

## Formulaciones basadas en bionanomateriales arcillosos para reducir la lixiviación del herbicida clopiralida en el suelo

M.A. Adelino, R. Celis, M.C. Hermosín, J. Cornejo

Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla (IRNAS), CSIC, P.O. Box 1052, 41080 Sevilla, España. E-mail: madelino@irnase.csic.es

### Resumen

El quitosano [poli- $\beta$ -(1,4)-2-amino-2-desoxi-D-glucosa] es un polisacárido catiónico de origen natural que se ha utilizado recientemente para la preparación de bionanomateriales arcillosos. Trabajos recientes han demostrado que la intercalación de quitosano en montmorillonita aumenta la capacidad adsorbente del mineral de la arcilla para diferentes contaminantes aniónicos y para herbicidas ácidos, como la clopiralida. En este trabajo, se ha evaluado la capacidad de los complejos montmorillonita-quitosano de actuar como soporte del herbicida clopiralida con el fin de liberarlo lentamente y reducir su lixiviación en el suelo. Para ello, el herbicida previamente adsorbido en un complejo montmorillonita-quitosano se añadió a columnas de suelo de 20 cm de longitud y 3 cm de diámetro interno y se comparó su perfil de lixiviación con el del herbicida libre disuelto en agua. Respecto a la aplicación del herbicida libre no soportado, la aplicación en superficie de clopiralida en forma de complejo montmorillonita-quitosano retrasó la lixiviación del herbicida tanto en un suelo ácido (pH= 4.5) como en uno alcalino (pH= 8.0), mientras que cuando el herbicida fue incorporado a 1 cm de profundidad, la lixiviación sólo se retrasó en el suelo ácido. Este comportamiento se atribuyó a la destrucción del complejo adsorbente-herbicida tras su incorporación a una cierta profundidad en el suelo alcalino. La forma de aplicación de la formulación y el pH del suelo resultaron ser factores determinantes del patrón de liberación y lixiviación del herbicida clopiralida soportado en el complejo montmorillonita-quitosano.

### Introducción

La preocupación por la pérdida de la calidad de los suelos agrícolas ha ido en aumento en los últimos años, debido, en parte, a la contaminación sufrida por productos fitosanitarios y otros compuestos de origen antropogénico. Es por ello que existe un aumento en el interés por prevenir en lo posible la contaminación de dichos suelos para preservar su calidad.

Los bionanocomposites o bionanomateriales se han convertido en materiales de gran interés debido a sus propiedades estructurales y funcionales. En particular, los bionanomateriales basados en arcillas están despertando un interés cada vez mayor por las posibles aplicaciones que presentan las propiedades asociadas a su escala nanométrica (Darder et al., 2003; An and Dultz, 2007; Aguzzi et al. 2010). El quitosano es un polisacárido catiónico de origen natural que se ha utilizado recientemente para la preparación de bionanomateriales arcillosos, con buenas propiedades adsorbentes para especies aniónicas debido a que los grupos  $-\text{NH}_3^+$  del biopolímero, que no participan directamente en la interacción con el mineral de la arcilla, pueden actuar como sitios de cambio aniónico adicionales o de enlace polar (Darder et al., 2003; Celis et al., 2012). En consecuencia, estos complejos arcilla-quitosano pueden ser útiles en diferentes aplicaciones relacionadas con la adsorción de aniones, tales como el desarrollo de sensores potenciométricos o la depuración de aguas contaminadas con elementos traza en sus formas aniónicas (Darder et al., 2005; Bleiman and Mishael, 2010).

Los pesticidas con características ácidas, que se presentan a menudo en sus formas aniónicas al pH de los compartimentos medioambientales, constituyen un problema de contaminación de suelos y aguas superficiales y subterráneas, porque normalmente son retenidos muy débilmente por los componentes sólidos de suelos y sedimentos (Celis et al., 1999). Por este motivo, el desarrollo de adsorbentes dirigidos a reducir la elevada movilidad que presentan estos pesticidas en el medio ambiente tiene un indudable interés desde el punto de vista de la prevención y remediación de la contaminación de suelos y aguas.

En un trabajo previo, se prepararon diferentes sistemas organoarcillosos (SW-CH) basados en quitosano (CH) y una montmorillonita de Wyoming (SW), para posteriormente evaluar las propiedades de los mismos como adsorbentes del herbicida ácido clopiralida (Celis et al., 2012). En medio acuoso, los sistemas SW-CH presentaron buenas propiedades adsorbentes para el herbicida clopiralida a niveles de pH donde predominaban la forma aniónica del herbicida ( $\text{pK}_a = 2.1$ ) y la forma catiónica del quitosano ( $\text{pK}_a = 6.3$ ), es decir, en un rango de pH de 3-5. El proceso de adsorción del herbicida fue rápido, lineal y

reversible, compatible con la adsorción del herbicida por un mecanismo de cambio aniónico sobre los sitios con carga positiva del biopolímero asociado al mineral de la arcilla.

En este trabajo se ha evaluado la capacidad de un complejo montmorillonita-quitosano (SW-CH) de actuar como soporte del herbicida clopiralida con el fin de liberarlo lentamente y reducir su lixiviación en el suelo. Para ello, tras adsorber el herbicida en el complejo SW-CH, se determinó la capacidad de la formulación obtenida de reducir la lixiviación del herbicida en columnas de suelo en comparación a la aplicación del herbicida libre sin soportar, usando dos suelos con diferentes valores de pH y dos formas distintas de aplicación del herbicida (en superficie y enterrado).

## Materiales y métodos

### Materiales

El mineral de la arcilla utilizado para la síntesis del bionanocomposite fue montmorillonita de Wyoming SWy-2, suministrada por The Clay Minerals Society (Universidad de Purdue, Indiana). La montmorillonita fue saturada en sodio mediante tres tratamientos sucesivos de 10 g de arcilla con 200 ml de una disolución de NaCl 1 M, tras lo que se lavó con agua desionizada, se liofilizó y se conservó a temperatura ambiente. A la montmorillonita resultante (SW) se asoció quitosano (Figura 1) de bajo peso molecular proporcionado por Sigma-Aldrich (España). El quitosano (CH) es un polímero catiónico natural que forma parte de los exoesqueletos de crustáceos e insectos, de la pared celular de los hongos y los microorganismos. El grupo amino en el CH tiene un valor  $pK_a$  de 6.3, razón por la cual posee una ligera carga positiva y es soluble en medios ácidos, dependiendo su carga del pH y pudiendo ligarse negativamente a superficies cargadas negativamente, tales como las superficies externas y/o internas de las arcillas.

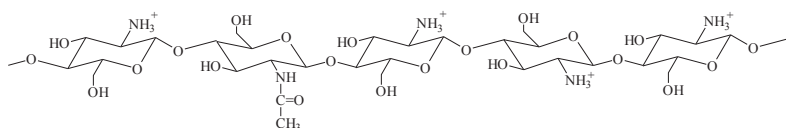


Figura 1. Estructura química del quitosano.

El herbicida clopiralida (Figura 2) utilizado en este estudio fue suministrado por Sigma-Aldrich (España) con una pureza del 99%. Se trata de un herbicida selectivo de la familia de los ácidos piridino-carboxílicos utilizado para el control de malas hierbas de hoja ancha en diferentes cultivos a dosis de 50-200 g/ha. Tiene un  $pK_a$  de 2.1, un peso molecular de 192 g/mol y una solubilidad en agua de 1 g/l (20 °C). Su forma aniónica predomina a los valores de pH de la mayoría de los compartimentos ambientales.

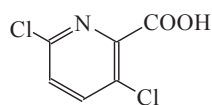


Figura 2. Estructura química de la clopiralida.

Para los experimentos de lixiviación se eligieron dos suelos con diferente composición y pH. El suelo 1 fue un suelo ácido ( $pH= 4.5$ ) de origen forestal con un 56% de arena, 33% de limo, 11% de arcilla y 5.5% de carbono orgánico. El suelo 2 fue un suelo alcalino ( $pH= 8.0$ ) de origen agrícola con un 63% de arena, 16% de limo, 21% de arcilla y 1.4% de carbono orgánico. Los suelos se recogieron del horizonte superficial (0-20 cm), se secaron al aire, se tamizaron con un tamiz de 2 mm y se almacenaron a 4 °C hasta su utilización.

## Métodos

**Síntesis del complejo SW-CH.** Para la síntesis del complejo SW-CH, se añadieron 0.8 g de arcilla (SW) a 200 ml de una solución acuosa (pH= 5.0) que contenía 650 mg de CH y 3 mmol de ácido acético. La suspensión resultante se agitó durante 24 horas a 25 °C, se centrifugó, se lavó cinco veces con 200 ml de agua desionizada, se liofilizó y el complejo SW-CH resultante se almacenó a temperatura ambiente hasta su uso.

**Caracterización del complejo SW-CH.** El complejo SW-CH se caracterizó por análisis elemental, difracción de rayos X y espectroscopia de infrarrojos con transformada de Fourier. Los análisis elementales se llevaron a cabo utilizando un analizador elemental Perkin-Elmer, modelo 1106. Los diagramas de difracción de rayos X se obtuvieron utilizando un difractómetro Siemens D-5000 con radiación  $\text{CuK}\alpha$ , en agregados orientados. Los espectros de infrarrojos se obtuvieron con un espectrómetro Jasco FT / IR 6300 (Jaco Europe Srl), colocando la muestra sólida directamente en el portamuestras horizontal de reflectancia total atenuada (ATR) de la célula.

**Experimentos de adsorción.** La isoterma de adsorción de clopiralida a SW-CH se obtuvo equilibrando por agitación 20 mg de SW-CH con 8 ml de disoluciones acuosas con diferentes concentraciones de clopiralida ( $C_{\text{ini}}= 0.1\text{-}100$  mg/l) preparadas en HCl 1 mM. Las suspensiones se agitaron en tubos de centrifuga durante 24 h, se centrifugaron y los sobrenadantes se filtraron y analizaron por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para determinar la concentración de herbicida en la disolución de equilibrio,  $C_e$  (mg/l). La cantidad de clopiralida adsorbida,  $C_s$  (mg/kg), se determinó a partir de la diferencia entre las concentraciones de las disoluciones iniciales y de equilibrio.

La adsorción de clopiralida en los suelos 1 y 2 sin enmendar y enmendados con SW-CH se determinó agitando 0.5 g de suelo, sin enmendar o enmendado con SW-CH a dosis del 5% y del 10%, con 8 ml de una disolución de clopiralida 1 mg/l preparada en agua (pH = 6.5). Las suspensiones resultantes se agitaron durante 24 h a  $20 \pm 2$  °C, tras lo cual fueron centrifugadas y los sobrenadantes filtrados y analizados por HPLC. La cantidad de clopiralida adsorbida ( $C_s$ ) por los suelos enmendados y sin enmendar se determinó a partir de la diferencia entre las concentraciones iniciales del herbicida ( $C_{\text{ini}}$ ) y equilibrio ( $C_e$ ). Los porcentajes de clopiralida adsorbida (Ads%) se determinaron a partir de la fórmula:  $\% \text{Ads} = [(C_{\text{ini}} - C_e) / C_{\text{ini}}] \times 100$  y los coeficientes de distribución ( $K_d$ ) se calcularon como:  $K_d = C_s / C_e$ .

**Preparación de la formulación SW-CH-Clopiralida.** Para la preparación de la formulación del herbicida clopiralida soportada en el complejo SW-CH, se pusieron en contacto 200 mg de SW-CH con 80 ml de una disolución de clopiralida de 100 mg/l preparada en HCl 1 mM. Tras agitar durante 24 h, la suspensión se filtró y el sólido resultante se secó al aire para posteriormente molerlo en un mortero de ágata y conservarlo a temperatura ambiente hasta su uso. El porcentaje de herbicida en la formulación se determinó a partir de la diferencia entre la concentración de herbicida en la disolución inicial y final y fue del 1.4%.

**Experimentos de lixiviación.** La lixiviación se estudió en columnas de vidrio de 30 cm de longitud  $\times$  3.1 cm de diámetro interno empaquetadas a mano. En primer lugar se colocó lana de vidrio y se añadieron 10 g de arena de mar en el fondo de las columnas. Después se añadió el suelo (128 g de suelo 1 ó 164 g de suelo 2) hasta alcanzar 20 cm y, para terminar, otros 10 g de arena de mar. Las columnas se saturaron con agua, determinándose el volumen de poros de las mismas a partir de la diferencia entre el volumen añadido y el lixiviado: 72 ml para el suelo 1 y 64 ml para el suelo 2. El herbicida clopiralida se aplicó a las columnas a una dosis de 0.5 kg/ha, bien en forma libre bien como formulación soportada en SW-CH, en este último caso tanto en superficie como enterrada bajo 1 cm adicional de suelo. Diariamente, las columnas se regaron con 15 ml de agua y los lixiviados procedentes de las columnas se recogieron y analizaron por HPLC para determinar la concentración de clopiralida en los mismos. Tras la experiencia de lixiviación, la cantidad de herbicida residual en las columnas de suelo se extrajeron con una mezcla de agua/acetronitrilo/ácido acético 91.5/5.0/3.5, analizándose posteriormente los extractos por HPLC.

## Análisis del herbicida

La clopiralida se analizó por HPLC utilizando un cromatógrafo Waters 1525 acoplado a un detector UV-VIS de fila de diodos Waters 2996. Las condiciones de análisis utilizadas fueron: una columna Nova-Pack C18 de 150 mm de longitud  $\times$  3.9 mm de diámetro interno, una fase móvil de

agua/acetonitrilo/ácido acético (91.5/5.0/3.5), con una velocidad de flujo de 0.7 ml/min, volumen de inyección de 25  $\mu$ l y detección UV a 280 nm.

## Resultados y discusión

### Características del sistema SW-CH

A partir de los resultados del análisis elemental de la muestra SW-CH (7.0% de C y 1.20% de N) se estimó la cantidad de quitosano en la misma, que resultó ser del 14.6%. Asumiendo una completa ionización de los grupos  $-NH_2$  del biopolímero, la cantidad de quitosano presente correspondió a una cantidad muy próxima al 100% la capacidad de intercambio catiónico (CIC) de la montmorillonita (76.4  $cmol_c/kg$ ). Estudios previos han puesto de manifiesto que el pH es un factor decisivo en la interacción de quitosano con montmorillonita, porque un aumento en el pH conduce a una disminución en el grado de protonación del biopolímero, aumentando la cantidad adsorbida en la arcilla (An and Dultz, 2007). En nuestro caso, el pH final de la suspensión arcilla:quitosano fue de 5.0, pH al cual cabe esperar una protonación casi completa de biopolímero, que posteriormente se adsorbió hasta la saturar la CIC de la montmorillonita.

Los difractogramas de rayos X de la muestra original de montmorillonita saturada en sodio (SW) mostraron los espaciados basales esperados de 12.5 Å, para la muestra secada a temperatura ambiente, y de aproximadamente 10 Å, tras el calentamiento a 200°C. El complejo SW-CH presentó a temperatura ambiente un espaciado menos definido de aproximadamente 15 Å y una resistencia al colapso tras el calentamiento a 200 °C, manteniendo un espaciado de 13.7 Å. Este valor corresponde a una distancia entre láminas de arcilla en torno a 4 Å, lo que es consistente con la presencia de quitosano en el espacio interlamina de la montmorillonita principalmente como una monocapa, que evitó el colapso de las láminas de arcilla tras el calentamiento a 200 °C (Darder et al., 2003; Bleiman and Mishael, 2010).

En el espectro de FT-IR de quitosano puro, se identificaron las bandas correspondientes a las vibraciones de tensión de los grupos O-H y N-H del biopolímero, próximas a 3300  $cm^{-1}$ , las correspondientes a las vibraciones de tensión de los grupos C-H, cercanas a 2900  $cm^{-1}$ , y las de tensión del grupo C=O (amida I) y deformación del grupo N-H a 1650  $cm^{-1}$  y 1590  $cm^{-1}$ , respectivamente. En el espectro de SW-CH, se observó un desplazamiento de la banda de deformación del grupo N-H hasta 1530  $cm^{-1}$  respecto al valor de 1590  $cm^{-1}$  encontrado para el quitosano puro, probablemente debido a la fuerte interacción que se produce entre las superficies cargadas negativamente de la montmorillonita y los grupos amino protonados ( $-NH_3^+$ ) del quitosano (Darder et al, 2003; Monvisade y Siriphannon, 2009)

### Estudios de adsorción

En la Figura 3 se representa la isoterma de adsorción de la clopiralida en la montmorillonita original sin quitosano (SW) y en el complejo SW-CH obtenida a pH= 3. Como puede observarse, el aumento de la adsorción es considerable para el complejo (SW-CH) con respecto a la montmorillonita sin quitosano (SW), para la cual la adsorción fue prácticamente nula. La nula adsorción del herbicida en la montmorillonita original se debe a que a pH= 3 el herbicida se encuentra en su forma aniónica y es repelido por las superficies con carga negativa del mineral de la arcilla. La presencia de CH en el complejo neutralizó la carga superficial negativa de la arcilla y proporcionó sitios cargados positivamente que favorecieron la adsorción de la clopiralida (Celis et al., 2012).

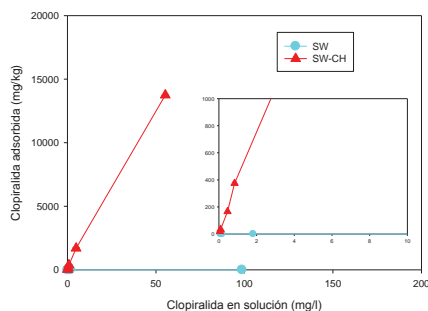


Figura 3. Isotherma de adsorción de la clopiralida sobre SW y SW-CH a pH= 3.

La Tabla 1 muestra los resultados de adsorción de clopiralida en los suelos 1 y 2 sin enmendar y enmendados con el complejo SW-CH en proporciones del 5% y del 10%. Puede observarse cómo la adición de SW-CH dio lugar a un aumento en la adsorción de clopiralida sólo en el caso del suelo ácido (suelo 1). Esto puede atribuirse a la presencia de sitios de intercambio catiónico en el complejo SW-CH sólo al pH de las suspensiones suelo/agua de este suelo (pH ~ 5.0, Tabla 1). Por el contrario, cuando SW-CH se añadió al suelo alcalino (suelo 2), el pH final de las suspensiones fue de 8.0 (Tabla 1), lo que probablemente provocó la pérdida de sitios con carga positiva del quitosano asociado a la arcilla ( $pK_a=6.3$ ) y con ello su capacidad adsorbente para la clopiralida.

Tabla 1. Parámetros de adsorción de clopiralida en suelos sin enmendar y enmendados con el complejo SW-CH.

Muestra	pH <sub>inicia</sub>	pH <sub>equilibri</sub>	%Ads	K <sub>d</sub> (l/kg)
	l	o		
Suelo 1	6.5	4.7	5	0.67 ± 0.08
Suelo 1 + SW-CH (5%)	6.5	4.8	10	1.72 ± 0.27
Suelo 1 + SW-CH (10%)	6.5	4.9	18	3.56 ± 0.09
Suelo 2	6.5	8.0	< 5	< 0.5
Suelo 2 + SW-CH (5%)	6.5	8.0	< 5	< 0.5
Suelo 2 + SW-CH (10%)	6.5	8.0	< 5	< 0.5

### Estudio de lixiviación

La Figura 4 muestra las curvas de lixiviación de la clopiralida en columnas con los suelos 1 y 2, tras la aplicación del herbicida bien en forma libre disuelto en agua bien adsorbido en SW-CH. La aplicación de la formulación (SW-CH-Clopiralida) a los dos suelos se realizó de dos formas distintas, directamente en superficie o enterrando la formulación a 1 cm de profundidad. Como podemos observar en la Figura 4, respecto a la aplicación del herbicida libre no soportado, la aplicación en superficie de clopiralida soportada en el complejo SW-CH retrasó la lixiviación del herbicida tanto en el suelo ácido (suelo 1) como en el alcalino (suelo 2), mientras que cuando el herbicida fue incorporado a 1 cm de profundidad, la lixiviación sólo se retrasó en el suelo ácido. Este comportamiento puede atribuirse a la destrucción del complejo adsorbente-herbicida tras su incorporación a una cierta profundidad en el suelo alcalino, lo que dio lugar a una rápida liberación del herbicida, resultado que está de acuerdo con los datos de adsorción de los suelos enmendados con SW-CH (Tabla 1). Estos resultados ponen de manifiesto que la forma de aplicación de la formulación y el pH del suelo son factores determinantes del patrón de liberación y lixiviación del herbicida clopiralida soportado en el complejo montmorillonita-quitosano.

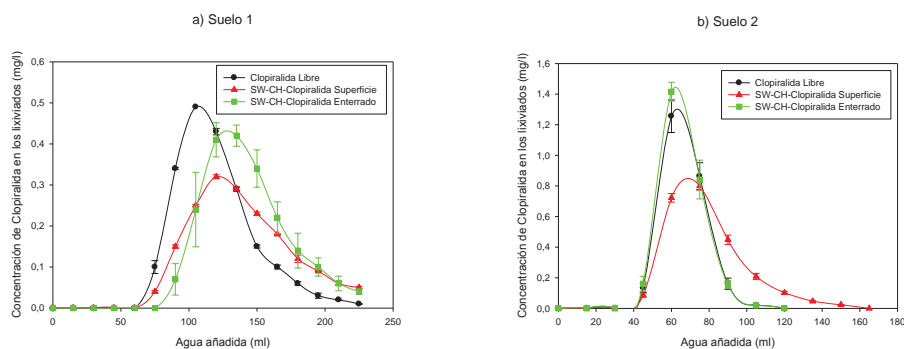


Figura 4. Curvas de lixiviación relativas de la clopiralida en columnas de suelo.

En la Figura 5 se representan las curvas de lixiviación acumuladas de clopiralida en las columnas de suelo, donde podemos observar las cantidades totales de herbicida recuperadas en los lixiviados. Las curvas acumuladas obtenidas para el herbicida libre muestran una recuperación del 75 % del herbicida añadido en el caso del suelo 1 (ácido) y próxima al 100% en el caso del suelo 2 (alcalino). Dado que no se detectó cantidad alguna de clopiralida en el interior de las columnas de suelo al finalizar el experimento de lixiviación, la cantidad no recuperada en el suelo 1 debe atribuirse a degradación del herbicida y/o a una adsorción irreversible al suelo durante el experimento. Las curvas acumuladas obtenidas tras la aplicación del complejo muestran que, si bien se produce un retraso en la lixiviación en el suelo 1 para los dos modos de aplicación y en el suelo 2 para la aplicación enterrada, las cantidades totales lixivias fueron próximas a las obtenidas para el herbicida libre.



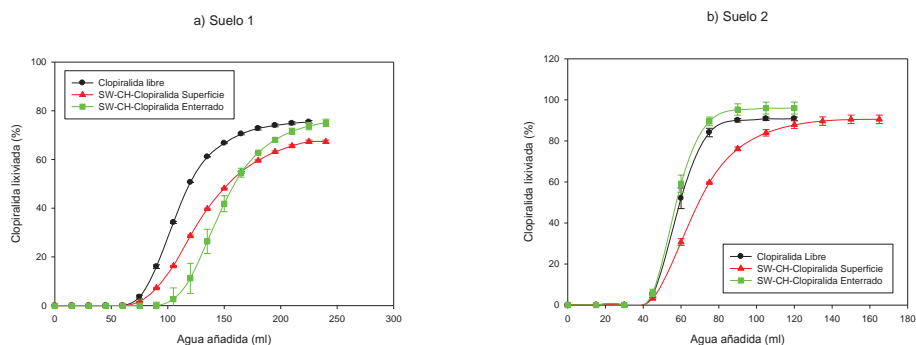


Figura 5. Curvas de lixiviación acumulada de la clopiralida en columnas de suelo

## Conclusiones

La interacción del biopolímero quitosano con una montmorillonita resultó un complejo que mostró buenas propiedades adsorbentes para el herbicida clopiralida a pH= 3, al que tanto la forma aniónica del herbicida como la forma catiónica del quitosano predominaron. La adición del complejo montmorillonita-quitosano a suelos fue efectiva a la hora de aumentar la adsorción de clopiralida, siempre que el pH del suelo presente niveles ligeramente ácidos y permita la existencia de cargas positivas en el polímero orgánico. La aplicación del herbicida preadsorbido en el complejo montmorillonita-quitosano o como bionanoformulado a columnas de suelo retrasó la lixiviación del herbicida cuando se aplicó a un suelo ácido tanto en superficie como enterrado y cuando se aplicó a un suelo alcalino en superficie. La forma de aplicación de la formulación y el pH del suelo resultaron ser factores determinantes del patrón de liberación y lixiviación del herbicida clopiralida soportado en el complejo montmorillonita-quitosano. Los resultados indican la viabilidad del complejo montmorillonita-quitosano de ser utilizado como soporte de plaguicidas aniónicos como la clopiralida, para reducir su elevada movilidad y, con ello, el riesgo de contaminación de suelos y aguas adyacentes.

## Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio Español de Ciencia e Innovación (MICINN, Proyectos AGL2008-04031-C02-01 y AGL2011-23779) y la Junta de Andalucía (JA, Proyecto P07-AGR-03077 y Grupo de Investigación AGR-264), con cofinanciación FEDER-FSE a través del Programa Operativo 2007-2013. M.A. Adelino agradece el MICINN la concesión de una Beca de Formación de Personal Investigador, también cofinanciada con FEDER-FSE.

## Bibliografía

- Aguzzi C., Capra P., Bonferoni C., Salcedo I., Sánchez R., Caramella C., Viseras C. 2010. Chitosan-silicate biocomposites to be used in modified drug release of 5-aminosalicylic acid (5-ASA). *Applied Clay Science*, 50, 106-111.
- An J.-H., Dultz S. 2007. Polycation adsorption on montmorillonite: pH and T as decisive factors for the kinetics and mode of chitosan adsorption. *Clay Minerals*, 42, 329-339.
- Bleiman N., Mishael Y.G. 2010. Selenium removal from drinking water by adsorption to chitosan-clay composites and oxides: batch and column tests. *Journal of Hazardous Materials*, 183, 590-595.
- Celis R., Hermosín M.C., Cox L., Cornejo J. 1999. Sorption of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid by model particles simulating naturally occurring soil colloids. *Environmental Science and Technology*, 33, 1200-1206.
- Celis R., Adelino M.A., Hermosín M.C., Cornejo J. 2012. Montmorillonite-chitosan bionanocomposites as adsorbents of the herbicide clopyralid in aqueous solution and soil/water suspensions. *Journal of Hazardous Materials*, 209-210, 67-76.
- Darder M., Colilla M., Ruiz-Hitzky E. 2003. Biopolymer-clay nanocomposites based on chitosan intercalated in montmorillonite. *Chemistry of Materials*, 15, 3774-3780.

Darder M., Colilla M., Ruiz-Hitzky E. 2005. Chitosan-clay nanocomposites: application as electrochemical sensors. *Applied Clay Science*, 28, 199-208.

Monvisade P., Siriphannon P. 2009. Chitosan intercalated montmorillonite: preparation, characterization and cationic dye adsorption. *Applied Clay Science*, 42, 42