, c) Mesotriona, d) ET15/SWy-2 12/10, d) MS/ET15 3,99/12/10

Por último, se distinguen a 1321 y 1148 cm^{-1} las bandas asociadas a las vibraciones del grupo SO_2 . Después de la incorporación del herbicida Mesotriona en el complejo SWy-2/ET15, es decir, de la formación de la formulación MS/ET15 (3,99/12/10), la característica más relevante fue la aparición de una nueva banda de adsorción a 1704 cm^{-1} y la desaparición de la banda de la de 1660 (Figura 4.17.e) lo que indica que el herbicida en su forma aniónica, enolato, interacciona con los grupos amina protonados de ET15.

Los espectros de infrarrojos de las FLCs del herbicida Flufenacet se muestran en las Figuras 4.18-4.19. Al espectro correspondiente al herbicida Flufenacet (Fig. 4.18. y 4.19.c) se le asocian diferentes bandas: a 3075 cm^{-1} la de tensión de los enlaces C-H aromáticos y entre 1250 y 1000 cm^{-1} las bandas de flexión de dichos los enlaces. La banda a 2984 cm^{-1} corresponde a los enlaces C-H no aromáticos, y la banda correspondiente al enlace C=O de la amida a 1657 cm^{-1} , aunque el enlace C=N del grupo diazol también aparece en esa zona. Las bandas a 1509 y 1497 cm^{-1} podrían asignarse a las vibraciones de tensión C-C del anillo aromático. La banda fuerte a 1155 cm^{-1} correspondiente al enlace C-F (Chen y col., 2013).

En la formulación, Figura 4.18. La banda a 1352 cm^{-1} del surfactante B048 se ve desplazada en la formulación en 5 cm^{-1} , esa banda corresponde a los grupos CH_2 del surfactante por tanto pueden implicar una interacción mediante enlaces de tipo puente de hidrógeno entre el agua de solvatación de los grupos etoxi de las moléculas del surfactante y el herbicida. Un desplazamiento en las bandas asociadas a los enlaces C=N y a las aminas terciarias (1301 y 1248 cm^{-1}), puede indicar la interacción mediante puentes de hidrógeno entre los pares de electrones libres del nitrógeno del FLF con los grupos OH del agua que se encuentra solvatando al grupo polar del surfactante (Martin-Neto y col., 1994; Sposito y col., 1996), además se observa un desplazamiento de la banda a 1657 cm^{-1} de Flufenacet en 17 cm^{-1} , debido a la interacción de la amina terciaria con el surfactante.

En el espectro de la formulación FLF/ET15 (Figura 4.19) aparecen nuevas bandas respecto al complejo sin herbicida que se asocian claramente a bandas del herbicida FLF. Aparece una banda a 1658 cm^{-1} asociada al enlace amida, se observan bandas tanto del complejo como del FLF pero no desplazamiento de las mismas lo que indica que hay FLF en la formulaciones pero al no tener un contenido de ingrediente activo muy alto no se pueden apreciar desplazamientos en las mismas y por consiguiente el tipo de interacciones entre ambos pudiendo ser de tipo hidrofóbicas entre el anillo aromático del FLF y la cadena alquílica del surfactante

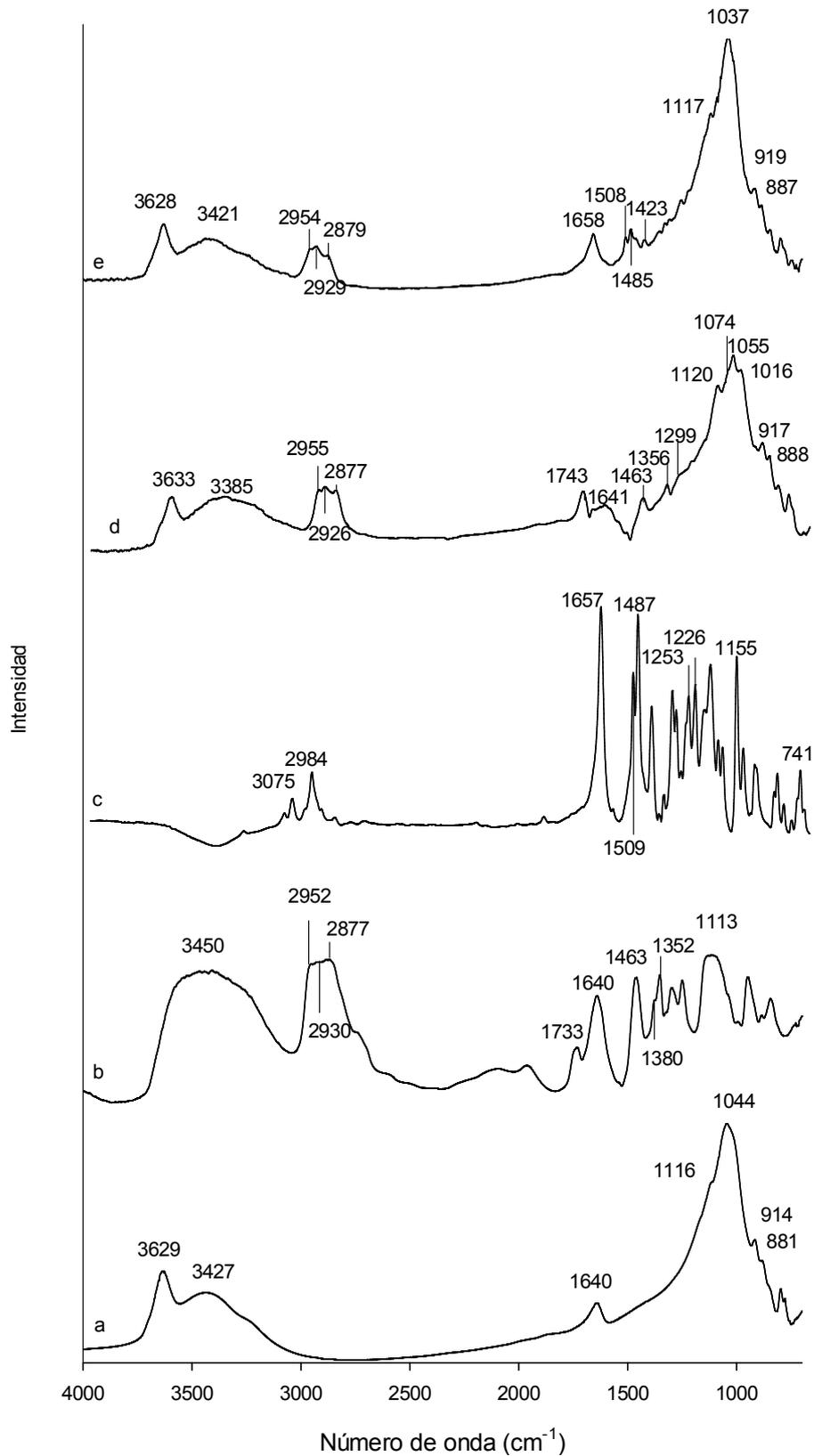


Figura 4.18. Espectros por IR de la formulación FLF/B048: a) Montmorillonita Swy-2, b) B048, c) Flufenacet, d) B048/SWy-2 e) FLF/B048 (0,134/0,1/0,1)

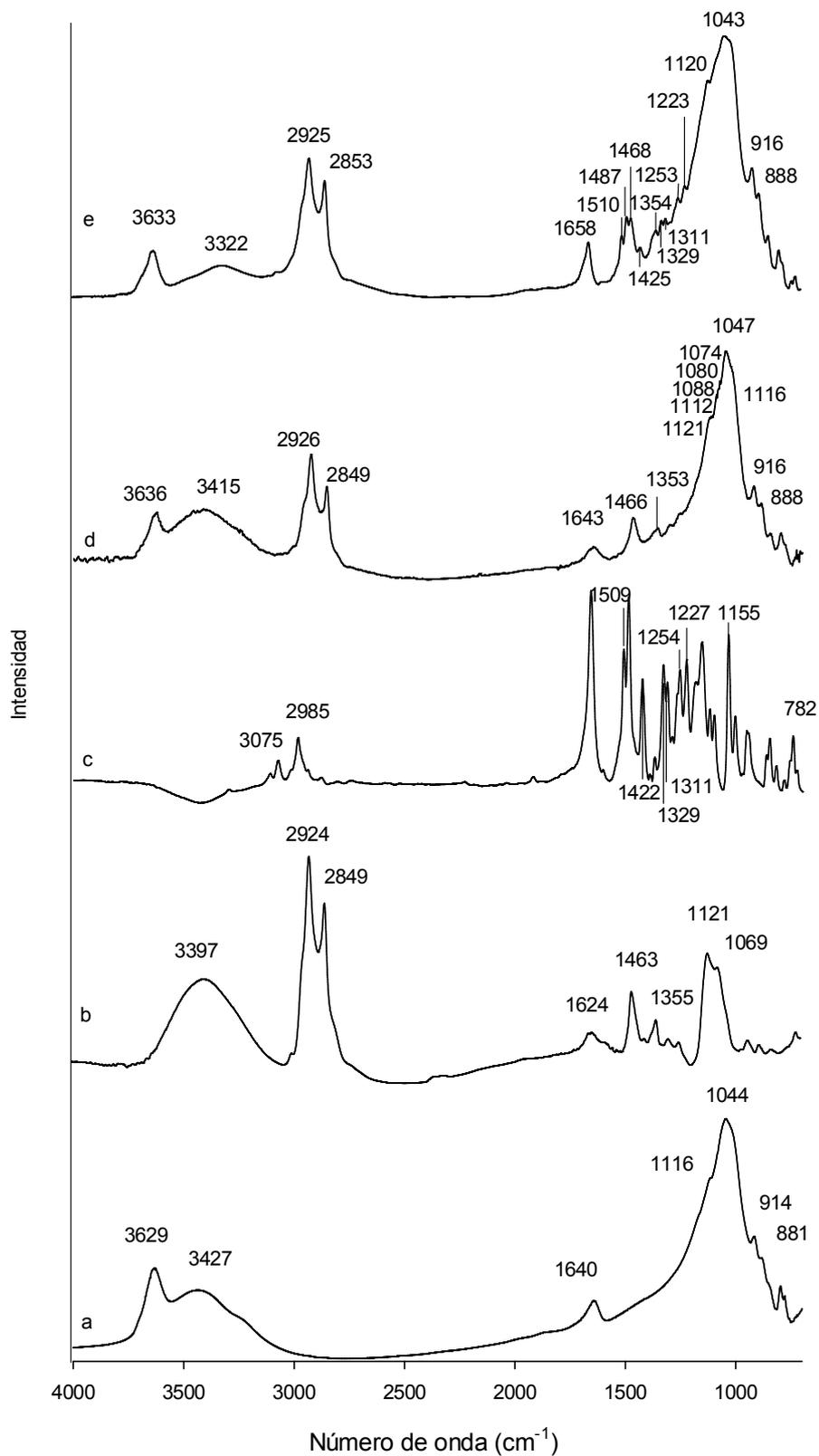


Figura 4.19. Espectros por IR de la formulación FLF/ET15: a) Montmorillonita Swy-2, b) ET15, c) Flufenacet, d) ET15/SWy-2, e) FLF/ET15 (0,152/1/0,5)

4.2.7 Comportamiento de las FLCs herbicidas-Surfactantes Comerciales- Montmorillonita en el sistema suelo-agua

4.2.7.1. Estudios de liberación in Vitro

Operando según el método experimental descrito en el apartado 3.2.10 se obtuvieron los datos necesarios para realizar los estudios de liberación in vitro de los productos técnicos de los herbicidas y de las diferentes FLCs. Los datos se muestran en las Figuras 4.20-4.22. Tales datos se han representado en forma de porcentajes acumulados de ingrediente activo liberado frente al tiempo expresado en horas.

En los resultados obtenidos para el herbicida Mesotriona (MS) (Figura 4.20) el modelo de liberación de las FLCs fue similar durante todo el experimento, siendo un proceso progresivo, a las 20 h se había liberado aproximadamente un 50% de producto técnico y entre un 5-20% de MS de las FLCs. Este efecto puede ser debido a la solubilización de MS que está adsorbida en la superficie del mineral de arcilla con la que no está fuertemente unida a ésta. A continuación ocurre una disminución gradual en la cantidad de Mesotriona liberada desde las FLCs, no llegando al 100% de ingrediente activo liberado al final del experimento de 120 horas.

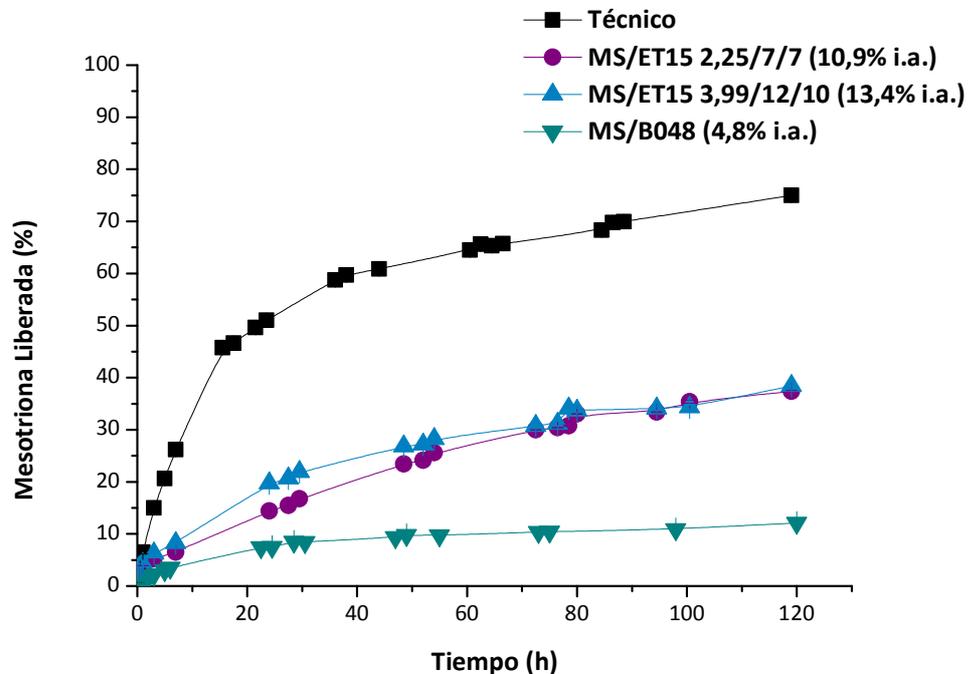


Figura 4.20. Porcentajes de Mesotriona liberada en agua desde diferentes FLCs (% acumulado)

Las FLCs del herbicida Metribuzina (MZ), (Figura 4.21), dieron perfiles de liberación diferentes al caso anterior, dándose en este caso un proceso muy rápido de liberación en las primeras 10 horas liberándose entre un 30-50 % de ingrediente activo según la formulación. Este hecho está en concordancia con la mayor solubilidad que presenta la MZ respecto a MS, por lo que se obtiene una explosión inicial de liberación más rápida que con otros herbicidas menos solubles.

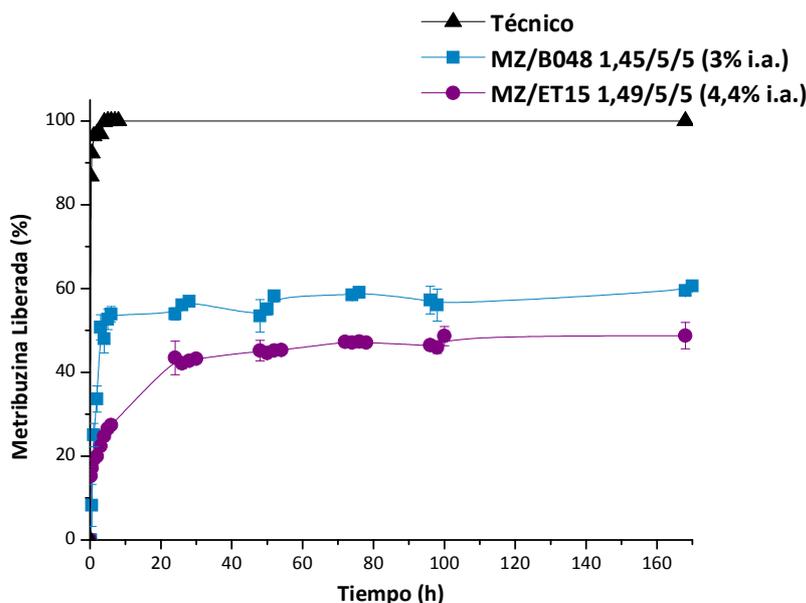


Figura 4.21. Porcentajes de Metribuzina liberada en agua desde diferentes FLCs (% acumulado)

El modelo de liberación para las formulaciones de Flufenacet FLF/B048 y FLF/ET15 (Figura 4.22) fue similar en las primeras 10 h, con un proceso de liberación inicial rápido presentando aproximadamente un 60% y un 70% de i.a. liberado respectivamente. Posteriormente se distingue una segunda fase de la liberación del herbicida, donde se observa una disminución gradual en la cantidad liberada hasta el 95% para la formulación de B048 y del 80% de i.a. liberado para la formulación de ET15 pasadas 90 h.

Todas las FLCs ensayadas mostraron una liberación más lentas que el producto técnico por lo que se demostró que las formulaciones obtenidas mediante la tecnología desarrollada eran realmente de liberación controlada. Según este comportamiento se puede demostrar que la liberación controlada de los herbicidas desde las FLCs bajo estudio es de tipo matricial, en las que el herbicida está disperso en la matriz del complejo surfactante-arcilla (tanto adsorbido en la superficie como en el espacio interlaminar de la misma).

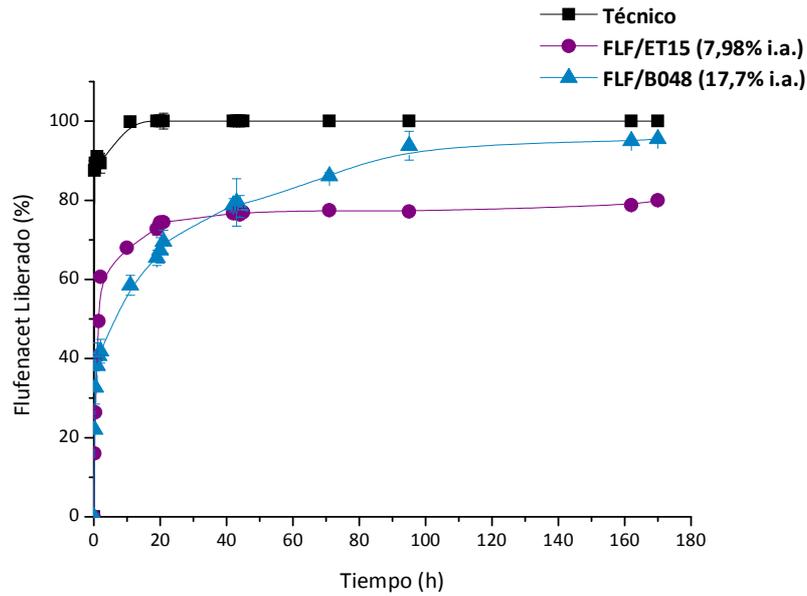


Figura 4.22. Porcentajes de Flufenacet liberado en agua desde diferentes FLCs (% acumulado)

Se modelizaron los perfiles de liberación mediante la ecuación de Ritger-Peppas (1987). De acuerdo con los coeficientes de correlación $R^2 > 0,97$, los datos experimentales se ajustaban bien a la ecuación de Ritger y Peppas (Tabla 4.8) para las formulaciones elaboradas con Mesotriona, Flufenacet y Metribuzina.

Se ha reseñado que en casos puros de liberación tipo Fickian, el exponente n tiene el valor límite de entre 0,43 y 0,50 para la liberación desde sistemas monolíticos (Ritger y Peppas, 1987). Los valores de exponente difusional (n) se encontraban entre 0,40 y 0,56 para las FLCs de MS, 0,56 y 0,58 para las FLCs de FLF y 0,45 y 0,23 para las FLCs de MZ. La mayoría estarían dentro del intervalo para ser descritas como Fickianas salvo para las FLC de Metribuzina MZ/ET15 ya que se aleja del valor de n para una liberación ideal de tipo Fickian para un sistema monolítico que podría ser debido a la heterogeneidad en la adsorción del herbicida en la muestra. En el resto de sistemas, el valor n indica que el herbicida está inmerso en una matriz de surfactante que está a su vez adsorbida en la arcilla y que el herbicida no está interaccionando con la arcilla debido a su baja afinidad de éste por la superficie de la montmorillonita. Las interacciones del herbicida con la superficie del mineral de la arcilla habrían producido pequeñas desviaciones de los valores de n de la situación ideal para un sistema monolítico (0,50).

Tabla 4.8. Valores de los parámetros de las ecuaciones empíricas y $t_{1/2}$ correspondientes al estudio de liberación de ingrediente activo para las FLCs de Mesotriona, Metribuzina y Flufenacet

Ecuación	Formulación	$K_1 (h)^{-n}$	n	R^2
$\frac{M_t}{M_0} = K_1 t^n$	MS/ET15 2,25/7/7	2,58±0,27	0,56±0,02	0,99
	MS/ET15 3,99/12/10	4,63±0,37	0,45±0,02	0,99
	MS/B048	1,96±0,03	0,40±0,35	0,97
	FLF/B048	1,51±0,01	0,56±0,02	0,99
	FLF/ET15	1,72±0,02	0,58±0,02	0,98
	MZ/B048	0,24±0,01	0,45±0,03	0,97
	MZ/ET15	0,19±0,01	0,23±0,01	0,97

En general la liberación de los herbicidas desde las FLCs fue progresiva a lo largo del tiempo obteniéndose en todos los casos un porcentaje final de herbicida liberado menor que el obtenido con el producto técnico del herbicida, debido a que en las FLCs el herbicida se presenta adsorbido en la matriz arcillosa de la formulación y debe difundir a través de ésta donde se encuentra atrapado para alcanzar el medio externo. Sin embargo estos porcentajes liberados de herbicida variaron en función de la composición y propiedades físico-químicas de las FLCs.

4.2.7.2. Estudios de adsorción-desorción de Flufenacet en suelos

La finalidad de estos estudios fue identificar los factores responsables del comportamiento del FLF en los suelos estudiados y de esta forma conectar la eficacia de las formulaciones con los procesos naturales que tienen lugar en el suelo. Las isothermas de adsorción de Flufenacet en suelos con diferentes propiedades químicas y de textura se muestran en la Figura 4.23. La secuencia que presentan los diferentes suelos en cuanto a adsorción es la siguiente: AL>LB≈LT>CR, siendo el suelo AL el que más FLF adsorbe y el suelo CR el que menos adsorción presenta. Las isothermas de adsorción se ajustaron a la ecuación de Freundlich y los parámetros correspondientes se recogen en la Tabla 4.9.

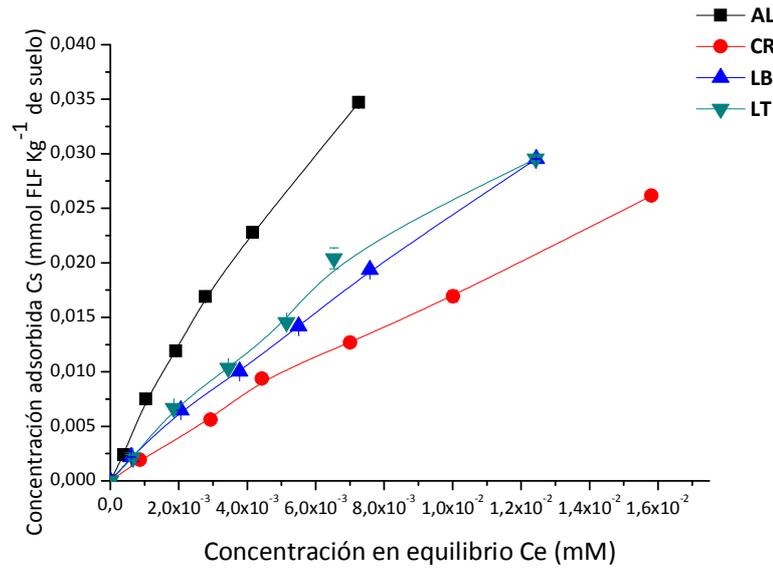


Figura 4.23. Isotermas de adsorción de FLF en los suelos AL, CR, LB, LT

Tabla 4.9. Parámetros de la ecuación de Freundlich y valores de K_{oc} obtenidos de las isotermas de adsorción de FLF en los suelos

Suelos	K_f (L kg ⁻¹)	n	R^2	K_{foc} (L kg ⁻¹)
AL	1,77±0,19	0,80±0,02	0,99	90,08±9,19
LT	1,04±0,11	0,81±0,02	0,99	136,42±13,13
LB	1,38±0,11	0,88±0,02	0,99	213,68±17,04
CR	0,96±0,15	0,87±0,03	0,99	157,94±24,80

Los exponentes n presentaban todos valores cercanos a la unidad ($n > 0,8$), por lo que los valores de K_{foc} podían ser comparados. El coeficiente K_{foc} se usa frecuentemente para caracterizar la adsorción de compuestos hidrofóbicos en base al concepto de que el carbono orgánico exhibe la misma afinidad para un compuesto hidrofóbico independientemente del tipo de MO en el suelo. Flufenacet es adsorbido en los diferentes suelos estudiados dependiendo de sus propiedades físico-químicas y la naturaleza química del mismo, debido a que es una molécula de gran tamaño con una baja polaridad ($\log K_{ow} = 3,2$, 24°C). La baja polaridad de esta molécula indica que la adsorción en suelos ocurre principalmente en dominios hidrofóbicos.

Si la materia orgánica fuera el componente principal de los suelos responsable de la adsorción de este herbicida, los valores de K_{foc} deberían estar en concordancia con el rango

descrito en otros suelos, 113-144 L kg⁻¹ (Pest Management Regulatory agency, Canada, 2003). El valor de K_{foc} obtenido para el suelo AL (Tabla 4.9), presenta un valor inferior, a pesar de ser el que más adsorbe y mayor proporción de MO presenta. Esto indica que otros factores están interviniendo en la adsorción de FLF en el suelo AL, lo que puede estar correlacionado con el alto contenido de óxidos amorfos de este suelo y alta proporción en materia orgánica, tal como se ha descrito para otros herbicidas hidrofóbicos (Morillo y col., 2004).

Los suelos LT y LB presentan una adsorción similar entre ellos. En estos casos, la fracción arcilla de los suelos así como la cantidad de materia orgánica juegan un papel muy importante en la adsorción de FLF en suelos. La proporción de materia orgánica en los suelos LB y LT fue muy similar, 1,11 y 1,31 %, respectivamente, (Tabla 4.1), al igual que el tipo de materia orgánica (Tabla 4.3), que explicaría la leve diferencia en la adsorción entre estos suelos. La desviación en los valores de K_{foc} (Tabla 4.9) de los suelos LT y LB, indica que otros factores aparte de la materia orgánica están interviniendo en la adsorción de FLF para el suelo LB. Sheng y col. (2001) demostraron que en suelos con presencia de montmorillonita y bajo contenido en MO como en el suelo LB, el tipo de mineral de la arcilla presente era responsable en gran parte de la adsorción de ciertos herbicidas hidrofóbicos, lo que podría explicar la desviación en el valor de K_{foc} obtenido en este suelo. La isoterma de adsorción de FLF en montmorillonita (Figura 4.24) confirma la mayor tendencia a adsorberse en este mineral presente solamente en el suelo LB, y su papel en la adsorción frente a otros minerales presentes en estos suelos.

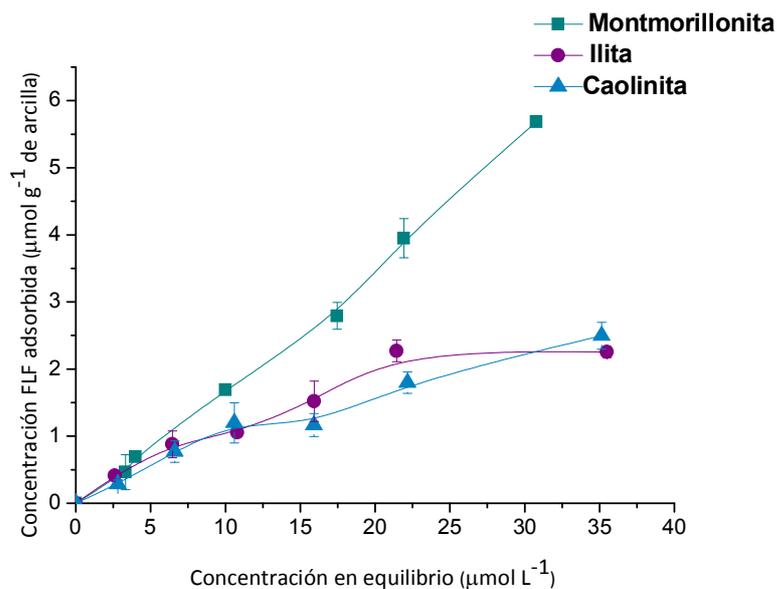


Figura 4.24. Isotermas de adsorción de FLF en los minerales de arcilla más representativos presentes en los suelos bajo estudio. (Realizadas a una concentración de 1,6 g L⁻¹ de arcilla)

Otra razón posible para la diferencia en los valores de K_{fOC} observada entre los suelos LB y LT a pesar de su similitud en el contenido y tipo de materia orgánica es el hecho de que la constante K_f es la cantidad de herbicida adsorbido para una concentración en equilibrio de 1 mmol L⁻¹, es decir, a concentraciones mucho más altas que las que se obtienen experimentalmente en las isothermas estudiadas. Es por ello que las pequeñas diferencias que se observan entre las isothermas de los suelos LB y LT puedan verse acrecentadas a mayores concentraciones de equilibrio (1 mmol L⁻¹), y esa es en parte la razón de la diferencia en el valor K_f de ambos suelos.

Por último, el suelo CR es el que presenta una menor adsorción de FLF. Como se ha discutido anteriormente la diferencia en la adsorción en este suelo respecto al suelo LB, con un contenido en MO similar (1,1 y 1,0%) era debido a la presencia de una alta proporción de fracción arcilla en este último (70% frente al 21,7% de CR), estando presentes esmectitas. A diferencia del suelo LB, los valores de K_{fOC} de los suelos LT y CR son similares y entran dentro de los valores de referencia de este herbicida, por lo que la adsorción de FLF en estos suelos está ocurriendo casi exclusivamente en la MO de los mismos. Por tanto, la menor adsorción en el suelo CR sobre el suelo LT se debe al mayor contenido de MO de este último suelo. En la Figura 4.25 se muestran las isothermas de desorción de Flufenacet en los suelos del presente estudio. Los valores de los coeficientes de histéresis así como los porcentajes de desorción se muestran en la Tabla 4.10.

Tabla 4.10. Porcentajes de desorción (%D) de FLF y coeficientes de histéresis (H) en suelos, en función de la concentración inicial usada.

FLF (mg L ⁻¹)	AL		LB		LT		CR	
	%D	H	%D	H	%D	H	%D	H
1	3,65	8,5	5,44	7,32	16,21	5,92	19,42	4,06±
	±1,36	±0,30	±0,00	±0,30	±0,00	±0,3	±1,36	2,04
3	8,41	7,29	13,07	7,23	16,47	3,78	21,55±	3,91±
	±1,34	±0,8	±1,22	±0,77	±0,52	±0,76	3,24	0,64
5	10,37	5,44	18,00	5,12	18,00	3,44	24,02±	3,10±
	±0,32	±0,30	±1,60	±0,59	±0,12	±0,89	0,81	0,78
7	11,39	4,7	18,88	4,81	19,13	3,19	28,52±	2,46±
	±0,66	±0,15	±1,87	±0,22	±0,17	±0,98	1,38	0,8
10	12,06	4,51	16,60	5,41	16,02	3,31	28,25±	2,54±
	±0,52	±0,24	±0,08	±0,13	±3,88	±0,19	5,52	0,88
15	15,24	3,41	18,32	4,92	22,12	3,12	28,33±	2,6±
	±1,5	±0,33	±0,65	±0,27	±2,72	±0,18	0,71	1,02

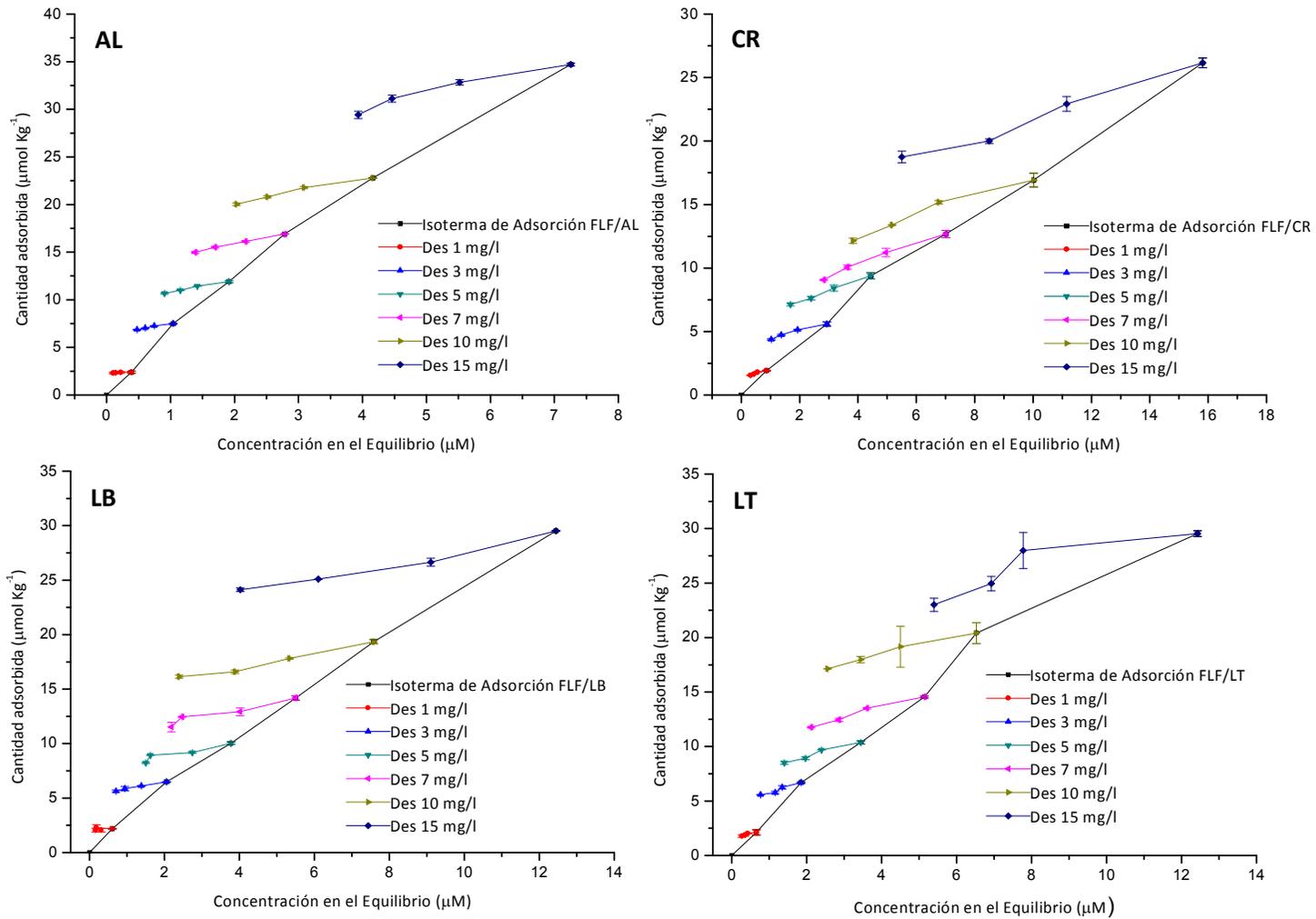


Figura 4.25. Isothermas de adsorción-desorción de FLF en suelos AL, CR, LB y LT a diferentes concentraciones

Los bajos porcentajes de desorción y los altos valores de H en los cuatro suelos indican que la retención del herbicida fue debida a formación de complejos con alta afinidad en estos suelos. Resultados similares fueron reseñados en los estudios de Gajghiye y Gupta (2001) y Gupta y col. (2001). En general los valores de histéresis fueron mayores en los suelos AL y LB, especialmente a bajas concentraciones. El suelo CR presentó los mayores porcentajes de desorción y menores valores de H, mientras que el suelo LT presentaba un porcentaje de desorción similar al suelo LB pero los valores de histéresis de éste mayores. Los porcentajes de desorción seguían una secuencia inversa a la observada en la adsorción: $CR > LT \geq LB > AL$.

La histéresis ha sido atribuida por varios autores al atrapamiento de las moléculas sorbidas en estructuras meso- y microporosas dentro de las estructuras minerales y la matriz de la materia orgánica, de las que difunde lentamente (Louchart y col., 2005; Wang y Keller, 2009). En el presente estudio, la degradación del herbicida o inadecuado equilibrio puede excluirse como causa significativa de histéresis. Las diferencias entre los grados de histéresis en los diferentes suelos se deben a la composición de los mismos.

En los suelos AL y LB los mayores valores de histéresis pueden estar asociados a adsorción en dominios diferentes a los del suelo LT y CR, en los que la adsorción ocurre fundamentalmente a través de la MO. En el suelo AL, el alto contenido de óxidos amorfos resulta en una mayor micro y meso porosidad, proporcionando sitios adicionales de adsorción a los de la MO, y de los cuales debe difundir a la solución del suelo, ralentizándose su liberación y dando valores altos de histéresis. En el suelo LB, los altos valores de H pueden provenir de estar en parte impedida la desorción tanto de minerales de arcilla tipo esmectita, como de los complejos organominerales formados por la asociación de la MO con minerales de arcilla (fundamentalmente, montmorillonita).

Por otra parte, en los cuatro suelos se apreció una mayor histéresis para la concentración menor usada de FLF. Ello puede estar relacionado con adsorción en sitios de diferente afinidad. La MO se ha descrito como un adsorbente donde existen diferentes conformaciones de la misma teniendo regiones condensadas y expandidas que interaccionarían de manera diferente con el herbicida FLF (Xing y Pinatello, 1997; Gunasekara y col., 2003). Asimismo, en el suelo LB, independientemente de la existencia de diferentes dominios de adsorción en la MO, la heterogeneidad en la adsorción deriva también de la presencia de minerales con alta afinidad por FLF tales como montmorillonita. Igualmente, existe una gran heterogeneidad en sitios de adsorción en el suelo AL derivada tanto de la MO presente como del alto contenido de óxidos. A concentraciones bajas de FLF los sitios de adsorción de alta afinidad estarían operando, de los

que sería más difícil la desorción. A medida que incrementa la adsorción se irían ocupando también los sitios de menor afinidad, de los cuales el herbicida se desorbería en una mayor extensión, reduciéndose la histéresis. La adsorción a sitios (o dominios) de diferente afinidad indica que la adsorción en los sitios de baja afinidad empieza a ocurrir antes de que se saturen los de alta afinidad (Undabeytia y col., 2002).

4.2.7.3 Estudios de lixiviación y bioactividad de Flufenacet y sus formulaciones en suelos

En estos experimentos el objetivo fue seguir no sólo la movilidad del herbicida sino también ver posteriormente el grado de bioactividad de las formulaciones de FLF, usando condiciones similares a las existentes en el campo. Los suelos empleados en estos experimentos fueron los suelos AL, CR y LT a diferentes regímenes de lluvia (84 y 168 mm). Se emplearon dos formulaciones con distinto contenido de i.a.: 7,98% la preparada con el surfactante ET15 y 17,7% preparada con B048. Estas formulaciones se compararon con una formulación comercial de Flufenacet, Tiara 60®.

En el suelo AL (Figura 4.26) se pueden observar patrones diferentes en cuanto al comportamiento de las formulaciones según el régimen de lluvia empleado. En las columnas en las que se aplicaron 84 mm de lluvia (Figura 4.26.a) se aprecia que la mayoría del herbicida queda retenido en los primeros 4 centímetros de suelo siendo $97\pm 0,5\%$, $98\pm 0,5\%$ y $75\pm 8\%$, para las formulaciones FLF/ET15, FLF/B048 y Tiara 60® respectivamente, resultando una disminución promedio de la lixiviación entre las FLCs y la FC de aproximadamente un 22,5%. En el segundo anillo (4-8 cm), disminuye significativamente la concentración FLF entre las columnas con FLCs, ya que estas formulaciones solo lixivian entre el 1-2%, a diferencia de la FC, que lixivian un 18%.

A doble dosis de agua (Figura 4.26.b), se vio favorecida la lixiviación del herbicida a lo largo del perfil de la columna. En este caso, y a diferencia de las columnas a dosis simple de riego, se puede decir que la formulación comercial queda distribuida en todos los anillos de la columna, acumulándose mayormente, en el segundo anillo. Por el contrario, el comportamiento de las FLCs sigue manteniéndose, encontrándose las concentraciones mayores en el primer anillo (0-4 cm), siendo aproximadamente un 70% para FLF/ET15 y un 85% para FLF/B048, y disminuyendo respecto a cuándo sólo se emplearon 84 mm de lluvia y al mismo tiempo la lixiviación aumenta a niveles inferiores de suelo. Al comparar el comportamiento de las FLCs frente a la comercial bajo este régimen de lluvia, se observa una concentración aproximadamente de 3 y 3,5 veces superior para las formulaciones surfactante-arcilla en el primer anillo frente a la comercial. Estos datos

demuestran que si el régimen de lluvia o riego fuera superior, la mayor parte de la F.C. lixiviaría a profundidades donde no podría ejercer su efecto herbicida.

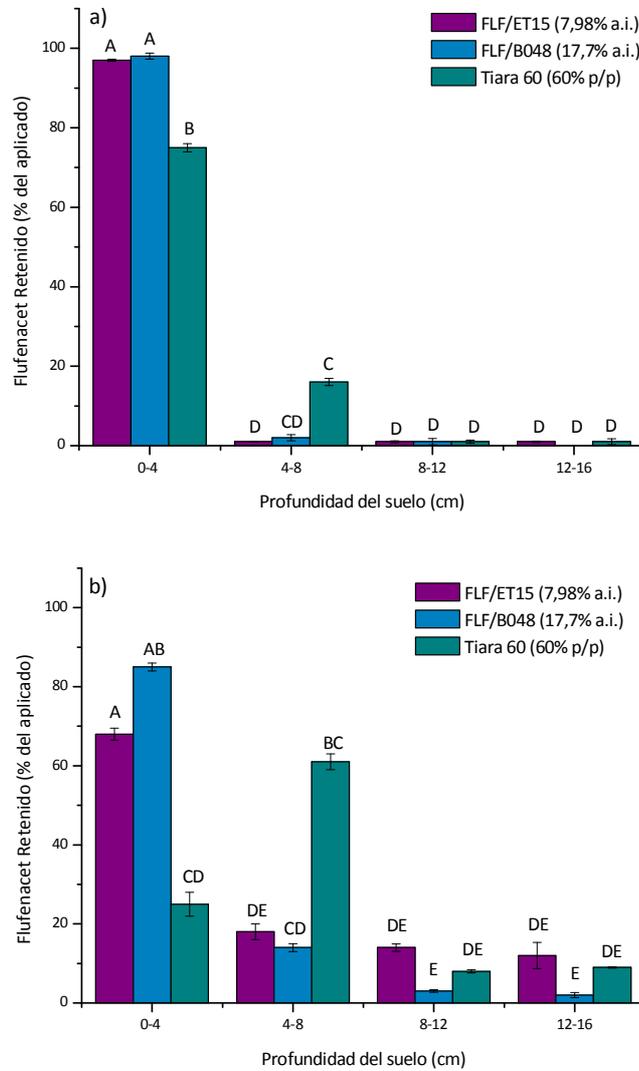


Figura 4.26. Porcentaje de FLF que permanece retenido en columnas del suelo AL en función de la profundidad tras los experimentos de lixiviación con 84 (a) y 168 (b) mm de lluvia. Las barras verticales representan errores estándares

Una vez concluidos los estudios de lixiviación, el suelo contenido en los distintos anillos se usó para estudiar el efecto herbicida tanto de las FLCs como de la FC. Dicho efecto se determinó midiendo la reducción de la altura de los brotes de *Setaria viridis* con respecto a un control sin herbicida (inhibición del crecimiento). En la Figura 4.27, los ensayos de bioactividad en

el suelo AL confirmaban los resultados anteriores, ya que los porcentajes de inhibición en el suelo proveniente del primer anillo eran aproximadamente el doble para el caso de las columnas a dosis de agua simple (Figura 4.27.a) y del cuádruple para el caso de las columnas a doble dosis de agua (Figura 4.27.b) entre las FLCs y la comercial. Con las FLCs se produjo completa inhibición en el crecimiento de malas hierbas (100% de la inhibición de las malas hierbas). En el siguiente anillo (4-8 cm), las diferencias en los resultados son también significativas en ambos regímenes de lluvia entre la formulación comercial y las FLCs, siendo las inhibiciones en estas menores en ambos casos que en la formulación comercial.

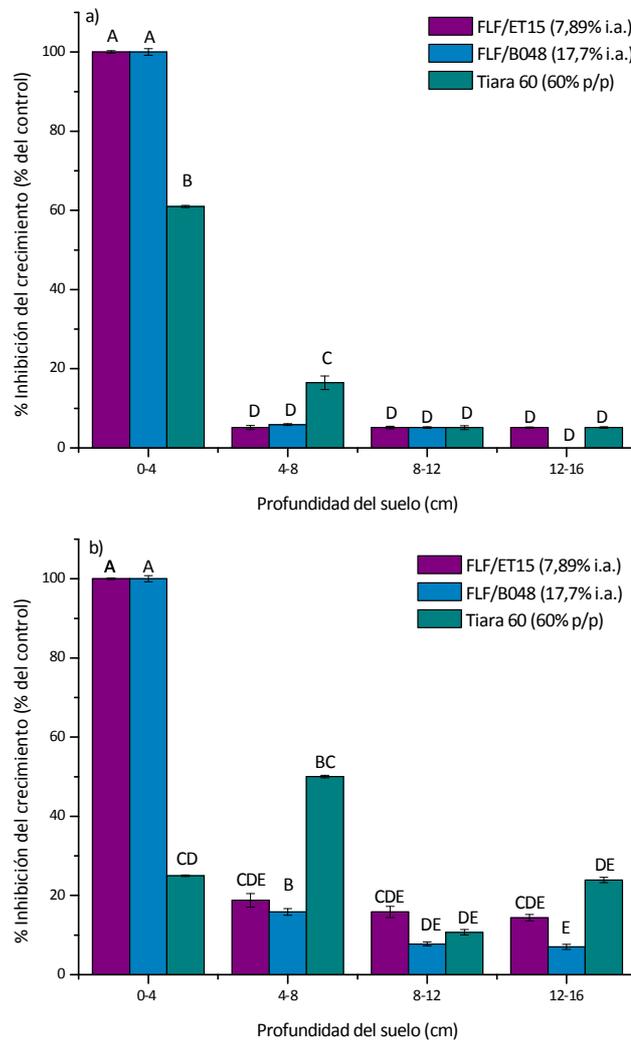


Figura 4.27. Actividad herbicida de FLF a distinta profundidad de las columnas de suelo AL tras 84 (a) y 168 (b) mm de lluvia. Las barras verticales representan errores estándares.

En el resto de anillos, no se dan diferencias significativas entre las diferentes formulaciones. Estos resultados demuestran que son necesarias dosis mucho menores del herbicida si se aplica como FLCs para obtener los mismos resultados que con la formulación comercial en las capas más superficiales del suelo, que es donde preferentemente han de actuar contra las malas hierbas.

En la Figura 4.28.a, correspondiente a la cantidad de FLF remanente en el suelo LT tras los experimentos de lixiviación, las concentraciones del herbicida en el primer anillo tras 84 mm de lluvia fueron del $59\pm 2\%$ con la FC frente a valores de $83\pm 3,4\%$ y $90\pm 4\%$ con las formulaciones FLF/ET15 y FLF/B048, respectivamente, en los primeros 4 cm de suelo. Ello muestra claramente una mayor cantidad de herbicida extraído en el anillo superior de la columna, que se traduce en una reducción promedio de la lixiviación del 35% en la capa superior del suelo. La cantidad de FLF extraído en el segundo anillo (4-8 cm) para el producto comercial es menor que en el primer anillo, siendo 22% para Tiara 60® y 3% para FLF/ET15 y FLF/B048. En los siguientes anillos la FC presenta un porcentaje mayor respecto a las FLCs, aunque no se aprecian variaciones significativas entre las diferentes FLCs.

Para el caso de las columnas a doble dosis de agua, Figura 4.28.b, existen diferencias más significativas entre los diferentes anillos, siendo menor en general la concentración de herbicida retenido en el primer anillo (0-4 cm), aunque hay una diferencia apreciable entre la FC y las FLCs (más del triple que con la FC). En el segundo anillo, no hay gran diferencia entre las cantidades de herbicida extraído con las formulaciones de liberación controlada, pero sí con la FC siendo aproximadamente del 40% para FLF/ET15 y FLF/B048 y del 60% para Tiara 60®. Por el contrario, en el anillo siguiente (8-12 cm) se observa una diferencia significativa entre la cantidad de herbicida extraído siendo la diferencia de un 37% de herbicida extraído en Tiara60® y sólo 3% para las FLCs, es decir, casi 10 veces superior la concentración en este anillo de la formulación comercial.

La Figura 4.29.a, correspondiente a la actividad del herbicida FLF en los diferentes anillos de las columnas del suelo LT tras 84 mm de lluvia, muestra que el porcentaje de inhibición del crecimiento de malas hierbas en el primer anillo (0-4 cm) no es tan significativamente diferente entre las formulaciones como en los suelos anteriores, siendo estos del 100% para FLF/ET15 y FLF/B048 y 85% para Tiara 60®. Por el contrario, en los anillos inferiores (4-8 cm; 8-12 cm; 12-16 cm), se pone de manifiesto que los valores de inhibición obtenidos están de acuerdo con el patrón de distribución y con los valores referidos al porcentaje remanente de FLF en las columnas (Figura 4.29.a) para estos mismos anillos. Es de reseñar que al haber actividad herbicida con la FC

a las profundidades más bajas, implicaría que podría dañar al cultivo al que hay que proteger ya que sus raíces suelen estar a más profundidad que las de las malas hierbas.

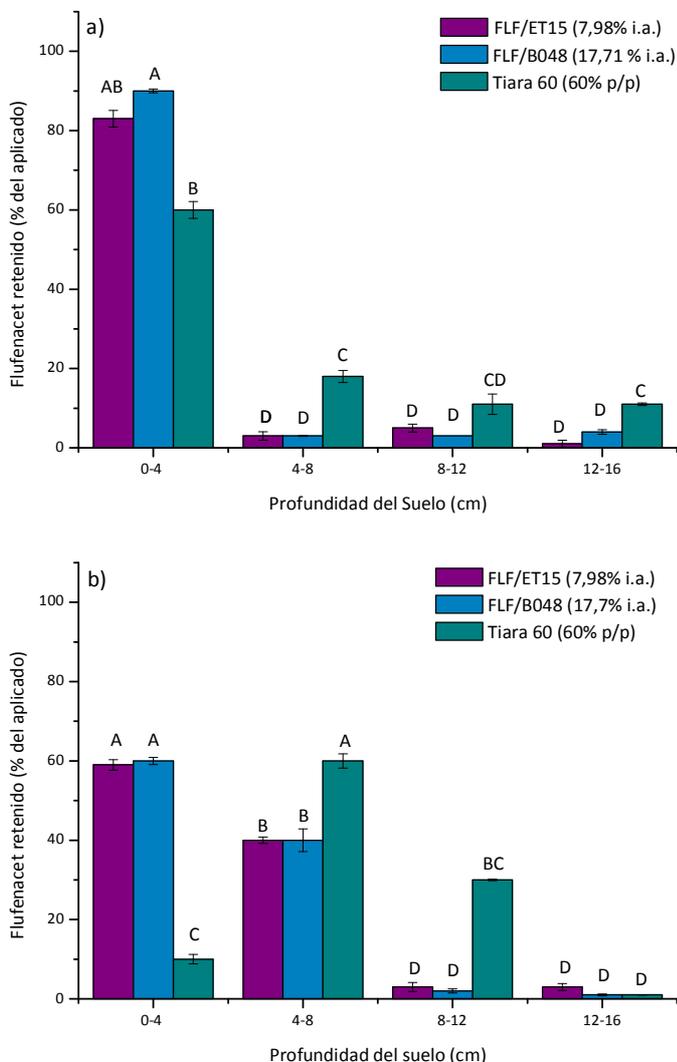


Figura 4.28. Porcentaje de FLF que permanece retenido en columnas del suelo LT en función de la profundidad tras los experimentos de lixiviación con 84 (a) y 168 (b) mm de lluvia. Las barras verticales representan errores estándares

En la Figura 4.29.b, se aprecia un comportamiento similar al obtenido en las columnas a dosis simple de agua. El porcentaje de inhibición para FLF/ET15 y FLF/B048 es del total, 100%, y tan solo del 17% para Tiara 60®, estos valores ponen de manifiesto que la actividad del herbicida es al menos 6 veces superior en esta sección de la columna para las FLCs en relación al producto

comercial. En los siguientes dos segmentos de la columna (4-8 cm; 8-12 cm), se observa una bioactividad mayor (75%) a la presentada en la capa superior del suelo para la formulación comercial, observándose diferencias significativas entre las FLCs y el producto comercial en estos segmentos de la columna. Estos resultados de actividad en la parte inferior de la columna se correlacionan con las cantidades de herbicida remanente extraídas (Figura 4.29.b), ya que estas mostraban el mismo orden de variación, observándose de igual manera diferencias significativas en los anillos inferiores de la columna entre la cantidad de herbicida extraído de las FLCs y del producto comercial.

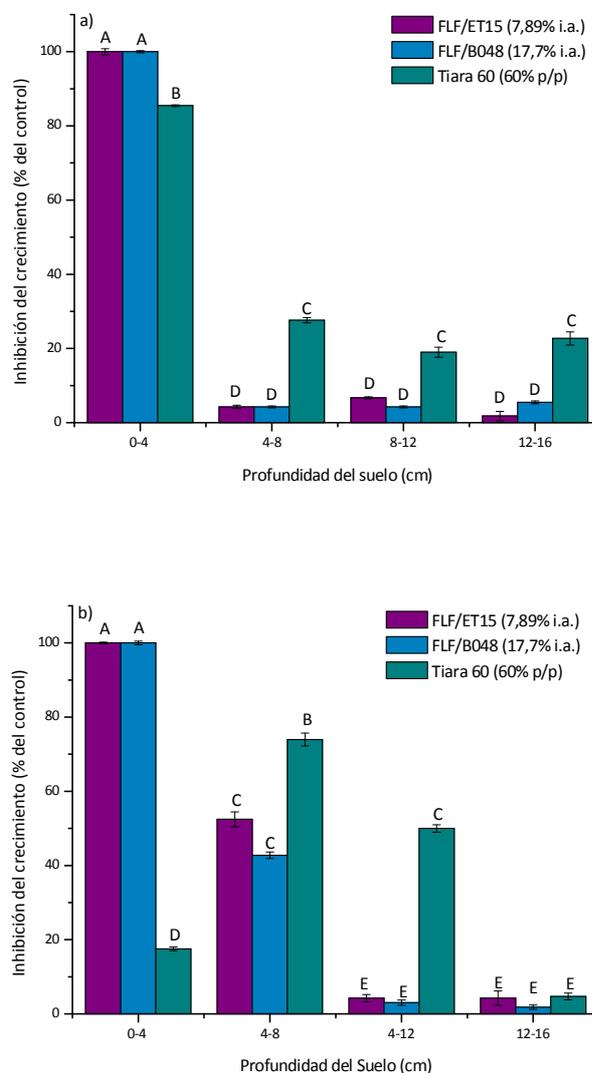


Figura 4.29. Actividad herbicida de FLF a distinta profundidad de las columnas de suelo LT tras 84 (a) y 168 (b) mm de lluvia. Las barras verticales representan errores estándares.

En la Figura 4.30.a, correspondiente a las concentraciones de FLF extraídas de la columnas empaquetadas con suelo CR tras 84 mm de lluvia, se observa claramente una mayor cantidad de plaguicida extraído en la capa superior (0-4 cm) con las tres formulaciones utilizadas, siendo el porcentaje extraído de 81% con FLF/ET15, 78% con FLF/B048 y 66% con Tiara 60®. El análisis estadístico de estos datos indica que existe una diferencia significativa entre las concentraciones de las FLCs y la formulación comercial del herbicida. La concentración de FLF extraída en el siguiente segmento (4-8 cm) es mayor con el producto comercial respecto a las FLCs, variando el porcentaje extraído desde un 2% para el sistema FLF/ET15 hasta un 20% para el producto comercial. En los siguientes anillos, no se aprecian diferencias significativas con las tres formulaciones en las cantidades de herbicida retenidas.

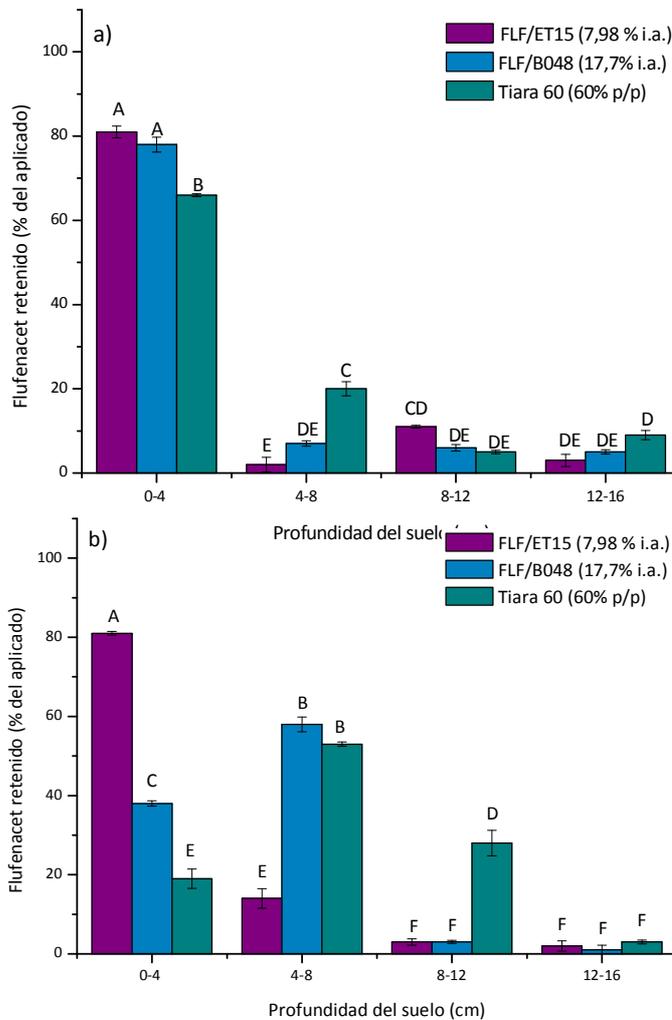


Figura 4.30. Porcentaje de FLF que permanece retenido en columnas del suelo CR en función de la profundidad tras los experimentos de lixiviación con 84 (a) y 168 (b) mm de lluvia. Las barras verticales representan errores estándares

En el caso de la columna a doble dosis (Figura 4.30.b), existe una variación mayor entre las concentraciones extraídas de las FLCs y la FC, siendo éstas de 81% para FLF/ET15, 38% para FLF/B048 y 19% para Tiara 60[®], concordando con los perfiles de liberación expuestos en la Figura 4.22 donde se observa que, aunque la liberación de la formulación FLF/ET15 es más rápida durante las primeras horas que la formulación FLF/B048, a mayores tiempos hay una menor liberación de la FLF/ET15 y por eso permanece una mayor cantidad en el anillo superior, mientras que a FLF/B048 se libera en mayor cuantía y por eso su presencia en el siguiente anillo (4-8 cm) es superior. Estos valores ponen de manifiesto un considerable aumento de la cantidad de herbicida presente en este anillo para la formulación FLF/ET15 en comparación con las otras dos formulaciones y respecto a los anillos inferiores. La diferencia entre las cantidades extraídas de las dos FLCs en este suelo con respecto a los anteriores se debe a la considerable menor adsorción de FLF en el suelo CR y a sus menores valores de histéresis que hacen que el herbicida quede muy débilmente retenido en la matriz de este suelo. Por esta razón, se observan variaciones significativas respecto a las columnas a doble dosis de agua en la formulación comercial y FLF/B048, siendo para ésta la concentración en el segundo anillo similar a la FC y significativamente diferenciando su comportamiento en el anillo inferior (8-12 cm) donde la concentración de la formulación comercial alcanza un 28% frente al 3% de las FLCs.

La Figura 4.31.a, correspondiente a la actividad del herbicida en los diferentes anillos de la columna, del suelo CR, muestra que la actividad en el anillo superior (0-4 cm) es del 85% tanto para las FLCs como la formulación comercial. Esto pone de manifiesto que para concentraciones relativamente altas de FLF presente, su bioactividad es la misma. A menores concentraciones de herbicida, las diferencias en la actividad del mismo en las plántulas son más sensibles. En la Figura 4.32 se observa dicho efecto en las diferentes formulaciones de FLF sobre la mala hierba *Setaria viridis*. Ello queda reflejado en los porcentajes de inhibición en el siguiente anillo (4-8 cm) que presenta porcentajes de inhibición del 14%, 39% y 71% correspondiendo respectivamente a concentraciones de FLF de 2%, 7% y 20%. Esta relación entre actividad herbicida y concentración no se observa tan claramente en los dos suelos anteriormente utilizados, lo que se puede explicar debido a la menor retención de FLF por este suelo tal como se ha descrito anteriormente. El herbicida está más biodisponible para la planta y por ende su efecto es más pronunciado en este suelo, que se manifiesta en que los valores de inhibición del crecimiento obtenidos están de acuerdo con los valores referidos al porcentaje remanente de FLF en las columnas de suelos para los diferentes anillos mostrados en la Figura 4.31.a

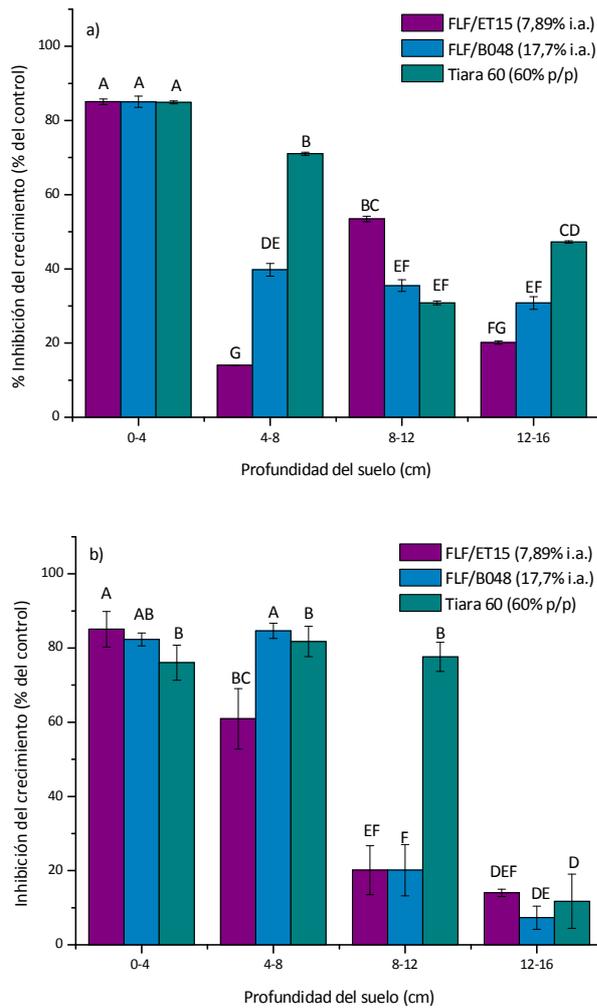


Figura 4.31. Actividad herbicida de FLF a distinta profundidad de las columnas de suelo CR tras 84 (a) y 168 (b) mm de lluvia. Las barras verticales representan errores estándares.

Los valores obtenidos para las columnas a doble dosis de agua (Figura 4.31.b) presentan leves diferencias entre las FLCs y la formulación comercial en el primer anillo (0-4 cm) por lo que para las FLCs se observan valores de inhibición mayores que para la FC. Los resultados más significativos se obtuvieron en el tercer anillo, presentando de nuevo el triple de inhibición en la FC respecto a las FLCs. Cabe decir, en función a estos datos obtenidos, que en los anillos inferiores de la columna de observa una mayor actividad para la formulación comercial que para las formulaciones de liberación controlada, en concordancia con la cantidad de herbicida extraída para cada formulación en estas fracciones. Resultados similares fueron obtenidos por otros autores al estudiar la bioactividad de FLCs de herbicidas (Sánchez-Verdejo y col., 2008, Undabeytia y col., 2011, Katz y Mishael, 2014).

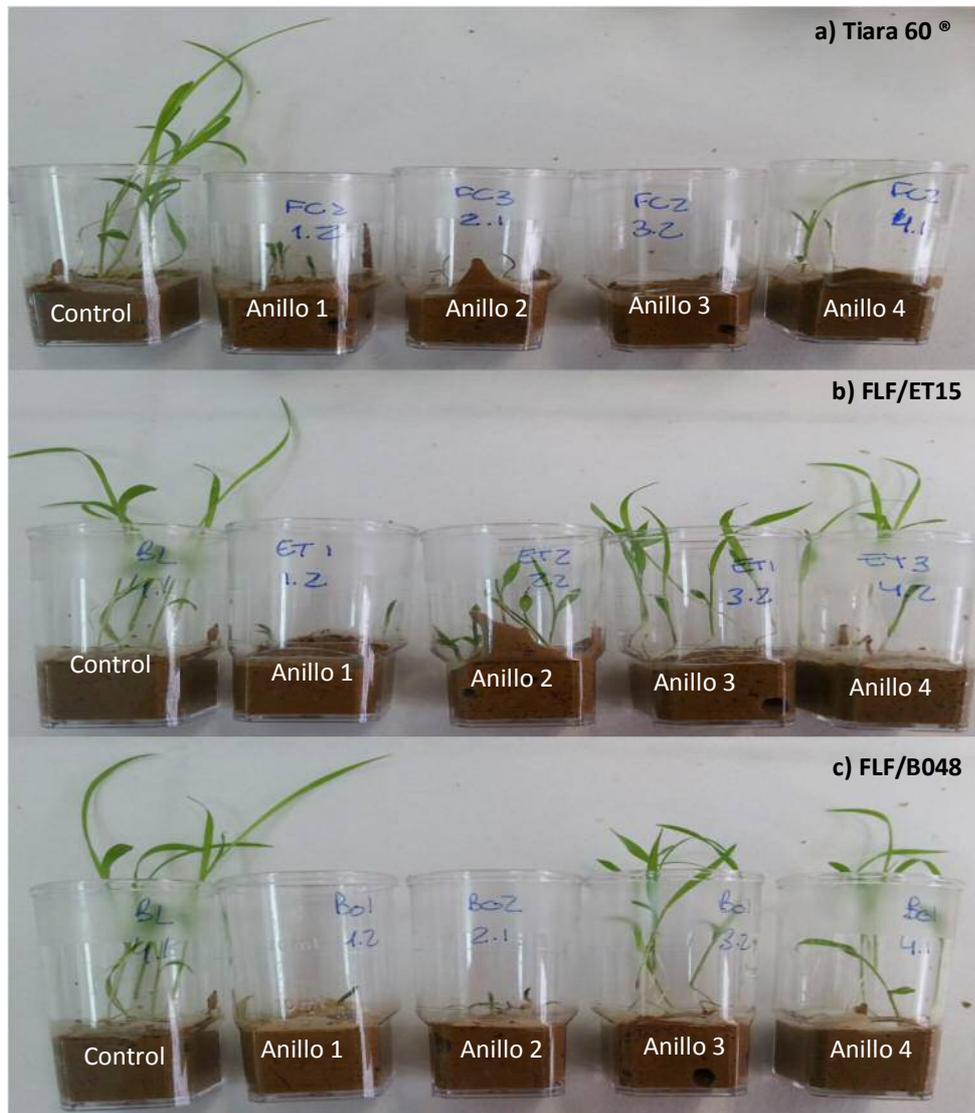


Figura 4.32. Efecto de las formulaciones utilizadas basadas en Flufenacet: a) Tiara 60®; b) FLF/ET15; c) FLFL/B048, en los diferentes anillos de la columna de suelo CR sobre el crecimiento de la mala hierba *Setaria Viridis* respecto al control sin herbicida.

Los resultados obtenidos en estos ensayos demuestran que las FLCs diseñadas en este trabajo son eficaces en el control de las malas hierbas a largo plazo en la capa superior del suelo. En este trabajo se demuestra claramente que las FLCs reducen la lixiviación del herbicida a lo largo del perfil del suelo respecto a la formulación comercial en los tres suelos estudiados, presentando una mejor actividad biológica en la capa superior del suelo. A partir de los estudios de liberación in vitro, adsorción-desorción, movilidad y bioeficacia es posible diseñar y elegir una Formulación de liberación controlada adecuada que permita obtener el perfil de lixiviado y

actividad biológica deseados dependiendo de las necesidades agronómicas específicas y del tipo de suelo donde tenga que ser aplicada.

4.2.7.4. Estudios de Lixiviación y bioactividad de Mesotriona y sus formulaciones en suelo.

En estos experimentos el objetivo era seguir la movilidad del herbicida en las formulaciones de Mesotriona, usando condiciones similares a las existentes en el campo. El suelo empleado en estos experimentos fue CR. La formulación empleada fue MS/ET15 (3,99/12/10), que presentaba la mayor cantidad de *i.a.* (13,3%), y la formulación comercial Callisto[®] (Figura 4.33).

La cantidad de Mesotriona retenida en la capa superior (0-3 cm) al aplicar la FLC y posteriormente irrigar con 70 mm de lluvia, fue de $43,40 \pm 5,8\%$ (Figura 4.33.a), lo que significaba una reducción importante en la lixiviación con respecto a la FC, ya que no se determinó ninguna cantidad de Mesotriona asociada a la FC en la capa superior de la columna. En el segmento siguiente (3-6 cm), la FLC presentó una cantidad superior a la FC, dos veces la de la FC. Este fenómeno viene definido por la lixiviación de la mayor parte de la FC a las capas inferiores del suelo, disminuyendo progresivamente la cantidad retenida de la FLC a esa misma profundidad. Esto indica que la formulación MS/ET15 lixivía menos y queda retenida en las capas más superficiales del suelo donde debe ejercer su efecto herbicida.

Una vez concluidos los experimentos de lixiviación de Mesotriona en columnas de suelo, se determinó la bioactividad del herbicida, presente en cada segmento de las columnas utilizadas, tanto de las tratadas con la FC como la FLC de Mesotriona, mediante la realización de bioensayos con plantas de girasol en los que se cuantificó el efecto blanqueante del herbicida con una curva dosis-respuesta (% de inhibición de la clorofila respecto a un control). Los resultados de la actividad herbicida se muestran en la Figura 4.33.b. En el anillo superior (0-3 cm) se obtuvo un porcentaje de inhibición de la clorofila del 70% aproximadamente al usar la FLC, pero con la FC no se obtuvo ninguna inhibición, confirmando con esto la ausencia de Mesotriona en el primer anillo, tal y como se muestra en la Figura 4.34.a. En los dos anillos siguientes (3-6 y 4-9 cm), la FLC presentó un porcentaje de inhibición menor concordando con los resultados obtenidos en el experimento de lixiviación donde la concentración de herbicida en estos anillos es menor. Se

pone de manifiesto que los valores de inhibición obtenidos están de acuerdo con el patrón de distribución y con los valores referidos al porcentaje remanente de MS en las columnas.

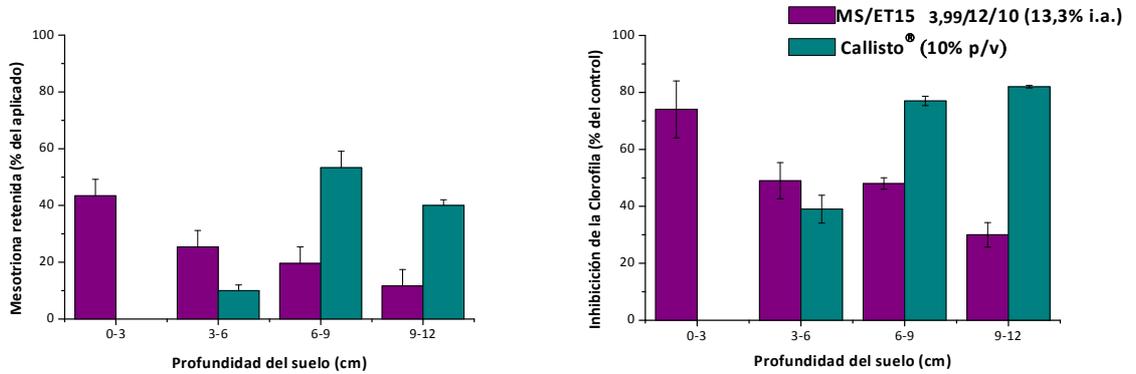


Figura 4.33. a) Porcentajes de Mesotriona retenidos tras 70 mm de lluvia en columnas de suelo en función de la profundidad en experimentos de lixiviación; b) Actividad herbicida de Mesotriona en los anillos de las columnas del suelo CR tras 70 mm de lluvia

4.2.7.5. Experimento de campo

Una vez comprobado en laboratorios el efecto de la formulación MS/ET15 3,99/12/10 en cuanto a su actividad herbicida, la formulación comercial Callisto® y la FLC de Mesotriona, MS/ET15 3,99/12/10, fueron usadas para realizar experimentos de campo. En la Figura 4.34 se presenta la imagen del experimento de campo en estado inicial antes de aplicar el herbicida bajo las diferentes formulaciones. Después de 37 días de la siembra de maíz (el cultivo) y de girasol (mala hierba), se observa el rápido crecimiento de este último en relación al tamaño del cultivo de maíz.



Figura 4.34. Aspecto del cultivo el día que se aplicó el tratamiento con la FC de Mesotriona y la formulación MS/ET15 (3,99/12/10), 37 días después de la siembra

En la Figura 4.35 se presenta el cultivo 25 días después del tratamiento con Mesotriona, observándose que en las parcelas tratadas con la FC no han desaparecido por completo las plantas de girasol, lo que indica que hubiera sido necesaria al menos una segunda aplicación de la misma para conseguirlo, con el consiguiente gasto económico y perjuicio medioambiental que ello conllevaría. Sin embargo, en las parcelas tratadas con la formulación MS/ET15 (3,99/12/10) no se observan malas hierbas, lo que significa que la aplicación de esta formulación no solo elimina las plantas de girasol que ya habían crecido, sino que impide que las semillas que aún no habían brotado puedan hacerlo.

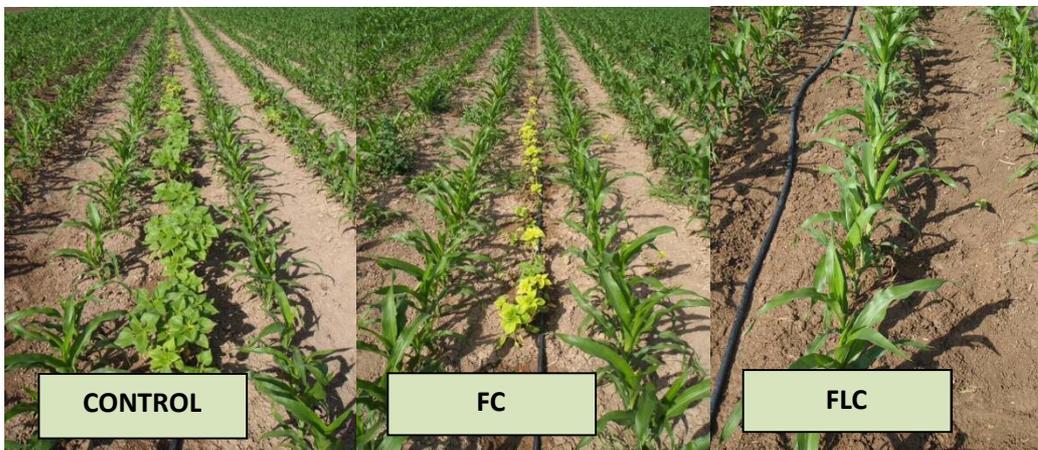


Figura 4.35. Aspecto del cultivo 25 días después del tratamiento con la formulación comercial (FC) de Mesotriona y la formulación de liberación controlada MS/ET15 (3,99/12/10) (FLC) en comparación con la parcela control

En lo que respecta a la pérdida de Mesotriona a lo largo del perfil del suelo por lixiviación y su posibilidad de contaminación de aguas subterráneas, la Tabla 4.11 y la Figura 4.36 muestran las cantidades extraídas de Mesotriona en los muestreos que se realizaron después de 10, 30 y 180 días tras el tratamiento con las distintas formulaciones en la capa arable del suelo. Las extracciones se realizaron a tres profundidades: de 0-10 cm para la primera capa, de 10-20 cm para la segunda y de 20-30 cm para la tercera, con el fin de estudiar la persistencia y la movilidad del herbicida.

Tabla 4.11. Distribución de Mesotriona (% del aplicado) a lo largo del perfil del suelo, tras 10, 30 y 180 días de tratamiento, expresada como porcentaje de la cantidad total aplicada

		Profundidad del suelo			Total extraído
		0-10 cm	10-20 cm	20-30 cm	
10 días	F.C.	6,4±4,8	9,2±4,2	21,0±3,7	36,6±12,7
	MS/ET15 (3,99/12/10)	49,5±77,7	10±7,2	4,0±4,6	63,5±3,3
30 días	F.C.	1,2±1,0	4,7±1,0	20,4±4,8	26,3 ± 6,8
	MS/ET15 (3,99/12/10)	0,9±5,0	12,3±4,0	5,1±2,2	18,2±5,8
180 días	F.C.	0,6±0,4	0,50±0,03	0,70±0,03	1,8±0,46
	MS/ET15 (3,99/12/10)	0,30±0,03	0,40±0,07	0,30±0,07	1,1±0,42

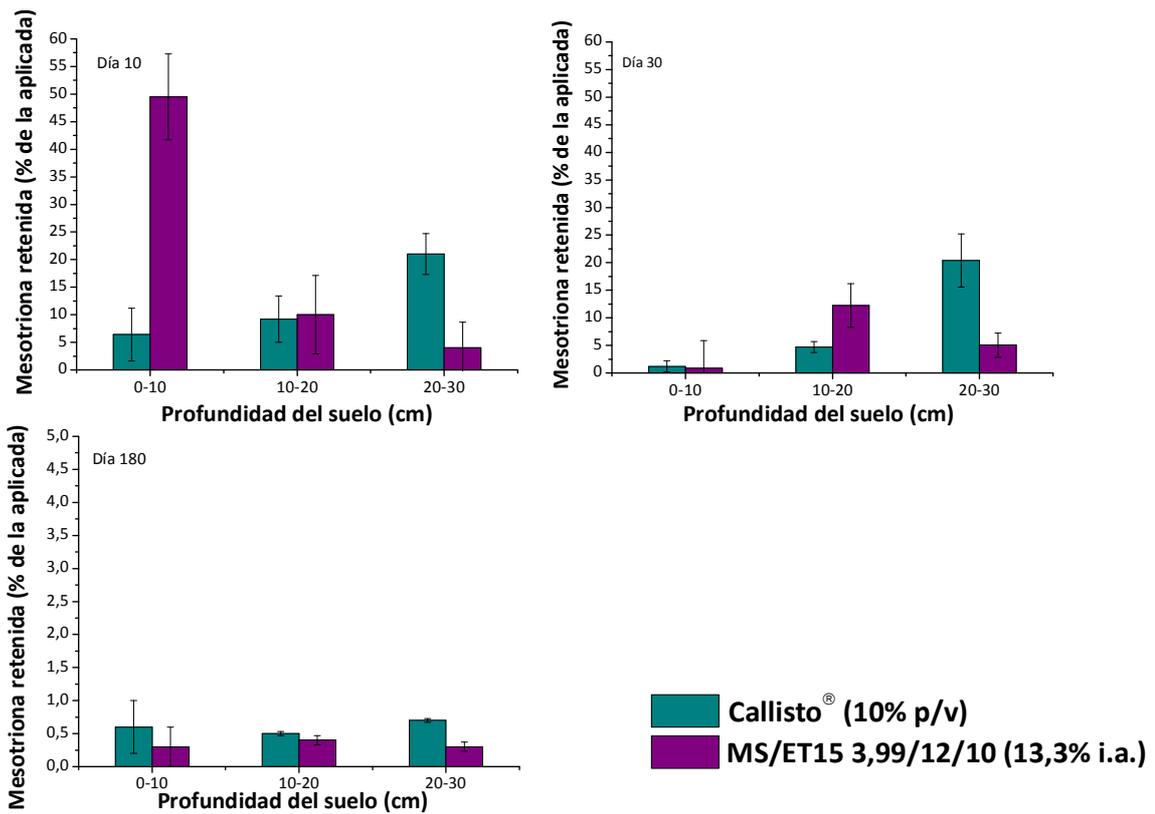


Figura 4.36. Distribución de Mesotriona tras el tratamiento con la FC y la formulación MS/ET15 (3,99/12/10) en función de la profundidad del suelo después de 10, 30 y 180 días de tratamiento

En el muestreo realizado después de 10 días del tratamiento con el herbicida (Figura 4.36), la distribución de Mesotriona proveniente de las distintas formulaciones en el perfil del suelo no fue igual en todas las profundidades estudiadas. Se observó una cantidad del 49,5% de la Mesotriona aportada por la formulación MS/ET15 (3,99/12/10) en la primera capa (0-10 cm), que era significativamente mayor si la comparamos con el 6,4% de la comercial. En la siguiente capa (10-20 cm), la acumulación de herbicida fue prácticamente igual cuando se empleó la FLC (10%) que para la FC (9,2%). Pero las cantidades retenidas en la capa más profunda analizada (20-30 cm) mostraron que la mayor parte de producto de la FC se había lixiviado, encontrando sólo un porcentaje del 21% a esta profundidad. Esto marcó una gran diferencia con la FLC, ya que su mayor porcentaje se encontraba en la primera capa (0-10 cm) analizada.

También es de destacar la pérdida del 63,4% de Mesotriona en los 30 cm del suelo en profundidad tan solo después de 10 días de su aplicación al emplear la FC en comparación con una pérdida de solo 36,5% al emplear la FLC. La mayor parte de la Mesotriona ha debido perderse por lixiviación hasta profundidades del suelo mayores de 30 cm, en donde ya no puede ejercer su efecto herbicida contra las malas hierbas, con la posibilidad añadida de la posible contaminación de aguas subterráneas poco profundas.

Esta es la razón de que el tratamiento con la FC no controlara las malas hierbas de manera eficaz y se produjera un rebrote de las mismas debido a la escasez de producto en los primeros centímetros del suelo, tal como se observó en las fotos del cultivo a distintos tiempos de tratamiento anteriormente presentadas. Por el contrario, la FLC MS/ET15 (3,9/12/10) sí lo consiguió. En la Figura 4.35 se puede observar el efecto de estas formulaciones comparándolas con la parcela control.

La distribución del herbicida después de 30 días de su aplicación (Figura 4.36 y Tabla 4.11) es muy distinta a la de después de 10 días, ya que el producto total incorporado de la formulación MS/ET15 (3,99/12/10) se reduce hasta un 18,2% en los 30 cm de suelo estudiados, y la cantidad encontrada en los primeros centímetros del suelo (0-10 cm) se había reducido del 49,5% presente a los 10 días hasta el 0,88%. Sin embargo, la cantidad de herbicida en el suelo aportada por la FC solo se redujo del 36,6% presente a los 10 días al 26,3% a los 30 días. En el caso de la FC, a los 10 días la mayor parte del herbicida (21%) estaba retenido en la zona más profunda estudiada (20-30 cm), y permaneció prácticamente el mismo porcentaje tras 30 días (20,4%). Por el contrario, en el caso de la FLC, a los 10 días la mayor parte del herbicida estaba presente en los primeros centímetros (49,5%), y 30 días después del tratamiento solo un 0,88% permanecía en esta zona más superficial. Ello parece indicar que al encontrarse la mayoría del

producto en los primeros 10 centímetros se produjo una más rápida degradación del mismo, debido a que en la superficie del suelo hay una mayor actividad microbiológica y los cambios de temperatura y radiación solar hacen que los procesos de disipación sean más favorables. Esto mismo fue observado por Sun y col. (2013), que demostraron en experimentos de campo con cultivo de maíz, que el mayor deterioro de Mesotriona ocurrió dentro de la primera semana de aplicación, y a los 30 días más del 98% del producto en el suelo se había disipado.

El último muestreo realizado, a los 180 días tras el tratamiento (Figura 4.36), presenta ya muy bajas cantidades de Mesotriona en suelo tanto en las parcelas que habían sido tratadas con la FC como en las que se trataron con la FLC.

Al final del experimento de campo se calculó el rendimiento de la cosecha obtenido con las distintas formulaciones (Tabla 4.12), no encontrándose ninguna diferencia significativa entre ellas.

Tabla 4.12. Rendimiento de maíz según la formulación de Mesotriona empleada

Formulación	Kg grano/parcela
Callisto®	23,7±0,4
MS/ET15 (3,99/12/10)	23,6±1,4

En conclusión, el experimento de campo demuestra que la formulación MS/ET15 (3,99/12/10) presentaba menos problemas de pérdidas por lixiviación que la FC, y al mismo tiempo había realizado su función contra las malas hierbas, con lo que se facilitaban todas las tareas de recolección.

4.3. FORMULACIONES DE LIBERACIÓN CONTROLADA BASADAS EN MONTMORILLONITA Y MEZCLA DE SURFACTANTES SINTETIZADOS Y SURFACTANTES COMERCIALES

4.3.1. Adsorción de surfactantes sintetizados MBA-12 y MBE-12 en montmorillonita

En la Figura 4.37 se muestran las isothermas de adsorción de dos surfactantes biodegradables sintetizados en nuestros laboratorios MBE-12 y MBA-12, en montmorillonita. A pesar de la similitud estructural de ambos surfactantes, estos presentan diferencias acusadas en su adsorción en la arcilla, la cual ocurre a través de interacciones de tipo electrostática. El surfactante MBE-12 presenta un máximo de adsorción de 0,5 mmol/g de arcilla mientras que la adsorción de MBA-12 alcanza un plateau a 1,74 mmol/g de arcilla. Esta mayor afinidad de MBA-12 por la superficie de la arcilla quedó de manifiesto mediante el ajuste de ambas adsorciones experimentales a la ecuación de Langmuir-Scatchard. Frente a un valor de coeficiente de enlace (K_L) de 4000 M^{-1} para MBE-12 ($R^2=0,933$) se obtuvo un valor de 8000 M^{-1} para MBA-12 ($R^2=0,963$).

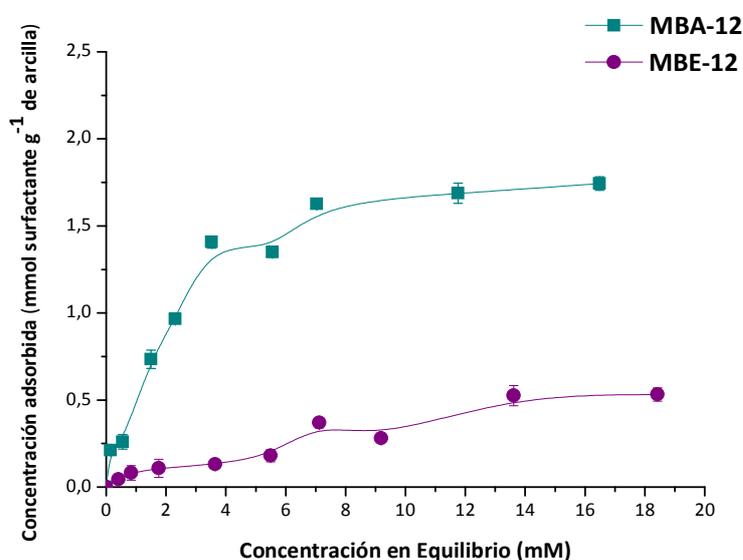


Figura 4.37. Isothermas de adsorción de los surfactantes MBA-12 y MBE-12 a diferentes concentraciones en Montmorillonita (SWy-2) a una concentración $1,6 \text{ g L}^{-1}$ de arcilla.

Este diferente comportamiento entre ambos surfactantes puede explicarse en base a: (i) la diferente conformación intrínseca de ambos surfactantes (MBE-12 es más flexible mientras que MBA-12 posee grupos CONH planares y rígidos) (Pisárčik y col., 2006), estando más limitada la adopción de diferentes ordenamientos en el espacio interlamilar para MBA-12; y (ii), la mayor capacidad de formar enlaces de hidrógeno en MBA-12 con respecto a MBE-12, ya que mientras que las moléculas de MBE-12 sólo pueden actuar exclusivamente como aceptores de hidrógeno a través del grupo éster, las moléculas de MBA-12 pueden actuar como donadores y aceptores, a través del átomo de N unido con hidrógeno, y del oxígeno del grupo amida respectivamente. Ello permite el desarrollo de una mayor estructura del surfactante MBA-12 en el espacio interlamilar, lo cual se confirmó por difracción de rayos X.

La Figuras 4.38 y 4.39 muestran los diagramas de rayos X a diferentes recubrimientos de MBE-12 y MBA-12 en la arcilla. En MBE-12 (Figura 4.38), el espaciado a 1,22 nm de la SWy-2 aumenta hasta 1,49 nm tras la adsorción de 0,04 mmol g⁻¹ del surfactante y se produce un incremento de 1,49 a 1,64 nm correspondiente a una cantidad adsorbida de 0,5 mmol g⁻¹ de arcilla. Este último valor correspondería a una bicapa de surfactantes paralela a la superficie de la arcilla (Jaynes y Vance, 1996). Por el contrario, con MBA-12 (Figura 4.39), se observa una difracción a 1,43 nm a bajos recubrimientos (0,2 mmol g⁻¹ adsorbido), asociados a una monocapa de adsorción del surfactante, y al incrementar el recubrimiento, esta difracción desaparece y aparece una nueva a 2,04 nm a un recubrimiento del doble de la CCC (1,74 mmol de MBA-12 g⁻¹ de arcilla). Estos últimos datos apuntan a una conformación de tipo parafínica en el espacio interlamilar de la arcilla. Una aproximación teórica al área ocupada por sitio de adsorción de MBA-12 indica un valor de 0,72 nm², que es la mitad del correspondiente al área por sitio de adsorción (1,57 nm²) estimado a través de un valor de la CCC de 0,8 mmol g⁻¹ y un área superficial de 760 m² g⁻¹. Esto supone que por sitio de adsorción existen dos moléculas de MBA-12, que únicamente puede justificarse mediante una conformación tipo parafina. Este comportamiento también puede ser debido a que la adsorción a 0,2 mmol g⁻¹ se produce a una concentración de surfactante MBA-12 por debajo de la cmc, en cambio la adsorción a 1,74 mmol g⁻¹ se produce a concentraciones iniciales mucho mayores del surfactante y por consiguiente, por encima de la cmc del mismo, por lo que cabe esperar una adsorción del surfactante en la superficie del mineral de la arcilla diferente en ambos sistemas.

El desarrollo de FLCs implica la solubilización del herbicida en las micelas formadas en solución y su posterior adsorción. La baja adsorción de MBE-12 en la superficie de la arcilla limita enormemente el contenido de ingrediente activo que puede obtenerse en la formulación final.

De aquí que MBA-12 sea un mejor candidato para el desarrollo de FLCs de herbicidas, por lo que se focalizará a partir de ahora en este surfactante.

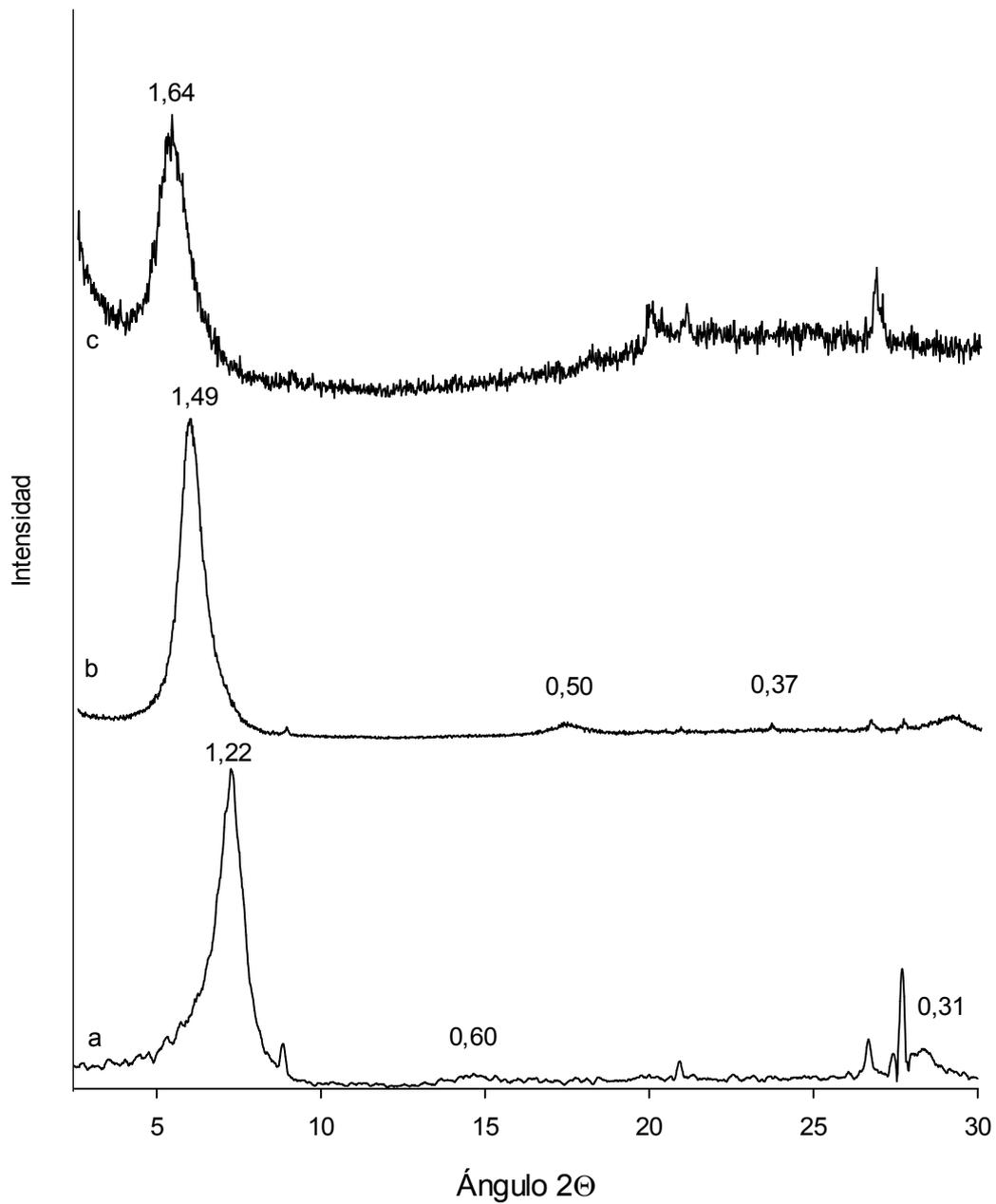


Figura 4.38. Difractogramas de Rayos X a diferentes recubrimientos del surfactante MBE-12 a) SWy-2; b) MBE-12 0,04 mmol g⁻¹; c) MBE-12 0,5 mmol g⁻¹

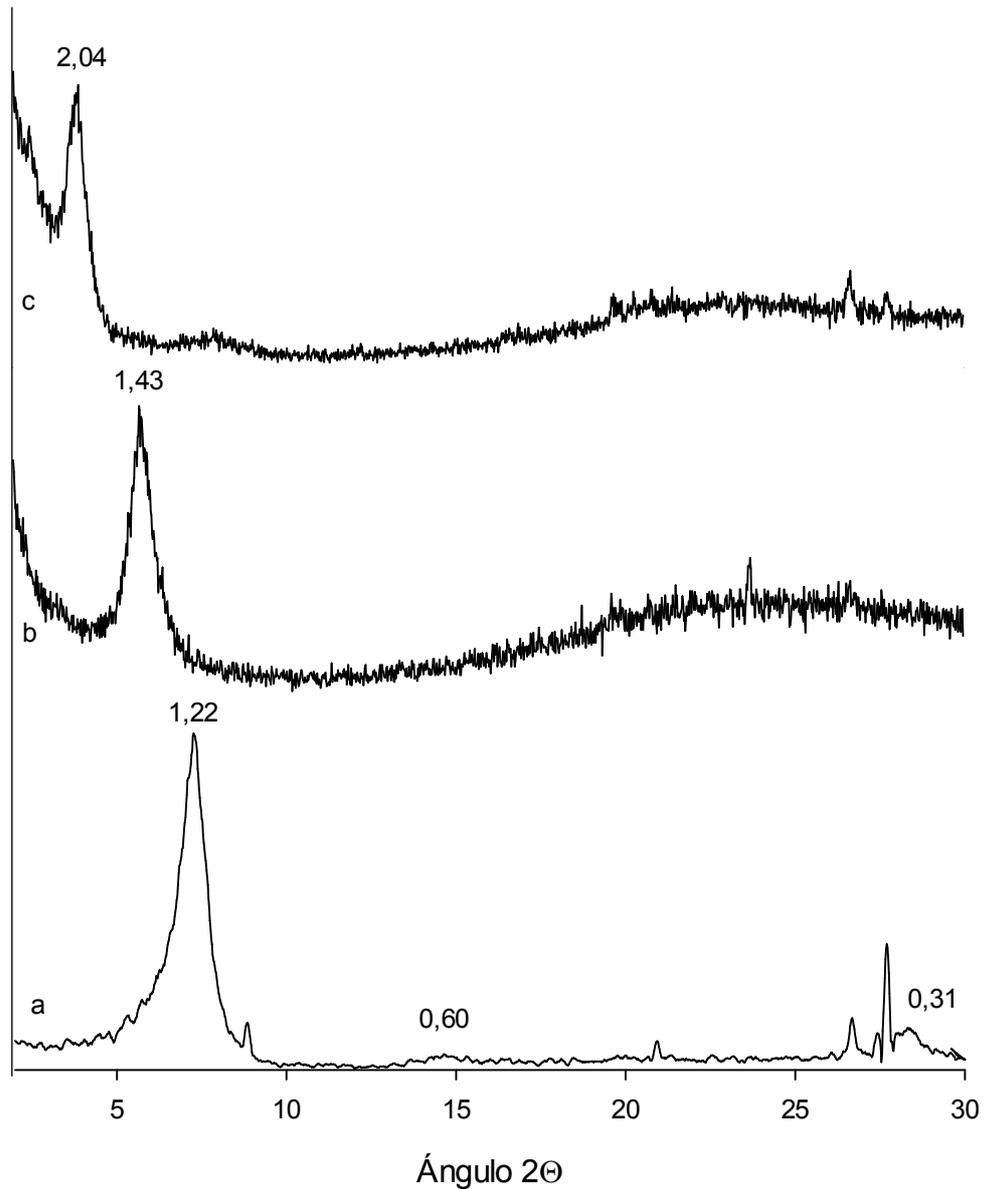


Figura 4.39. Difractogramas de Rayos X a diferentes recubrimientos del surfactante MBA-12: a) SWy-2; b) MBA-12 $0,2 \text{ mmol g}^{-1}$; c) MBA-12 $1,74 \text{ mmol g}^{-1}$

4.3.2. Solubilidad de Mesotriona en micelas mixtas de surfactantes

4.3.2.1. Relación entre solubilización y la concentración micelar crítica (cmc)

La solubilización de MS era fuertemente dependiente de la naturaleza del surfactante empleado (Tabla 4.13). Así, el uso de surfactantes no iónicos (B048 y B266) apenas incrementaba la solubilidad del herbicida. El aumento de la concentración empleada de surfactante de 3 a 6 mM solo producía incrementos en la cantidad solubilizada del orden de 0,06 mol de MS por mol de surfactante. Esta baja solubilidad es predecible teniendo en cuenta el carácter ácido de la

molécula del herbicida que se encuentra de forma aniónica en solución, frente al marcado carácter no-iónico de los surfactantes. Sin embargo, la cantidad solubilizada con ET15 es un orden de magnitud mayor debido al carácter básico de dicho surfactante, el cual a los pHs de equilibrio se encuentra en forma catiónica, dando lugar a una relación molar de solubilización (MSR) de 0,85 y 0,68 para 3 y 6 mM de ET15. Dichas relaciones son próximas a las descritas en Galán-Jiménez y col. (2015), quienes indicaron un valor de aproximadamente 0,93 a bajas concentraciones de surfactante (es decir, un mol de surfactantes ET15 solubilizaba un mol de mesotriona en las micelas); y un valor de 0,72 a concentraciones altas de ET15.

Tabla 4.13. Solubilización de MS en función de la concentración de surfactante(s) usado(s) en sistemas individuales y mixtos así como el contenido de MS tras su adsorción en la arcilla. La concentración de arcilla usada era 4,44 g/L.

Surfactante	Conc. (mM)	MS solubilizado (mM)	MS adsorbido experimental (% p:p)	MS adsorbido teórico (% p:p)
-	-	0,40±0,50	-	-
MBA-12	3	0,44±1,20	0,60±2,50	0,2
	6	0,54±2,50	1,20±1,60	0,6
B048	3	0,40±0,80	0,50±2,14	0,2
	6	0,58±0,90	1,60±0,88	0,6
B266	3	0,45±1,00	1,30±0,73	0,3
	6	0,62±0,60	3,30±0,99	0,8
ET15	3	2,58±0,25	5,70±1,80	8,9
	6	4,07±0,45	7,40±0,89	10,6
MBA-12/B048	3	0,59±0,52	0,60±0,02	0,5
	3			
MBA-12/B266	3	5,51±1,20	16,70±0,98	13,5
	3			
MBA-12/ET15	3	7,52±0,88	6,90±0,53	17,6
	3			
ET15/B266	3	3,36±0,23	7,30±0,98	9,3
	3			
ET15/B048	3	3,24±1,20	6,20±0,68	8,8
	3			

Con el surfactante MBA-12, también catiónico, la cantidad solubilizada de MS era muy baja y similar a las de los beroles (Tabla 4.13). Una razón de este comportamiento puede ser debido a su alta cmc (4,06 mM), la cual es muy superior a la del resto de los surfactantes, y en

especial cuando se compara al surfactante catiónico ET15, lo cual indica una disposición diferente de la carga electrostática (Shiloach y Blankschtein, 1998). En el surfactante MBA-12, la carga positiva está muy localizada en la interfase agua/núcleo micelar, dando lugar a una densidad electrostática alta y por tanto aumentando la cmc. Sin embargo, en el surfactante ET15, la presencia de los grupos polares EO produce una menor densidad de carga en el núcleo micelar, disminuyendo la concentración necesaria para formar agregados micelares en solución.

Si las interacciones de tipo electrostáticas son responsables de la gran solubilización del herbicida en micelas catiónicas como las formadas por ET15, la alta cmc del surfactante MBA-12 no es suficiente para justificar la baja relación molar de solubilización (MSR) obtenida a la mayor concentración usada de surfactante (0,05). Esto indica que otro factor que se podría considerar es la conformación del grupo polar en solución. La conformación adoptada es el resultado de varios equilibrios: la disminución de la interacción del resto bencénico con la cadena hidrofóbica a medida que aumenta la longitud de ésta; la tendencia del anillo bencénico rígido a permanecer en la interfase; la influencia del oxígeno carbonilo en la cadena lateral del grupo polar (Pisárčik y col., 2006). Una conformación en donde se incremente el ángulo entre la cadena lateral formada por el resto bencénico y la cola hidrofóbica como ocurre con cadenas hidrofóbicas largas, producirá una menor densidad de carga electrostática y por tanto, una menor solubilización del herbicida.

El uso de mezclas de surfactantes puede dar lugar a micelas mixtas con cmc inferior que la de los componentes individuales de la mezcla dando lugar a un incremento de la solubilización de moléculas diana (Al-Wardian y col., 2004; Bérlabi y col., 2010; Wei y col., 2011). Por tanto, la solubilización del herbicida MS en mezclas de surfactantes dependerá fundamentalmente de las interacciones a nivel molecular entre los surfactantes que determinarán las propiedades físicas de la mezcla tales como su cmc en solución. En la Figura 4.40 se representan las gráficas de tensión superficial del surfactante MBA-12 y los surfactantes mixtos de donde se obtienen los valores de cmc experimentales, en la que se observan los valores de la cmc (punto de intersección de ambas rectas) de las micelas mixtas por debajo del valor de cmc del surfactantes MBA-12 en solitario

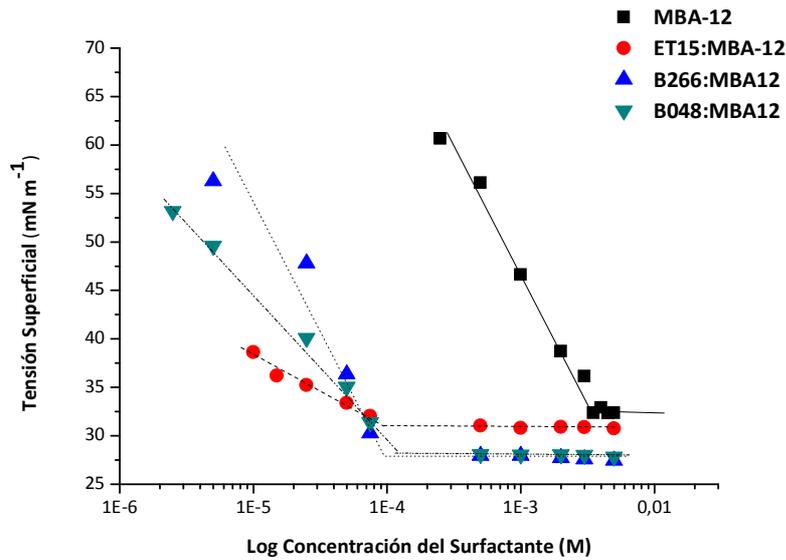


Figura 4.40. Gráfica de la tensión superficial (γ) frente al logaritmo de la concentración de surfactante MBA-12 y Surfactantes Mixtos MBA-12/ET15; MBA-12/B266 y MBA-12/B048

Se ha incidido en el sistema formado por micelas mixtas constituidas por MBA-12, debido a su gran biodegradabilidad, y con ET15 como referencia por su carácter catiónico. La ecuación de Clint (Clint, 1992) se puede usar para predecir la cmc de mezclas si existe un comportamiento ideal en la mezcla y que para sistemas binarios viene dada por la siguiente expresión:

$$\frac{1}{CMC_{12,teor}} = \frac{\alpha}{CMC_1} + \frac{1 - \alpha}{CMC_2} \quad (26)$$

donde α es la fracción molar del surfactante 1 en la solución de la mezcla, y CMC_1 , CMC_2 y $CMC_{12,teor}$ son, respectivamente, las concentraciones micelares críticas de los surfactantes 1, 2 y de la mezcla ideal al valor de α . Como puede observarse en la Tabla 4.14, los valores experimentales de cmc de las mezclas (CMC_{12}) son siempre inferiores que las correspondientes a sus valores teóricos con la excepción del sistema MBA-12/ET15, indicando un comportamiento no ideal en los sistemas mixtos de los surfactantes bajo estudio, debido a interacciones sinérgicas en la formación de los agregados micelares en solución.

Tabla 4.14. Valores de C_{12} teórico, según la ecuación de Clint, y de X_1^M y β^M de mezclas equimolares de surfactantes ($\alpha = 0.5$) usando el método de Rubingh a 25°C.^{1,2}

Sistema	$C_{12, \text{teor}} \text{ (M)}$	$C_{12} \text{ (M)}$	X_1^M	β^M
MBA-12/ET15	$5,44 \cdot 10^{-5}$	$1,08 \cdot 10^{-4}$	n.d. ³	n.d. ³
MBA-12/B048	$2,44 \cdot 10^{-4}$	$1,46 \cdot 10^{-4}$	0,24	-4,5
MBA-12/B266	$6,84 \cdot 10^{-4}$	$1,26 \cdot 10^{-4}$	0,39	-8,7
ET15/B048	$4,50 \cdot 10^{-5}$	$3,30 \cdot 10^{-5}$	0,70	-1,7
ET15/B266	$5,11 \cdot 10^{-5}$	$2,77 \cdot 10^{-5}$	0,71	-4,1

1. El subíndice 1 representa al primer surfactante en cada combinación.
2. Los límites de error de los parámetros son $\pm 4\%$.
3. n.d., no determinado por falta de consistencia en los cálculos.

Un análisis más detallado de estas interacciones puede obtenerse a través del parámetro β^M de acuerdo con la Teoría de Solución Regular mediante el uso de la aproximación de Rubingh (Rubingh, 1979), el cual se calcular a través de un método iterativo basado en las Eqs. (27) y (28)

$$\left(\frac{(X_1^M)^2 \ln(\alpha CMC_{12} / X_1^M CMC_1)}{(1-X_1^M)^2 \ln[(1-\alpha) CMC_{12}]^2 / (1-X_1^M) CMC_2} \right) = 1 \quad (27)$$

$$\beta^M = \frac{\ln \left(\frac{\alpha CMC_{12}}{X_1^M CMC_1} \right)}{(1 - X_1^M)^2} \quad (28)$$

donde X_1^M es la fracción molal del surfactante 1 en el total de la micela mixta. Valores positivos del parámetro β^M indican interacciones repulsivas (antagonismo) entre ambos surfactantes para la formación de micelas mixtas, mientras que valores negativos indican interacciones atractivas (sinergismo) y valores próximos a cero indican que no hay interacción (mezcla ideal). En la Tabla 4.14 puede observarse que el valor más negativo corresponde al sistema MBA-12/B266, que presenta también una mayor reducción de la CMC_{12} respecto al valor teórico predicho $CMC_{12, \text{teor}}$. Los valores de β^M no se pudieron obtener para el sistema MBA-12/ET15 debido a la falta de consistencia al resolver las ecuaciones (2) y (3), que es debido a la gran diferencia entre los valores de cmc de los componentes usados y a fuertes interacciones antagonísticas (Hoffman and Pössnecker, 1994; Dubey y col., 2014).

El valor de β^M refleja el balance entre las interacciones hidrofóbicas en el núcleo micelar de ambos surfactantes así como las interacciones hidrofílicas entre los grupos polares, que a su vez comprenden interacciones de tipo electrostático y estérico. Las diferencias en la longitud de la cadena alquílica entre B266 y B048 no son suficientes para explicar el comportamiento tan distinto cuando están formando micelas mixtas con surfactantes catiónicos. El menor valor de β^M con B048 se ha atribuido al incremento de las repulsiones estéricas debido a su mayor número de grupos EO (Galán-Jiménez y col., 2015).

Por otra parte, las interacciones de tipo electrostático son también responsables de los bajos valores de β^M , para los sistemas MBA-12 con B048 y B266, obtenidos ya que existen interacciones de tipo ión-dipolo entre pares de electrones solitarios de los átomos de oxígeno de los beroles, y el grupo portando carga positiva del surfactante catiónico. Estas interacciones serán mayores con MBA-12 que con ET15, debido a la presencia de grupos EO en este último que disminuyen la densidad de carga en la cabeza polar y que explica también parcialmente la mayor disminución en el valor de β^M en el sistema MBA-12/B048 frente al sistema ET15/B266.

La mayor compatibilidad estructural entre los surfactantes MBA-12 y B266 explica la mayor reducción en la cmc respecto a la predicha usando las concentraciones individuales, que lleva implícito una mayor solubilización en las micelas mixtas formadas por estos surfactantes frente a otros sistemas, debido a la mayor concentración de micelas cargadas en solución capaces de interactuar con el herbicida que con respecto a las cmc individuales de dichos surfactantes. Sin embargo, la Teoría de Solución Regular no puede explicar la gran solubilización de MS observada en el sistema ET15/MBA-12. Ello apunta a otras razones que permitan explicar dicho incremento a pesar de la menor compatibilidad estructural a priori entre dos surfactantes catiónicos para la formación de micelas mixtas.

4.3.2.2. Relación entre solubilización y carga micelar

En la Figura 4.41 se muestra el tamaño micelar y el potencial zeta de micelas mixtas formadas por MBA-12 a distintas relaciones molales con los surfactantes ET15, B048 y B266. Estas relaciones se eligieron de forma que las concentraciones individuales de surfactantes se encontraban por encima de su cmc. Como puede observarse, las micelas de MBA-12 ($Y=1$) son las de menor tamaño poseyendo una carga superficial muy elevada (+60 mV), corroborando la mayor exposición del grupo de amonio cuaternario en la interfase acuosa al comparar con el

grupo polar de ET15 ($Y=0$), en el que la carga está menos expuesta por la presencia de cadenas de grupos EO unidas a la amina protonada.

En los sistemas MBA-12/B048 y MBA-12/B266, a medida que aumenta la proporción de surfactante no iónico, se produce un aumento del tamaño de la micela y una reducción de la carga micelar. Estos hechos se explican por la incorporación de moléculas no iónicas en los agregados micelares, que incrementan el tamaño de la micela y que a través de las interacciones ión-dipolo entre los grupos amonio de MBA-12 y EO de los beroles reducen la carga micelar. La reducción de carga es mayor en el sistema MBA-12/B048 que en el sistema MBA-12/B266. Así para mezclas equimolares con MBA-12 y beroles ($Y=0,5$), el tamaño de la micelas es menor con B048 (8,1 nm) que con B266 (8,9 nm) a pesar del menor tamaño de este surfactante. Asimismo, la carga micelar es mayor con B266 (+30 mV) que con B048 (+20 mV). Estos hechos provienen de la naturaleza de las moléculas no iónicas de surfactantes intercaladas entre las moléculas de MBA-12. Wei y col. (2012) indicaron que surfactantes con cadenas largas de polioxietilenos pueden enrollarse sobre grupos polares cargados positivamente. En el caso de B048 las cadenas de EO pueden enrollarse debido a su mayor longitud (10 grupos EO) alrededor del amonio cargado positivamente, lo que producirá una disminución del tamaño y reducción de la carga comparada con surfactantes de cadenas cortas de EO como B266. Este apantallamiento de la carga micelar con B048, será también causa de la menor solubilización de MS en el sistema MBA-12/B048 (0,59mM) frente a la solubilidad en el sistema MBA-12/B266 (5,51 mM, Tabla 4.13).

En el sistema MBA-12/ET15 se puede apreciar dimensiones de las micelas no realísticas cuando están constituidas únicamente por ET15 ($Y=0$), indicando la formación de otros agregados en solución. Estos agregados desaparecen al aumentar la relación de MBA-12 ($Y \geq 0,5$). A estas relaciones la dinámica de población obedece a una única distribución de micelas, a pesar del antagonismo entre estos surfactantes debido al carácter catiónico de ambos. Sin embargo, la carga micelar no es muy alta, mostrando valores de aproximadamente +35 mV para $Y= 0,5$, similares a los del sistema MBA-12/B266 para esta misma proporción de surfactantes. La formación de estas micelas mixtas entre MBA-12 y ET15 se podría explicar mediante interacciones de tipo electrostático entre la nube de electrones π del anillo aromático de MBA-12 y la amina protonada de ET15, además de interacciones adicionales entre los restos hidrofóbicos de larga cadena.

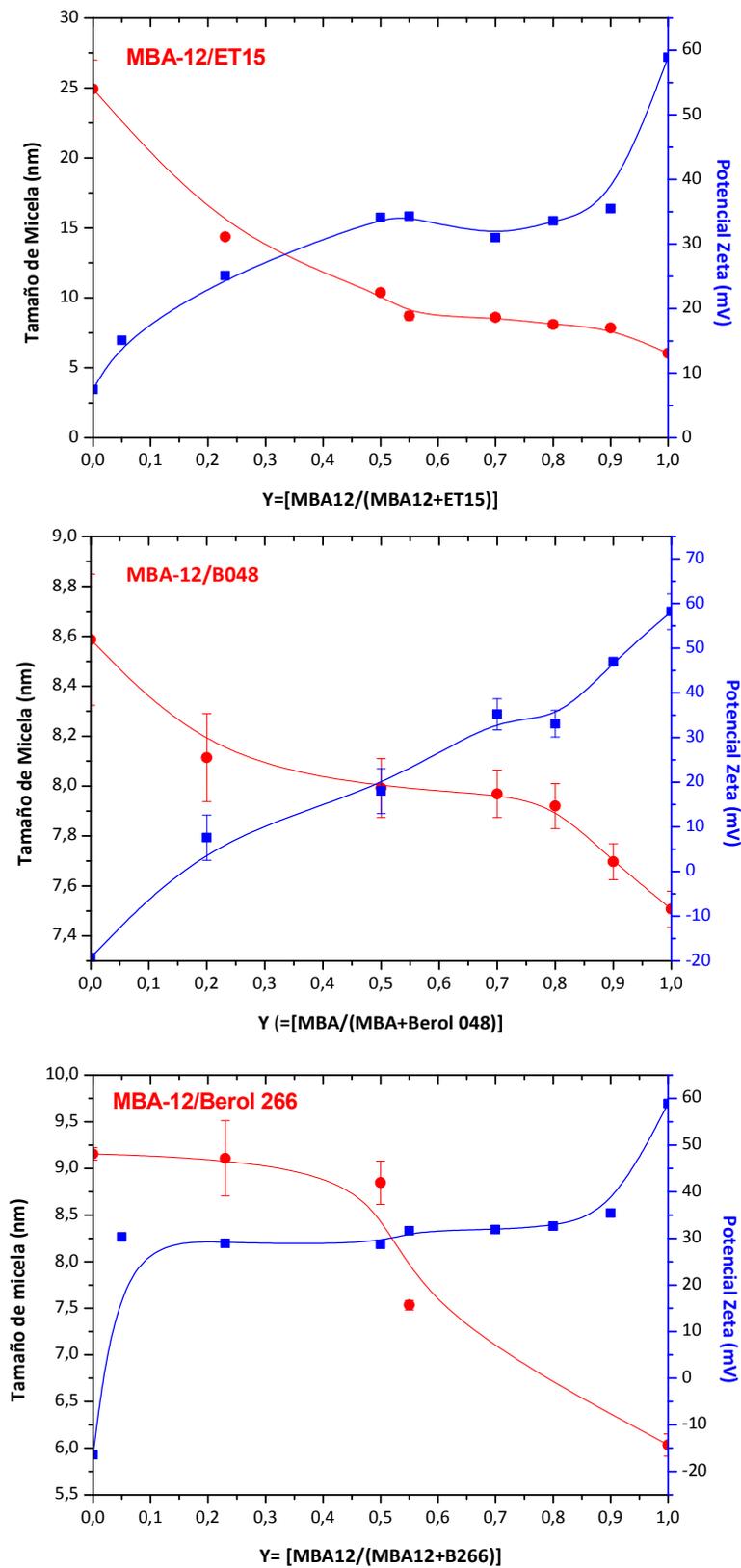


Figura 4.41. Diagramas de tamaño micelar (●) frente a potencial Zeta (■) de diferentes relaciones molales del surfactante MBA-12: MBA-12/ET15; MBA-12/B048, MBA-12/B266

4.3.3. Preparación de FLCs herbicida-micelas mixtas de surfactantes- montmorillonita

En la Tabla 4.13 se muestran los porcentajes experimentales obtenidos tras la adsorción de las micelas mixtas cargadas con el herbicida Mesotriona en montmorillonita manteniendo la concentración de esta última constante ($4,44 \text{ g L}^{-1}$). El contenido de MS adsorbido es muy bajo cuando se usan surfactantes individuales, como es de esperar debido al bajo incremento en su solubilidad con la excepción de ET15, que origina incrementos de hasta 7,4% de herbicida adsorbido. Sin embargo, la cantidad de ingrediente activo en las formulaciones tras adsorción de micelas mixtas era un orden de magnitud mayor que las formadas por surfactantes individuales como consecuencia de su mayor poder de solubilización.

En la Tabla 4.13 se muestra también el cálculo de la cantidad teórica de ingrediente activo en las formulaciones mediante la siguiente aproximación: (i) determinación experimental de la cantidad de surfactante adsorbido basándose en el coeficiente de enlace determinado previamente; (ii) estimación de la cantidad solubilizada de MS; y (iii) que existe la misma proporcionalidad de MS entre el surfactante adsorbido y el que permanece en solución. En la determinación de la cantidad teórica de MS adsorbido mediante el uso de mezclas de surfactantes se usó en el cálculo como coeficiente de enlace el promedio de los coeficientes individuales. La Tabla 4.13 muestra en general un buen ajuste entre el contenido teórico y el experimental. Sin embargo es de destacar la gran discrepancia obtenida para el sistema MBA-12/ET15, a pesar de ser el sistema que mayor solubilización producía de MS. En el sistema MBA-12/ET15 existe una gran competencia entre ambos surfactantes por los sitios de adsorción como queda reflejado en sus altos coeficientes de enlace, y además existe un antagonismo entre ambos surfactantes como se demostró anteriormente, que se traduce tanto en una menor afinidad por la superficie de la arcilla, como en interacciones más impedidas entre moléculas de surfactantes de MBA-12 adsorbidas con moléculas de ET15 y viceversa. Teniendo en cuenta que la solubilización viene en gran medida determinada por ET15, su menor adsorción se traduce en un menor contenido de ingrediente activo.

Se ha elegido como formulación para estudiar su comportamiento en el sistema suelo-agua la correspondiente al sistema MBA-12/B266 ya que posee el mayor contenido de ingrediente activo, por lo que previamente se va a proceder a su caracterización por difracción de rayos X y espectroscopía de infrarrojo. La nomenclatura de dicha formulación será: MBA-12/B266/MS (16,7%)

4.3.5. Caracterización de la FLC Mesotriona-micelas mixtas-montmorillonita.

Difracción de Rayos X. Se caracterizó la formulación MBA-12/B266/SWy-2/MS mediante difracción de Rayos X y también el complejo sin herbicida (MBA-12/B266/SWy-2)(Figura 4.42).

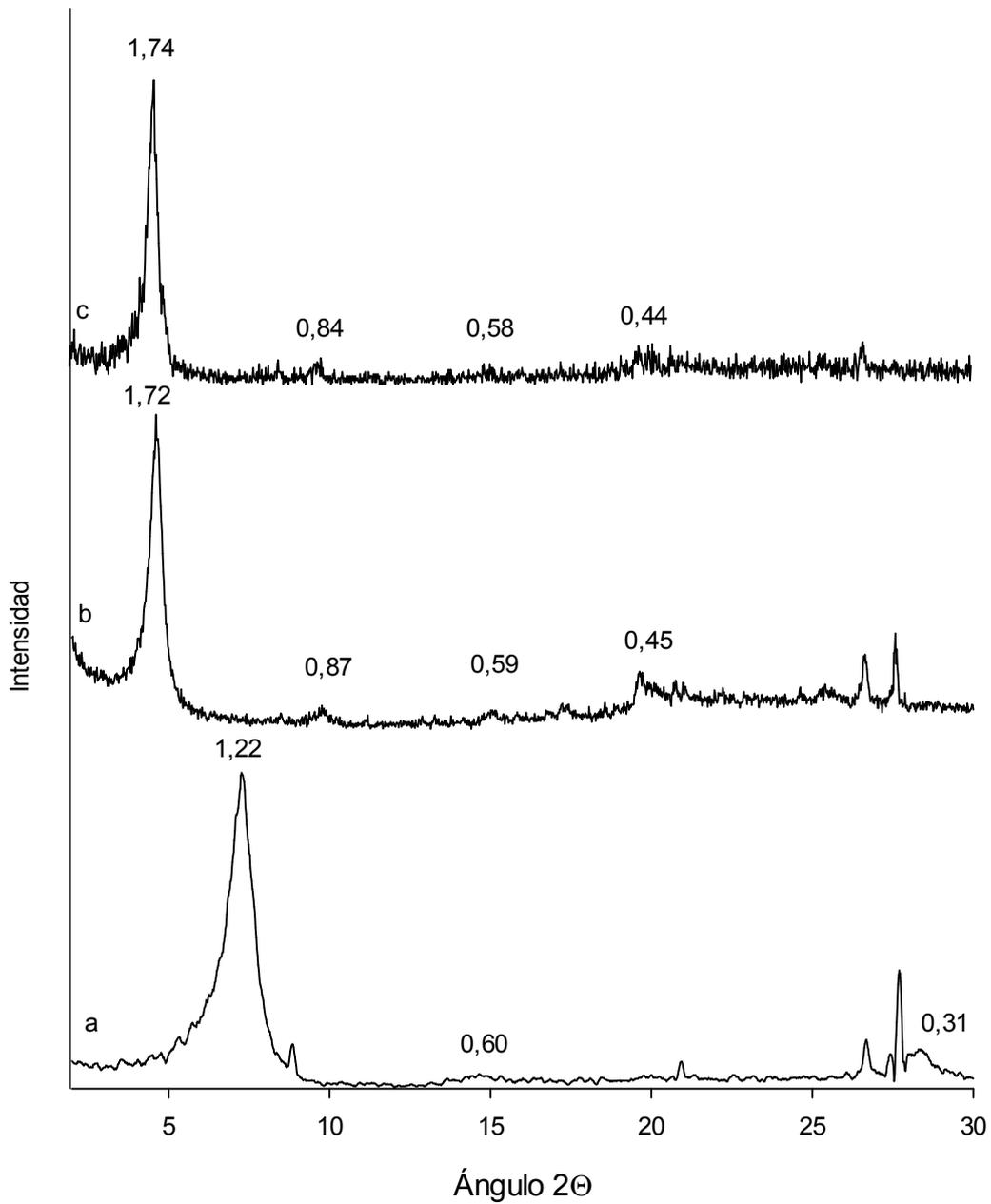


Figura 4.42. Difractograma de Rayos X de la formulación B266MBA-12MS: a) B266MBA-12/SWy-2; c) B266MBA-12/MS/SWy-2

En la Figura 4.42.b se presenta el difractograma del complejo sin herbicida en el que se observa una difracción a 1,72 nm que indica que las micelas mixtas se adsorben en el mineral de la arcilla como una bicapa paralela al plano basal, tal como se ha observado. Las siguientes difracciones corresponden a los diferentes órdenes de dicha difracción, ($n= 2, 3, 4$). En la Figura 4.42.c se presenta el DRX correspondiente a la formulación con MS, con una difracción a 1,74 nm con lo cual la disposición por la que se deduce que los surfactantes siguen manteniendo la disposición de bicapa en el espacio interlamilar a pesar de haberse adsorbido el herbicida.

Infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR).

En la Figura 4.43 se muestra el espectro de infrarrojos del compuesto MBA-12, en el que se aprecian las siguientes bandas correspondientes al grupo amida: a 1655 cm^{-1} (banda de amida I) debido a la vibración de tensión del enlace C=O, acoplada con la vibración de tensión del enlace C-N; a 1532 cm^{-1} que es una banda asociada principalmente a la vibración de deformación del enlace N-H (banda de amida II), pero también está relacionada con la vibración de tensión del enlace C-N; asimismo, la banda a 1295 cm^{-1} también se asigna a vibración de tensión del enlace C-N; la banda a 3263 cm^{-1} se asocia con la vibración de tensión del enlace N-H en amidas secundarias. Otras bandas son asignadas al anillo aromático: a 1487 y 1577 cm^{-1} podrían corresponder a bandas de respiración del anillo; varias bandas no bien definidas que aparecen en la zona de 3029 cm^{-1} se asignan a vibraciones de tensión de los enlaces C-H. Del resto de la molécula se observan las vibraciones de tensión simétrica y asimétrica de los enlaces C-H de los grupos CH_2 a 2958 y 2854 y vibraciones de flexión de CH_2 a 1469 cm^{-1} y de tensión del enlace C-N^+ a 1334 cm^{-1} . La vibración de tensión del enlace $\text{N}^+\text{-H}$ suele aparecer como una banda fuerte en la región $3070\text{-}2370\text{ cm}^{-1}$ y es indicativa de moléculas enlazadas por puentes de hidrógeno en conformación trans. En el caso de MBA-12, se observa una banda de absorción fuerte a 3263 cm^{-1} , e incluso la banda a 3029 cm^{-1} , anteriormente asignada a los enlaces C-H del anillo, podría estar en parte relacionada también con dicho enlace $\text{N}^+\text{-H}$.

La adsorción de micelas mixtas de MBA-12/B266 sobre montmorillonita no produjo cambios muy significativos en el espectro de infrarrojos (figura 4.43 e). La banda a 1120 cm^{-1} del surfactante B266 puro, relacionada con los grupos etoxilos, se ve alterada tras su adsorción en montmorillonita apareciendo varias bandas a menores frecuencias (1117 cm^{-1} y otras bandas pequeñas sobre la banda ancha del mineral a 1046 cm^{-1}), y que tal como se comentó anteriormente, es indicativo de interacciones de estos grupos con la superficie de la arcilla.

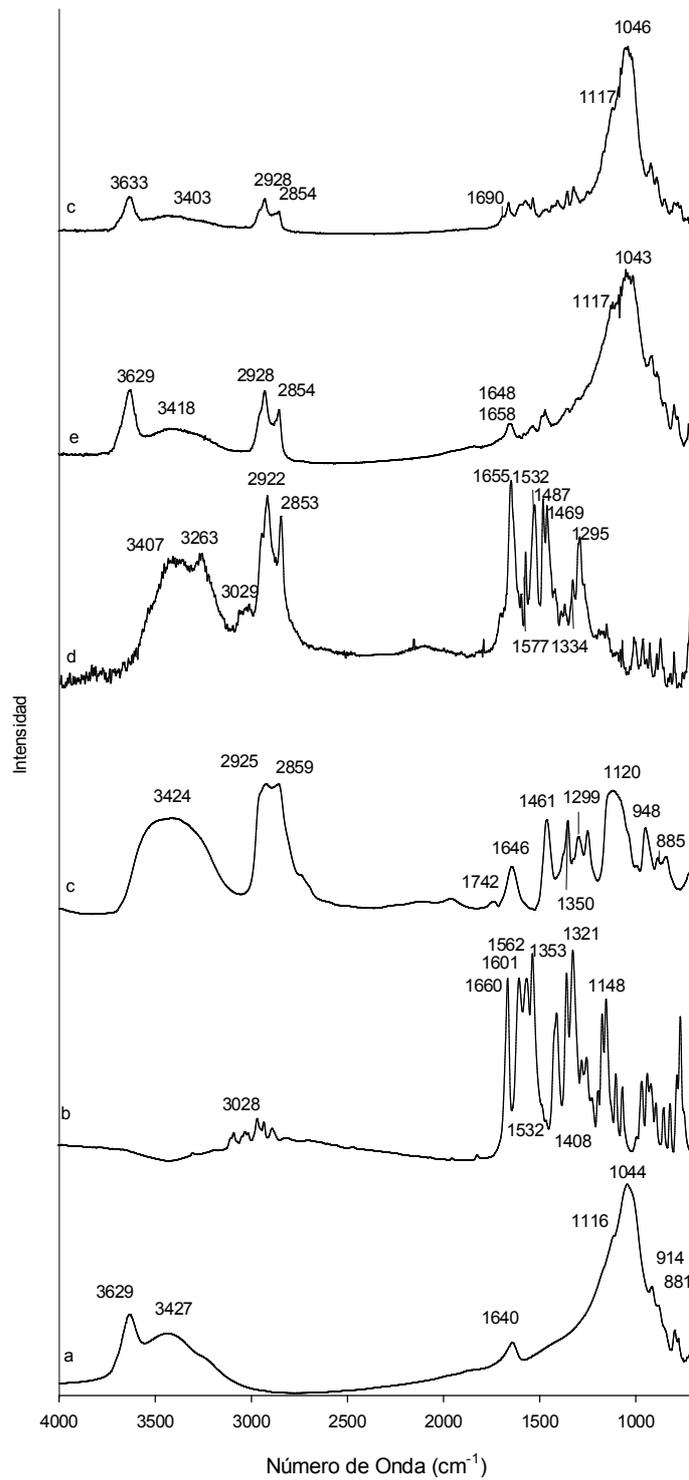


Figura 4.43. Espectros por IR de la formulación B266MBA-12MS: a) Montmorillonita Swy-2, b) MS, c) B266, d) MBA-12, e) B266MBA12; f) B266MBA-12MS

Por parte de MBA-12 no se observan las bandas a 3263 y 3029 cm^{-1} . Ello podría indicar la ruptura de enlaces de H entre las moléculas de MBA-12 por interacción directa con la arcilla, a través de fuertes interacciones entre el grupo amonio con carga positiva del surfactante con la superficie negativamente cargada de la arcilla, con restricción en el movimiento de los grupos gem-metilos unidos al grupo amonio cuaternario (desaparición de la banda a 1334 cm^{-1} del enlace C-N⁺) por interacción electrostática con la superficie de la arcilla.

Tras interacción de las micelas cargadas con MS, es de destacar la disminución en la frecuencia de la banda del agua de hidratación interlaminar a 3418 cm^{-1} en el complejo MBA12/B266/SWy-2 hasta 3403 cm^{-1} en la formulación con MS, así como de su intensidad, indicando que parte del agua ha sido desplazada del espacio interlaminar. En lo que respecta a las bandas del herbicida, prácticamente no han sufrido cambios. Se pueden observar las bandas del grupo SO₂ a 1353 y 1320 cm^{-1} (esta última ya muy solapada por la banda ancha de los grupos Si-O de la montmorillonita), las bandas a 1532 y 1353 cm^{-1} del grupo NO₂, y también una banda a 1658 cm^{-1} que se corresponde con el grupo C=O de cetonas. Ello indica que la mesotriona está adsorbida en esta formulación en su forma ceto, y no en su forma aniónica como ocurría en el caso de la formulación con el complejo SWy-2/ET15 que se estudió anteriormente. Tan solo aparece una pequeña banda a 1690 cm^{-1} que podría asignarse a la forma aniónica del herbicida, pero es insignificante comparada con la de la forma ceto neutra. Ello parece indicar que la interacción del herbicida ha de estar produciéndose preferentemente a través del surfactante no iónico B266, y en menor proporción a través del surfactante catiónico MBA-12. Se observa también una banda a 1574 cm^{-1} que en Mesotriona aparecía a 1562 cm^{-1} y se asociaba a enlaces de hidrógeno entre las moléculas del herbicida a través del grupo carbonilo. El hecho de que haya sufrido este desplazamiento podría indicar que la interacción del herbicida en forma neutra con B266 se está produciendo también a través de enlaces tipo puentes de hidrogeno.

4.3.5. Comportamiento de las FLC herbicidas-micelas mixtas-montmorillonita en el sistema suelo-agua

4.3.5.1. Estudios de liberación in vitro.

El perfil de liberación in vitro de la FLC de Mesotriona basada en micelas mixtas MBA-12/B266 fue progresivo a lo largo del tiempo. En la Figura 4.44, se observa que la liberación de la

FLC fue más lenta que la del producto técnico. Al final del experimento no llega a liberarse el 100% de la MS que contenía la FLC, siendo un 80% aproximadamente el contenido total liberado para la formulación MBA-12/B266/MS. La liberación es rápida en el producto técnico, de forma que las 8 primeras horas ya se había liberado más del 50% de MS. Sin embargo, en el mismo tiempo sólo se había liberado un 17% del i.a. de la FLC.

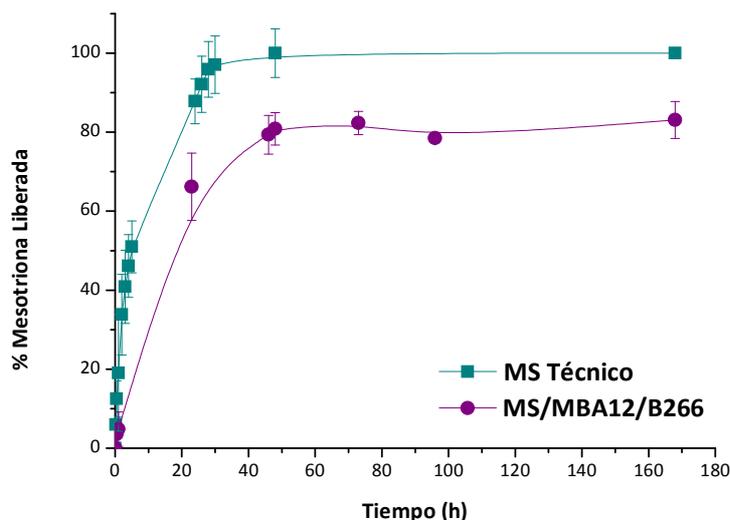


Figura 4.44. Porcentajes de Mesotriona Liberada en agua desde las diferentes formulaciones tanto comercial como FLC (% acumulado)

Como en apartados anteriores y se analizó el tipo de liberación del herbicida ajustándolo al modelo de Ritger-Peppas (1987). En la Tabla 4.15 se muestra el coeficiente de correlación obtenido para la formulación. El valor de R^2 indica que los datos experimentales se ajustan bien al modelo. El valor de n fue 0,47 para MS/B266/MBA-12, por lo que el mecanismo de liberación de MS desde las FLC se corresponde con una liberación tipo Fickian. Este tipo de liberación indica que en el caso de las formulaciones surfactante-arcilla el herbicida no está interaccionando con la arcilla si no que está inmerso en una matriz del surfactante adsorbido a su vez en la arcilla. Una matriz compleja de estas características habría producido desviaciones de los valores de la n de la situación ideal para un sistema de tableta monolítico (0,50).

Tabla 4.15. Valores de los parámetros de la ecuación de Ritger-Peppas correspondientes al estudio de liberación de Mesotriona de FLC basadas en micelas mixtas y Montmorillonita.

Ecuación	Formulación	$K_1 (h)^n$	n	R ²
$\frac{M_t}{M_0} = K_1 t^n$	MS/B266/MBA-12	0,134±0,025	0,47±0,05	0,97

De las constantes K y n se calcularon los valores $t_{1/2}$ (h) que es el tiempo necesario para la liberación del 50% del herbicida (Tabla 4.15), siendo para esta formulación 19 h.

4.3.5.2. Estudios de lixiviación y bioactividad de la FLC de Mesotriona basada en micelas mixtas y montmorillonita

Se siguió la movilidad del herbicida con formulaciones de Mesotriona usando condiciones similares a las existentes en el campo mediante el empleo de columnas empaquetadas con el suelo CR. La cantidad de Mesotriona retenida en la capa superior (0-3 cm) al aplicar la FLC fue de aproximadamente 50% (Figura 4.45), lo que significa una reducción importante en la lixiviación con respecto a la FC, ya que no se determinó ninguna cantidad de Mesotriona asociada a la FC en la capa superior de la columna por haber lixivado a mayor profundidad. En el segmento siguiente (3-6 cm), la FLC presentó una cantidad también superior a la FC. Este fenómeno viene definido por la lixiviación de la mayor parte de la FC a las capas inferiores del suelo. Esto indica que la FLC lixivía menos y queda retenida en las capas más superficiales del suelo donde debe ejercer su efecto herbicida.

Una vez concluidos los experimentos de lixiviación de Mesotriona en columnas de suelo, se determinó la bioactividad del herbicida, presente en cada segmento de las columnas utilizadas, tanto de la FC como de la FLC de Mesotriona, mediante la realización de bioensayos con plantas de girasol en los que se cuantificó el efecto blanqueante del herbicida con una curva dosis-respuesta (% de inhibición de la clorofila respecto a un control).

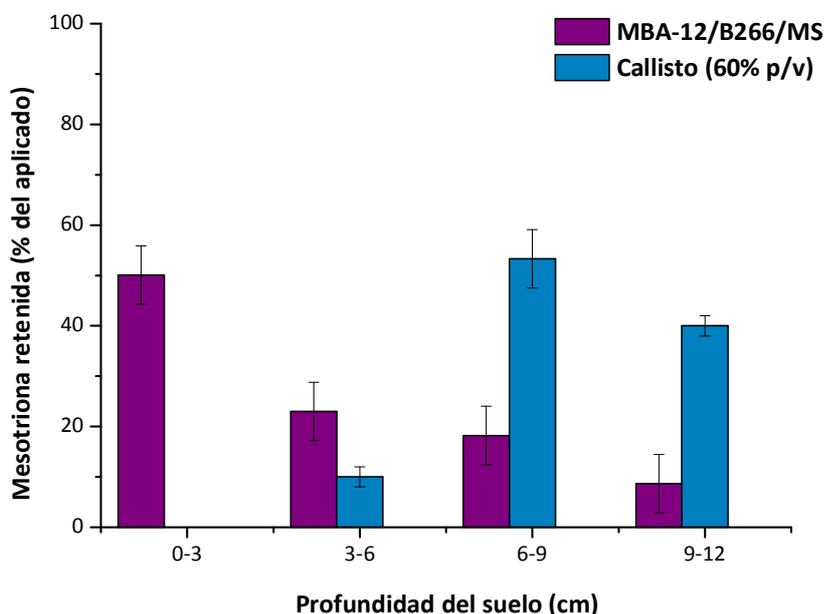


Figura 4.45 Porcentajes de Mesotriona retenidos tras 70 mm de lluvia en columnas de suelo CR en función de la profundidad en experimentos de lixiviación

Los resultados de la actividad herbicida se muestran en la Figura 4.46. En el anillo superior (0-3 cm) se obtuvo un porcentaje de inhibición de la clorofila de más del 80% para la FLC, pero con la FC no se obtuvo ninguna inhibición, confirmando con esto la ausencia de Mesotriona en el primer anillo, tal y como se muestra en la Figura 4.45. En los dos anillos siguientes (3-6 cm), la FLC todavía presentó un porcentaje de inhibición mayor que la FC concordando con los resultados obtenidos en el experimento de lixiviación. Pero en los dos casos profundidades inferiores (6-9 y 9-12 cm) donde la concentración de MS proveniente de las FC era mayor, se observó una inhibición cercana al 80%, mientras que la inhibición proveniente de la FLC disminuía cada vez más. Se pone de manifiesto que los valores de inhibición obtenidos están de acuerdo con el patrón de distribución y con los valores referidos al porcentaje remanente de MS en las columnas.

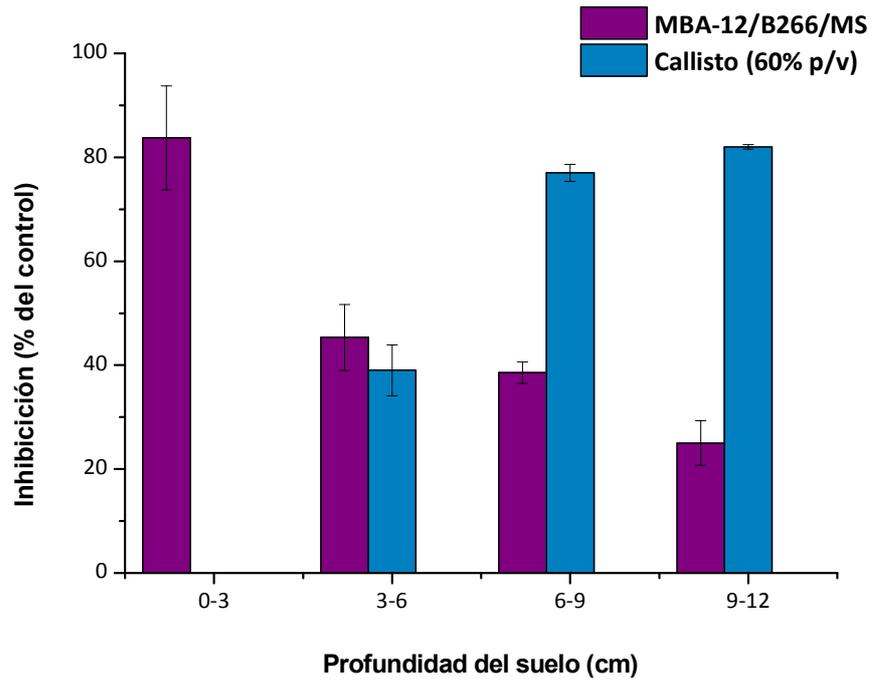


Figura 4.46. Actividad herbicida de Mesotriona a diferentes profundidades de las columnas del suelo CR tras 70 mm de lluvia

Conclusiones

1. La solubilización de los herbicidas por los surfactantes seleccionados dependía de su estructura molecular. El uso de tres herbicidas pertenecientes a distintas familias químicas cambiaba su modo de solubilización. Mientras que el herbicida Metribuzina se solubilizaba en la capa externa de las micelas con la parte polar de Metribuzina incorporada entre los grupos polares, y con la parte más hidrofóbica hacia la parte nuclear de las micelas; la solubilización del herbicida Flufenacet tenía lugar en el núcleo micelar a través de interacciones hidrofóbicas, y el herbicida Mesotriona mediante interacción con los grupos polares de las micelas.
2. La adsorción de los surfactantes en Montmorillonita tenía lugar a través de mecanismos diferentes con la amina etoxilada ET15 y con los beroles B048 y B266. El surfactante ET15 se adsorbía a través de interacciones de tipo electrostáticas por intercambio catiónico, adoptando distintas conformaciones a medida que incrementaba la carga del surfactante, yendo de monocapa a bicapa, y conformación parafínica con el grupo polar hidratado planar a la superficie de la arcilla creando huecos en los que se intercalaban los herbicidas Flufenacet y Mesotriona. La alta adsorción de Mesotriona producía un aumento en el espaciado basal debido a una disposición más perpendicular de las cadenas hidrofóbicas, y una deshidratación de la arcilla al reemplazarse moléculas de agua con el herbicida. En los beroles, la disposición del surfactante en la arcilla era de bicapa, con una gran interacción entre los grupos etoxilos y la superficie de la arcilla, no incrementándose su espaciado basal tras adsorción de los herbicidas.
3. Para el diseño de formulaciones herbicidas-surfactante-montmorillonita se realizó una aproximación para el cálculo teórico de contenido de ingrediente activo basándose en: (i) modelización de la adsorción de los surfactantes usando la ecuación de Langmuir-Scatchard, lo que permitió la determinación de los coeficientes de enlace además de predecir las cantidades máximas de cada surfactante que podían adsorberse en la superficie de la arcilla; (ii) la máxima solubilidad de los herbicidas mediante incorporación en micelas para las concentraciones de surfactantes empleadas; y (iii), la máxima adsorción de herbicida posible (considerando que existe la misma proporcionalidad entre el herbicida y el surfactante en solución y aquel adsorbido en la superficie de la arcilla), en un amplio rango de relación arcilla/surfactante. Se mostró la factibilidad de esta aproximación mediante el buen ajuste entre las cantidades experimentales y predichas para distintas relaciones herbicida/surfactante/arcilla con los herbicidas Flufenacet y Mesotriona, pero no con Metribuzina debido probablemente a su alta solubilidad intrínseca y baja solubilización con surfactantes. Esta aproximación permitió la

obtención de formulaciones de Flufenacet y Mesotriona con contenidos de ingrediente activo de hasta el, 17,7 y 13,3%, respectivamente.

4. Experimentos de liberación in vitro de las formulaciones de Flufenacet, Mesotriona y Metribuzina previamente preparadas, presentaron una cinética de liberación en agua más lenta que la de los herbicidas técnicos, correspondiendo a una liberación de tipo Fickian que indicaba que se trataba de un proceso controlado por difusión de las moléculas de herbicida desde la matriz.
5. Con las formulaciones de Flufenacet diseñadas, se realizaron experimentos de lixiviación en columnas de suelo, mostrando una fuerte reducción en los suelos AL, LT y CR. En el suelo AL el herbicida FLF quedó más retenido en el primer anillo para la FLC FLF/B048 (17,7% i.a) a ambos regímenes de lluvia, siendo 100% bioactiva. Para el suelo LT, ambas FLCs quedaron más retenidas en el primer anillo, lixiviando a mayor profundidad a mayores regímenes de lluvia (0-4 cm 60% y 4-8 cm 40%) aun así la FC se encontraba más retenida (60%) en el segundo anillo y lixivió a capas más profundas. Por lo general, el herbicida permaneció en la capa superior de los mismos al emplear las FLCs frente a la FC se concentraba a profundidades más bajas. En el suelo franco-arenoso (CR), a mayores regímenes de lluvia, fue posible observar diferencias entre las dos FLCs. De FLF/ET15 permaneció un 80% en el primer anillo, mientras que de FLF/B048 un 40%, en comparación con la formulación comercial de la que sólo estaba presente un 20%. Ello fue debido a la menor adsorción del herbicida en este suelo más arenoso.
6. Experimentos de lixiviación de mesotriona en columnas de suelo indicaron una reducción en la lixiviación de esta FLC frente a la FC. Mientras la formulación comercial eluía completamente en el primer anillo dando mayores concentraciones en las capas más profundas del suelo llegando a alcanzar un 50% del herbicida retenido en el tercer anillo, la FLC retenía el 43,4% del herbicida y era bioactiva mostrando un 70% de inhibición en un cultivo de girasol.
7. Se seleccionó como formulación a ensayar en experimentos de campo la formulación de Mesotriona obtenida mediante el empleo de concentraciones iniciales de 3,99 g L⁻¹ de herbicida, 12 g L⁻¹ del surfactante ET 15 y 10 g L⁻¹ de montmorillonita, debido al contenido alto de sustancia activa (13,3%), su menor liberación en agua a lo largo del tiempo respecto a la formulación comercial y a la disminución en la lixiviación en columnas de suelo. En los estudios de campo, se puso de manifiesto 25 días después de su aplicación a la dosis recomendada, la completa desaparición de malas hierbas en el caso de la FLC, pero no con la FC. Ello era consecuencia de la mayor pérdida por lixiviación sufrida por la FC hacia capas más profundas del suelo, mientras

que una gran parte de la FLC permanecía en las capas más superficiales del mismo. Como consecuencia, esta formulación presentó menores problemas de persistencia en el suelo una vez concluido el cultivo, pues su degradación fue más rápida al encontrarse en los primeros centímetros en la superficie del suelo.

8. La solubilización de MS incrementó enormemente mediante el uso de sistemas mixtos de surfactantes, especialmente con el sistema MBA-12/B266. Ello es debido a su gran compatibilidad estructural que explica la enorme reducción en la cmc respecto a la predicha usando las concentraciones individuales, y por tanto, una mayor concentración de micelas cargadas en solución capaces de interaccionar con el herbicida, con respecto a las formadas por sistemas individuales de estos surfactantes. Además, dicho sistema presenta una gran densidad de carga positiva que incrementa la solubilización. Estos dos factores permitieron obtener formulación de MS con un contenido alto de ingrediente activo (13.5% p:p), incapaces de obtener mediante el uso de los surfactantes individuales.

9. Los experimentos de lixiviación para la FLCs basada en micelas mixtas indicaron menor lixiviación a capas inferiores del suelo, quedando un 50% retenido en el primer anillo, mientras que la FC había eluido completamente. Los resultados obtenidos mediante bioensayo de la fórmula B266MBA-12MS muestran también una gran bioactividad del herbicida en la capa superior del suelo con las FLCs (80% de inhibición).

Como resumen de todas las conclusiones anteriores se puede decir que se ha demostrado la viabilidad de un procedimiento para la obtención de FLCs mediante la encapsulación de plaguicidas en micelas de surfactantes y posterior adsorción de éstas en la superficie de un mineral de arcilla. La validación de esta aproximación permite un ahorro tanto de costes materiales como de tiempo en el diseño y obtención de formulaciones de plaguicidas basadas en complejos surfactantes/minerales de arcilla. Estas formulaciones presentan una menor toxicidad que las FCs correspondientes, y al mismo tiempo presentan ventajas adicionales tales como reducción de la lixiviación de la sustancia activa así como el mantenimiento de su bioactividad. El impacto de estas formulaciones tanto en la funcionalidad del suelo como en la estructura microbiana es mínimo y de menor grado que el ejercido por las FCs.

Bibliografía

- Andrades M.S., Rodríguez-Cruz M.S., Bernal M.A., Sánchez-Martín M.J., Sánchez-Camazano M. Influencia de la modificación de suelos con un surfactante catiónico en el incremento de adsorción de pesticidas por suelos. Estudios de la zona No saturada del suelo Vol.VI. Álvarez-Benedi y Marinero P. 2003.
- Abelmann K., Kleineidam S., Knicker H., Grathwohl P., Kögel- Knabner I. Sorption of HOC in soils with carbonaceous contamination: Influence of organic-matter composition. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 168, 1-14 (2005).
- Al-Kathib K., Uland J.B., Olson B., Graham D.W. Alachlor and metolachlor transformation pattern in corn and soil. *Weed Sci.* 2002; 50: 581-586.
- Al-Wardian, A.; Glenn, K.M.; Palepu, R.M. Thermodynamic and interfacial properties of binary cationic mixed systems. *Colloids Surf. A.* 247, 115-123 (2004).
- Albro P.; Parker C.; Marbury G.; Hernandez O.; Corbin F. Spectrometric Characterization of Metribuzin and its Metabolites. *Appl. Spectrosc.* 1984, 38, 556-562
- Alferness P. and Wiebe L. Determination of mesotrione residues and metabolites in crops, soil and water by liquid Chromatography with Fluorescence detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* *J.Agric Food Chem.* 2002, 50 3926-3934.
- Andrades M.S., Rodríguez-Cruz M.S., Sánchez-Martín M.J., Sánchez-Camazano M. Effect of the modification of natural clay minerals with hexadecylpyridinium cation on the adsorption-desorption of fungicides. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 2004; 84: 133-141.
- Andrades M.S., Sánchez-Martín M.J., Sánchez-Camazano M. Significance of soil properties in the adsorption and mobility of the fungicide metalaxyl in vineyard soils. *J. Agric. Food Chem.* 2001; 49: 2363-2369.
- Arshady, R. 1999. Microspheres, microcapsules & liposomes. The MML Series. Vol. 1. Preparation & Chemical Applications. Citus Books, London, United Kingdom, 576 pp.
- Ashton F.M., Crafts A.S. Mode of action of herbicides. John Wiley and Sons, Inc. (NY). 1981.
- Aulton M. E. Farmacia, La Ciencia del diseño de las formas farmacéuticas. 2ª ed. Elsevier. 2004.
- Barry, B.W.; El Eini, D.I.D. Solubilization of hydrocortisone, dexamethasone, testosterone and progesterone by long-chain polyoxyethylene surfactants. *J. Pharm. Pharmacol.* 1976, 28, 210-218.
- Bending G.D.; Rodríguez-Cruz M.S. Microbial aspects of the interaction between soil depth and biodegradation of the herbicide isoproturon. *Chemosphere* 2007, 66, 664-671.
- Bending G.D.; Rodríguez-Cruz M.S.; Lincoln, S.D. Fungicide impacts on microbial communities in soils with contrasting management histories. *Chemosphere* 2007, 69, 82-88.
- Bérlabi, H.; Bendedouch, D.; Bouanani, F. Mixed micellization properties of nonionic fluorocarbon/cationic hydrocarbon surfactants. *J. Surfact. Deterg.* 13, 433-439 (2010).
- Blumhorst, M.R.; Weber, J.B. Cyanazine dissipation as influenced by soil properties. *J. Agric. Food Chem.* 1992, 40, 894-897.
- Brito R.O., Marques E.F., Gomes P., Falcão S., Söderman O. Self-Assembly in a Catanionic Mixture with an Aminoacid-Derived Surfactant: From Mixed Micelles to Spontaneous Vesicles. *J. Phys. Chem.* 2006; 110: 18158-18165.

Bibliografía

- Calvet R. Adsorption of organic chemicals in soils. *Environ. Health Persp.* 1989; 88: 145-177.
- Carrizosa, M.J.; Hermosín, M.C.; Koskinen, W.C.; Cornejo, J. Use of organosmectites to reduce leaching losses of acidic herbicides. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 2003, 67, 511-517.
- Carter A.D. "Leaching mechanism". En: *Pesticide Chemistry and Bioscience, the Food-Environment Challenge*. Brooks & Roberts, Eds. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, (UK) 291-301. 1999.
- Carter A.D. Herbicide movement in soils: principles, pathways and processes. *Weed Res.* 2000; 40: 113-122.
- Celis, R.; Trigo, C.; Facenda, G.; Hermosín, M.C.; Cornejo, J. Selective modification of clay minerals for the adsorption of herbicides widely used in olive groves. *J. Agric. Food Chem.* 2007, 55, 6650-6658.
- Chen X., Yin J., Li P., He M., Jin L., Wu J., Yang S., Hu D. Synthesis and Antibacterial Activity of Bisthioether Derivates Containing a 1,3,4- Thiadiazoles Moiety. Phosphorus Sulfur Silicon Relat. Elem. 2014, 189, 134-142,
- Cheng H. (Ed.). *Pesticides in the soil environment: processes, impacts and modeling*. Soil Sci. Soc. Am. J. Madison (WI). 1990.
- Chevillard, A., Angellier-Coussy, H., Guillard, V., Gontard, N., Gastaldi, E.. Investigating the biodegradation pattern of a ecofriendly pesticide delivery system based on wheat gluten and organically modified montmorillonites. *Polymer Degradation and Stability.* 2012,97, 2060-2068.
- Chevillard, A., Angellier-Coussy, H., Peyron, S., Gontard, N., Gastaldi, E.. Investigating Ethofumesato-Clay Interactions for Pesticide Controlled Release. *Soil Chemistry.* 2012, 76;2, 420-431.
- Clint, J.H. Micellization of mixed nonionic surface active agents. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 71, 1327-1334.
- Coates J. Interpretation of Infrared spectra, A Practical Approach. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. R.A. Meyers. 2000, 10815-10837.
- Cotterill, J.V.; Wilkins, R.M. Controlled release of phenylurea herbicides from a lignin matrix: Release kinetics and modification with urea. *J. Agric. Food Chem.* 1996, 44, 2908-2912.
- Davis, R.F.; Wauchope, R.D.; Johnson, A.W.; Burgos, B.; Pepperman, A.B. Release of fenamiphos, atrazine, and alachlor into flowing water from granules and spray deposits of conventional and controlled-release formulations. *J. Agric. Food Chem.* 1996, 44, 2900-2907.
- del Hoyo C.; Dorado C.; Rodríguez-Cruz M. S.; Sanchez-Martín M. J. Physico-Chemical Study of Selected Surfactant-Clay Mineral Systems. *J. therm. Anal. Cal.* 2008, 94,227-234.
- Deng Y.; Dixon.; Noman White G. Bonding mechanism and conformation of poly(ethylene oxide)-based surfactants in interlayer of smectite. *Colloid Polym. Sci.* 2006, 284, 347-356
- Deng Y.; Dixon.; Noman White G. Intercalation and surface modification of smectite by two non-ionic surfactants. *Clays and Clay minerals.* 2003, 51, 150-161 Bonding mechanism and conformation of poly(ethylene oxide)-based surfactants in interlayer of smectite. *Colloid Polym. Sci.* 2006, 284, 347-356

- Dubey, N. Studies of mixing behavior of cationic surfactants. *Fluid Phase Equilib.* 368, 51-57 (2014).
- Edwards, D.A., Adeel, Z., Luthy, R.G.. Distribution non-ionic surfactant and phenantrene in a sediment/aqueous system. *Environ. Sci. Technol.* 1994, 28,1550-1560,
- El-Bahri, Z.; Taverdet, J.L. Elaboration and characterisation of microparticles loaded by pesticide model. *Powder Technol.* 2007, 172, 30-40.
- El-Nahhal, Y.; Nir, S.; Polubesova, T.; Margulies, L.; Rubin, B. Leaching, phytotoxicity and weed control of new formulations of alachlor. *J. Agric. Food Chem.* 1998, 46, 3305-3313.
- El-Nahhal, Y.; Undabeytia, T.; Polubesova, T.; Mishael, Y.; Nir, S.; Rubin, B. Organo-clay formulations of pesticides: reduced leaching and photodegradation. *Appl. Clay Sci.* 2001, 18, 309-326.
- Engberts J. B. F. N., Hoekstra D. Vesicle-Forming Synthetic Amphiphiles. *Biochim. Biophys. Acta.* 1995; 1241: 323-340.
- European Commission 2003 EUROPEAN COMMISSION HEALTH & CONSUMER PROTECTION DIRECTORATE-GENERAL Directorate E – Food Safety: plant health, animal health and welfare, international questions
E1 - Plant health Flufenacet 7469/VI/98-Final 3 July 2003
- Ezquerro C.; Ibarz G.; Crespo C.; Sacristán J. Characterization of montmorillonites modified with organic divalent phosphonium cations. *Appl. Clay Sci.* 2015, 111,1-9
- Fekete R., Marosi G., Fekete P., dredán J., Marton S., Antal I. Structural characteristics and permeability of ethyl cellulose films containigs different plasticizers. *Macromolecular symposium.* 2006, 239, 105-113.
- Fendler J.H., Fendler E.J. *Catalysis in Micellar and Macromolecular Systems.* Academic Press (NY). 1975.
- Fernandes R.M.F., Marques E.F., Silva B.F.B., Wang Y. Micellization Behavior of a Catanionic Surfactant with High Solubility Mismatch: Composition, Temperature, and Salt Effects. *J. Mol. Liq.* 2010; 157: 113–118.
- Fernández-Pérez, M. Controlled release systems to prevent the agro-environmental pollution derived from pesticide use. *J. Environ. Sci. Health B* 2007, 42, 857-862.
- Fernández-Urrusuno, R.; Ginés, J.M.; Morillo, E. Development of controlled release formulations of alachlor in ethylcellulose. *J. Microencapsulation* 2000, 17, 331-342.
- Flores-Céspedes, F.; Villafranca-Sánchez, M.; Pérez-García, S.; Fernández-Pérez, M. Modifying sorbents in cotrolled release formulations to prevent herbicides pollution. *Chemosphere* 2007, 69, 785-794.
- Fournier J.C.; Soulas G.; Parekh, N.R. “Main microbial mechanism of pesticide degradation in soils”. En: *Soil Ecotoxicology.*1997. ARC Press, Inc. (Ed.), NY, pp. 85-116.
- Frost R.; Rintoul. Lattice vibrations of montmorillonite: an FT Raman and X-ray diffraction study. *Appl. Clay Sci.* 1996, 11,171-183

Bibliografía

- Gajbhiye V.T. y Gupta S., Adsorption-Desorption behavior of Flufenacet in five different soils of India. *Pest Manag Sci.* 2001, 57, 633-639
- Galán-Jiménez M.C., Michael Y., Nir S., Morillo E., Undabeytia T., Factors Affecting the Design of Slow Release Formulations of Herbicides Based on Clay-surfactant Systems. A methodological Approach. *PLOS ONE.* 2013, 8: 1-9
- Gan, Y.; Hussain, M.; Rathor, N.M. Behaviour of an alginate-kaolin based controlled-release formulation of the herbicide thiobencarb in simulated ecosystems. *Pestic. Sci.* 1994, 42, 265-272
- García-Torres L., Fernández-Quintanilla C. Fundamentos sobre malas hierbas y herbicidas. M. A P. A, Publicaciones del Servicio de Extensión Agraria, Madrid. 1991
- Garrido-Herrera, F.J.; González-Pradas, E.; Fernández-Pérez, M. Controlled release of isoproturon, imidacloprid, and cyromazine from alginate-bentonite-activated carbon formulations. *J. Agric. Food Chem.* 2006, 54, 10053-10060.
- Gautam K.K., Tyagi V.K. Microbial Surfactants: a Review. *J. Oleo Sci.* 2006; 55: 155-166.
- Gerstl, Z.; Nasser, A.; Mingelgrin, U. Controlled release of pesticides into water from polymer formulations. *J. Agric. Food Chem.* 1998, 46, 3803-3809.
- Gómez de Barreda D., Gamón M., Lorenzo E., Sáez A. Residual herbicide movement in soil columns. *Sci. Total Environ.* 1993; 132: 155-165.
- Griffin W.C. Classification of Surface-Active Agents by HLB. *J. Soc. Cosmetic. Chem.* 1949; 1: 311-326.
- Gunasekara, A.S.; Xing, B.S. Sorption and desorption by soil organic matter: Importance of aromatic and aliphatic components. *J. Environ. Qual.* 2003, 32, 240-246.
- Gupta S., Gajbhiye V.T. y Agnihotri N. P., Adsorption-Desorption, Persistence, and Leaching Behavior of flufenacet in Alluvial soil of India. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 2001, 66, 9-16,
- Gupta S., y Gajbhiye V.T. Effect of Concentration, moisture and soil type on the dissipation of flufenacet from soil. *Chemosphere.* 2002,47,901-906,
- Gustafson A.I. Groundwater ubiquity store: a simple method for assessing pesticide leachability. *Environ.Toxicol. Chem.* 1989; 8: 339-357.
- Gutiérrez H., Arregui M.C. Comportamiento de los herbicidas en suelos, agua y plantas. *FAVE.* 2000; 14: 73-89.
- Hao J., Hoffmann H. Self-Assembled Structures in Excess and Salt-Free Catanionic Surfactant Solutions. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 2004; 9: 279-293.
- Hartley G.S. Aqueous Solution of the Paraffin-Chains Salts: a Study in Micelles fFormation. Hermann, París. 69 pp. 1936.
- Hartley G.S., Gram-Bryce I.J. Physical principles of pesticides behaviour. Academic Press, London. 1980.

- Hausman N. E., Singh S., Tranel P.J., Riechers D. E., Kaundun S. S., Polge N. D., Thomasd D. A., and Hagera A. G.. Resistance to HPPD-inhibiting herbicides in a population of waterhemp (*Amaranthus tuberculatus*) from Illinois, United States. *Pesticide Manager Science* 2011; 67: 258-261. Society of Chemical Industry, 2011
- Hess F. D., Foy C. L. Interaction of Surfactants with Plant Cuticles. *Weed Technol.* 2000; 14: 807-813.
- Hirech, K.; Payan, S.; Carnelle, G.; Brujes, L.; Legrand, J. Microencapsulation of an insecticide by interfacial polymerization. *Powder Technol.* 2003, 130, 324-330.
- Hoffman, H.; Pössnecker, G. The mixing behavior of surfactants. *Langmuir* 10, 381-389 (1994).
- Holland P.M., Rubingh D.N. Mixed Surfactant Systems. ACS Symposium Series, 1992.501, 57-91.
- Israelachvili J.N., Mitchell D.J., Ninham B.W. Theory of self-assembly of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers. 1976; 72: 1525-1568.
- Jaynes W., Vance G. BTEX sorption by organo-clays: Cosorptive enhancement and equivalence of interlayer complexes. *SOIL SCIENCE SOCIETY OF AMERICA JOURNAL.* 1996, 60, 6, 1742-1749.
- Jiménez D., Moreno S.A., Gracida J.N. Propiedades, aplicaciones y producción de biotensioactivos. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 2010; 26(1): 65-84.
- Kaler E.W., Murthy A. K., Rodríguez B.E., Zasadzinski J.A.N. Spontaneous Vesicle Formation in Aqueous Mixtures of Single-Tailed Surfactants. *Science (Washington, DC).* 1989; 245: 1371-1374.
- Katagi T. Surfactants Effects on Environmental Behavior of Pesticides. *Reviews Of Environmental Contamination and Toxicology.* 2008; 194: 71-177.
- Katz H., Mishael Y. Reduced Herbicide Leaching by in situ Adsorption of Herbicide-Micelle Formulations to Soils. *J. Agric. Food Chem.* 2014, 62: 50-57
- Khan A., Marques E.F. Synergism and Polymorphism in Mixed Surfactant Systems. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 2000; 4: 402-410.
- Khurama R., Vaidya S., Devi M.M., Ganguli A.K. New Catanionic Surfactants, Phase Stability and Synthesis of Ultrafine CdS Nanoparticles. *J. Colloid Interface Sci.* 2010; 352: 470-475.
- Kile, D.E.; Chiou, C.T. Water solubility enhancements of DDT and trichlorobenzene by some surfactants below and above the critical micelle concentration. *Environ. Sci. Technol.* 1989, 23, 832-838.
- Knicker H. Solid state CPMAS ^{13}C and ^{15}N NMR spectroscopy in organic geochemistry and how spin dynamics can either aggravate or improve spectra interpretation. *Organic Geochem.* 42, 867-890 (2011).
- Knowles D.A. Chemistry and Technology of Agrochemical Formulations. London. Chapman and Hall. 1998.
- Knowles D.A. Trends in pesticide formulation. Agrow Report DS-215. PJB Publications, Surrey. 2001.

Bibliografía

- Knowles D.A. Trends in the use of surfactants for pesticide formulations. *Pestic Outlook*. 1995; 6: 31-34.
- Kudsk P.; Streibig J.C. Herbicides a two edged sword. *Weed Res*. 2003, 43, 90-102.
- Louchart, X.; Lennartz, B.; Voltz, M. Sorption behaviour of diuron under a Mediterranean climate. *Agron. Sustain. Dev*. 2005, 25, 301-307.
- Luning Prak D.J.; Jahraus W. I.; Sims J. M.; Roy MacArthur A. M.. An ¹H NMR investigation into the loci of solubilization of 4-nitrotoluene, 2,6-dinitrotoluene, and 2,4,6-trinitrotoluene in nonionic surfactant micelles. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 375 (2011) 12–22.
- Lunning Prak, D.J. Solubilization of nitrotoluenes in micellar nonionic surfactant solutions. *Chemosphere* 2007, 68, 1961-1967.
- Mallakpour, S.; Dinari, M. Preparation and characterization of new organoclays using natural amino acids and Cloisite Na⁺. *Applied Clay Science*. 2011, 51, 353-359.
- Mallory-Smith, C.A., Retzinger, E. J.; Revised Classification of Herbicides by Site of Action for Weed Resistance Management Strategies. *Weed Technology*. 2003 17(3): 605-619.
- Maqueda C.; Partal P.; Villaverde J.; Perez-Rodriguez J. L. Characterization of sepiolite-gel-based formulations for controlled release of pesticides. *Appl. Clay Sci*. 2009a, 46, 289–295
- Maqueda, C., Villaverde, J., Sopeña, F., Undabeytia, T., Morillo, E.. Effects of Soil Characteristics on Mtribuzin Dissipation Using Clay-Gel-Based Formulations. *J. Agri. Food Chem*. 2009b, 57, 3273-3278.
- Margulies, L.; Stern, T.; Rubin, B. Slow release of S-ethylidipropylcarbamothioate from clay surfaces. *J. Agric. Food Chem*. 1994, 42, 1223-1227.
- Margulies, L.; Stern, T.; Rubin, B.; Ruzo, L. Photo-stabilization of trifluralin adsorbed on a clay matrix. *J. Agric. Food Chem*. 1992, 40, 152-155.
- Marques E.F. Size and Stability of Catanionic Vesicles: Effects of Formation Path, Sonication, and Aging. *Langmuir*. 2000; 16: 4798-4807.
- Martin-Neto, L.; Vieira, E.M.; Sposito, G. Mechanism of atrazine sorption by humic acid: A spectroscopic study. *Environ. Sci. Technol*. 1994, 28, 1867-1873
- Mata J., Varade D., Bahadur P. Aggregation behavior of quaternary salt based cationic surfactants. *Thermochim. Acta* 428, 147-155 (2005).
- Mishael, Y.; Undabeytia, T.; Rytwo, G.; Papahadjopoulos-Sternberg, B.; Rubin, B.; Nir, S. Sulfometuron incorporation in cationic micelles adsorbed on montmorillonite. *J. Agric. Food Chem*. 2002a, 50, 2856-2863.
- Mishael, Y.G.; Undabeytia, T.; Rabinovitz, O.; Rubin, B.; Nir, S. Slow-release formulations of sulfometuron incorporated in micelles adsorbed on montmorillonite. *J. Agric. Food Chem*. 2002b, 50, 2864-2869.
- Mishael, Y.G.; Undabeytia, T.; Rabinovitz, O.; Rubin, B.; Nir, S. Sulfosulfuron incorporated in micelles adsorbed on montmorillonite for slow release formulations. *J. Agric. Food Chem*. 2003, 51, 2253-2259.

- Mitchell G., Bartlett D. W., Fraser T. E., Hawkes T. R., Holt D. C., Townson J. K., and Wichert R. A.. Mesotrione: a new selective herbicide for use in maize. *Pesticide Manager Science* 2001; 57: 120-128. Society of Chemical Industry, 2001
- Morillo E., Undabeytia T., Maqueda C., Ramos A. Glyphosate adsorption on soils of different characteristics. Influence of copper addition. *Chemosphere*. 2000;40: 103-107.
- Morillo, E.; Undabeytia, T.; Cabrera, A.; Villaverde, J.; Maqueda, C. Effect of soil type on Adsorption-desorption, mobility, and Activity of the herbicide Norflurazon. *J. Agric.Food. Chem.* 2004, 52, 884-890.
- Muthmann, R. 2007. "The use of plant protection products in the European Union. Data 1992-2003. Environment and Energy. Statistical Books". Nadin P. (Ed.), págs. 19-32. Office for Official Publications of the European Communities, Luxemburgo.
- Nagarajan, R. Molecular packing parameter and surfactant self-assembly: The neglected role of the surfactant tail. *Langmuir* 2002, 18, 31-38.
- Navarro, S.; Vela, N.; Gimenez, M.J.; Navarro, G. Effect of the temperature on the disappearance of four triazine herbicides in environmental waters. *Chemosphere*. 2004, 24, 51-59.
- Nir, S.; Rubin, B.; Mishael, Y.; Undabeytia, T.; Rabinovitch, O.; Polubesova, T. 2006. Controlled release formulations of anionic herbicides. US Patent Document 7, 030-062 B2.
- Nir, S.; Undabeytia, T.; Yaron-Marcovich, D.; El-Nahhal, Y.; Polubesova, T.; Serban, C.; Rytwo, G.; Lagaly, G.; Rubin, B. Optimization of adsorption of hydrophobic herbicides on montmorillonite preabsorbed by monovalent organic cations: Interaction between phenyl rings. *Environ. Sci. Technol.* 2000, 34, 1269-1274.
- Nitschke M., Pastore G.M. Biosurfactantes: Propiedades e Aplicações. *Quim.Nova*. 2002; 25: 772-776.
- Norrish, K. Forces between clay particles. *Proc. Int. Clay Conf. Madrid*. 1972, 375-383.
- Okahata Y., Kunikate T. Formation of Stable Monolayer Membranes and Related Structures in Dilute Aqueous Solution from Two-Headed Ammonium Amphiphiles. *J. Am. Chem. Soc.* 1979; 101(18): 5231-5234.
- Ortega M. (2009). Comportamiento reológico de disoluciones acuosas de surfactantes comerciales no iónicos (Tesis Doctoral). Granada: Universidad de Granada.
- P. Holland, D. Rubing. D. Rubing, P. Holland (Eds.). *Cationic Surfactants*, Marcel Dekker (NY). 1991
- Pasquali R. C., Bregni C., Serrao R. Geometría de Micelas y otros Agregados de sustancias Anfílicas. *Acta Farm. Bonaerense*. 2005; 24: 19-30.
- Pedraza A.M. (2009). Nuevos métodos Químico-Analíticos basados en procesos de agregación molecular competitiva. (Tesis Doctoral). Córdoba: Universidad de Córdoba.
- Pereira E. I.; Minussi F.B.; da Cruz C.C.T.; Bernardi A.C.C.; Ribeiro C.. Urea-Montmorillonite-Extruded Nanocomposites: A Novel Slow-Release Material. *J. Agric. Food Chem.*, 2012, 60, 5267-5272.

Bibliografía

Piccolo, O.; Borzatta, V.; Delogu, G.; Capparella, E.; De Candia, C.; Gobbi, C.; Di Blasi, G. 2006. Cyclodextrin complex of compositions comprising pesticide and synergist. WO Patent Document 2006111570.

Pisárcik M., Polakovicová M., Devínsky F., Lacko I. Dynamic Light scattering, Interfacial Properties, and Conformational Analysis of Biodegradable Quaternary ammonium Surfactants. *Langmuir*. 2006; 22: 9160-9168.

Polubesoba, T., Nir, S., Rabinovitz, O., Barinoser, M., Rubin, B.. Sulfentrazone Adsorbed on Micelle-Montmorillonite Complexes for Slow Release in Soil. *J. Agri. Food Chem.* 2003,57,3410-3414.

Reiss-Husson F., Luzzati V. The Structure of the Micellar Solutions of Some Amphiphilic Compounds in Pure Water as Determined by Absolute Small-Angle X-Ray Scattering Techniques. *J. Phys. Chem.* 1964; 68: 3504-3511.

Ritger, P.; Peppas, N. A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-Fickian release from non-swelling devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs. *J. Controlled Rel.* 1987, 5, 37-42.

Rodríguez-Cruz M., Sánchez-Martín M., Andrades M., Sánchez-Camazano M. Comparison of pesticide sorption by physicochemically modified soils with natural soils as a function of soil properties and pesticide hydrophobicity. *J. Soil Sedim. Contam.* 2006; 15: 401-415.

Rodríguez-Cruz M.S., Sánchez-Martín M.J., Andrades M.S., Sánchez-Camazano M. Modification of clay barriers with a cationic surfactant to improve the retention of pesticides in soils. *J. Hazard Mater. B.* 2007; 139: 363-372.

Rosen M. *Surfactants and Interfacial Properties*. 3ª Ed. Wiley Interscience (NY). 2004.

Rouchaud J., Neus O., Cools K., Bulcke R. Dissipation of Triketone mesotrione herbicide in the soil of corn crops grown on different soil types. *Toxicological and Environmental Chemistry*. 2000, 77, 31-40

Rouchaud J., Neus O., Cools K., Bulcke R., Flufenacet soil persistence and mobility in corn and wheat crops. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 1999, 63,460-466,

Rubingh, D.N. (1979). *Solution chemistry of surfactants*. Plenum, New York, p. 337.

Salaguer JL, Fernández A. <http://www.firp.ula.ve/archivos/cuadernos/S302.pdf> 24/12/2013; 12:24

Sánchez-Martín M.J., Rodríguez-Cruz M.S., Andrades M.S., Sánchez-Camazano M. 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.

Sanchez-Verdejo, T.; Undabeytia, T.; Nir, S.; Maqueda, C.; Morillo, E. Environmentally friendly slow release formulations of alachlor based on clay-phosphatidylcholine. *Environ. Sci. Technol.* 2008, 42, 5779-5784.

Scher, H.B.; (ED.) *Controlled-Release Delivery Systems for Pesticides*. Marcel Dekker, New York. 1999.

- Sheng, G.; Johnston, C.T.; Teppen, B.J.; Boyd, S.A. Potential contributions of smectite clays and organic matter to pesticide retention in soils. *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49, 2899-2907.
- Shiloach, A.; Blansschtein, D. Measurement and prediction of ionic/nonionic mixed micelle formation and growth. *Langmuir* 14, 7166-7182, 1998.
- Shinoda K., Arai H. The correlation between Phase inversion Temperature in Emulsion and Cloud Point in Solution of noionic Emulsifier. *J. Phys. Chem.* 1964; 68(12): 3485-3490.
- Shukla D., Tyagi V.K. Cationic Gemini Surfactants. A review. *J. Oleo Sci.* 2006; 55: 381-390.
- Silva, I. Halloysita para la liberación controlada de fungicidas iónicos y moleculares en árboles frutales. 2013. <http://uvadoc.uva.es/handle/10324/3912> 09/06/2015; 12:00
- Smith, A.E.; Aubin, A.J. Degradation of [14 C] amidosulfuron in aqueous buffers and in acidic soil. *J. Agric.Food.Chem.* 1993, 22, 2400-2403.
- Sonon, L.S.; Schwab A.P. Transport and persistence of nitrate, atrazine and alachlor in large intact soil columns under two levels of moisture content. *Soil Sci.* 2004, 169, 541-553.
- Sopeña, F.; Cabrera, A.; Maqueda, C.; Morillo, E. Ethylcellulose formulations for controlled release of the herbicide alachlor in a sandy soil. *J. Agric. Food Chem.* 2007a, 55, 8200-8205.
- Sopeña, F.; Maqueda, C.; Morillo, E. Norflurazon mobility, dissipation, activity, and persistence in a sandy soil as influenced by formulation. *J. Agric. Food Chem.* 2007b, 55, 3561-3567.
- Sposito, G.; Martin-Neto, L.; Yang, A. Atrazine complexation by soil humic acids. *J. Environ. Qual.* 1996, 25, 1203-1209.
- Sun Y., Xu Y., Sun Y., Qin X., Wang Q. Dissipation and dynamics of mesotrione in maize and soil under field ecosystem. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 90, 242–247 (2013).
- Taboada, E.R.; Dekker, A.; Van Kammen-Polman, A.; Smelt, J.H.; Boesten, J.; Leistra, M. Adsorption, degradation and leaching of pirimicarb in orchard soils. *Sci. Total Environ.* 1994, 153, 253-260.
- Takasuka M., Saito T., Nakai H. Fourier transform infrared spectrometric study of tautomeric (enol-keto) and dimeric equilibria in 2-hydroxypyridines and 1,3-cyclohexanediones in CHCl₃ and/or CCl₄ solutions. *Vib. Spectrosc.* 13, 65-74 (1996).
- Tanford C. Micelles Shape and Size. *J. Phys. Chem.* 1972; 76: 3020-3024.
- Tanford, C. The hydrophobic effect : Formation of micelles and biological membranes. Wiley, New York, 1973; p. 52.
- Theng, B.K.G.; The chemistry of clay organic reactions. Hilger, London. 1974
- Tokiwa F.. Solubilization Behavior of a Polyoxyethylene Sulfate Type of Surfactant in Connection with the Micellar Charge. *J. Phys. Chem.*, 1968, 72 (12), pp 4331–4333.
- Tondre C., Caillet C. Properties of the amphiphilic films in mixed cationic/anionic vesicles: a comprehensive view from literature analysis. *Adv. Colloid Interface Sci.* 2001; 93: 115-134.

Bibliografía

Tyagi B.; Chudasama C.; Jasra R. Determination of structural modification in acid activated montmorillonite clay by FT-IR spectroscopy. *Spectrochim. Acta A Mol. Biosmol. Spectrosc.* 2006, 64, 273-278

Undabeytia T., Sopena F., Sánchez-Verdejo T., Villaverde J., Nir S., Morillo E., Maqueda C. Performance of Slow-Release Formulations of Alachlor. *Soil & Water Management & Conservation.* 2010, 74, 3, 898-905.

Undabeytia, T.; Mishael, Y.G.; Nir, S.; Papahadjopoulos-Sternberg, B.; Rubin, B.; Morillo, E.; Maqueda, C. A novel system for reducing leaching from formulations of anionic herbicides: Clay-liposomes. *Environ. Sci. Technol.* 2003, 37, 4475-4480.

Undabeytia, T.; Nir, S.; Gomara, M.J. Clay-vesicle interactions: fluorescence measurements and structural implications for slow release formulations of herbicides. *Langmuir* 2004, 20, 6605-6610.

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

Undabeytia, T.; Nir, S.; Rytwo, G.; Serban, C.; Morillo, E.; Maqueda, C. Modeling adsorption-desorption processes of Cu on edge and planar sites of montmorillonite. *Environ. Sci. Technol.* 2002, 36, 2677-2683.

Undabeytia, T.; Nir, S.; Tel-Or, E.; Rubin, B. Photo-stabilization of the herbicide norflurazon by using organo-clay. *J. Agric. Food Chem.* 2000b, 48, 4767-4773.

Undabeytia, T.; Recio, E.; Maqueda, C.; Morillo, E.; Gomez-Pantoja, E.; Sanchez-Verdejo, T. Reduced metribuzin pollution with phosphatidylcholine-clay formulations. *Pest Manag. Sci.* 2011, 67, 271-278.

Undabeytia, T., Recio, E., Maqueda, C., Sánchez-Verdejo, T., Balekb, V.. Slow diuron release formulations based on clay-phosphatidylcholine complexes. 2012. *Applied Clay Science* 55; 53-61

Wang, P.; Keller, A.A. Sorption and desorption of atrazine and diuron onto water dispersible soil primary size fractions. *Water Res.* 2009, 43, 1448-1456.

Ware, G.W., Whitacre, D.M. *The Pesticide Book*. 6^a Ed. Meister Media Worldwide. Willoughby, Ohio. 2004.

Wauchope R.D., Yeh S., Linders J.B., Kloskowski R., Tanara K., Rubin B., Katayama A., Kordel W., Gerstl Z., Lane M., Unsworth J. Pesticide sorption parameters: theory, measurements, uses, limitations and reliability. *Pest Manag. Sci.* 2002; 58: 419-445.

Wei, J.; Huang, G.; An, C.; Yu, H. Investigation on the solubilization of polycyclic aromatic hydrocarbons in the presence of single and mixed Gemini surfactants. *J. Hazard. Mater.* 190, 840-847 (2011).

Wei, J.; Huang, G.; Zhu, L.; Zhao, S.; An, C.; Fan, Y. Enhanced aqueous solubility of naphthalene and pyrene by binary and ternary Gemini cationic and conventional nonionic surfactants. *Chemosphere* 89, 1347-1353 (2012).

Wilkins, R.M. *Controlled delivery of AROP-protection agents*. Taylor & Francis Ltd, London, UK. 1990,

Wilkins, R.M. Controlled-release granules, with emphasis on lignin-based methods. En: Controlled-release delivery systems for pesticides. Scher, H.B. (ed.), Marcel Dekker Inc., N.Y. 1999, 195-222.

Xiarchos, I.; Doulia, D. Effect of nonionic surfactants on the solubilization of alachlor. *J. Hazardous Mat.* 2006, 136, 882-888.

Zhao, J.; Wilkins, R.M. Controlled release of the herbicide, fluometuron, from matrix granules based on fractionated organosolv lignins. *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 4023-4028.

Zhou W., Yang J., Lou L., Zhu L. Solubilization Properties of polycyclic aromatic Hydrocarbons by saponin, a plant-derived biosurfactant. *Environ. Pollut.* 2011; 159: 1198-1204.