

***COMPORTAMIENTO DEL HERBICIDA  
NORFLURAZONA EN EL SISTEMA SUELO-AGUA.  
OBTENCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y APLICACIÓN  
DE COMPLEJOS DE INCLUSIÓN  
NORFLURAZONA-CICLODEXTRINA***

Memoria presentada por Jaime Villaverde Capellán  
para optar al grado de Doctor en Farmacia  
Sevilla, Abril 2003

## *Agradecimientos*

*A mis directores de tesis, D<sup>a</sup>. Esmeralda Morillo González, D. Juan Manuel Ginés Dorado y D. Jose Ignacio Pérez Martínez por su apoyo constante y acertada dirección durante el desarrollo de este trabajo de investigación.*

*Al Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla por las facilidades prestadas.*

*A los Doctores D<sup>a</sup>. Celia Maqueda y D. Tomás Undabeytia por sus consejos y activa colaboración para la consecución de todos los objetivos marcados durante el periodo de realización de esta memoria de investigación.*

*A mis compañeros de trabajo, Alegría Cabrera Mesa, María Fernanda Hidalgo García, Rocío Reinoso Limones, Aguas-Santas Romero Quiles y Fátima Sopeña Vázquez por su ayuda, participación y entusiasmo transmitido durante el trabajo realizado en el departamento.*

*A la Lda. D<sup>a</sup>. María del Carmen Jiménez de Haro por la ayuda prestada para llevar a cabo el análisis de los complejos obtenidos por microscopía electrónica.*

*A mis padres y hermana por el cariño mostrado en todo momento, y a mis amigos por su apoyo y amistad entregada.*

## **1.1 PLAGUICIDAS**

La FAO/OMS define el término plaguicida como cualquier sustancia o mezcla de ellas utilizada para prevenir o controlar plantas o animales indeseables e incluso aquellas otras destinadas a utilizarse como reguladores del crecimiento de la planta, defoliantes o desecantes.

Los plaguicidas orgánicos pueden agruparse en varias clases, dependiendo de su naturaleza química. De acuerdo con Weber (1994), el esquema de clasificación es el siguiente:

1. Plaguicidas fuertemente básicos: plaguicidas con N cuaternarios.

2. Plaguicidas básicos.

3. Plaguicidas ácidos:

Herbicidas carboxílicos.

Plaguicidas hidroxiacidos.

Herbicidas aminosulfonilácidos.

Plaguicidas de ácidos orgánicos de P y As.

Fungicidas organometálicos.

4. Plaguicidas no iónicos o neutros

Herbicidas de anilida y amidas.

Plaguicidas carbamatos y carbanilatos.

Plaguicidas de hidrocarburos clorados.

Herbicidas de dinitroanilina y reguladores del crecimiento.

Insecticidas organofosforados.

Plaguicidas de fenilurea.

*Comportamiento del herbicida norflurazona en el sistema suelo-agua. Obtención, caracterización y aplicación de complejos de inclusión norflurazona-ciclodextrina.*

Plaguicidas piretroides.

Herbicidas tiocarbamatos.

En general, los plaguicidas son compuestos orgánicos con propiedades tóxicas, de aquí que sea necesario saber qué tipo de interacción existe entre estos compuestos y los suelos, así como con sus constituyentes. En el caso de plaguicidas con N cuaternarios, son compuestos altamente básicos, con una gran solubilidad en agua.

En el caso de plaguicidas básicos, los rangos de basicidad van desde muy bajas a moderadas ( $pK_a=1-5$ ), siendo su basicidad dependiente de los grupos funcionales. Así por ejemplo, compuestos de cloro-s-triazinas como anilazina, atrazina, cianazina, propazina y simazina, tienen muy baja basicidad ( $pK_a$  de 1 a 1.8), mientras que metoxi-s-triazinas, como ametrina, dipropetrina, prometrina y terbutrina tienen basicidad moderada ( $pK_a$  de 3.5 a 4.3). La retención en suelos suele ser baja a valores de pH neutros pero los valores se doblan y triplican a pHs más bajos.

Los plaguicidas de tipo ácido se pueden englobar en dos grupos, por un lado los aminosulfonilácidos, hidroxilácidos y carboxílicos, ya que comparten propiedades comunes, como su menor retención por los coloides del suelo, teniendo por lo tanto una mayor movilidad, siendo su adsorción dependiente del pH. Por otro lado se encontrarían aquellos que poseen grupos reactivos de P y As, los cuales son por lo general altamente retenidos por los coloides del suelo o forman sales insolubles en los suelos y son prácticamente inmóviles.

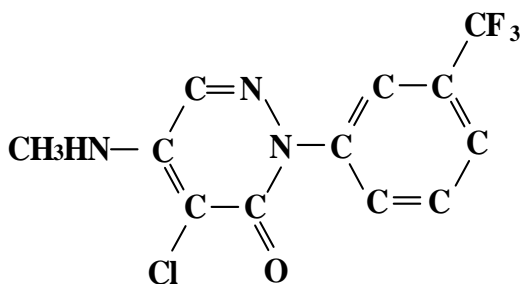
En el caso de los plaguicidas no iónicos, no es posible obtener unas generalidades ya que su comportamiento difiere enormemente dependiendo de la familia a la que pertenezcan. Por ejemplo, plaguicidas fumigantes, como la cloropicrina, el 1,3-dicloropropeno y el metilisocianato, presentan una solubilidad en agua de alta a muy alta ( $K_{ps}$  varía entre 1620 y  $1.3 \times 10^4$  mg/L) y además son extremadamente volátiles, oscilando sus presiones de vapor entre 20 y 1702 mmHg, en contraposición a los plaguicidas piretroides, como bifentrina o fluvalinato, que poseen una solubilidad en

agua muy baja además de una muy baja volatilidad.

### **1.1.1. Norflurazona**

A continuación se describen las características del herbicida norflurazona, al que se hará referencia a lo largo de la presente memoria.

Químicamente se trata del (4-cloro-5-metilamino-2-(3-trifluorometilfenil) piridazin-3-ona. Es un herbicida que pertenece al grupo de las piridazinonas, inhibidor de la síntesis de carotenoides, con un peso molecular de 303.7, siendo su fórmula química la siguiente:



*Figura 1. Estructura del herbicida norflurazona.*

#### **1.1.1.1. Propiedades físico-químicas**

La norflurazona pura es un sólido cristalino incoloro. Su punto de fusión se encuentra sobre 180°C. Presenta una baja solubilidad en agua de 28 mg/L, siendo mucho mayor su solubilidad en disolventes orgánicos: acetona 50 g/L, etanol 142 g/L y 2.5 g/L en xileno. Es una molécula estable en solución acuosa en un margen de pH entre 3 y 9. El herbicida almacenado a 20 °C tiene una vida mayor o igual a 4 años. Se degrada rápidamente por la luz solar, siendo su vida media (DL<sub>50</sub>) en suelo de 21-28 días

Se comercializa bajo las marcas: Zorial<sup>®</sup>, Evital<sup>®</sup> Solicam<sup>®</sup> y Solicam Rapid<sup>®</sup> (Herbicide handbook, 1994). Evital<sup>®</sup> (5% ia) es una formulación comercial granulada

*Comportamiento del herbicida norflurazona en el sistema suelo-agua. Obtención, caracterización y aplicación de complejos de inclusión norflurazona-ciclodextrina.*

(50 g de ingrediente activo/Kg). Solicam<sup>®</sup>, Solicam rapid<sup>®</sup> y Zorial<sup>®</sup> son formulaciones de polvos humectables.

### **1.1.1.2. Mecanismo de acción**

El modo primario de acción consiste en la inhibición de la fitoendosaturasa o la inhibición de la deshidrogenación básica en la biosíntesis de carotenoides, siendo la inhibición del carotenoide un efecto secundario. Sin la protección de los carotenoides la clorofila es destruida por fotooxidación, lo cual conlleva la muerte de la planta.

Otros modos de acción:

- a) Inhibición de la reacción colina.
- b) Alteración en la relación de los ácidos linolénico/linoleico.
- c) Influencia en los ribosomas de los cloroplastos.

### **1.1.1.3. Aplicaciones**

Es considerado como uno de los más efectivos herbicidas de preemergencia para cultivos de algodón, fresas, cítricos, nueces, soja y frutas con hueso (1-4 Kg/ha), para el control de numerosas malas hierbas. En plantas, norflurazona sufre N-desmetilación dando lugar un metabolito biológicamente inactivo además de sufrir una descloración por hidrólisis. Su pérdida tanto en suelos como en agua se da por fotodegradación o volatilización. En general, este herbicida lixivia con dificultad en suelos con una elevada cantidad en materia orgánica, estando más favorecida en suelos minerales.

## **1.2. INTERACCIÓN DE PLAGUICIDAS CON SUELOS**

Las interacciones que tienen lugar entre las moléculas del plaguicida y las fracciones coloidales del suelo están influenciadas considerablemente por la humedad,

temperatura, pH, contenido en minerales y contenido en materia orgánica del suelo. A su vez, también están relacionadas con las características de los plaguicidas orgánicos en cuanto a solubilidad en agua, polaridad, tamaño molecular y características químicas. De acuerdo con esto el grado de adsorción de un plaguicida por el suelo depende de la naturaleza de la fracción coloidal y de la estructura química del compuesto.

En general, los plaguicidas son compuestos orgánicos con propiedades tóxicas. Por eso es necesario saber qué tipo de interacción existe entre estos compuestos y los suelos, así como con sus constituyentes.

### **1.2.1. Origen de los plaguicidas en el suelo**

La aplicación de plaguicidas sobre el suelo depende entre otras cosas de la forma de aplicación del mismo.

Unas veces los tratamientos se efectúan directamente a las partes aéreas de las plantas para combatir sus plagas, donde un 50% aproximadamente del producto utilizado se deposita en el suelo; o bien, llega a éste por arrastre, por acción de la lluvia o del viento, del plaguicida incorporado a la planta. Este es el caso que normalmente se presenta en la aplicación de insecticidas, fungicidas y herbicidas.

Otras veces el tratamiento se hace directamente al suelo, como en la aplicación de nematicidas y algunos herbicidas, apareciendo el producto en cantidades mayores.

En menor proporción, pueden también proceder de restos vegetales diversos que quedan en el suelo al recolectar el cultivo, o desprendidos durante el tratamiento. Por último hay que considerar el arrastre de restos suspendidos en la atmósfera por el viento o la lluvia.

### **1.2.2. Evolución de los plaguicidas en el suelo**

Cuando un plaguicida se aplica al campo, éste se distribuye en las distintas fases del ambiente (suelo, agua, aire, animales y plantas). Esta distribución dependerá tanto de las propiedades del plaguicida como de las propiedades de las distintas fases. Entre las propiedades del plaguicida hay que considerar su solubilidad, y por ello, todos los factores susceptibles de hacerla variar tienen una gran influencia en la dinámica del plaguicida.

Los procesos de la dinámica de los plaguicidas en suelos pueden englobarse en dos grupos: procesos de transferencia y procesos de transformación.

A continuación se realizará un comentario escueto sobre cada uno de ellos, si bien los procesos de adsorción-desorción, lixiviación y fotodegradación serán desarrollados con más detalle por ser objeto del presente trabajo.

Entre los procesos de transferencia se encuentran:

a) **Adsorción-desorción:** Los procesos de adsorción y desorción son, entre los distintos factores a considerar, los más importantes en cuanto a la interacción de plaguicidas con suelos. El proceso de adsorción se debe a la atracción entre una superficie sólida y un vapor o disolución, y resulta de la interacción de fuerzas que emanan de la superficie del adsorbente y las moléculas o iones del adsorbato. Este concepto es aplicable al caso de los plaguicidas. Estos pueden actuar como adsorbatos y quedar retenidos en el suelo, que actúa como adsorbente. Estos procesos serán estudiados con más detalle en otro apartado posterior, debido a la importancia que revisten, al influir en todos los demás procesos.

b) **Absorción, exudación y retención por las plantas:** depende de las propiedades del herbicida (Ashton y Crafts, 1981) tanto para maleza como para plantas de interés agrícola. Herbicidas como el 2,4-D poseen de moderada a alta solubilidad en agua y son muy móviles tanto fuera como dentro de las plantas, mientras que los herbicidas dinitroanilinas son muy insolubles y muy inmóviles en plantas. Normalmente,



la cantidad de un herbicida móvil absorbido y retenido por la planta alcanza desde 0.1% hasta 5% de la cantidad total aplicada.

c) **Volatilización:** es un proceso frecuente en el movimiento y desaparición de plaguicidas 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, composición del suelo, contenido en agua, naturaleza del plaguicida y grado de adsorción.

d) **Lixiviación y flujo capilar:** Se le denomina también percolación o flujo de masas. La lixiviación es un proceso frecuente de transporte de los plaguicidas en profundidad a lo largo del perfil del suelo, que puede tener lugar tanto si el plaguicida 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. Los procesos de movimiento de masas y de difusión están implicados en ambos casos (Hartley y Graham-Bryce, 1980; Taboada y col., 1994). Los factores a tener en cuenta que influyen en la lixiviación son: las características físico-químicas del suelo (White y col., 1986), frecuencia e intensidad de la lluvia y el riego (Wietersen y col., 1993), solubilidad del plaguicida, posibilidad de adsorción del plaguicida en los coloides del suelo.

e) **Erosión:** al estar los plaguicidas 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 plaguicida sobre la superficie del suelo cuando son movidas de un lugar a otro por el agua o el aire, mediante el proceso de erosión.

f) **Difusión:** es el proceso por el cual el plaguicida es transportado en el suelo debido a sus energías térmicas. A causa de ellas, hay un neto movimiento 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.

*Comportamiento del herbicida norflurazona en el sistema suelo-agua. Obtención, caracterización y aplicación de complejos de inclusión norflurazona-ciclodextrina.*

Los factores más influyentes en la difusión de los plaguicidas en el suelo son: la solubilidad, la temperatura, la humedad y porosidad del suelo, la densidad de vapor y el grado de adsorción del plaguicida.

Entre los procesos de transformación cabe señalar:

a) **Degradación química y microbiológica:** están íntimamente ligadas entre sí siendo difícil establecer independencia entre ellas, por lo que se suele denominar degradación bioquímica.

Así, 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 quizá el mecanismo de descomposición de plaguicidas 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 (Blumhorst y Weber, 1994).

Por último, hay que señalar que la descomposición bioquímica de los plaguicidas depende principalmente de la estructura química de la molécula y de las condiciones del sistema suelo: composición, humedad, aireación, sustancias catalizadoras y microorganismos.

b) **Degradación fotoquímica:** Consiste en la degradación no biológica de plaguicidas mediante la luz solar. La cantidad de herbicida fotoquímicamente degradado depende de la susceptibilidad de la molécula, de su exposición a la luz, del tiempo de exposición, del grado de adsorción del plaguicida en el suelo, de la presencia de catalizadores fotoquímicos, del pH del suelo y del grado de aireación del mismo.

### **1.2.3 Adsorción-desorción de plaguicidas en el suelo**

Son los procesos más importantes, ya que condicionan directa o indirectamente la magnitud de los demás. La adsorción puede definirse como cualquier cambio en la concentración en una interfase que es diferente del seno de la fase (solución, gas, sólido). El sistema suelo es un sistema complejo, estando formado por muchas fases que incluyen sólidos, partículas coloidales, solución del suelo, solutos como nutrientes, plaguicidas y otras sustancias orgánicas naturales presentes, gases como CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, y vapores de herbicidas volátiles y otros orgánicos.

Un factor adicional a tener en cuenta es la variedad de mecanismos de adsorción que son posibles dependiendo de las propiedades químicas y físicas del herbicida. Así, los herbicidas iónicos son adsorbidos por los coloides del suelo mediante fuerzas coulombicas dependiendo de su carga iónica. Por el contrario 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 aniones fosforados se complejan con los coloides del suelo por intercambio de ligando y por reacciones de precipitación. Los plaguicidas que se presentan en forma molecular se unen a los coloides del suelo por enlaces de hidrógeno (fuerzas dipolo-dipolo dirigidas directamente), complejos de transferencia de carga, o por fuerzas de Van der Waals, de London o Debye y aquellos que son altamente apolares, por enlaces hidrofóbicos.

Los diferentes mecanismos de adsorción dan lugar a diferentes tipos de isothermas (Calvet, 1989). De acuerdo con Giles y col. (1960), se pueden establecer cuatro tipos diferentes de isothermas, que implican una afinidad distinta del adsorbato por el adsorbente:

- Isotherma 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

*Comportamiento del herbicida norflurazona en el sistema suelo-agua. Obtención, caracterización y aplicación de complejos de inclusión norflurazona-ciclodextrina.*

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.

- Isotermas 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.

El proceso inverso de la adsorción es la desorción y ésta 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, es decir, la cantidad de soluto que queda retenido por el adsorbente en los procesos de desorción es diferente de la esperada de acuerdo con su isoterma de adsorción, para una concentración de equilibrio dada.

Mediante la ecuación de Freundlich se puede describir la adsorción de herbicidas por suelos en sistemas acuosos multicomponentes:

$$x/m=K C^n$$

El término  $x/m$  refleja la cantidad de herbicida adsorbido por el suelo,  $K$  es una constante que refleja la capacidad de adsorción,  $C$  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 de adsorción.

La fracción de herbicida adsorbido depende del tipo de suelo. Asumiendo que  $n$  sea igual a 1, la ecuación anterior puede ser reordenada para dar lugar a un coeficiente de distribución para un herbicida dado en un suelo determinado, según la expresión:

$$K=[x/m]/C=C_s/C_e$$

Siendo  $C_s$  la cantidad de herbicida adsorbido en el suelo y  $C_e$  la cantidad de herbicida en solución. Los valores de  $K$  se encuentran normalmente altamente correlacionados con el contenido de materia orgánica de los suelos, aumentando a medida que aumenta el contenido de dicha materia orgánica. Si se asume que los herbicidas se adsorben sólo por superficies orgánicas y que el porcentaje de carbono orgánico del suelo es conocido, se puede calcular un valor  $K_{oc}$  (coeficiente de partición) para un herbicida dado adsorbido por un determinado suelo:

$$K_{oc}=[K/\% \text{ carbono orgánico}] \times 100$$

De acuerdo con Kanazawa (1989), se obtienen altos valores de  $K_{oc}$  para herbicidas con propiedades catiónicas y compuestos lipofílicos de baja a extremadamente baja solubilidad. El valor de  $K_{oc}$  para un herbicida con propiedades básicas es dependiente del  $pK_a$  del compuesto (cuanto mayor sea el  $pK_a$  tanto mayor es el  $K_{oc}$ ). El valor de  $K_{oc}$  para un herbicida con propiedades ácidas es también dependiente del  $pK_a$  del compuesto y del pH del sistema (cuanto menor sea el pH, mayor será  $K_{oc}$ ).  $K_{oc}$  para herbicidas no iónicos está normalmente inversamente relacionado con las solubilidades en agua de los compuestos. Este coeficiente es frecuentemente usado en el estudio de la adsorción de compuestos hidrofóbicos apolares, siendo el concepto compatible con la idea de que el carbono orgánico del suelo tiene la misma afinidad para un determinado compuesto apolar, sea cual sea la procedencia o fuente de dicho carbono orgánico. Cuando los enlaces hidrofóbicos son los responsables de la adsorción de un herbicida, los valores de  $K_{oc}$  deben ser más o menos constantes entre los diferentes suelos.

### **1.2.3.1. Adsorción de plaguicidas sobre materia orgánica**

Las sustancias húmicas son los principales componentes de la materia orgánica del suelo y se dividen en 3 categorías, atendiendo a su solubilidad:

*Comportamiento del herbicida norflurazona en el sistema suelo-agua. Obtención, caracterización y aplicación de complejos de inclusión norflurazona-ciclodextrina.*

- 1) Ácidos fúlvicos: Solubles tanto en medio ácido como alcalino.
- 2) Ácidos húmicos: Solubles en medio alcalino, pero insolubles en medio ácido.
- 3) Huminas: Insolubles tanto en ácidos como en álcalis.

Todos ellos son polímeros de compuestos aromáticos que contienen cadenas alifáticas, aunque el grado de aromaticidad y los enlaces entre los distintos componentes no están bien definidos.

Respecto a la composición estructural solo se conocen qué grupos funcionales, enlaces y anillos aromáticos están implicados, pero no su disposición dentro de la estructura. Los ácidos húmicos poseen una estructura básica con anillos aromáticos del tipo di- o trihidroxifenol, unidos entre ellos por enlaces, -NH-, -N=, -S-, etc. En cuanto a los ácidos fúlvicos, se ha establecido que consisten en ácidos fenólicos y bencencarboxílicos unidos entre ellos a través de enlaces de hidrógeno para formar una estructura polimérica de considerable estabilidad, la cual está extensamente sustituida por grupos funcionales conteniendo oxígeno. Los ácidos fúlvicos debido a sus bajos pesos moleculares y su alta acidez son más solubles que los húmicos y juegan un papel especial respecto a las transformaciones de los plaguicidas. Los ácidos fúlvicos pueden actuar como agentes transportadores para ciertos plaguicidas en suelos y aguas naturales, incluso para sustancias orgánicas que son insolubles en medio acuoso. Por otra parte, los ácidos fúlvicos, debido a su alto contenido en grupos funcionales, pueden catalizar la descomposición química de ciertos herbicidas; por ejemplo, la hidroxilación de cloro-s-triazinas (Cox y col., 1996; Sun y Pignatello, 1993).

La materia orgánica tiene un papel muy importante en los procesos de adsorción-desorción y posterior movilidad de plaguicidas. Ello es debido a propiedades como la capacidad de cambio de cationes en las sustancias húmicas, que es más alta que la de los silicatos laminares, siendo del orden de 200 a 400 meq/100 g, y poseen además una gran área superficial. De hecho su importancia es tal, que se define el coeficiente  $K_{oc}$  para describir la adsorción de plaguicidas en suelos, normalizado de acuerdo con el contenido

de materia orgánica. Incluso se han llevado a cabo estudios basándose en la influencia de la materia orgánica en el ciclo biológico del plaguicida en suelos, incorporándose ésta de una forma exógena sobre suelos arenosos y así poder demostrar claramente esta estrecha relación. Worrall y col. (1998) llevaron a cabo un estudio relacionado con la importancia de la materia orgánica en la movilidad, adsorción y disponibilidad de herbicidas orgánicos en suelos, aplicando la materia orgánica de una manera exógena a través de abonos, confirmando la importancia de la misma en estos procesos, además de poner en evidencia una reducción de la biodisponibilidad de los plaguicidas por el incremento en la adsorción sobre la materia orgánica.

Los mecanismos que operan en la adsorción de plaguicidas en la materia orgánica son el cambio iónico, cambio de ligandos, fuerzas de Van der Waals, enlaces de hidrógeno, procesos de ión-dipolo y coordinación, a los que hay que añadir complejos de transferencia de carga y enlaces hidrofóbicos. Dichos mecanismos se encuentran solapados, siendo a veces difícil su distinción.

La materia orgánica, concretamente las sustancias húmicas, presentan un alto contenido en grupos químicos de naturaleza diferente, estando presentes tanto componentes hidrofílicos como hidrofóbicos. Los compuestos de baja solubilidad en agua se adsorberán preferencialmente en estas áreas hidrofóbicas mediante los llamados enlaces hidrofóbicos. La partición de los plaguicidas sobre estas superficies hidrofóbicas se realiza por interacciones soluto-solvente débiles, que son especialmente importantes en el caso de plaguicidas no iónicos, los cuales poseen altos valores de  $K_{oc}$  (Weber y Swain, 1993; Loux y col., 1989; Jones, M., N. y Bryan, N., D, 1999).

La adsorción a través de intercambio catiónico, se da en el caso de plaguicidas que, o bien son catiónicos en solución por ejemplo en el caso de los plaguicidas dicuat, paracuat y clordimeform (Maqueda y col., 1989, 1990, 1993), o bien pueden aceptar un protón de las superficies ácidas o de la solución del suelo y adsorberse como molécula protonada (Jacinthe y Pichtel, 1992).

Los enlaces por puentes de H son factibles dependiendo de la polaridad de la molécula del herbicida, que interacciona a través de los grupos funcionales de los ácidos húmicos que contienen hidroxilos y oxígenos. Las reacciones de transferencia de carga provienen de estructuras redox que las sustancias húmicas poseen, dando lugar a estructuras resonantes por transferencia de carga con núcleos aromáticos. Mecanismos de transferencia de carga han sido reseñados en el caso de clordimeform (Maqueda y col., 1989).

Por otra parte, los plaguicidas pueden ser incorporados a las sustancias húmicas a través de enlaces covalentes mediante una oxidación acoplada con radicales polimerizados estables. En el caso del 2,4-D existe evidencia de reacciones de oxidación acoplada vía fenólica (Piccolo y col., 1996).

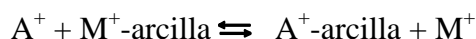
### **1.2.3.2. Adsorción de plaguicidas sobre minerales de la arcilla\_**

La fijación de moléculas orgánicas por minerales de la arcilla depende tanto de las características del silicato (naturaleza del silicato, densidad de carga laminar, naturaleza del catión que satura el espacio interlaminar, etc.) como de las propiedades de las moléculas adsorbidas (grupos funcionales, tamaño, capacidad de protonación, etc).

En líneas generales las reacciones implicadas pueden clasificarse de la siguiente forma:

*A) Procesos de cambio iónico: adsorción de moléculas cargadas.*

A.1) Cambio catiónico: el mecanismo de adsorción de moléculas cargadas por cambio catiónico se explica mediante el intercambio que puede producirse entre cationes minerales adsorbidos que compensan parte de las cargas superficiales de la arcilla y los cationes orgánicos presentes en la fase líquida en contacto con ella. El enlace tiene lugar por fuerzas electrostáticas:





Donde  $M^+$  representa al catión mineral y  $A^+$  a la molécula orgánica cargada.

Aunque existen pocos plaguicidas catiónicos, han sido ampliamente estudiados los herbicidas dicuat, paracuat, clordimeform y clormequat, (Maza y col. 1989; Morillo y Maqueda, 1992; Weber, 1994). Todos son bases fuertes y se ionizan completamente en agua. Debido a su carácter iónico, son altamente solubles en agua y fácilmente adsorbidos por los minerales de la arcilla.

Los cationes orgánicos presentan una serie de propiedades diferentes de los inorgánicos, las cuales determinan el proceso de cambio iónico en las arcillas:

\*La adsorción está influida por otras fuerzas, como enlaces de hidrógeno, ión-dipolo y otras fuerzas físicas, cuya importancia depende en cada caso de factores tales como peso molecular, grupos funcionales y configuración de la molécula.

\*La interacción del catión orgánico con el disolvente empleado puede hacer cambiar la adsorción de dicho catión.

\* El efecto de la densidad y tipo de carga laminar condiciona la orientación de las moléculas en el espacio interlaminar.

A.2) Adsorción de moléculas orgánicas protonadas: muchos compuestos orgánicos pueden adsorberse en el espacio interlaminar de los minerales de la arcilla protonándose y convirtiéndose en cationes. La protonación puede tener lugar en la misma superficie de la arcilla o previamente en solución (Morillo y col, 1997b).

La protonación en la superficie de la arcilla depende de la acidez superficial y la protonación en solución depende del pH de la misma. En ambos casos hay que tener en cuenta el valor de pKa del compuesto. Cuando la protonación se da en solución, la especie protonada se adsorbe por intercambio catiónico.

La protonación en la superficie de la arcilla puede darse mediante tres mecanismos diferentes:

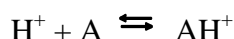
1.- Transferencia de protones que ocupan sitios de cambio:



2.- Donación de protones del agua asociada a un catión interlamilar (hidrólisis):



El grado de desplazamiento de la reacción depende del poder polarizante del catión (o sea, de su carga y radio iónico) pues cuanto mayor sea, más polarizadas están las moléculas de agua (Morillo, y col. 1991). Los protones obtenidos pueden ser tomados por una base orgánica.



La especie protonada se adsorbe a continuación por cambio catiónico.

3.-Transferencia de protones de otras especies protonadas presentes:



Un grupo importante de herbicidas que presentan este tipo de interacción son las triazinas sustituidas. Estos compuestos poseen un carácter débilmente básico, por lo que su existencia en forma de catión dependerá de su capacidad para adquirir un protón, siendo entonces adsorbidos mediante intercambio catiónico. La adsorción de estos compuestos aumenta con el pH de la solución, hasta llegar al pKa del compuesto, a partir del cual disminuye su adsorción. El pKa depende de la naturaleza de los sustituyentes del anillo triazínico (Moreau-Kervevan y Mouvet, 1998).

A.3) Formación de hemisales: cuando una molécula B, adsorbida bajo forma catiónica protonada, fija otra molécula B mediante la formación de un compuesto donde el protón  $\text{H}^+$  es compartido:

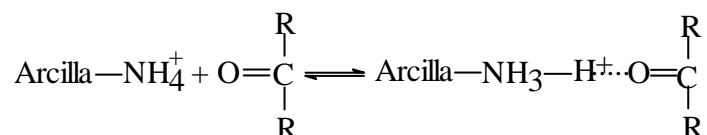


A.4) Cambio aniónico: en contra de lo que cabría esperar, también se ha observado la adsorción de aniones por minerales de la arcilla:



*B) Procesos de enlace de hidrógeno:*

B.1) Enlace de hidrógeno orgánico-orgánico: cuando los cationes de cambio de la arcilla son orgánicos, existe la posibilidad de que éstos interactúen con otras especies orgánicas mediante enlaces de H. Es un proceso parecido a la formación de hemisales. El protón permanece asociado al catión orgánico inicialmente presente, pero interactúa con grupos polares negativos de la otra molécula.



B.2) Procesos por puentes de agua: implican la unión de moléculas orgánicas polares al catión metálico de cambio a través de las moléculas de agua de su primera esfera de hidratación (Sánchez-Martín y Sánchez-Camazano, 1987; Roldán y col., 1991; Weber y Swain, 1993).

*C) Procesos de cambio de ligandos: enlaces por transferencia de carga:*

Interacción que se produce cuando existe una transferencia de electrones entre un dador rico en electrones y un aceptor deficiente en electrones. Estas reacciones se dan con más frecuencia con óxidos y con las sustancias húmicas del suelo, más que con minerales de la arcilla, como se verá en otro apartado de este trabajo.

*D)IÓN-dipolo y coordinación:*

Interacción entre los dipolos de las moléculas orgánicas neutras y los cationes de cambio del silicato, bien directamente o a través del agua de hidratación del catión. La naturaleza del catión saturante del mineral de la arcilla y el agua asociada a él juegan un papel muy importante, ya que determinan la acidez superficial de la arcilla.

Se establece una competencia entre los dipolos de agua de la esfera de hidratación del catión  $M^+$  y las moléculas polares que se adsorben, pues ambos tienden a estar rodeando al catión de cambio.

Entre los plaguicidas polares, los compuestos que presentan mayor interés en estos procesos de adsorción son los carbamatos y los plaguicidas organofosforados (Franci y col., 1990; Pusino y col., 1991; Lalah y Wandiga, 1996; Jana y Das, 1997).

La interacción con los cationes de cambio se puede dar directamente, sustituyendo a dipolos de agua de la primera esfera de hidratación, dando lugar a un enlace ión-dipolo, o bien, sin desplazar al agua, dando lugar a un enlace por puentes de agua.

La adsorción de plaguicidas también puede darse por coordinación, es decir, por la formación de complejos estables con los cationes de cambio. Esto le ocurre al plaguicida aminotriazol con Ni y Cu, principalmente, aumentando su adsorción cuando el catión de cambio es uno de ellos. También le ocurre al glifosato en presencia de Fe, Al y Cu (Morillo y col., 1997b).

#### E) *Fuerzas de Van der Waals:*

Son fuerzas físicas, relativamente débiles, que se superponen a las demás interacciones. Es el resultado de la atracción entre dipolos de moléculas cercanas, por eso disminuyen cuando aumenta la distancia entre ellas. Estas fuerzas son por tanto mayores cuanto mayor sea el tamaño de la molécula adsorbida.

### **1.2.3.3. Adsorción de plaguicidas sobre óxidos y oxihidróxidos**

La adsorción de plaguicidas sobre óxidos es importante, especialmente en plaguicidas ácidos, por interacciones electrostáticas vía adsorción del anión del herbicida sobre sitios de cargas dependientes del pH, cargados positivamente (Maqueda y col., 1986; Loux y col., 1989). Madrid y Díaz-Barrientos (1991) sugirieron que este mecanismo es el que parece estar operando en la adsorción del plaguicida 2,4-D sobre lepidocrocita, atribuyendo la menor adsorción de este plaguicida en presencia de fosfato al efecto que la carga negativa de este último tiene sobre el potencial eléctrico y no a una competencia por los sitios de adsorción. Además de estas interacciones electrostáticas,

otros mecanismos que pueden estar operando en la adsorción de plaguicidas sobre óxidos son interacciones dipolo-dipolo, como es el caso de la hidracida maleica sobre lepidocrocita (Roldán y col., 1991) y la adsorción de primisulfuron sobre ferrihidrita, goetita, buserita y sílica (Ukrainczyk y Ajwa, 1996).

En el estudio del plaguicida clorsulfuron, también ácido, se observó una estrecha relación entre la adsorción de este plaguicida y el número de grupos protonados  $\text{FeOH}_2^+$  (Borggaard y Streibig, 1988). Sin embargo, a bajos pHs, la disminución en la adsorción de clorsulfuron no es fácilmente explicable si la protonación de grupos hidroxilos se considera el único factor importante en su adsorción. Los resultados pueden ser explicados atendiendo a otro mecanismo, como es el intercambio de ligando entre los grupos hidroxilos y el plaguicida. Este mecanismo es el que parece estar teniendo lugar también entre óxidos de hierro y el plaguicida organofosforado glifosato (Maqueda y col, 2002).

#### **1.2.4. Movilidad de plaguicidas en suelos.**

Los herbicidas disueltos en la solución del suelo son percolados a través del suelo por fuerzas gravitacionales y en línea ascendente por capilaridad. Los procesos de movimiento de masas y de difusión están implicados en ambos casos (Hartley y Graham-Bryce, 1980; Taboada y col., 1994). El flujo de agua a través del suelo es normalmente estimado mediante la ecuación de Darcy, la difusión del herbicida a través de la fase líquida por la ley de Fick, la adsorción del herbicida por los coloides del suelo a través de la ecuación de Freundlich y la partición del herbicida con su vapor a través de la ley de Henry. Fundamentándose en estas ecuaciones y a través de numerosas hipótesis se han desarrollado numerosos programas de modelización (CREAMS, PRZM, PESTAN, SESOIL) para predecir el movimiento de plaguicidas y herbicidas a través del suelo. En general dichos modelos pueden clasificarse en dos grupos:

- modelos determinísticos basados en ecuaciones diferenciales clásicas como

de convección-dispersión.

- modelos probabilísticos, basados en el concepto de riesgo, y priorizando parámetros claves.

Tres procedimientos principales en el laboratorio han sido empleados para medir la movilidad relativa de herbicidas a través de suelos: a) columnas de suelos (Weber y col., 1986); b) cromatografía de capa fina de suelo, desarrollados por Helling (1971); c) ensayos inclinados con bandejas de espesor fino de suelo, desarrollados por Gerber y col (1970). La movilidad relativa de un herbicida a través de un suelo dado se estima comparando la cantidad de plaguicida que aparece en el lixiviado, su distribución en el perfil del suelo después del lixiviado y la distancia recorrida relativa a la del frente de agua ( $R_f$ ). Dependiendo del herbicida implicado y las condiciones del estudio, las cantidades de herbicida que aparecen en el lixiviado pueden ser desde no detectables hasta alcanzar más del 90%. Gómez de Barreda y col. (1993) observaron que la capacidad de lixiviación bajo las mismas condiciones disminuía en el orden: bromacilo>atrazina>simazina>terbumetona>terbutilazina>diuron>trifluralin.

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.

Otros factores a tener en cuenta que influyen en la lixiviación son las características físico químicas del suelo (White y col., 1986), frecuencia e intensidad de la lluvia y el riego (Wietersen y col., 1993; Sánchez-Camazano y col., 1996; Morillo y col. 2000; Undabeytia y col., 2000a; Singh y col. 2002).

### **1.2.5. Fotodegradación de plaguicidas.**

Consiste en la degradación no biológica de herbicidas mediante la luz solar. La energía de descomposición fotoquímica de herbicidas se encuentra inversamente relacionada con la longitud de onda de la energía radiante a través de la ecuación de

Einstein, según la cual cuanto más corta sea la longitud de onda mayor será la energía disponible para la fotodegradación. La radiación ultravioleta con longitudes de onda de 200 a 420 nm es la responsable de la degradación fotoquímica de la mayoría de los plaguicidas.

La luz ultravioleta induce una gran variedad de reacciones tales como oxidación, reducción, hidrólisis e isomerización de muchos herbicidas, que incluyen ácidos fenoxialcanoicos como 2,4-D, fenilureas como monurón, amidas tales como CDAA, dinitroanilinas como la trifluralina, ácidos benzoicos, como dicamba, carbamatos como profan, herbicidas fenólicos como DNOC, triazoles como aminotriazol. La cantidad de herbicida fotoquímicamente degradado depende de la susceptibilidad de la molécula, de su exposición a la luz, que depende a su vez del método de aplicación, su tiempo de exposición, el grado de adsorción del plaguicida en el suelo, presencia de catalizadores fotoquímicos, pH del suelo y grado de aireación del suelo. La degradación puede alcanzar desde un bajo porcentaje para un suelo en el que se incorpora el compuesto, hasta más de un 90 % para un herbicida acuático.

En general, se puede distinguir entre fotólisis directa e indirecta. En el primer caso se trata de plaguicidas que absorben la luz ultravioleta dentro del espectro de radiación solar ( $\geq 290$  nm), y la fotólisis indirecta, que tiene lugar cuando la energía de la radiación solar es absorbida por otros compuestos que luego transmiten esta energía a la molécula del plaguicida, o bien dan lugar a nuevas especies reactivas (peróxidos, radicales OH, etc.), que atacan a las moléculas del plaguicida.

La fotólisis directa es importante solo en los primeros milímetros del suelo donde llega la radiación solar, en la superficie de las plantas y, fundamentalmente, en ecosistemas acuáticos, donde los plaguicidas pueden ser transportados en disolución o bien adsorbidos en la materia particulada. La radiación solar UV de mínima longitud de onda que llega a la superficie terrestre es de aproximadamente 286 nm (Roof, 1982), siendo fundamentalmente la radiación en el rango 300-380 nm la responsable de los

procesos de fotólisis (Zepp, 1982).

Los procesos de fotodegradación se ven afectados, en sistemas acuáticos, por sustancias en suspensión o disolución. Zepp y col (1985) han estudiado la fotólisis de soluciones de ácido húmico con objeto de conocer mejor los procesos de fotólisis indirecta, demostrando que las sustancias húmicas son responsables de la fotooxidación de distintos compuestos orgánicos, actuando como precursoras de especies reactivas como oxígeno en estado singulete y radicales OH. Estas reacciones pueden dar lugar a una fotólisis rápida de compuestos que normalmente permanecen estables a la luz. Por otro lado El Azzouzi y col (1999), mediante el estudio de la fotodegradación del plaguicida imazapir en presencia de sustancias húmicas, llegaron a la conclusión de que éstas protegían al plaguicida, observándose una leve disminución en su degradación en comparación con la sufrida en una solución acuosa. Kamiya y col (1995) observaron que la presencia de  $\beta$ -CD promovía la fotodegradación de paration y disminuía la del paraoxon. Kamiya y col (2001) detectaron un incremento en la fotodegradación, en varios plaguicidas organofosforados, en presencia de las CDs naturales y de sustancias húmicas.

La adsorción de plaguicidas en la superficie de minerales de la arcilla también puede dar lugar a un efecto de fotoestabilización de las moléculas, especialmente a las rápidamente fotodegradables (Undabeytia y col. 2000b).

Katagi (1993) ha estudiado la fotodegradación del insecticida esfenvalerate en suspensiones de montmorillonita, caolinita, óxidos de hierro y dióxido de titanio. En todos los casos se observó una aceleración en la fotodegradación de este insecticida excepto en presencia de  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ . Según este autor la exposición de las suspensiones de arcilla,  $\text{FeO}(\text{OH})$  y  $\text{TiO}_2$  a la luz ultravioleta da lugar a radicales OH que participan en los procesos de fotólisis. Larson y col (1991) observaron que los iones  $\text{Fe}^{3+}$  aceleraban la fotodegradación de triazinas atribuido también a la formación de radicales OH.



### **1.3. LIBERACION CONTROLADA DE PLAGUICIDAS**

Los plaguicidas orgánicos que se aplican al suelo son una de las sustancias contaminantes que más preocupan actualmente, ya que es necesario el uso de cantidades masivas de los mismos para la obtención de buenas cosechas, pero a su vez, provocan problemas de contaminación ambiental con graves riesgos tanto para la especie humana como para los ecosistemas naturales. En el momento de la aplicación de un plaguicida se emplean dosis muy altas y posiblemente tóxicas, que frecuentemente decrecen rápidamente en el campo hasta concentraciones por debajo del nivel de efectividad mínimo. Como consecuencia, se necesita volver a aplicar repetidas veces el plaguicida para poder mantener controlada una plaga.

Muchos de los problemas que provocan los plaguicidas, tales como percolación, cortos periodos de actividad, fitotoxicidad, etc, pueden reducirse usando formulaciones que protegen al ingrediente activo, y en las que su liberación se produce de una manera controlada (Wilkins, 1983). La concentración del plaguicida en el medio suelo-planta-agua es así gobernada por el grado de liberación del plaguicida, que depende de la formulación que se use, así como de las pérdidas del mismo por degradación, percolación, volatilización y adsorción sobre los elementos constituyentes del suelo.

Actualmente la industria de los plaguicidas enfoca gran parte de su interés en el desarrollo de productos que no sean dañinos ni para las personas ni para el medioambiente y que a la vez sean eficientes en la lucha contra una plaga específica, usando las mínimas dosis posibles y que actúe a lo largo de un tiempo suficiente para obtener la eficacia biológica deseada, reduciendo al mínimo sus efectos de contaminación. Existen distintas técnicas y materiales que se emplean para la preparación de formulaciones de liberación controlada de plaguicidas. La mayoría de los procesos de recubrimiento y encapsulación han sido desarrollados por grandes industrias y la mayor parte de ellos continúan bajo patente, por lo que no se conocen los procedimientos ni los productos empleados.

Las formulaciones de liberación controlada han adquirido gran significación en estos últimos años en la industria de los plaguicidas debido a las ventajas que aportan, ya que reducen la toxicidad del plaguicida y minimizan su impacto medioambiental al reducir la evaporación y la percolación del mismo. Además, el recubrimiento de los plaguicidas los protegen de las influencias medioambientales, reduciéndose las pérdidas por degradación fotolítica, química y microbiológica, por lo que se necesita aplicar menos cantidad de materia activa para conseguir la eficacia deseada y ello conlleva una reducción en los niveles de plaguicidas en el medioambiente. Por otra parte, se ha comprobado que las formulaciones de liberación controlada pueden aumentar la selectividad del plaguicida y además pueden reducir las incompatibilidades físicas que surgen cuando se usan mezclas de plaguicidas, así como reducir el antagonismo biológico de ciertas mezclas cuando se aplican al campo.

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.). 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 0.2 y 2 mm.

En el caso de las microcápsulas, las sustancias que más comúnmente se han empleado como recubrimiento del plaguicida han sido las siguientes: poliurea, poliamida, resina de melamina, nylon, gelatina, etc. (Scher, 1999). En los últimos años han empezado a desarrollarse y utilizarse también las encapsulaciones moleculares con ciclodextrinas (CDs) (Szejtli, 1982) en las que se forman unos complejos de inclusión entre dos o más moléculas, siendo una de ellas la molécula hospedadora que es la que incluye a la molécula huésped, que sería el plaguicida. Las CDs pueden atrapar una gran

variedad de moléculas que tengan el tamaño de uno o dos anillos de benceno, o incluso moléculas más largas que tengan una cadena de tamaño comparable, formando complejos de inclusión (Szejtli, 1988).

Estas encapsulaciones con CDs tienen las ventajas anteriormente mencionadas para otras formulaciones de liberación controlada, pero además presentan para ciertos plaguicidas poco solubles la ventaja del aumento de su solubilidad en agua, y por tanto su disponibilidad en la solución del suelo (Ginés y col., 1998; Morillo y col., 1998; Pérez-Martínez y col., 2000). Ello se debe a que las CDs presentan alta solubilidad en agua por tener grupos hidroxilos libres en la superficie externa del anillo, siendo la cavidad interna ligeramente apolar. Pero son muy diversas las aplicaciones de los complejos de inclusión de CDs y plaguicidas. Así, Kamiya y col. (1994) han demostrado que el efecto de inclusión de la  $\beta$ -CD sobre paratión inhibe su fotodegradación; el aumento en la disponibilidad de compuestos como el p,p'-DDT mediante su encapsulación con CDs ha sido propuesto como un método para la recuperación de suelos contaminados (Wang y Brusseau, 1993); Dailey y col. (1993) describen la preparación y caracterización espectroscópica de complejos de inclusión de aldicarb y sulprofos con CDs; la liberación controlada de plaguicidas organofosforados ha sido objeto de estudio por parte de Szente (1998).

Dentro de las microcápsulas es interesante señalar el empleo reciente de liposomas y micelas como moléculas huésped para plaguicidas. La formación de liposomas y micelas ha sido extensivamente investigada para su uso en la industria farmacéutica y cosmética (Crommelin y Schreier, 1994). Existen pocos trabajos hasta el momento en lo que se refiere al empleo de vesículas y micelas en la liberación controlada de plaguicidas (Mishael y col., 2002a; Mishael y col., 2002b), aunque la baja solubilidad de muchos plaguicidas en agua ha dado lugar al uso de soluciones micelares para las que se emplean surfactantes.

En el caso de micropartículas y gránulos, el tamaño de partícula (y la uniformidad) es importante, especialmente en aplicaciones donde la duración de la salida

del plaguicida sea crítica. Sin embargo, una formulación conteniendo un rango de tamaños de partícula relativamente amplio tendrá un periodo de efectividad mayor.

La biodegradabilidad de los materiales de formulación también es un aspecto importante en cuanto a la liberación controlada de plaguicidas para aplicaciones medioambientales (Lohmann, 1992). Algunos materiales biodegradables usados en estas formulaciones son los siguientes: polímeros sintéticos, tales como polipéptidos o polivinilalcohol; biopolímeros provenientes de plantas, animales o microorganismos, tales como polisacáridos (almidón, celulosa, pectina, etc.), proteínas, poliésteres, ligninas, látex, resinas, etc.; biopolímeros modificados por sustitución, “crosslinking” o “grafting”, etc. De todos estos materiales biodegradables la macromolécula polifenólica lignina representa un producto abundante en plantas terrestres que protege frente a la luz, agua y microorganismos, degradándose a una menor velocidad que los polisacáridos.

En general existen muchos estudios básicos dedicados a la preparación de formulaciones de liberación controlada de plaguicidas (Dailey y col., 1993; Ginés y col., 1996, 1998; Ishiwata y Kamiya, 1999a, 2000) y al estudio de su cinética de liberación en agua (Davis y col., 1996; Johnson y Pepperman, 1998; Gerstl y col., 1998; Fernández-Urrusuno y col., 2000; Pérez-Martínez y col., 2001; Fernández-Pérez y col., 2000b; Zhao y Wilkins, 2000a; Zhu y Zhuo, 2001). No obstante, la aplicación real de dichas formulaciones en suelos al mismo tiempo que progresan las cosechas no está tan bien documentada en lo que se refiere a su bioeficacia, pérdidas por lixiviación, escorrentías y volatilización, o por procesos de degradación fotoquímica, bioquímica y/o microbiológica, y se conoce relativamente poco sobre la influencia de distintos factores medioambientales en el comportamiento de las formulaciones de liberación controlada.

Quizás los trabajos más abundantes sean los relativos al estudio de la lixiviación del ingrediente activo de las formulaciones de liberación controlada en columnas de suelo en el laboratorio, con objeto de demostrar la efectividad de la formulación con relación a una liberación más lenta del herbicida. A este respecto se pueden señalar trabajos tales como los de Boydston (1992), Mervosh y col.(1995), Johnson y

Pepperman (1995, 1996), Kok y col., (1999) o Hickman y col.(1999). Fernández-Pérez y col., (1998, 2000a, 2000b y 2001) estudiaron la movilidad de los herbicidas isoproturon y atrazina en columnas de suelo empleando una formulación de alginato con bentonita con la cual consiguieron disminuir la movilidad en suelos de ambos. Undabeytia y col. (2000) observaron que las formulaciones del herbicida norflurazona empleando organoarcillas eran más efectivas para reducir la lixiviación del mismo en columnas de suelo, pero sin embargo la eficacia herbicida era comparable a la de la formulación comercial.

Wilkins (1983) ha estudiado durante años la cinética de liberación de herbicidas e insecticidas de gránulos con matrices de lignina, concluyendo que la liberación del plaguicida se produce mediante un mecanismo de difusión controlada. Estudios realizados con el herbicida 2,4-D y gránulos de lignina dieron como resultado el control de malas hierbas en plantaciones de coníferas durante 14 meses (Ferraz y col., 1997). Variando la concentración del plaguicida, el tipo de matriz empleada, la temperatura del ensayo, el tamaño de los gránulos y los aditivos empleados, el tiempo necesario para liberar el 50% del plaguicida ( $T_{50}$ ) puede variar desde 2 días hasta varias semanas (Cotterill y col., 1996).

El tipo de plaguicida encapsulado y sus grupos funcionales tienen una gran influencia en el grado de liberación del mismo, debido a la energía de enlace químico que se establece entre la matriz y el plaguicida, así como a la facilidad de solubilización del mismo. Cuanto mayor es la solubilidad de un plaguicida, menor es el valor de  $T_{50}$ . El coeficiente de partición octanol-agua de un plaguicida ( $K_{ow}$ ) es también un buen factor para predecir el valor de  $T_{50}$  y el grado de liberación, ya que cuanto mayor sea  $K_{ow}$ , más lenta es la liberación, pues la afinidad del plaguicida por la fase orgánica (lignina, almidón, celulosa, etc.) es mayor que por el agua.

El uso de aditivos solubles en agua a la fase matriz influye también en la cinética de liberación. Así por ejemplo, la adición de urea incrementó el grado de liberación de diurón en matrices de lignina (Cotterill y Wilkins, 1996). La rápida disolución de la urea

crea una estructura porosa, incrementando la penetración del agua dentro de los gránulos de lignina.

Polímeros naturales como el almidón han sido utilizados también como material matriz. Las formulaciones encapsuladas con almidón presentan una difusión controlada del ingrediente activo desde el interior del gránulo hasta la solución del suelo, por lo que le influyen factores tales como el tamaño del gránulo, la humedad, temperatura y actividad microbiana. Se han usado mucho para los plaguicidas atrazina, alaclor y metolaclor (Buhler y col., 1994; Mills y Thurman, 1994; Hickman y col., 1999).

También se han empleado alginatos en formulaciones tipo gel, que requieren además la incorporación de adsorbentes dentro del gel. Los adsorbentes más empleados han sido arcillas, sílice, alúmina o carbón, dando lugar a un mayor control en el grado de liberación (Pepperman y Kuan, 1993; Johnson y Pepperman, 1995).

Algunos derivados de la celulosa se emplean también como matrices para formulaciones de liberación controlada de plaguicidas, aunque su uso y el desarrollo de estas formulaciones no está tan extendido como los de lignina o almidón. Los derivados de la celulosa son buenos candidatos para este tipo de formulaciones ya que son biodegradados vía hidrólisis por la enzima celulasa, producidas por bacterias y hongos muy corrientes en medios naturales. Algunos de estos derivados son solubles en agua o inestables, por lo que han de hacerse insolubles o estabilizarlos durante la síntesis de la cadena macromolecular mediante “crosslinking” o por adición de ciertas sustancias. Así por ejemplo, la carboximetilcelulosa se ha usado estabilizada con gelatina (Prasad y Kalyanasundaram, 1993). La liberación de aldícarb de carboximetilcelulosa con aluminio ha sido también descrita (Darvari y Hasirci, 1996). Dailey y col., (1998 y 1999) han estudiado las propiedades de liberación controlada de los plaguicidas atrazina, metribuzín y cianazina de formulaciones poliméricas elaboradas con derivados de celulosa: etilcelulosa y butirato y acetato de celulosa. Fernández-Urrusuno y col., 2000 estudiaron la liberación controlada del plaguicida alaclor con formulaciones de distintos tipos de etilcelulosa.

Los minerales de la arcilla representan otro grupo de aditivos para conseguir formulaciones de liberación controlada. Modificando el espacio interlamilar de los minerales de la arcilla con cationes orgánicos la superficie se hace hidrofóbica y la adsorción de moléculas de plaguicidas aumenta (Gerstl, 1998; Nir y col., 2000). Hace unas décadas la montmorillonita saturada con el catión piridinio fue usada para estabilizar el herbicida N,N-di-n-propyl thiocarbamato (Mortland, 1968). Más tarde esta idea fue usada para proteger herbicidas frente a la fotodegradación (Margulies y col., 1992, 1993; El-Nahhal y col., 1999a) y para reducir la percolación y la volatilidad de alaclor y metolaclor usando montmorillonita modificada por cambio catiónico con el ión benciltrimetilamonio (El-Nahhal y col., 1998, 1999b). Otra posibilidad que se ha estudiado es la de abrir el espacio interlamilar mediante reacciones de pilarización, con objeto de aumentar la penetración de moléculas de plaguicida entre las láminas (Polubesova y col., 2000). Además, la modificación de las nuevas galerías obtenidas mediante la adsorción de ciertos cationes o moléculas orgánicas puede aumentar también la adsorción de plaguicidas (Zielke y Pinnavaia, 1988; Srinivasan y Fogler, 1990; Michot y Pinnavaia, 1991; Mishael y col., 1999). Estudios de liberación de alaclor de montmorillonitas pilareadas con Al y su transporte en columnas de suelo revelaron el potencial uso de montmorillonitas pilareadas para formulaciones de liberación controlada de herbicidas (Gerstl y col., 1998).

Una de las líneas recientes de investigación en liberación controlada de plaguicidas se basa en la biodegradabilidad en suelos de distintos polímeros, tanto naturales como sintéticos. De esta forma, el plaguicida no necesita estar químicamente unido a la matriz, y, por otra parte, la cinética de liberación del mismo no estaría controlada por el grado de difusión del plaguicida en cuestión, sino por el grado de biodegradabilidad del polímero, independientemente de las propiedades del plaguicida.

Así, a través de la elección de un polímero idóneo, su cinética dependerá de la actividad microbiana del suelo, que varía según la estación del año de una forma paralela

a como lo hace el ciclo de crecimiento de las cosechas (Marshall y col., 1999).

## **1.4. CICLODEXTRINAS (CDs)**

### **1.4.1. Historia y concepto**

El primer trabajo sobre el aislamiento de una sustancia reconocible como CD fue realizado por Villiers en 1891. Dicho investigador aisló una pequeña cantidad de sustancia cristalina de un medio de cultivo de *Bacillus amylobacter*, la cual fue denominado celulosina.

El siguiente avance en la química de las cicloextrinas fue realizado entre los años 1903 y 1911 por Schardinger, que fue el primero en aislar el bacilo productor de la enzima responsable de la transformación del almidón en CD (*Bacillus macerans*).

Schardinger caracterizó esta sustancia cristalina como una mezcla de dos oligosacáridos cíclicos, a los cuales denominó dextrina cristalina  $\alpha$  y dextrina cristalina  $\beta$ , describiendo detalladamente su aislamiento y preparación de ambas sustancias cristalinas. Por ello, estas CDs son también conocidas como dextrinas de Schardinger, cicloglucanos o cicloamilosas.

Pringsheim descubre su poder complejante y su aptitud para formar compuestos de inclusión con distintas moléculas, observando una modificación en el comportamiento de las mismas.

Las CDs se pueden definir como oligosacáridos cíclicos constituidos por un número variable de unidades de glucosa unidas por enlaces  $\alpha$ -(1,4). Estas moléculas son capaces de formar complejos de inclusión con numerosos productos, debido a su conformación toroidal o de “donut”, que delimita una cavidad relativamente apolar, mientras que el exterior presenta una naturaleza hidrofílica, pudiendo formar compuestos de inclusión tanto en medio líquido como en estado sólido (Szejtli, 1982).



En los últimos años las CDs han acaparado un gran interés en el campo de los plaguicidas, debido a su capacidad para formar compuestos de inclusión con estas moléculas, obteniéndose importantes mejoras que resolverían algunos de los problemas más importantes que plantean en la actualidad, así por ejemplo, el aumento de la hidrosolubilidad, lo que supondría una reducción en la toxicidad y coste económico que supone el empleo de disolventes orgánicos (Szejtli, 1988).

#### **1.4.2. Obtención**

Las CDs son producidas por la acción de la enzima CD glicosiltransferasa (CGT) en un medio que contenga almidón. El producto primario de la rotura por la CGT experimenta una reacción intramolecular dando lugar a productos finales cíclicos, por medio de enlaces  $\alpha$ -(1,4).

La nomenclatura de las CDs se realiza por medio de letras griegas para denotar el número de unidades de D-glucosa:  $\alpha$  para las de 6 unidades,  $\beta$  para las de 7,  $\gamma$  para las de 8 y así sucesivamente para CDs superiores. Se puede llegar a encontrar CDs con un mayor número de subunidades de D-glucosa, pero estas presentan dificultades tanto para su purificación como para su posible complejación con otras moléculas. CDs con un número inferior a 6 unidades no se pueden aislar debido a impedimentos estéricos.

#### **1.4.3. Estructura química**

Como consecuencia de la conformación del  $C_1$  de las unidades de  $\alpha$ -D-glucopiranososa y la ausencia de libre rotación en los enlaces glucosídicos, estas moléculas no son totalmente cilíndricas, sino que presentan una conformación troncocónica. Los grupos hidroxilos secundarios (ligados a los átomos  $C_2$  y  $C_3$  de las unidades de glucosa) y los hidroxilos primarios se encuentran situados, cada uno, en los polos opuestos de la molécula, siendo más estrecho el lado donde se encuentran los hidroxilos primarios,

confiriendo a la molécula una estructura hidrofílica en el exterior de la misma. La libre rotación de los hidroxilos primarios, debido a que no se encuentran rodeados por átomos de hidrógeno, puede ser la responsable de la reducción del diámetro efectivo por donde esto ocurra, mientras que los hidroxilos secundarios, situados en cadenas más rígidas, no tendrían esa posibilidad.

Los hidroxilos secundarios pueden formar puentes de hidrógeno entre sí, concretamente entre el hidroxilo secundario portado por el C<sub>2</sub> y el hidroxilo secundario portado por el C<sub>3</sub> del residuo glucopiranosil adyacente. Por lo tanto en las CDs se puede formar un cinturón completo de uniones de hidrógeno, siendo responsable de la formación de una estructura rígida, tal y como ocurre con la β-CD.

Esta estructura, así estabilizada, permite una orientación particular de los protones libres H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>, H<sub>4</sub>, H<sub>5</sub> (soportados por C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub>). Los H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub> y H<sub>4</sub>, se encuentran dirigidos hacia el exterior, mientras que los H<sub>3</sub> y H<sub>5</sub> lo están hacia el interior de la cavidad.

La cavidad de la CD consiste en un anillo de átomos de hidrógeno aportados por los C<sub>3</sub>, otro anillo de oxígenos aportados por los enlaces glucosídicos y por un último anillo de átomos de hidrógeno aportados por los C<sub>5</sub>. Por esta razón, la cavidad presenta un carácter apolar.

#### **1.4.4. Propiedades fisicoquímicas**

Las principales características estructurales de la CDs naturales se recogen en la tabla 1 y sus propiedades fisicoquímicas más importantes en la tabla 2.

*Tabla 1.- Dimensiones de las CDs naturales.*

<b>CAVIDAD:</b>	<b><math>\alpha</math></b>	<b><math>\beta</math></b>	<b><math>\gamma</math></b>
<b>Diámetro interior (Å)</b>	5	6	8
<b>Diámetro exterior (Å)</b>	14.6	15.4	17.5
<b>Profundidad (Å)</b>	7.9	7.9	7.9
<b>Volumen (Å<sup>3</sup>)</b>	174	262	427
<b>Volumen/mol (mL)</b>	104	157	256
<b>Volumen/g. (mL)</b>	0.1	0.14	0.20

*Tabla 2.- Propiedades físico-químicas de las CDs naturales.*

	<b><math>\alpha</math></b>	<b><math>\beta</math></b>	<b><math>\gamma</math></b>
<b>Peso molecular</b>	972	1135	1297
<b>Solubilidad (1)</b>	14.5	1.85	23.2
<b>Punto de fusión (°C)</b>	275	280	275
<b>Contenido en agua (%)</b>	10	13	16

(1) en gramos por 100 mL de agua a temperatura ambiente.

## **1.5. COMPUESTOS DE INCLUSIÓN CON CICLODEXTRINAS**

### **1.5.1. Concepto**

El término “einschlussverbindurg” (compuesto de inclusión) fue introducido por Schlenk en 1950, aunque también se conoce en la literatura a través de otras denominaciones, tales como caltrato, aducto, compuesto molecular y complejo.

En general, los complejos de inclusión son compuestos moleculares que presentan la estructura característica de un caltrato, en el cual la molécula hospedadora envuelve a otra. De este modo, el compuesto incluido (molécula huésped), se encuentra situado en la cavidad del hospedador, sin verse afectada de manera significativa su estructura. Aparte de la leve deformación, un hecho característico es que el tamaño y la forma de la cavidad disponible permanecen prácticamente inalterados. Los compuestos de inclusión resultantes pertenecen a los complejos del tipo “hospedador-invitado”.

### **1.5.2. Requerimientos para la formación de compuestos de inclusión**

La formación de los compuestos de inclusión con CDs se divide en 5 etapas, que se describen a continuación.

- I) Ruptura del agua de estructura del interior de la cavidad de la CD con eliminación de algunas moléculas de agua fuera del anillo.
- II) Desordenación de la estructura del agua alrededor de la molécula que va a ser incluida y transporte de algunas moléculas de agua hacia la solución.
- III) Interacción de la molécula del sustrato o de algunos de sus sustituyentes con grupos del borde o del interior de la cavidad de la CD.
- IV) Formación de posibles puentes de hidrógeno entre el sustrato y la CD.

V) Restablecimiento de la estructura del agua alrededor de la parte exterior de la molécula de CD después de la inclusión.

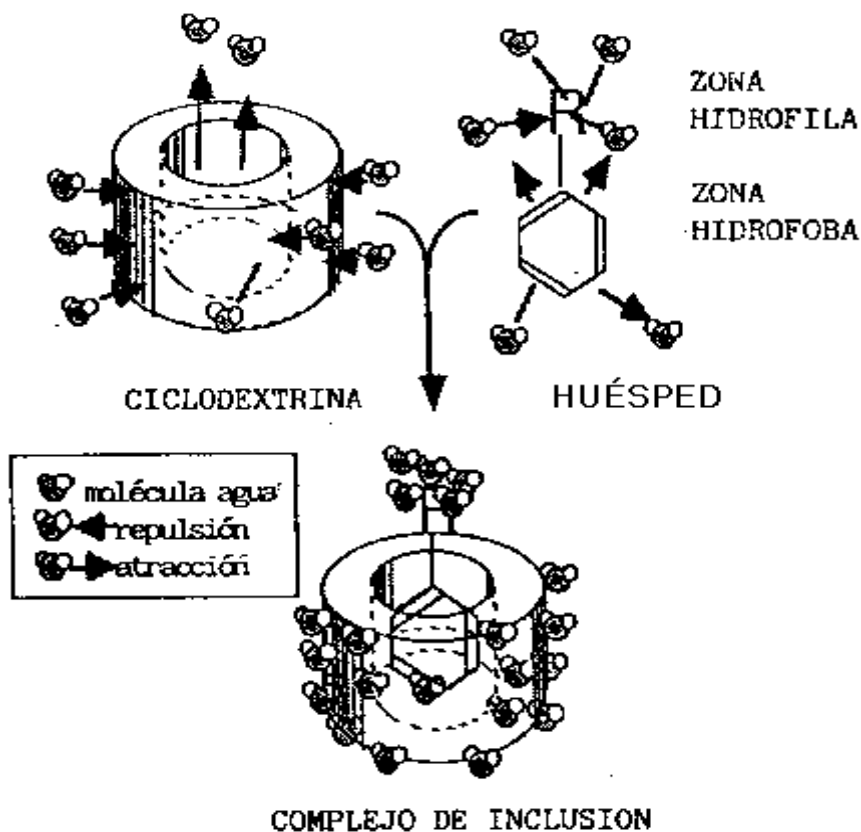
Resulta importante señalar que la fase de formación de puentes de hidrógeno nunca va a ser una fase limitante en el proceso de formación del complejo de inclusión, debido a que se forman de una manera extremadamente rápida. La formación del complejo de inclusión se establece mediante uniones no covalentes sustrato-ligando, tales como Van der Waals, electrostáticas, de inducción o polarización y de dispersión o de London.

Para que se forme un complejo de inclusión deben cumplirse una serie de requisitos, los cuales se enumeran a continuación.

#### Factores estéricos

Se trata de un factor limitante en la formación del complejo puesto que el tamaño de la molécula huésped determinará la inclusión, parcial o total de la misma, en la cavidad de la CD. De las diferentes etapas para la formación del complejo las etapas de aproximación (I) e interacción (IV) están claramente influenciadas por la compatibilidad geométrica entre la CD y la molécula huésped. El proceso global se esquematiza en la figura 2.

Una buena acomodación de la molécula huésped al tamaño de la cavidad de un tipo concreto de CD conducirá a un mayor número de interacciones entre ambas moléculas, hecho que conduce a un valor más elevado para la constante de estabilidad del complejo. Sin embargo, también puede darse la formación del complejo de inclusión, con la sola penetración de ciertos grupos o cadenas laterales de dichas moléculas dentro de la cavidad de la CD (Bekers y col., 1991).



*Figura 2. Esquema de la formación de un compuesto de inclusión con CD.*

De todo ello se puede concluir fácilmente, teniendo en cuenta las dimensiones de las cavidades de las CDs, qué moléculas o radicales de bajo peso molecular forman complejos estables con la  $\alpha$ -CD (Liveri y col., 1992; Steffan y col., 1992; Novak y col., 1994; Pérez Martínez y col., 1995; Lino y col. 2002), y del mismo modo moléculas de alto peso molecular con mayor número de ramificaciones formarán complejos estables con CDs de mayor cavidad como la  $\beta$  y en especial la  $\gamma$ -CD (Matsuyama y col., 1987; Pitha y col., 1987 Giordano y col., 1988; Tan y col., 1991; Van Doorne y Bosch, 1991; Suenaga et. Al., 1992; Singh y Agarwal, 2002; Charoenchaitrakool y col., 2002).

En algunos casos se han detectado moléculas cuya complejación está dificultada por el uso de derivados de CDs (Moyano y col., 1997). En este caso lo que aparecen son impedimentos estéricos debidos a los radicales de la propia CD.

### Medio

En principio, no es necesario ningún tipo de disolvente para que se pueda formar un compuesto de inclusión. Por ejemplo, mezclando  $\beta$ -CD cristalina finamente pulverizada con ácido salicílico pulverizado y almacenándolos varios meses en un recipiente cerrado, a temperatura ambiente, se forma espontáneamente un compuesto de inclusión de estequiometría 1:1. Con “moléculas huésped” no sublimables, este proceso no es posible llevarlo a la práctica, al ser demasiado lento.

El proceso de complejación se ve favorecido en presencia de agua. La formación de complejos en solución es un proceso muy rápido; sin embargo, sustancias que posean buena solubilidad son complejadas débilmente, por regla general. En cambio, las moléculas que presenten una buena complejación suelen poseer baja solubilidad en agua.

En la preparación de los complejos de inclusión en medio líquido se pueden diferenciar claramente dos etapas. En la primera fase, es necesario que el plaguicida pase del estado sólido a la solución acuosa que contiene la CD, es decir que se solubilice. La segunda fase consiste en la formación del complejo de inclusión tras un proceso de equilibrio, el cual se establece muy rápidamente.

Generalmente, la presencia de disolventes orgánicos no es deseable, pero muchas veces es inevitable. Moléculas huésped muy poco solubles no pueden ser complejadas en una concentración o tiempo aceptable sin acudir al empleo de estos disolventes. Muchas veces, estos disolventes no pueden ser eliminados en su totalidad, pues forman parte integral del producto en forma de complejo disolvente-CD, o bien como compuesto ternario (disolvente-huésped-CD) ligado a la cavidad de la CD, junto al huésped principal.

### Polaridad y carga

Partiendo de la idea de que la naturaleza de la cavidad de la CD es hidrófoba es fácil pensar que las especies o radicales menos iónicos y de carácter hidrófobo darán lugar a la formación de complejos de inclusión más estables en solución acuosa,

favoreciéndose la aparición de fuerzas de interacción entre ambas moléculas de tipo hidrófobo, las cuales son las principales responsables de la formación del complejo. De esta forma, moléculas fuertemente hidrófilas y grupos fuertemente hidratados e ionizados no son o son débilmente complejables.

Por último hay que tener en cuenta que fuerzas cohesivas demasiado fuertes entre moléculas impiden su separación, lo cual es una precondition para la inclusión. Una medida de la cohesión entre las moléculas de una sustancia cristalina lo va a dar el punto de fusión del compuesto, por lo que productos con un punto de fusión superior a 250°C no conducen a compuestos de inclusión estables.

### **1.5.3. Métodos de elaboración**

No existe una técnica universal para la preparación de complejos de inclusión ya que el método tendrá que adaptarse a las características del principio activo y sus requerimientos. A la hora de elegir un método de elaboración es importante tener en cuenta si el método va destinado a una producción a nivel de laboratorio o industrial. Aunque los métodos de elaboración descritos en la bibliografía son numerosos y variados, se podría hacer una clasificación en función de su naturaleza.

#### **1.5.3.1. Preparación de complejos en medio líquido**

Estos métodos consisten básicamente en añadirle el plaguicida o una solución acuosa del mismo u otro disolvente, si el principio no es hidrosoluble, a una solución acuosa de CD bajo agitación.

El disolvente utilizado deberá ser principalmente miscible con el agua. Una vez añadido el plaguicida la solución se dejará en agitación durante un tiempo variable para conseguir el equilibrio.

#### *Coprecipitación*

Este método de obtención del complejo de inclusión solo podría ser usado para



*Comportamiento del herbicida norflurazona en el sistema suelo-agua. Obtención, caracterización y aplicación de complejos de inclusión norflurazona-ciclodextrina.*

aquellos complejos que presenten una solubilidad limitada. La mezcla se somete a agitación durante varios días en un recipiente cerrado a temperatura constante hasta alcanzar el equilibrio. El complejo precipita y se puede aislar mediante filtración llevándolo por último a un estufa o a vacío durante 24 horas.

*Atomización*

Este proceso consiste en la preparación de una solución de CD en agua y del plaguicida en un disolvente orgánico, siendo etanol el más comúnmente utilizado. Ambas soluciones se mezclan en las proporciones adecuadas para evitar la coprecipitación de alguna de las sustancias participantes. Posteriormente se dejan en agitación, por ejemplo en un ultrasonidos, durante un determinado tiempo hasta conseguir una distribución homogénea de las soluciones. Una vez conseguida esta solución, se introduce en un *atomizador*, donde es nebulizada en forma de gotas finamente divididas. La acción del aire a alta temperatura evapora el disolvente obteniéndose el complejo sólido.

*Liofilización*

Se realiza de la misma manera que en el caso anterior pero sometiendo la muestra a liofilizado (congelación-liofilización), para la eliminación del disolvente y así obtener el complejo sólido.

*Neutralización*

Consiste en adicionar el principio activo en forma de sal a una solución ácida o básica de CD provocando la posterior precipitación al ajustar el pH a la neutralidad, filtrando y secando posteriormente el precipitado obtenido. No es aplicable para principios activos inestables a pHs ácidos o básicos. Ha de tenerse en cuenta también que las CDs a pHs muy ácidos se convierten en oligosacáridos lineales por hidrólisis.

### **1.5.3.2. Preparación de complejos en medio sólido**

Entre otros métodos los más utilizados son el *amasado*, la molienda y el calentamiento en contenedor sellado.

#### *Amasado*

Este método es uno de los más descritos en la bibliografía, consistente en la disolución del principio activo en un disolvente adecuado, volátil, en un mortero, y se van añadiendo cantidades de CD paulatinamente, amasando la mezcla simultáneamente. El tiempo empleado para el *amasado* es variable, secándose en una estufa, evaporándose el disolvente y obteniendo finalmente el complejo sólido de inclusión. La gran ventaja de este método es que se obtiene un rendimiento muy alto del proceso, además de ser un método barato y sencillo muy apto para su uso a nivel industrial.

#### *Molienda*

Consiste en someter la mezcla física a un tratamiento de molienda en un molino mediante un proceso de pulverización. Este método está especialmente recomendado para principios activos sensibles a la hidrólisis. Al igual que el anterior, es de una gran aplicación en el ámbito industrial por su sencillez, rendimiento y bajo costo para la obtención del complejo.

#### *Calentamiento en contenedor sellado*

La mezcla de CD y principio activo, se introduce en un recipiente hermético (de acero o vidrio), sometiéndola a continuación a agitación vigorosa y calentamiento a una temperatura definida durante un tiempo determinado.

### **1.5.4. Métodos de estudio del complejo de inclusión**

En el transcurso del proceso de formación del complejo de inclusión, se van a dar interacciones entre la molécula del plaguicida y la CD que pueden ser de diferente naturaleza (hidrofóbicas, fuerzas de Van der Waals, enlaces de hidrógeno,

electrostáticas) y éstas se producirán de manera independiente o en cooperación (Giordano y la Manna, 1991, Bekers y col., 1991). Estas interacciones pueden modificar las propiedades fisico-químicas de la molécula huésped, siendo su estudio lo que permitirá seguir la inclusión y determinar la naturaleza del complejo formado. Existen numerosos métodos de estudio de la complejación. Para su aplicación hay que tener en cuenta que los complejos formados pueden presentarse en estado sólido o líquido.

#### 1.5.4.1. Métodos de estudio de los complejos de inclusión en solución

Todos ellos se rigen por un mismo principio general. Se basan en el análisis, por un lado del plaguicida y de la CD independientemente y por otro, en el análisis del complejo formado. Las modificaciones observadas son las que confirmarán la posible formación del complejo de inclusión por interacciones entre sus moléculas.

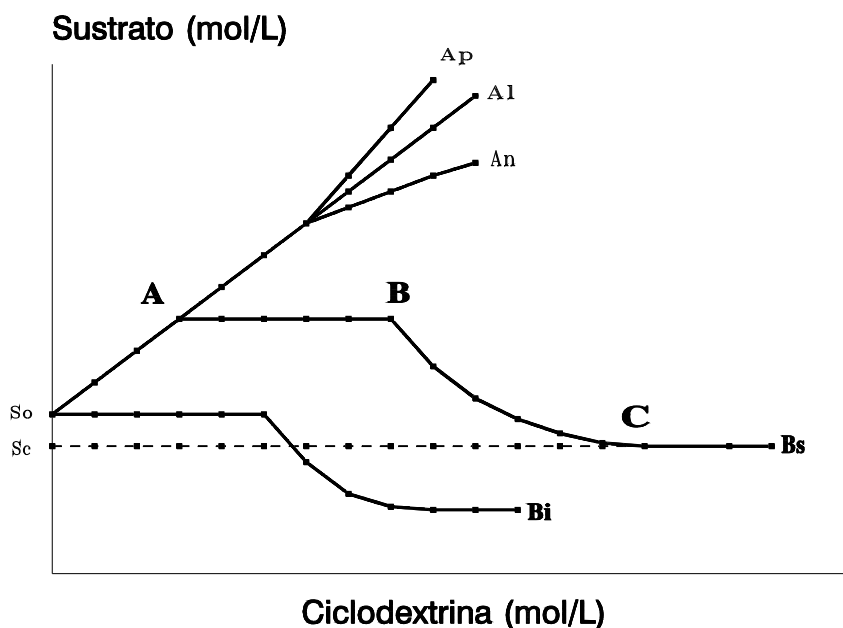


Figura 3.- Representación de los distintos tipos de diagramas de solubilidad existentes.  $S_c$ : solubilidad límite del complejo poco soluble.  $S_o$ : solubilidad de la molécula huésped.

*Comportamiento del herbicida norflurazona en el sistema suelo-agua. Obtención, caracterización y aplicación de complejos de inclusión norflurazona-ciclodextrina.*

Este método fue el propuesto por Higuchi y Connors, 1965. Se basa en la observación del cambio de solubilidad que presenta un sustrato a lo largo de la adición del agente complejante. La molécula de sustrato se irá añadiendo a soluciones de concentraciones crecientes de CDs, bajo condiciones de agitación y temperatura constantes. Tras dejarlos un tiempo suficiente para alcanzar el equilibrio, se realizarán medidas de las concentraciones de sustrato disuelto. Finalmente se representan las concentraciones de sustrato disuelto frente a las concentraciones crecientes de CDs. Los diagramas de solubilidad obtenidos se clasifican en diferentes tipos, los cuales se muestran en la figura 3.

- Tipo A: Si la solubilidad del complejo es ilimitada. Aparece un complejo soluble donde la concentración del sustrato aumenta con la concentración de la CD. Las curvas del tipo A pertenecen a alguno de estos subtipos:

$A_L$ : Se trata de un complejo de inclusión con estequiometría 1:1.

$A_P$ : El complejo posee una estequiometría superior a la proporción 1:1.

$A_n$ : este tipo de curvas son más difíciles de interpretar pues las interacciones soluto/soluto y solvente/soluto complican el sistema.

- Tipo B: se obtiene cuando la solubilidad del complejo es limitada, es decir, que posee un límite de solubilidad a partir del cual precipita. Existen dos subtipos:

$B_i$ : en este caso se forma el complejo de inclusión, pero este no es soluble, no existiendo mejora en la solubilidad de la molécula huésped.

$B_S$ : el complejo se forma y nos aporta una mejora en la solubilidad del huésped. En el punto A la solubilidad del complejo alcanza su límite y las posteriores adiciones de CD conducen a su precipitación. La concentración de sustrato permanece constante en el tramo de A hasta B debido a la disolución del sustrato sólido remanente, hasta que todas las moléculas de éste forman un complejo insoluble, por la creciente adición de CD, precipitando en un complejo.

*Comportamiento del herbicida norflurazona en el sistema suelo-agua. Obtención, caracterización y aplicación de complejos de inclusión norflurazona-ciclodextrina.*

En algunas ocasiones se ha podido observar un aumento de solubilidad a partir del punto C causado por la formación de un nuevo compuesto de inclusión.

El cálculo de la constante de estabilidad, para aquellos complejos para los cuales se les presupone una estequiometría de tipo 1:1,  $K_{1:1}$ , se realiza a partir de la pendiente de la curva  $A_L$  o bien de la pendiente de la porción inicial de la curva  $B_S$ , según la expresión de Higuchi y Connors (1965):

$$K_{1:1} = \frac{\text{pendiente}}{S_0 (1 - \text{pendiente})}$$

Otro de los datos que se pueden obtener a partir del diagrama de solubilidad es la eficacia solubilizante, que se define como el aumento de solubilidad relativa del plaguicida observado a una determinada concentración de CD, a partir de la siguiente ecuación:

$$\text{Eficacia solubilizante: } S_{cd}/S_0$$

$S_{cd}$ : Concentración del soluto a una determinada concentración de CD

$S_0$ : Solubilidad del sustrato en ausencia de CD.

*Espectrofotometría ultravioleta*

Mediante esta técnica se puede obtener información sobre la formación del complejo, observándose, en caso afirmativo, un desplazamiento espectral debido a la formación de complejo con CD. La presencia de un desplazamiento batocrómico del máximo de absorción de la sustancia a encapsular, acompañado de una ligera disminución de la intensidad de dicho máximo de absorción, es indicativo de la presencia de un compuesto de inclusión (Puglisi y col., 1990; Ismail, 1991; 1992; Leroy-Lechat y col., 1992).

*Resonancia magnética nuclear de protones (<sup>1</sup>H-RMN)*

La espectroscopía de <sup>1</sup>H-RMN es una de las técnicas más útiles de las que se dispone hoy en día para la confirmación de estequiometría, estabilidad y geometría de los complejos de inclusión obtenidos, proporcionando una información directa sobre la formación del complejo. La principal ventaja de esta técnica es que en el proceso de la absorción están implicados los núcleos de los átomos, pudiéndose dilucidar los átomos que se encuentran directamente implicados en las interacciones entre la molécula huésped y la CD (Amato., y col., 1992; Fronza, y col., 1992; Hirayama, y col., 1992; Krenn., y col., 1992; Matsuda y col., 1991; Dailey, y col., 1993; Pérez-Martínez., y col., 2000a).

La técnica, aplicada a la determinación de la formación de complejos de inclusión con CDs, se basa en la detección del desplazamiento de ciertos picos en el espectro del complejo respecto al espectro de las sustancias participantes por separado, provocado por la participación de los átomos de hidrógeno en la formación de los puentes de hidrógeno entre ambas moléculas. Se verán afectados por un lado, los átomos de hidrógeno localizados en el interior de la cavidad (C<sub>3</sub>-H y C<sub>5</sub>-H) y por otro lado, aunque en menor medida, aquellos situados en el exterior de la cavidad de la CD (C<sub>2</sub>-H, C<sub>4</sub>-H, C<sub>6</sub>-H).

La estequiometría de los complejos de inclusión puede calcularse mediante la técnica de los puntos de Job (Job, 1928), donde se representa la variación de los valores de desplazamiento químico para un determinado protón (H<sub>3</sub> y H<sub>5</sub> en el caso de la CD), frente a la fracción molar del huésped en una disolución plaguicida-CD. La estequiometría del compuesto de inclusión vendrá establecida en el punto de variación máximo, que se corresponde con una fracción molar determinada. Finalmente la constante de estabilidad, también puede ser determinada mediante la aplicación de la ecuación de Scott (1956).

#### **1.5.4.2. Métodos de estudio de los complejos de inclusión en estado sólido**

Los complejos de inclusión se pueden obtener en estado sólido y, como tales pueden ser estudiados, por varios métodos analíticos, los cuales, serán descritos a continuación:

##### *Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)*

Esta técnica se basa en la medida de la cantidad de calor absorbida o liberada por una muestra sometida a un programa de temperatura controlado (la temperatura aumenta linealmente con el tiempo). El equipo mide las diferencias entre la cantidad de calor de la muestra y un patrón de referencia. La comparación de los diagramas obtenidos, en una mezcla física y de plaguicida y CD con el del supuesto complejo podrá aportar una información crucial para confirmar la formación del complejo de inclusión (Kawahara y col., 1992; Uekama y col., 1992; ;Dailey y col., 1993; Pérez-Martínez y col., 1998; Pérez-Martínez y col., 2000; Bettinetti y Sorrenti, 1994).

##### *Termogravimetría (TG)*

Esta técnica se basa en la variación de peso que experimenta una muestra, colocada bajo una atmósfera controlada, sometida a un programa de temperaturas, normalmente aumentando de manera lineal con el tiempo. Se trata de una técnica de gran utilidad en los casos en que el plaguicida presente procesos de descomposición por debajo de la temperatura de descomposición de las CDs (a partir de 250°C). Con esta técnica se obtiene una información menos completa que con DSC. En general se trata de una técnica muy útil a la hora de determinar la formación, de compuestos de inclusión de una molécula huésped volátil (Szafranek, 1993; Nakai y col., 1988; Claudy y col., 1991).

##### *Microscopía de Platina Caliente (HSM).*

Es una técnica se basa en calentar la muestra hasta su punto de fusión, pudiendose observar los cambios que pudieran sufrir a dicha temperatura. Su uso no está muy generalizado en el campo de las inclusiones con CDs, aunque es útil cuando se trata

de un sustrato que presenta un punto de fusión superior al de las CDs, lo cual implica que los verdaderos compuestos de inclusión presenten un único efecto de fusión, tras el cual se obtiene un fluido homogéneo constituido por una sola fase correspondiente a dicho complejo. Cuando el principio activo funde a menor temperatura que la CD, resulta difícil de detectar su cambio de estado visualmente, debido a que su porcentaje en peso en la mezcla suele ser minoritario respecto al de la CD.

Esta técnica puede ser interesante en el caso de que el producto de estudio presente características volátiles, pudiéndose llegar a estudiar su sublimado, recogido al aplicar la muestra sobre el producto. Se ha aplicado esta técnica con éxito para poner en evidencia el proceso de transformación sólido-sólido que registra la  $\beta$ -CD (Kohata y col., 1994; Bettinetti y col., 1994; Pérez-Martínez y col., 1998; Pérez-Martínez y col., 2000).

#### *Espectroscopía de infrarrojos (IR)*

Se basa en la detección de la formación del complejo, mediante desplazamientos y variaciones en la intensidad de las bandas características de los grupos funcionales de la molécula huésped, comparándolos con los de las sustancias participantes, por separado, y la mezcla física. Dichos desplazamientos son debidos a que las rotaciones y/o vibraciones de la sustancia huésped en el interior de la cavidad de la CD se encuentran restringidas (Szejtli, 1988; Lin, 1990; Dailey y col., 1993; Muñoz-Botella y col., 1996).

#### *Difracción de Rayos X*

Esta técnica resulta muy útil para el estudio de la formación de complejos de inclusión cristalinos. Se basa en que cada sustancia posee un patrón de difracción característico. El patrón de difracción del complejo de inclusión se distingue claramente del espectro de la mezcla física de ambos componentes. El estudio del patrón de difracción permite determinar, además, el grado de cristalinidad de la muestra (Anguiano-Igea y col., 1992; Liu y col., 1992; Shangraw y col., 1992; Pérez-Martínez, y



col., 2000).

#### *Microscopía electrónica de barrido (SEM)*

La SEM se utiliza para el estudio microscópico de algunas sustancias puras, como los productos obtenidos por diversos métodos. Aunque exista una clara diferencia entre el estado de cristalización del material de partida y el del producto final, este método no es el idóneo para determinar la presencia de un complejo de inclusión en la muestra siendo útil para poder decir que existe un único componente en el producto final (Erden y Çelebi, 1988; Bekers y col., 1991; Ginés y col., 1992b; Krenn y col., 1992; Arias y col., 1994d; Moyano y col., 1994).

### **1.6. APLICACIÓN DE LAS CICLODEXTRINAS EN EL CAMPO DE LOS PLAGUICIDAS**

Las ciclodextrinas pueden jugar un importante papel en la solubilización de contaminantes orgánicos, además del arrastre de contaminantes orgánicos y metales pesados del suelo (Singh y col., 2002). Cada vez más se está prestando una mayor atención a la aplicación de las CDs en el campo de los plaguicidas ya que la encapsulación molecular mediante el empleo de éstas, presenta numerosas ventajas.

Conlleven un aumento de la solubilidad en agua del plaguicida, lo cual implica una más rápida y fácil liberación del mismo en la solución del suelo. Este hecho a su vez conlleva la reducción del uso de disolventes orgánicos (la mayoría de las moléculas de plaguicida son compuestos apolares, hidrófobos), reduciendo la contaminación por los mismos, además de suponer un ahorro desde el punto de vista económico. Debido al aumento de la solubilidad que provocan este tipo de encapsulaciones podemos conseguir su liberación, por acción de la lluvia, justo en el momento en el cual debe actuar. Ha sido posible aislar estos complejos tanto en forma sólida como en solución. Oliver y col. (1993) determinaron la formación de complejos de inclusión de  $\beta$ -CD, con los insecticidas aldicarb y sulfopros. Pérez-Martínez y col. (1998) confirmaron la formación

del complejo de inclusión entre la  $\beta$ -CD y el herbicida 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). Pérez-Martínez y col. (2000) también realizaron un estudio de caracterización de complejos entre la  $\beta$ -CD y 2,4-D. Pérez-Martínez y col. (1998) determinaron mediante análisis térmico (DSC y HSM), la formación del complejo de inclusión 2,4-D y  $\alpha$ -CD. Lezcano y col. (2002) confirmaron la formación de complejos de inclusión en solución con  $\beta$ -CD de tres fungicidas, tiabendazol, carbendazim y fuberidazol, determinando la estequiometría del compuesto (1:1) a través de diagramas de solubilidad tipo  $A_L$ .

Por otro lado desde el punto de vista de la recuperación de plaguicidas en suelos se han conseguido importantes efectos a partir de la encapsulación molecular con CDs, como son la mejora en la desorción de plaguicidas (Fuoco y Colombini, 1994). Pérez-Martínez y col. (1999,2000) comprobaron como el herbicida 2,4-D fue desorbido empleando soluciones de  $\beta$ -CD. Morillo y col., (2001) observaron como en un suelo previamente tratado con  $\beta$ -CD, se producía una disminución de la lixiviación de 2,4-D y como por el contrario se conseguía un aumento de su lixiviación si la solución de CD se aplicaba después de haber sido adsorbido el herbicida en el suelo. Otros estudios importantes son los relacionados con el efecto de algunos componentes del suelo a la hora de la formación del complejo de inclusión. Ishiwata y col., 1999 han llevado a cabo estudios sobre la influencia de las sustancias húmicas a la hora de la formación del complejo de inclusión con la molécula de plaguicida, demostrando su efecto inhibitorio.

Respecto a la influencia del complejo de inclusión en la fotodegradación química de los plaguicidas, se han llevado a cabo diversos estudios sobre el posible efecto fotoprotector que pudieran ejercer las CDs sobre el plaguicida. La importancia de este hecho radica en el efecto que la luz solar ejerce sobre la permanencia del plaguicida y de sus metabolitos en el medioambiente. Kamiya y Nakamura (1995), observaron una inhibición en la fotodegradación de paration y paraoxon cuando estos formaban un complejo de inclusión con la  $\beta$ -CD, relacionándolo a través del estudio estructural del complejo en función de la proximidad de los centros catalíticos de la CD y los centros

reactivos de la molécula de herbicida. Por el contrario, Ishiwata y col. (2001), observaron como en presencia de sustancias húmicas estos complejos de inclusión con CDs ejercían un efecto inductor sobre la fotodegradación de varios plaguicidas organofosforados.

Respecto a las propiedades de formulaciones de plaguicidas en estado sólido se han conseguido importantes mejoras, mediante la encapsulación con CDs, como la mejora del flujo, aumento de la humectabilidad y de la estabilidad térmica respecto a las moléculas iniciales (Szejtli, 1988). Szente (1998) comprobó estas mejoras mediante la encapsulación molecular de varios plaguicidas organofosforados (malation, DDVP, sumithion, clorpirifosy sulfopros) con  $\beta$ -CD.

En algunos casos logran suprimir la cualidades organolépticas desagradables de este tipo de sustancias, como el mal olor de los mismos (Szejtli, 1988).

Como ya se indicó anteriormente uno de los factores más importantes a la hora de formarse un compuesto de inclusión entre una CD y una molécula huésped es el factor estérico (tamaño de la cavidad de la CD y de la molécula huésped), de ahí que se hayan llevado a cabo diversos estudios enfocados a determinar el grado de importancia de este factor a la hora de formarse un complejo de inclusión entre una molécula de plaguicida y la CD. Fuoco y Colombini (1994) comprobaron la formación de un complejo de inclusión entre el herbicida difenzoquat y la  $\beta$ -CD a la misma vez que observaron como la inclusión del herbicida con las otras CDs naturales ( $\alpha$ - y  $\gamma$ -CD) resultó ser insignificante. Isiwata y Kamiya, (2000) realizaron estudios sobre la profundidad alcanzada en la inclusión de los herbicidas paration y malation en la cavidad de la  $\beta$ - y  $\gamma$ -CD. Por último, para conocer en mayor profundidad la interacción entre ambos tipos de moléculas también se han realizado modelizaciones moleculares a través de simulaciones por ordenador, para poder determinarse la manera más probable de interacción entre ambas moléculas. (Manunza y col., 1996).

## **2. OBJETIVOS**

Las plantas suponen la principal fuente de alimentos en el mundo, pero éstas son susceptibles de sufrir aproximadamente unas 100.000 enfermedades, causadas por una amplia variedad de agentes. Se estima que una tercera parte de los cultivos son devastados por estas plagas. El uso de plaguicidas se convierte así en algo totalmente imprescindible.

Los plaguicidas orgánicos que se aplican al suelo son una de las sustancias contaminantes que más preocupan actualmente, ya que es necesario el uso de cantidades masivas de los mismos para la obtención de buenas cosechas, pero, a su vez, provocan problemas de contaminación ambiental con graves riesgos tanto para la especie humana como para los ecosistemas naturales. Los plaguicidas se aplican en dosis muy altas, y posiblemente tóxicas, que frecuentemente decrecen rápidamente en el campo hasta concentraciones por debajo del nivel de efectividad mínimo. Como consecuencia, se necesita volver a aplicar repetidas veces el plaguicida para poder mantener controlada una plaga.

Cuando los herbicidas alcanzan la superficie del suelo, pueden sufrir una serie de procesos tales como degradación química y/o biológica, fotodescomposición, volatilización, absorción por las plantas y adsorción a los coloides del suelo. También pueden producirse 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 sucesiva en la zona raíz del cultivo a niveles que peligran 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.

*Comportamiento del herbicida norflurazona en el sistema suelo-agua. Obtención, caracterización y aplicación de complejos de inclusión norflurazona-ciclodextrina.*

Por ello, el presente trabajo de investigación pretende contribuir a una mejora en el empleo de estos plaguicidas para alcanzar un uso más racional de los mismos, optimizando las condiciones en su administración convencional.

La elección del plaguicida norflurazona se ha hecho basándose en las siguientes premisas:

La norflurazona es un herbicida de enorme interés a escala mundial utilizado en una gran variedad de tipos de cultivos. Este herbicida presenta una baja solubilidad en agua y pobre velocidad de disolución necesitando el empleo de agentes tensioactivos en las formulaciones comerciales con consiguientes perjuicios medioambientales. Esta memoria presenta una alternativa respetuosa con el medioambiente para mejorar estos inconvenientes mediante la encapsulación molecular con ciclodextrinas (sustancias naturales biodegradables) junto a la disminución de su pérdida debido a procesos de fotodegradación y lixiviación.

El primer objetivo que se planteará será el de conseguir una técnica útil, eficaz y barata para la obtención de los complejos de inclusión con ciclodextrinas, empleando para ello distintas técnicas de procesado. Se llevará a cabo una caracterización fisicoquímica de los mismos que permitirá, por una parte el conocimiento más exhaustivo del proceso de disolución y los factores que sobre él inciden, así como la confirmación de la consecución del complejo, evaluando el grado de interacción entre los productos del sistema binario norflurazona-ciclodextrina.

Por último se abordarán los estudios de interacción entre el herbicida puro y el herbicida complejado con ciclodextrinas y suelos de distintas características fisicoquímicas, con objeto de comprobar y determinar las ventajas que realmente aportan las formulaciones norflurazona-ciclodextrinas, llevándose a cabo estudios directamente relacionados con la problemática real que tiene el empleo de este herbicida, junto a la valoración de la actividad biológica tanto de la norflurazona pura como de la complejada con ciclodextrinas.

*Comportamiento del herbicida norflurazona en el sistema suelo-agua. Obtención, caracterización y aplicación de complejos de inclusión norflurazona-ciclodextrina.*

Consecuentes con lo anteriormente expuesto, los objetivos concretos del presente trabajo son:

- Elaboración de complejos de inclusión norflurazona-ciclodextrinas tanto en estado líquido como en estado sólido, utilizando distintas técnicas de procesado, así como distintas ciclodextrinas naturales:  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -ciclodextrina.
- Estudio físico-químico de los posibles complejos de inclusión para confirmar su obtención y poder caracterizarlos, calculando sus constantes de estabilidad y determinando la estequiometría de dichos complejos mediante estudios de solubilidad, así como empleando distintas técnicas (calorimetría diferencial de barrido, espectroscopía de infrarrojos, difracción de rayos X, microscopía electrónica de barrido y estudios de velocidades de disolución).
- Estudio de los procesos de adsorción-desorción de norflurazona en suelos de distintas características, e influencia de la presencia de ciclodextrinas en los procesos de desorción.
- Estudios de movilidad de norflurazona en columnas de suelos de distintas características en presencia y ausencia de ciclodextrinas, mediante la obtención de curvas de lixiviación, así como mediante extracción del plaguicida del suelo y realización de bioensayos sobre el mismo.
- Estudios de fotodegradación de norflurazona en ausencia y en presencia de  $\alpha$ - $\beta$ - y  $\gamma$ -ciclodextrinas, así como de distintos componentes coloidales del suelo: minerales de la arcilla, óxidos y sustancias húmicas.

Este trabajo de investigación constituye el inicio de un proyecto más amplio cuya finalidad radica en la utilización práctica de estos sistemas, que abaratarían los costes de la formulación del herbicida y disminuirían el impacto medioambiental que su administración produce en nuestro ecosistema.

### **3. EXPERIMENTAL**

#### **3.1. MATERIALES**

##### **3.1.1. Plaguicida**

Se ha utilizado el herbicida Norflurazona (97.8%) cedido por Laboratorios Novartis (Syngenta Agro S. A.).

##### **3.1.2. Ciclodextrinas**

La primera dificultad a la hora de elaborar complejos de inclusión es la de elegir la CD que mejor se adecue a la molécula huésped, lo cual es complicado por la gran variedad que existe en el mercado. Por lo tanto, sólo mediante los estudios y ensayos experimentales, se puede determinar qué CD es la idónea para el herbicida norflurazona en cuestión. Se han usado CDs naturales ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ -CD; pureza > 98%) por ser las de utilización más frecuente. Las sustancias empleadas provenían de:

- Rindex (F-París), la  $\alpha$ -CD.
- Roquette (F-Lestrem), la  $\beta$ -CD.
- Cyclolab (H-Budapest), la  $\gamma$ -CD.

##### **3.1.3. Suelos**

Para la realización de los estudios de investigación se usaron cinco suelos con distintas características, todos ellos tomados del horizonte superficial (0-20 cm).

*Comportamiento del herbicida norflurazona en el sistema suelo-agua. Obtención, caracterización y aplicación de complejos de inclusión norflurazona-ciclodextrina.*

En primer lugar se ha utilizado un suelo arenoso clasificado como Regosol Hidromórfico, que será denominado **SR**. Se encuentra situado en la finca Torreagro, en el término de Cartaya (Huelva), en el kilómetro 15 de la carretera comarcal H-1311 de Cartaya a Tariquejo. El relieve del terreno es llano y su topografía circundante es ondulada. La vegetación natural es inexistente ya que todo el suelo está intensamente cultivado de fresas, con riego por goteo.

El segundo suelo utilizado, se denominó **AL**, y se trata de un suelo franco limoso clasificado como Typic Eutrochrepts. Este se encuentra situado en la carretera de Fuenteheridos – Peña de Arias Montano. Su posición fisiográfica es en pendiente (escarpado 25%) y el terreno circundante está fuertemente ondulado. Su uso agrícola es principalmente para el cultivo de castaño y olivar. El terreno está situado sobre un material original de calizas duras cámbricas, encontrándose muy drenado y ligeramente húmedo.

El tercer suelo que se denominó **TM** es un suelo arcilloso y está clasificado como Entic Pelloxerert. Está localizado en la finca Tomejil (Carmona) perteneciente al CIFA Las Torres (Consejería de Agricultura, Junta de Andalucía). Este tipo de suelo es el llamado tierra negra de la “Vega de Carmona” y ocupa una superficie de unas 15.515 hectáreas. El material originario del suelo son arcillas. En cuanto a su geomorfología, el relieve del terreno es llano, más bien cóncavo, siendo la posición fisiográfica de planicie y casi depresión. La topografía del terreno circundante es ondulada y la pendiente es llana y menor del 3%. La altitud es de unos 110 metros. La vegetación natural es inexistente porque todo el suelo está intensamente cultivado de cereales, remolacha, algodón, girasol, etc., en secano. El suelo tiene un elevado contenido en humedad y una moderada capacidad de drenaje. No existe pedregosidad, rocosidad, ni elementos gruesos.

El cuarto suelo **ST** se trata de un suelo franco arenoso clasificado como podsol de alto contenido en hierro procedente de Strichen (Escocia). La vegetación natural es



matorral y césped, siendo su uso de pastoreo extensivo. Es un suelo desarrollado sobre esquistos ácidos, con una fuerte pendiente. Su color es marrón claro (7.5 YR 6/4). Fuertemente endurecido con piedras redondeadas en el material más fino con frecuentes vetas de color ocre y marrón oscuro en la parte inferior que presentan numerosos canales que gradualmente cambian de color a marrón rojizo.

El quinto suelo empleado fue un arenoso franco denominado **CR**, clasificado como Typic Xeropsamment. Este suelo fué tomado de una zona de pinar situada en la finca experimental HAMPÁ perteneciente al Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla y que durante bastantes años no había sido sometido a ninguna práctica cultural. Sus características más relevantes son su textura gruesa (arena) y su bajo nivel de fertilidad intrínseca.

El sexto y último suelo empleado fue el **P-27**, un suelo franco arcillo-arenoso procedente de Campofrío Huelva, (carretera Campofrío-Ventas de arriba). Está clasificado como un suelo Xerocept procedente originalmente de granitos. Situado en lomas, con una pendiente del 2-3% en una vegetación natural de dehesa (*Quercus Suber*).

#### **3.1.4. Mineral de la arcilla**

La arcilla modelo escogida fue una montmorillonita estándar de Wyoming (SWy-1) (Van Olphen y Fripiat, 1979) suministrada por Source Clay Minerals Repository (Missouri, USA). Su capacidad de cambio catiónico (CCC) es de 76.4 meq/100g, siendo sus principales cationes de cambio  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ .

#### **3.1.5. Acidos húmicos sintéticos**

Suministrados por FLUKA

### **3.1.6. Complejos naturales ácido fúlvico-metal**

Se trata de un complejo natural ácido fúlvico-metal (M-FA) extraído de un suelo podsol procedente de Strichen (Escocia). Este complejo es polinuclear con respecto a los metales, con un contenido de hierro que triplica al de aluminio (22.16 % Fe, 7.54 % Al) y con pequeñas cantidades de calcio y magnesio (577 y 441 mg/L, respectivamente).

### **3.1.7. Oxihidróxido (goetita)**

El oxihidróxido usado fue una goetita acicular sintética (GT) descrita por Pérez-Maqueda y col. (1999a y b). Su superficie específica de 43 m<sup>2</sup>/g, fue determinada por el método de adsorción de nitrógeno (BET). Su punto cero de carga (pzc), 8.2, fue medido siguiendo la movilidad electroforética de partículas con el pH de una suspensión diluida del mineral empleando un equipo Zetamaster (Malvern Instruments Ltd., Spring Lane South, Malvern, Worcestershire WR14 1AT, U. K.). Mediante difracción de rayos X se observó que era una goetita pura, formada por cristales asimétricos, siendo el tamaño en la dirección del eje c mucho mayor que en la dirección transversal en aproximadamente 3.5 veces.

## **3.2. MÉTODOS**

### **3.2.1. Determinación del plaguicida**

Para la valoración del plaguicida se utilizó un equipo de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) (Shimadzu), empleando las siguientes condiciones:

Fase: 60:40; Acetonitrilo:agua

Flujo: 0.6 mL/min

Detector: Fluorescencia

*Comportamiento del herbicida norflurazona en el sistema suelo-agua. Obtención, caracterización y aplicación de complejos de inclusión norflurazona-ciclodextrina.*

$\lambda_{\text{ex}}$ : 310 nm

$\lambda_{\text{em}}$ : 405 nm

Columna: Hypersil ODS 5  $\mu\text{m}$  15x0.4

El tiempo de retención es de 4.5 min

### **3.2.2. Determinaciones analíticas para la caracterización de suelos**

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

Para los diferentes ensayos se tomaron alícuotas representativas, siguiendo el método del “cuarteado” y para aquellos ensayos con necesidad de un mayor grado de subdivisión se molieron en mortero de ágata.

#### *a) Análisis químico de los suelos.*

Se realizó el análisis químico del suelo total, para lo cual, las muestras se sometieron a una disgregación triácida con ácido fluorhídrico, ácido nítrico y ácido perclórico siguiendo la metodología propuesta por Bennet y col. (1962) con ligeras variantes (Pérez Rodríguez y col., 1990). Por este procedimiento se evapora la sílice como  $\text{SiF}_4$ .

Para la disgregación se partieron de 1.25 g de muestra seca y molida finamente en mortero de ágata que se colocaron en una cápsula de teflón a la que se le añadieron 10 mL de ácido nítrico 1:1 y 10 mL de ácido perclórico 1:1, dejándola en reposo durante 15 minutos, al cabo de los cuales, se adicionaron 20 mL de ácido fluorhídrico y se evaporó a sequedad. Este tratamiento se repitió con ácido nítrico y perclórico llevándola a

*Comportamiento del herbicida norflurazona en el sistema suelo-agua. Obtención, caracterización y aplicación de complejos de inclusión norflurazona-ciclodextrina.*

sequedad hasta la desaparición total de humos blancos. Finalmente, una vez frío, se humedeció añadiéndose 3 mL de ácido clorhídrico concentrado y se calentó suavemente hasta disolución total de la muestra. Una vez fría, se filtró y se enrasó hasta 50 mL. A partir de esta disolución base se tomaron diferentes diluciones, acordes con las concentraciones de los elementos en la muestra.

Para determinar el contenido de sílice se realizaron las fusiones de las muestras en un autoclave de teflón con una mezcla de ácido fluorhídrico, ácido clorhídrico y ácido nítrico a 140°C durante 1 hora. Una vez fría se le agregaron 5 g de ácido ortobórico sólido y 100 mL de agua destilada, colocándose en una estufa a 80°C hasta su disolución completa. Dejada a temperatura ambiente se enrasó en un matraz de plástico ya que los matraces de vidrio se atacan parcialmente.

Las concentraciones de los elementos se determinaron por espectrofotometría de absorción atómica para el Si, Al, Fe, Ti, Ca y Mg, así como para los elementos minoritarios Mn, Cu, Ni, Co, Pb, Cd, Cr, Zn, y por fotometría de llama para los elementos Na y K.

Para los elementos mayoritarios, los resultados se expresan en porcentajes de óxidos respecto a la muestra seca, y para los minoritarios, en mg/L.

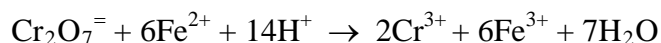
Para la determinación de la humedad y las pérdidas por calcinación se partió de 1g de muestra finamente molida, por duplicado, colocándolas en dos crisoles de porcelana y estos dentro de una estufa a 110°C durante 24 horas. Transcurrido este tiempo se pesan las muestras y posteriormente se introducen en un horno a 1100°C durante 45 minutos, y se vuelven a pesar. Los resultados se dan por diferencia de pesos y en tanto por ciento.

*b) Determinación del carbono orgánico total.*

Existe más de un método para determinar el carbono orgánico total de un suelo.

*Comportamiento del herbicida norflurazona en el sistema suelo-agua. Obtención, caracterización y aplicación de complejos de inclusión norflurazona-ciclodextrina.*

El método seguido ha sido el basado en la técnica descrita por Walkley y Black (1934), que consiste en la oxidación de la materia orgánica con dicromato potásico ( $\text{H}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ) 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  $60^\circ\text{C}$  durante toda la noche. La muestra una vez pesada se introdujo en un matraz erlenmeyer de 500 mL y se le agregaron 10 mL  $\text{K}_2\text{CrO}_4$  1 N, sometién dose 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 treinta segundos, al cabo de los cuales se dejó en reposo durante treinta 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 solución de difenilamina (2.5 g de producto disuelto en 20 mL de agua y 100 mL de ácido sulfúrico concentrado). Nuevamente se enfrió hasta temperatura ambiente e inmediatamente se procedió a valorar el exceso de dicromato no reducido mediante solución de sal de Mohr 0.5 N.

*c) Determinación del nitrógeno.*

Para la determinación del nitrógeno orgánico de las muestras de suelo, se utilizó el método Kjeldahl, basado en la utilización de una mezcla de selenio, sulfato de cobre como catalizadores de la reacción y sulfato potásico como potenciador del punto de ebullición de la mezcla de digestión, transformando el nitrógeno orgánico en sulfato amónico. Para ello, 1 g de muestra finamente pulverizado y secado en estufa a  $60^\circ\text{C}$  durante toda la noche, se introdujo en un matraz Kjeldahl, seguido de 1.5 g de mezcla catalizadora y 5 mL de ácido sulfúrico concentrado, agitándose suavemente el matraz

*Comportamiento del herbicida norflurazona en el sistema suelo-agua. Obtención, caracterización y aplicación de complejos de inclusión norflurazona-ciclodextrina.*

hasta que el ácido mojó perfectamente todo el contenido. Se calentó para efectuar la digestión, elevando la temperatura poco a poco hasta que el líquido tomó un color claro. A partir de este momento, se mantuvo la mezcla en ebullición durante treinta minutos más, al cabo de los cuales se dio por terminada la mineralización. Una vez frío el mineralizado, se procedió a la destilación y valoración del amoníaco utilizando el aparato de Bouat. Previamente, al mineralizado se le añadieron 10 mL de agua poco a poco y agitando, llevando el contenido a un matraz aforado de 50 mL y lavando con varias porciones de agua. Se tomaron 20 mL del mineralizado y en el matraz de destilación se le agregaron 3 g, aproximadamente, de hidróxido sódico en lentejas, acoplándose inmediatamente al destilador. El destilado final se valoró con ácido sulfúrico 0.005 N usando el indicador Shiro-Tashiro (1 mL de ácido sulfúrico 0.005 N gastado corresponde a 0.175 mg de nitrógeno).

*d) Determinación de la materia orgánica.*

El conocimiento de la materia orgánica en el suelo es de gran interés, pero es también importante conocer cual es el estado de dicha materia orgánica y, sobre todo, su grado de humificación.

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).

*e) Determinación del pH.*

Se siguió el método propuesto por Guitian y Carballas (1976), mediante la medida en pasta saturada de muestra en agua. Para ello un vaso de 50 mL de capacidad, se llenó de muestra hasta las 3/4 partes y se añadieron cantidades sucesivas de agua desmineralizada hasta obtener una pasta espesa. Sin agitar y dejando que el suelo se humedezca por capilaridad se siguió agregando agua hasta que un orificio hecho en el

centro con una varilla se cierra lentamente. Se dejó reposar durante treinta minutos, transcurridos los cuales se hizo la medida potenciométrica con electrodo de vidrio.

*f) Determinación de hierro, aluminio y manganeso amorfos.*

Se ha extraído el hierro, aluminio y manganeso amorfos presentes en los suelos siguiendo el método propuesto por McKeague y col. (1971). Se han empleado 0.75g de muestra dispersada en 30 mL de solución tampón oxálico-oxalato amónico a pH 3, agitándose durante 4 h en la oscuridad. El hierro, aluminio y manganeso se determinaron por absorción atómica expresando los valores como óxidos.

**3.2.3. Técnicas de elaboración de complejos de inclusión norflurazona-ciclodextrinas**

La preparación de los complejos se llevó a cabo por distintos métodos, tanto en solución (*atomizado, rotavapor*), como en estado sólido (*amasado*).

Por otra parte se prepararon mezclas físicas mediante simple mezcla mecánica de *norflurazona* con las CDs bajo estudio, las cuales servirán como muestras de referencia.

**3.2.3.1. Amasado**

Cantidades estequiométricas de *norflurazona* y CD fueron pesadas y mezcladas juntas en un mortero, siendo posteriormente sometidas a un proceso de *amasado* durante 45 minutos. Durante este proceso una cantidad apropiada de etanol fue adicionada a la mezcla con el fin de mantener una consistencia adecuada. En todos los casos el producto sólido obtenido fue lavado con 20 mL de etanol frío y posteriormente secado en estufa, a 37 °C, durante 24 horas, con el fin de eliminar el herbicida no complejado.

### **3.2.3.2. Atomizado**

Fue realizado en un Büchi 190M mini spray-Dryer. Para ello, el herbicida norflurazona fue disuelto en 400 mL de etanol (96% v/v) y la CD en 200 mL de agua destilada. Ambos compuestos fueron añadidos en cantidades estequiométricas para obtener una relación norflurazona:CD 1:1. Posteriormente las soluciones fueron mezcladas y agitadas en ultrasonidos, durante 15 minutos, hasta obtener una disolución de aspecto translúcido, la cual fue sometida a atomización. Las condiciones del proceso fueron las siguientes: flujo, 10 mL/s, temperatura de entrada: 157 °C, temperatura de salida: 90 °C y flujo del aire: 400 NL/h.

### **3.2.3.3. Rotavapor**

Se preparó una mezcla hidroalcohólica entre la CD y el herbicida, disolviendo éste en etanol (96%) y la CD en agua destilada, en relación estequiométrica 1:1. La mezcla fue llevada posteriormente a agitación en ultrasonido durante 15 minutos, para después ser tratada en un aparato de *rotavapor*-R (Büchi), hasta llevar la muestra a sequedad. El polvo recogido se dejó secar en la estufa durante 24 horas a 37°C.

## **3.2.4. Estudio de los complejos de inclusión norflurazona-ciclodextrinas**

### **3.2.4.1. Estudios de solubilidad**

Los estudios de solubilidad se llevaron a cabo de acuerdo con el método descrito por Higuchi y Connors (1965). Por un lado, el herbicida fue añadido en cantidades que excedían de su solubilidad teórica a 25 °C (28 mg/L), añadiendo 5 mg a 10 mL de soluciones de CD, a distintas concentraciones crecientes (desde 0 hasta  $1.2 \cdot 10^{-2}$  M para la  $\beta$ -CD y hasta 0.1 M para  $\alpha$  y  $\gamma$ -CD). Para eliminar cualquier posible interacción en estado sólido se adicionó el herbicida cuando las CDs se encontraban completamente



disueltas. El ensayo se hizo en matraces aforados de 25 mL, los cuales se pusieron en agitación, a 25 °C, durante una semana (tiempo estimado para el alcance del equilibrio). Las muestras así obtenidas fueron filtradas por inyección a través de un filtro de membrana de celulosa, Millipore de 0.22 µm. La porción de muestra así obtenida fue analizada mediante HPLC.

Los resultados obtenidos fueron representados para obtener el diagrama de solubilidad, con la concentración de herbicida disuelto frente a las cantidades crecientes de CD empleadas.

Por último se procedió a la determinación de las constantes de estabilidad ( $K_c$ ), las eficacias solubilizantes y la estequiometría para los distintos complejos obtenidos a partir de las distintas CDs naturales. Estas constantes fueron obtenidas mediante la ecuación propuesta por Higuchi y Connors (1965).

#### **3.2.4.2. Estudios de velocidad de disolución**

Los estudios de velocidad de disolución se realizaron según la técnica recogida en la USP XXV, usando un aparato modelo Turu Grau D-6, equipado con un sistema de palas. El medio de disolución fue agua desionizada (1000 mL), la velocidad de rotación fue de 50 rpm y la temperatura de  $25 \pm 0.5^\circ\text{C}$ . La cantidad de muestra analizada fue de 5 mg, para la norflurazona, usando cantidades equivalentes en norflurazona para los sistemas binarios. Fueron tomadas del medio de disolución alícuotas de 1mL por duplicado a intervalos de tiempo previamente establecidos (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50 y 60, minutos), para su posterior análisis mediante HPLC. Una vez representados los perfiles de liberación del plaguicida, se procedió a la determinación de la eficacia de disolución (ED), a distintos tiempos, parámetro que da información sobre el proceso de disolución.

El cálculo de la DE se realizó aplicando la siguiente fórmula:

$$ED = \int_0^t \frac{M}{M_t} dt$$

Siendo M la cantidad disuelta para cada tiempo y  $M_t$  la mayor cantidad de plaguicida que puede disolverse.

#### **3.2.4.3. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)**

Estos estudios fueron realizados empleando un aparato Mettler, compuesto por un horno FP85, una unidad de control de la temperatura FP80 HT y software de control FP89 HT. 10 mg de cada muestra fueron llevados a crisoles de aluminio, sellados y agujereados posteriormente, para así permitir la salida del gas que se pudiera producir durante el proceso de calentamiento. Este análisis térmico se llevó a cabo bajo una atmósfera de aire estática, a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min, en un intervalo máximo de temperaturas de 40 a 280 °C.

#### **3.2.4.4. Espectroscopía de Infrarrojos**

Los espectros de Infrarrojos se realizaron en un aparato *Nicolet 510-P*, mediante Transformada de Fourier, tanto de las materias primas por separado como de los sistemas binarios preparados. El intervalo del número de ondas fue desde 250 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ , con 32 barridos por espectro y una resolución de espectro de 4  $\text{cm}^{-1}$ . Las muestras fueron preparadas en pastillas usando 1 mg de muestra y 100 mg de KBr.

#### **3.2.4.5. Difracción de Rayos X**

Los difractogramas de las sustancias puras y de los distintos sistemas binarios preparados (agregados orientados), fueron obtenidos, utilizando un aparato Siemens modelo Kristallflex D5000, equipado con contador de centelleo, la radiación empleada fue  $\text{Cu } \alpha$  con filtro de níquel. Se trabajó a 36 Kv y 26 mA, la velocidad de barrido fue

de 1°/min, una velocidad de carta de 1 cm/min y sensibilidad adecuada, generalmente  $2 \cdot 10^4$  cps.

#### **3.2.4.6. Microscopía electrónica de barrido (SEM)**

Las características morfológicas de los diferentes sistemas estudiados, y de los productos puros, fueron estudiadas por SEM, usando un microscopio electrónico de barrido JSM-5400. La tensión empleada fue de 20 Kv y los spots (de 3 a 5) empleados fueron los adecuados en cada caso en particular para obtener la mejor calidad de imagen. Todas las muestras fueron fijadas a un portaobjetos de aluminio y posteriormente metalizadas mediante baño de oro, para hacerlas conductoras.

#### **3.2.5. Interacción de suelos con norflurazona y sus complejos con ciclodextrinas**

Para estudiar como afecta la formación de complejos norflurazona-CDs a la interacción del plaguicida con suelos, se han realizado ensayos de adsorción-desorción en tubos de centrífuga, ensayos de movilidad empleando columnas de suelo, bioensayos para poder comprobar el verdadero efecto del herbicida sobre la planta y por último ensayos de fotodegradación.

##### **3.2.5.1. Cinéticas de adsorción**

Las cinéticas de adsorción se realizaron para determinar el tiempo de contacto necesario entre los suelos y las soluciones de norflurazona para obtener una concentración de equilibrio constante. Para ello, se tomaron 5g de cada uno de los suelos y se pusieron en contacto con 10 mL de disolución del herbicida a distintas concentraciones, en medio  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  0.01 M para mantener la fuerza iónica constante, y se agitaron durante 1, 2, 3 y 6 días a una temperatura de 25°C. Después, las suspensiones se centrifugaron y se midió la concentración final de la disolución de herbicida en el sobrenadante. La cantidad adsorbida se calculó por diferencia entre las concentraciones

inicial y final. La curva de la cinética de adsorción se obtiene representando la cantidad total adsorbida frente al tiempo de contacto. En todos los casos el tiempo necesario para obtener una concentración de equilibrio fue de 24 horas.

### **3.2.5.2. Isotermas de adsorción-desorción**

Las isotermas de adsorción sobre los suelos seleccionados se realizaron mezclando 10 g del mismo con 20 mL de soluciones de norflurazona. El rango de concentración de norflurazona estaba entre 0 y 20 mg/L, (en medio 0.01 M de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ). Las suspensiones fueron agitadas en tubos de centrífuga de 50 mL, a una temperatura constante de 25 °C durante 24 horas. Todas las experiencias se realizaron por cuadruplicado. Posteriormente las suspensiones fueron centrifugadas y en el sobrenadante se midió la cantidad de norflurazona que no se había adsorbido. Las isotermas de adsorción se obtuvieron representando la cantidad adsorbida por el suelo, expresada en  $\mu\text{mol}$  de norflurazona adsorbida por kilogramo de suelo ( $\mu\text{mol}/\text{Kg}$ ), frente a las correspondientes concentraciones de equilibrio ( $\mu\text{mol}/\text{L}$ ). Las isotermas de adsorción han sido ajustadas a la forma logarítmica de la como ecuación de Freundlich:

$$\log C_s = \log K_f + n \log C_e$$

donde:

$C_s$  ( $\mu\text{mol}/\text{Kg}$ ): cantidad de plaguicida adsorbido por kilogramo de suelo.

$C_e$  ( $\mu\text{mol}/\text{L}$ ): concentración de plaguicida en la solución de equilibrio.

$K_f$ : es una constante relacionada con la capacidad de adsorción del suelo y representa la cantidad de plaguicida adsorbido cuando la concentración de equilibrio es la unidad.

$n$ : es un parámetro que indica la intensidad de la adsorción y está relacionado con la curvatura de la isoterma.

Dicha ecuación se ha usado para calcular los coeficientes de distribución  $K_d$  para

*Comportamiento del herbicida norflurazona en el sistema suelo-agua. Obtención, caracterización y aplicación de complejos de inclusión norflurazona-ciclodextrina.*

una concentración de equilibrio de  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ , los cuales han sido usados a su vez para calcular los coeficientes de distribución normalizados teniendo en cuenta el porcentaje de carbono orgánico de los suelos,  $K_{oc}$ .

$$K_{oc} = (K_d / \% \text{ CO}) \times 100$$

Las isotermas de desorción se llevaron a cabo reemplazando la mitad del sobrenadante de los tubos de centrífuga, una vez que el equilibrio de adsorción se había alcanzado, por 10 mL de solución 0.01 M de  $\text{KNO}_3$ . Cuando lo que se emplearon fueron las CDs, después de alcanzado el equilibrio de adsorción, se reemplazó todo el sobrenadante por solución 0.01 M de las mismas. Las suspensiones se dejaron equilibrar durante otras 24 horas más, en las mismas condiciones anteriores, y posteriormente se volvió a retirar la mitad del sobrenadante en el que se determinó por HPLC la concentración del plaguicida. Este proceso se repitió hasta un total de tres veces.

En las isotermas de desorción en que fue posible se calcularon los coeficientes de histéresis, H, de acuerdo con la siguiente expresión:

$$H = n_a / n_d$$

Donde  $n_a$  y  $n_d$  son las constantes n de Freundlich obtenidas de las isotermas de adsorción y desorción, respectivamente. Esta razón  $n_a/n_d$  ha sido usada por otros autores para describir la histéresis de desorción que presentan determinados compuestos en suelos (Van genuchten y col., 1977; Ma y col., 1993).

### **3.2.5.3. Movilidad en columnas de suelos**

Los experimentos de movilidad en columnas de suelos se llevaron a cabo por triplicado para algunos de los suelos seleccionados (AL, CO y SR). Se emplearon columnas de metacrilato de 30 cm de altura y 3.0 cm de diámetro interno. La parte final de la columna fue cubierta por un tejido de nylon, sobre el que se colocó una fina capa de lana de vidrio (0.5g) para contener firmemente al suelo en el interior de la columna. La parte superior de la columna fue cubierta con lana de vidrio para evitar las

alteraciones que el suelo pudiera sufrir a la hora de añadir la solución. Diferentes cantidades de cada suelo se adicionaron a la columna para obtener 24 cm de la misma ocupados por el suelo. Las columnas de suelo pudieron ser separadas en segmentos de 4 cm una vez finalizado los experimentos de movilidad. Todos los experimentos fueron llevados a cabo a temperatura constante de  $22\pm 1$  °C.

En anteriores experimentos, dos columnas de suelos de cada uno de los suelos seleccionados fueron saturadas por capilaridad con agua destilada para obtener un contenido de humedad del 100% de la capacidad del campo. El valor de 1 volumen de poro se calculó por la diferencia de peso entre la columna de suelo saturada y su peso seco.

Las columnas de suelos fueron acondicionadas adicionando 5 volúmenes de poro de una solución de 0.01 M de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , para así equilibrarlas con el electrolito de fondo, y posteriormente fueron añadidos 14 mL de una solución de 20 mg/L (3.96 Kg/ha) de norflurazona, con y sin  $\beta$ -CD 0.01 M. Las curvas de elución se obtuvieron por la aplicación diaria de 25 mL de agua destilada hasta que el herbicida no fue detectado en el líquido recuperado. Una vez finalizados los ensayos de lixiviado, las columnas de suelo fueron cortadas en 6 segmentos de 4 cm dejando el suelo secar. Los residuos de herbicida que permanecieron adsorbidos sobre el suelo de cada segmento fueron extraídos con metanol. La extracción se llevó a cabo por triplicado.

#### **3.2.5.4. Bioensayos**

##### **3.2.5.4.1 Valoración de la clorofila**

La actividad herbicida de la norflurazona en suelos fue determinada mediante la medida de su efecto blanqueante sobre las plantas de semilla de soja después de 10 días, desde su siembra comparado con un ensayo control, que no recibió ninguna aplicación del herbicida. Además se realizó otro ensayo control donde al suelo sólo se le adicionó una solución de  $\beta$ -CD 0.01 M, para poder observar el posible efecto que la CD podría ejercer sobre el crecimiento de la planta. Una curva de dosis-respuesta fue previamente

*Experimental*

*Comportamiento del herbicida norflurazona en el sistema suelo-agua. Obtención, caracterización y aplicación de complejos de inclusión norflurazona-ciclodextrina.*

establecida. Para ello se agitó vigorosamente durante 24 h, 20 g de cada uno de los suelos seleccionados adicionando las cantidades de herbicida apropiadas para alcanzar concentraciones en suelo de 0 a 3 mg/Kg. Esta misma experiencia se realizó también empleando las mismas cantidades de herbicida pero en presencia de  $\beta$ -CD 0.01 M. Sobre 10 g de suelo, añadidos sobre vasos desechables de plástico, se sembraron 5 semillas de soja que fueron cubiertas con otros 10 g de suelo. Las muestras de suelo sembrado fueron colocadas en una cámara de cultivo a  $25\pm 3$  °C, siendo regadas con agua destilada diariamente. La intensidad del blanqueo se determinó midiendo el contenido en clorofila de las plantas, y se calculó el porcentaje de inhibición comparándolo con el contenido en clorofila de la muestra control (sin añadir herbicida). Junto con la realización de este blanco se realizaron blancos con una solución de  $\beta$ -CD para poder tener en cuenta el posible efecto que pudiera tener en el crecimiento de las plantas.

La clorofila se determinó cortando los tallos en pequeños trozos y extrayendo la clorofila con 4 mL de N,N-dimetilformamida (DMF). Posteriormente las soluciones fueron incubadas durante 48 horas y el contenido en clorofila fue medido por espectroscopia visible (Perkin Elmer Lambda EZ210) a 664 y 647 nm, relacionándola con el peso neto de los tallos. El experimento fue llevado a cabo por cuadruplicado. La valoración de la clorofila de las plantas de los bioensayos se llevó a cabo empleando un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda EZ210, empleando las siguientes condiciones:

$\lambda$ : 664 y 647 nm

Volumen de muestra: 1.2 mL

Para el cálculo de la clorofila se aplican las siguientes fórmulas:

Clorofila a ( $\mu\text{g/mL}$ )=  $12.64 \text{ Abs}_{664} - 2.99 \text{ Abs}_{647}$

Clorofila b ( $\mu\text{g/mL}$ )=  $23.26 \text{ Abs}_{647} - 5.60 \text{ Abs}_{664}$

Clorofila total ( $\mu\text{g/g}$ )=  $\frac{(\text{Clorofila a} + \text{Clorofila b}) \times \text{Volúmen (4 mL)}}{\text{Peso plantas (g)}}$

Los datos obtenidos en la construcción de una curva dosis-respuesta para cada uno de los suelos tratados fueron utilizados para realizar un análisis de regresión para estimar el coeficiente  $CI_{25}$  (concentración del herbicida requerida para provocar la inhibición del 25% de la clorofila respecto al blanco). Diferentes ecuaciones fueron empleadas para establecer una adecuada relación entre la inhibición obtenida y la concentración del herbicida. La ecuación para la cual se obtuvo el mejor coeficiente de correlación fue elegida como la más apropiada para describir dicho efecto inhibitorio.

### **3.2.5.5. Fotodegradación**

Los estudios de fotodegradación se han llevado a cabo con un fotorreactor SUNTEST de Heraeus equipado con una lámpara de xenon y un filtro permanente que selecciona longitudes de onda superiores a 290 nm, con objeto de simular el espectro de emisión de la radiación solar. La energía de la lámpara era de  $500 \text{ W/m}^2$  y la superficie total de exposición del aparato de  $500 \text{ cm}^2$ .

Una disolución acuosa (200 mL) de norflurazona de 20 mg/L fue irradiada, con agitación, en matraces de cuarzo de 500 mL durante 7 horas. La misma experiencia se repitió en presencia de 10 g de suelo o de 20 mg de una montmorillonita, una goetita sintética y ácidos fúlvicos naturales en suspensión.

El descenso en la concentración de norflurazona durante los experimentos de fotólisis fue determinado por HPLC en las condiciones anteriormente descritas.

Todas las curvas de fotodegradación se ajustaron a una cinética de primer orden, teniendo en cuenta los resultados de  $r^2$  obtenidos para las mismas. La ecuación que describe la tendencia de una degradación de primer orden es (Atkins, 1994):

$$[C_t] = [C_0]e^{-kt}$$

Donde  $t$  es el tiempo (horas),  $[C_0]$  es la concentración de norflurazona a tiempo 0,  $[C_t]$  es la concentración de norflurazona a un determinado tiempo  $t$  y  $k$  es la constante



de degradación (horas). La vida media de fotodegradación ( $T_{1/2}$ ) se determina a partir de la constante de degradación, característica para cada tipo de condiciones.

### **3.2.5.6. Estudios estadísticos**

Se emplearon análisis múltiples de regresión lineal para poder relacionar la afinidad de norflurazona por adsorberse (expresada como su coeficiente de distribución,  $K_d$ ) con las distintas propiedades de los suelos empleados. Para este fin se usó el programa de análisis estadísticos JMP<sup>®</sup> versión 3.1 (SAS Instituto Inc., Cary, NC, USA, 1994). Las propiedades que se exponen en las tablas 3, 4 y 5 fueron evaluadas para predecir su afinidad por la adsorción. El procedimiento se llevó a cabo mediante un análisis múltiple de regresión en el cual los parámetros son añadidos o sustraídos de la regresión, dependiendo de la contribución de cada parámetro sobre  $R^2$ . Los parámetros fueron incorporados si el nivel de significación del coeficiente de la pendiente era  $\leq 0.10$ .

## **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **4.1. ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE NORFLURAZONA CON CICLODEXTRINAS**

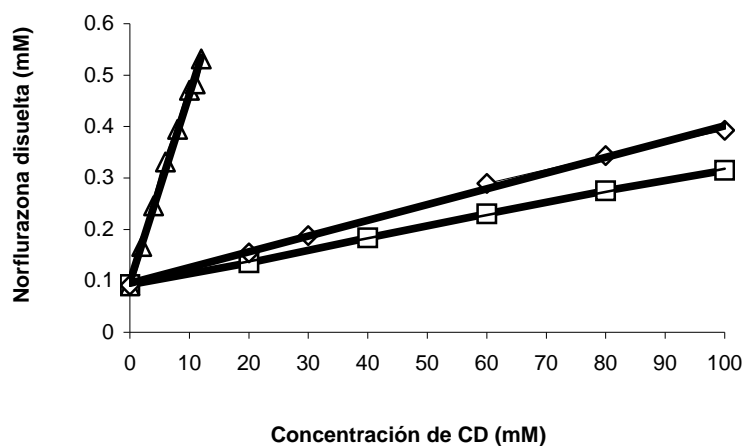
Como se indicó en el apartado de introducción, los compuestos de inclusión pueden formarse tanto en solución como en estado sólido, por lo que se abordará el estudio de estos sistemas en ambos medios. En los dos casos, la estructura de los posibles complejos formados puede diferir notablemente. Así, en solución, la molécula de plaguicida se halla alojada, total o parcialmente, en la cavidad de la CD, encontrándose el complejo rodeado por una estructura de moléculas de agua que solvata al sistema. En cambio, en estado sólido, las moléculas de plaguicida pueden situarse no sólo en la cavidad de la CD, sino también en los espacios intersticiales de la red cristalina, dependiendo del tipo de empaquetamiento. En el caso de sistemas amorfos, la mayor dificultad reside en poder diferenciar la presencia de un verdadero compuesto de inclusión o de una dispersión del plaguicida en el seno de la CD.

#### **4.1.1. Estudios en estado líquido**

##### **4.1.1.1. Diagramas de solubilidad de fases**

Para poder abordar el estudio de la interacción de cualquier principio activo con las CDs, en primer lugar hay que realizar el estudio de la estequiometría del complejo de inclusión formado en estado líquido, paso fundamental para la preparación posterior de mezclas previas de ambas sustancias y la obtención de los complejos en estado sólido utilizando distintos procesos. En la figura 4 se muestran los diagramas de solubilidad de la norflurazona en presencia de  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -CD. Observando los tres diagramas de solubilidad correspondientes a las tres CDs estudiadas, se aprecia un aumento lineal de la solubilidad del plaguicida a medida que aumenta la concentración de las CDs, clasificándose estas curvas como del tipo  $A_L$  de Higuchi (Higuchi y Connors, 1965).

*Comportamiento del herbicida norflurazona en el sistema suelo-agua. Obtención, caracterización y aplicación de complejos de inclusión norflurazona-ciclodextrina.*



*Figura 4. Diagramas de solubilidad de norflurazona a 25°C en presencia de  $\alpha$ -CD (□);  $\beta$ -CD (Δ) y  $\gamma$ -CD (◇).*

Todos los diagramas de solubilidad obtenidos mostraron un coeficiente de correlación superior a 0.996. En todos los casos, los complejos formados en solución no poseen un límite de solubilidad definido, hallándose éstos disueltos en su totalidad. Debido a que los diagramas obtenidos presentan una pendiente  $<1$ , se asume que los complejos presentarán una estequiometría (R) 1:1 en solución.

Las constantes de formación aparente ( $K_c$ ) y la eficacia solubilizante fueron calculadas siguiendo el método descrito en el apartado anterior de la presente memoria, y se muestran en la tabla 3. El estudio comparado de las constantes de complejación (tabla 3), muestra que entre las diferentes CDs empleadas, la que conduce a una mayor constante de complejación es la  $\beta$ -CD ( $360 \text{ M}^{-1}$ ). Estos resultados indican una acomodación óptima de la molécula de norflurazona en la cavidad de esta CD, pudiéndose destacar el alto valor de la eficacia solubilizante de la misma (ES), consiguiéndose un aumento de la solubilidad del plaguicida en agua en más de cinco veces.

*Tabla 3. Estequiometría (R) de los complejos en solución y diferentes parámetros obtenidos a partir del ensayo de solubilidad*

	<b>ES<sub>10 mM</sub></b>	<b>K<sub>c</sub> (M<sup>-1</sup>)</b>	<b>R</b>
<b>α-CD</b>	1.367	38.42	1:1
<b>β-CD</b>	5.198	360.00	1:1
<b>γ-CD</b>	1.476	51.82	1:1

ES<sub>10 mM</sub>: eficacia solubilizante a [CD]= 10 M.

K<sub>c</sub>: constante de complejación.

R: estequiometría del complejo.

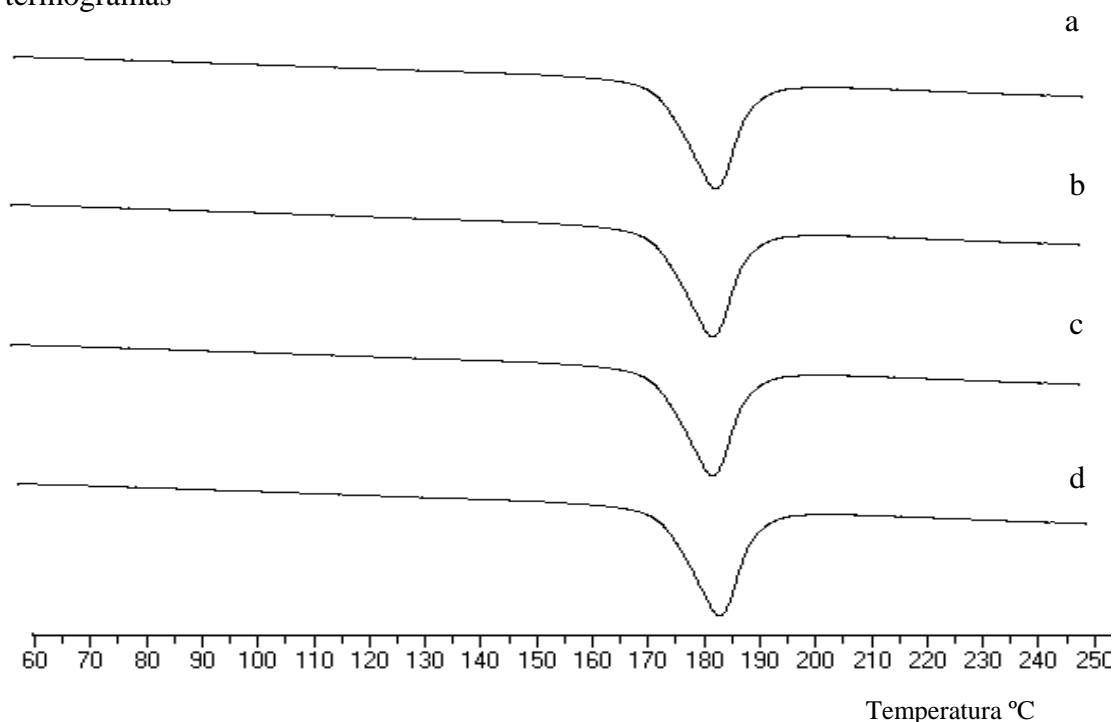
Es de destacar que el tamaño de la cavidad de la CD es determinante para la efectividad del proceso de complejación, obteniéndose una constante de estabilidad mayor para la β-CD (360 M<sup>-1</sup>) así como de la eficacia solubilizante (ES).

Debido al mayor diámetro interno de la cavidad de la γ-CD, en el proceso de complejación con esta CD, se produce un proceso fácil tanto de entrada como de salida de la molécula huésped de la cavidad, lo que se traduce en una menor K<sub>c</sub>. Por el contrario, en el caso de la α-CD, su reducida cavidad, dificultaría la entrada de la molécula conduciendo igualmente a una baja K<sub>c</sub>. Con estos resultados se pone de evidencia la relación entre la constante de estabilidad del complejo en solución con el mayor o menor impedimento estérico que pudiera ofrecer la CD, a la entrada del plaguicida.

#### **4.1.2. Estudios en estado sólido**

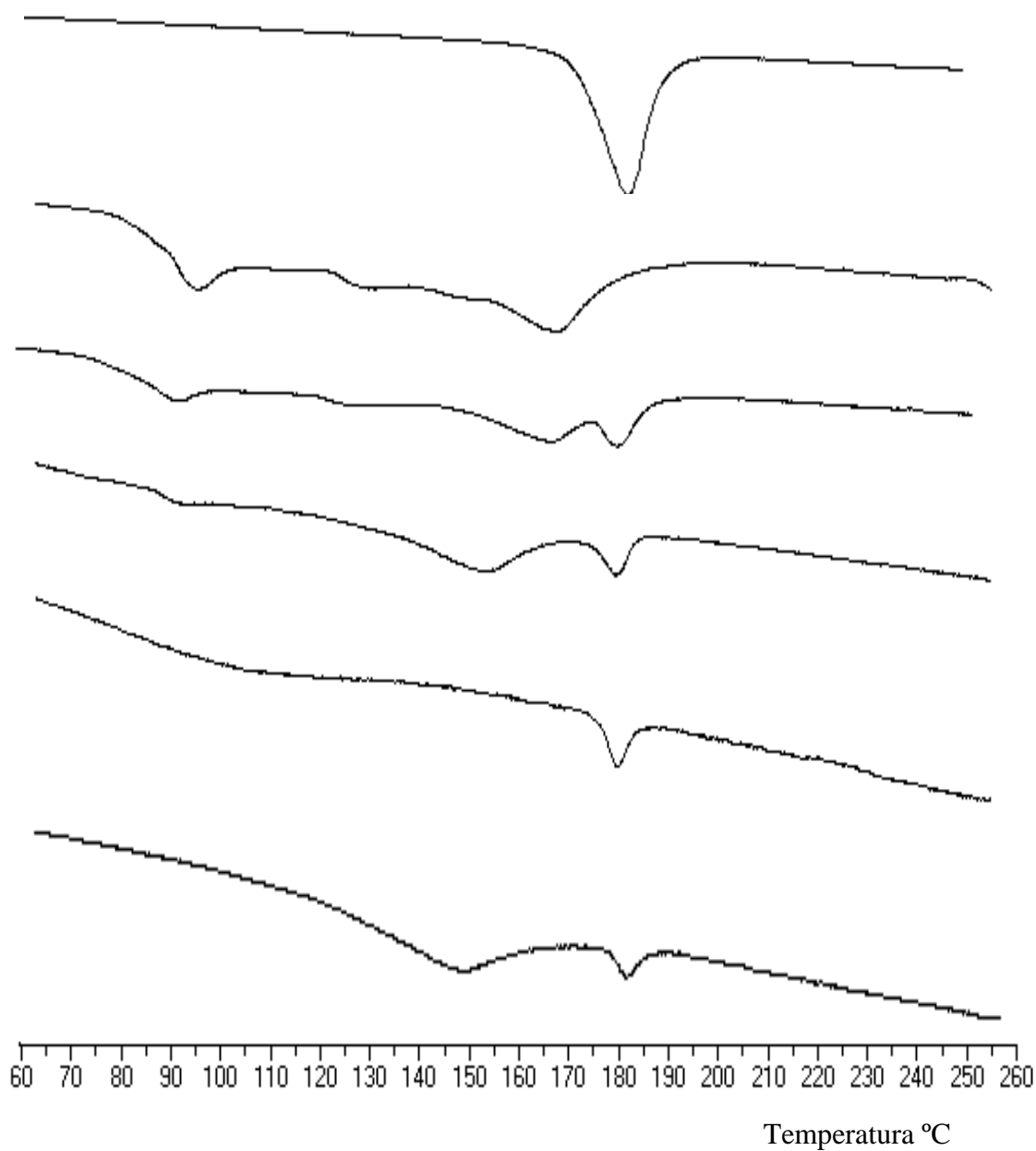
##### **4.1.2.1. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)**

Con el fin de poner en evidencia la posible influencia que los procesos de obtención de complejos de inclusión en estado sólido podrían ejercer sobre la estructura del herbicida puro, la norflurazona fue sometida a las diferentes técnicas de procesado. En la figura 5 se presentan los termogramas por DSC de norflurazona pura sometida a distintos tratamientos. Se puede observar que no existen cambios en los distintos termogramas

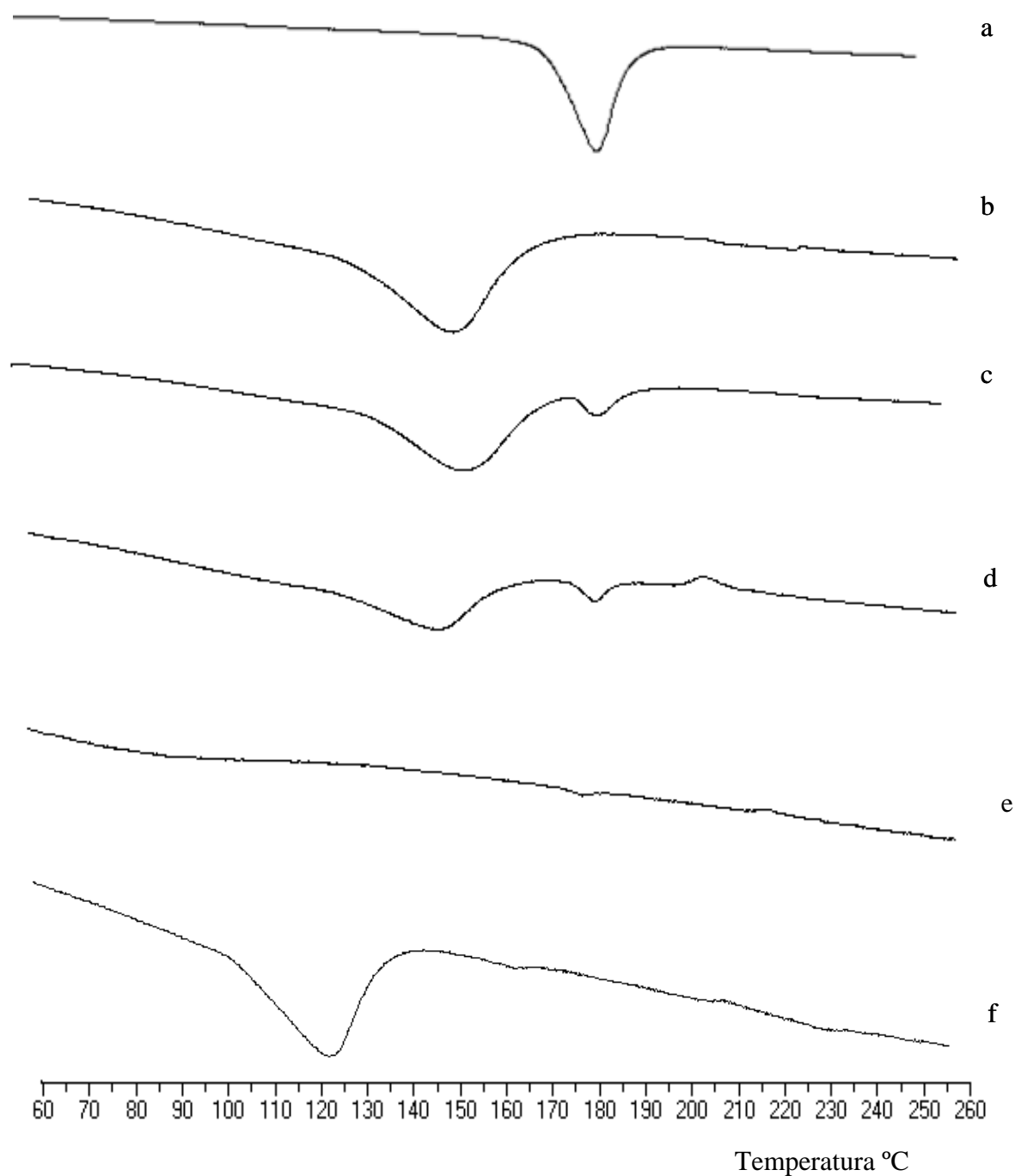


*Figura 5. Termogramas por DSC correspondientes a la norflurazona sometida a las distintas técnicas de procesado: a) sin tratamiento, b) amasado, c) atomizado y d) rotavapor.*

El termograma de la norflurazona presenta un efecto endotérmico correspondiente al proceso de fusión del plaguicida, sobre 180-185 °C con un incremento de entalpía de  $\Delta H_f = -68.7$  J/g.

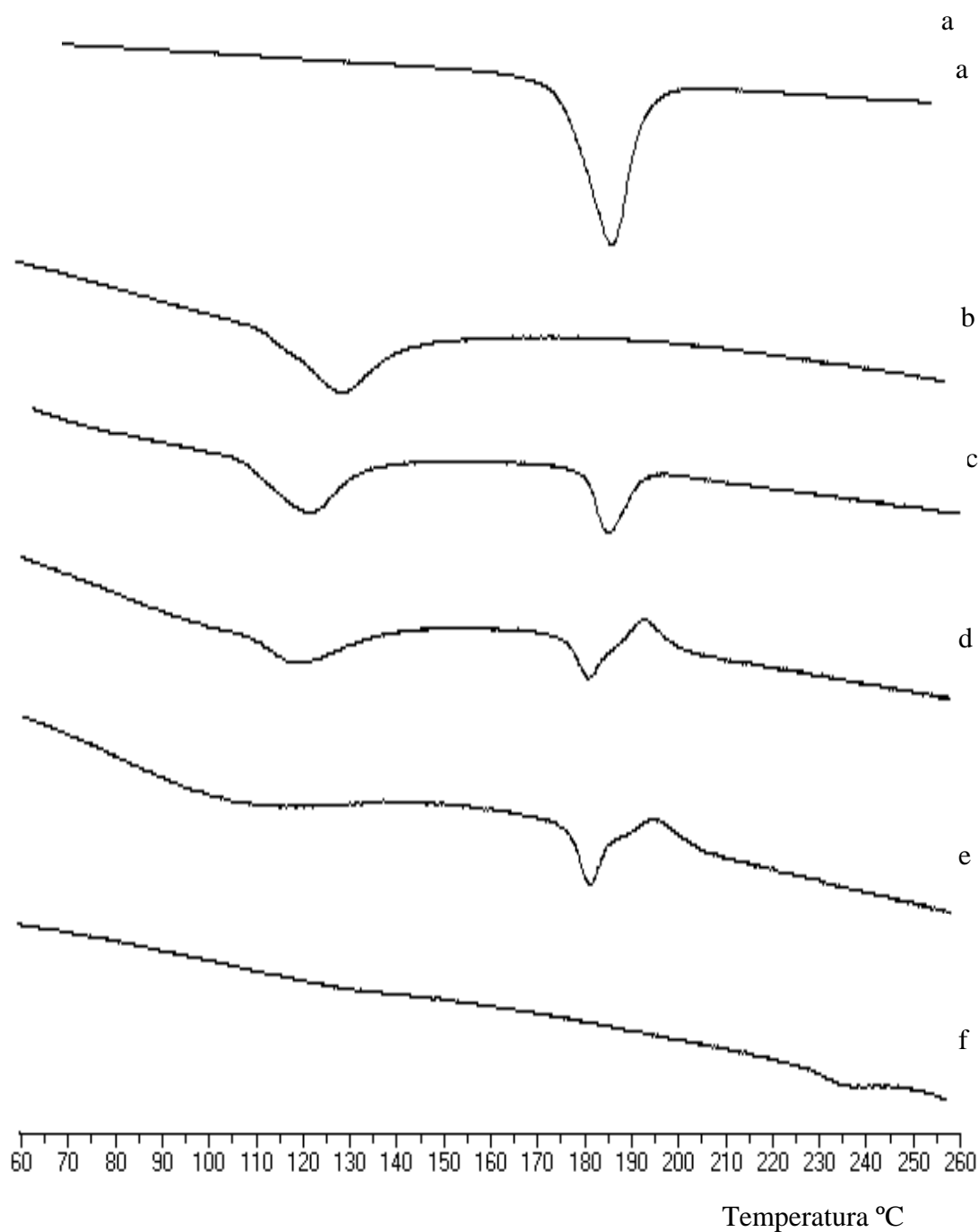


*Figura 6. Termogramas por DSC correspondientes al sistema norflurazona- $\alpha$ -CD: a) norflurazona, b)  $\alpha$ -CD, c) mezcla física, d) amasado, e) atomizado y f) rotavapor.*



*Figura 7. Termogramas por DSC correspondientes al sistema norflurazona- $\beta$ -CD: a) norflurazona, b)  $\beta$ -CD, c) mezcla física, d) amasado, e) atomizado y f) rotavapor.*

*Comportamiento del herbicida norflurazona en el sistema suelo-agua. Obtención, caracterización y aplicación de complejos de inclusión norflurazona-ciclodextrina.*



*Figura 8. Termogramas por DSC correspondientes al sistema norflurazona- $\gamma$ -CD: a) norflurazona, b)  $\gamma$ -CD, c) mezcla física, d) amasado, e) atomizado y f) rotavapor.*



*Comportamiento del herbicida norflurazona en el sistema suelo-agua. Obtención, caracterización y aplicación de complejos de inclusión norflurazona-ciclodextrina.*

Observando los termogramas de las tres CDs,  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , (Fig. 6b, 7b, y 8b), todos ellos muestran que dichas CDs sufren un proceso de deshidratación, registrándose importantes efectos endotérmicos que aparecen entre 60-150 °C.

En los termogramas de las mezclas físicas (Fig. 6c, 7c y 8c), se puede observar como aparecen los efectos endotérmicos tanto de las CDs como de la norflurazona, indicando la ausencia de interacción entre ambos componentes. (En la tabla 4 se muestran las entalpías de fusión para los diferentes sistemas norflurazona-CDs).

*Tabla 4. Entalpías obtenidas para los sistemas elaborados con  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -CD, y norflurazona.*

	$\alpha$ -CD		$\beta$ -CD		$\gamma$ -CD	
	$\Delta H_{f(\text{endo})}$	$\Delta H_{f(\text{exo})}$	$\Delta H_{f(\text{endo})}$	$\Delta H_{f(\text{exo})}$	$\Delta H_{f(\text{endo})}$	$\Delta H_{f(\text{exo})}$
<b>Mezcla física</b>	-7.25	---	-4.54	---	-15.8	---
<b>Amasado</b>	-7.15	---	-3.98	3.52	-9.52	5.94
<b>Atomizado</b>	-6.88	---	---	---	-8.44	3.76
<b>Rotavapor</b>	-3.85	---	---	---	---	---

En la figura 6 se muestran los diferentes termogramas obtenidos para los sistemas elaborados con  $\alpha$ -CD. En la mezcla física (Fig. 6c) se observa un efecto endotérmico sobre 182 °C aproximadamente con una entalpía de fusión de -7,25 J/g (tabla 4) correspondiente a la norflurazona, mostrando la no interacción de los componentes herbicida y CD. En el caso del sistema binario procesado por *amasado* (Fig. 6d) no se observan cambios importantes en la entalpía del pico endotérmico correspondiente a la norflurazona respecto a la mezcla física ( $\Delta H_f = -7,15$ ), lo que en principio indicaría la no formación de un complejo de inclusión, sin embargo, en el caso del producto obtenido mediante el procesado por *rotavapor* (Fig. 6f) se puede observar una disminución del

*Comportamiento del herbicida norflurazona en el sistema suelo-agua. Obtención, caracterización y aplicación de complejos de inclusión norflurazona-ciclodextrina.*

efecto endotérmico que corresponde al herbicida ( $\Delta H_f = -3,85$  J/g) que podría llevar a pensar en una complejación de una cierta cantidad del herbicida en la cavidad de la CD

En el atomizado (fig. 6e) sí se observan cambios, pues desaparecen los picos de deshidratación de la  $\alpha$ -CD. Teniendo en cuenta el DRX de esta muestra, como ya se verá en el correspondiente epígrafe, en el que se observa la pérdida de cristalinidad permaneciendo algunos picos de la  $\alpha$ -CD, podría ser que la técnica empleada condujera a una muestra heterogénea donde la norflurazona está por un lado (y eso daría el termograma de la norflurazona sólo) y la  $\alpha$ -CD aparte, o formando complejo sólido amorfo con algunas moléculas de norflurazona.

En la figura 7 se recogen los termogramas correspondientes a los sistemas elaborados con  $\beta$ -CD. Se puede observar como el sistema elaborado por *amasado* (Fig. 7d) presenta un aspecto muy parecido al de la mezcla física, aunque con una muy leve disminución en la entalpía de fusión correspondiente a la norflurazona, respecto a la mezcla física ( $\Delta H_f = -4.54$  J/g), además de observarse la aparición de un efecto exotérmico sobre los 205 °C. También se observa una disminución del efecto de deshidratación de la  $\beta$ -CD indicando que una menor cantidad de moléculas de agua se encuentra en la cavidad interna de la CD. La disminución del efecto de deshidratación de la CD y del pico endotérmico correspondiente a la fusión de la norflurazona junto con la aparición del pico exotérmico, podría ser indicativo de una complejación de parte del herbicida en la cavidad de la CD, con la formación de una nueva estructura cristalina.

En el termograma del sistema obtenido mediante el método de *atomizado* (Fig. 7e), desaparecen los efectos endotérmicos que corresponden a la fusión de la norflurazona y a la deshidratación de la CD. Este hecho podría indicar la complejación del herbicida en la cavidad de la CD.

Cuando para la elaboración de un nuevo sistema binario entre el herbicida y la  $\beta$ -CD se emplea el método de procesado del *rotavapor* (Fig. 7f), en su termograma sólo se presenta un pico endotérmico sobre los 120 °C correspondiente a la deshidratación de la

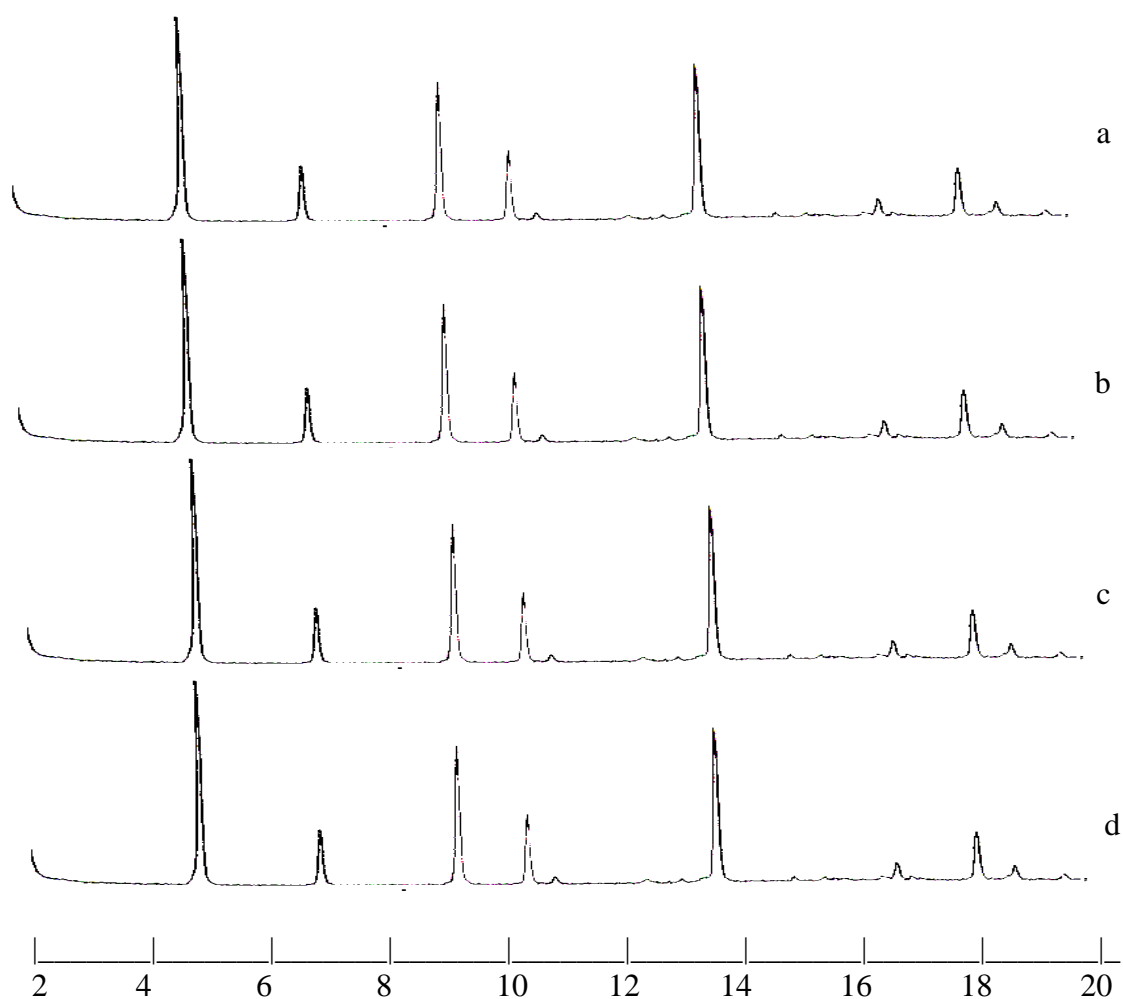
CD, desapareciendo el efecto endotérmico correspondiente a la norflurazona. Pero el hecho de que el efecto endotérmico correspondiente a la deshidratación se desplace a temperaturas más bajas (desde la zona de los 150 °C hasta la de 120 °C) indica que los enlaces entre el agua de hidratación y la CD son más débiles, y ello ha de ser consecuencia de otra interacción que está teniendo lugar en la cavidad de la CD.

En la figura 8 se pueden observar los termogramas correspondientes a diferentes sistemas binarios de norflurazona- $\gamma$ -CD. Para la mezcla física (Fig. 8c) se obtuvo un termograma en el que se observaron dos picos diferenciados correspondientes a la CD y a la norflurazona, mostrándose la ausencia de interacción entre los componentes. La entalpía de fusión correspondiente a la norflurazona fue de -15,8 J/g.

En las muestras obtenidas mediante las técnicas de *amasado* y *atomizado* (Fig. 8d y 8f) se observa la aparición de un pico exotérmico a 195 °C, que podría corresponder a una transición cristalina. Además se observó una disminución del efecto de deshidratación correspondiente a la  $\gamma$ -CD, sobre todo en el atomizado, indicando la disminución del número de moléculas de agua dentro de la cavidad. Estos resultados podrían hacer pensar en la formación de un complejo de inclusión por complejación parcial de la molécula del herbicida en la cavidad de la CD. En el caso del *rotavapor* (fig. 7f) no se observa ningún efecto, lo cual induce a pensar en la formación de un complejo de inclusión entre el herbicida y la CD.

#### **4.1.2.2. Difracción de rayos X (DRX)**

Como en el apartado anterior, se realizó un estudio de cómo afectan las distintas técnicas de procesado al herbicida puro empleando la técnica de DRX. Como muestra la figura 8, no se observó ningún cambio en la estructura de la norflurazona cuando se procesó con las mismas técnicas empleadas para obtener los sistemas binarios.



*Figura 9. Difractogramas de rayos X correspondientes a la norflurazona sometida a las distintas técnicas de procesado: a) sin tratamiento, b) amasado, c) atomizado y d) rotavapor.*

*Comportamiento del herbicida norflurazona en el sistema suelo-agua. Obtención, caracterización y aplicación de complejos de inclusión norflurazona-ciclodextrina.*

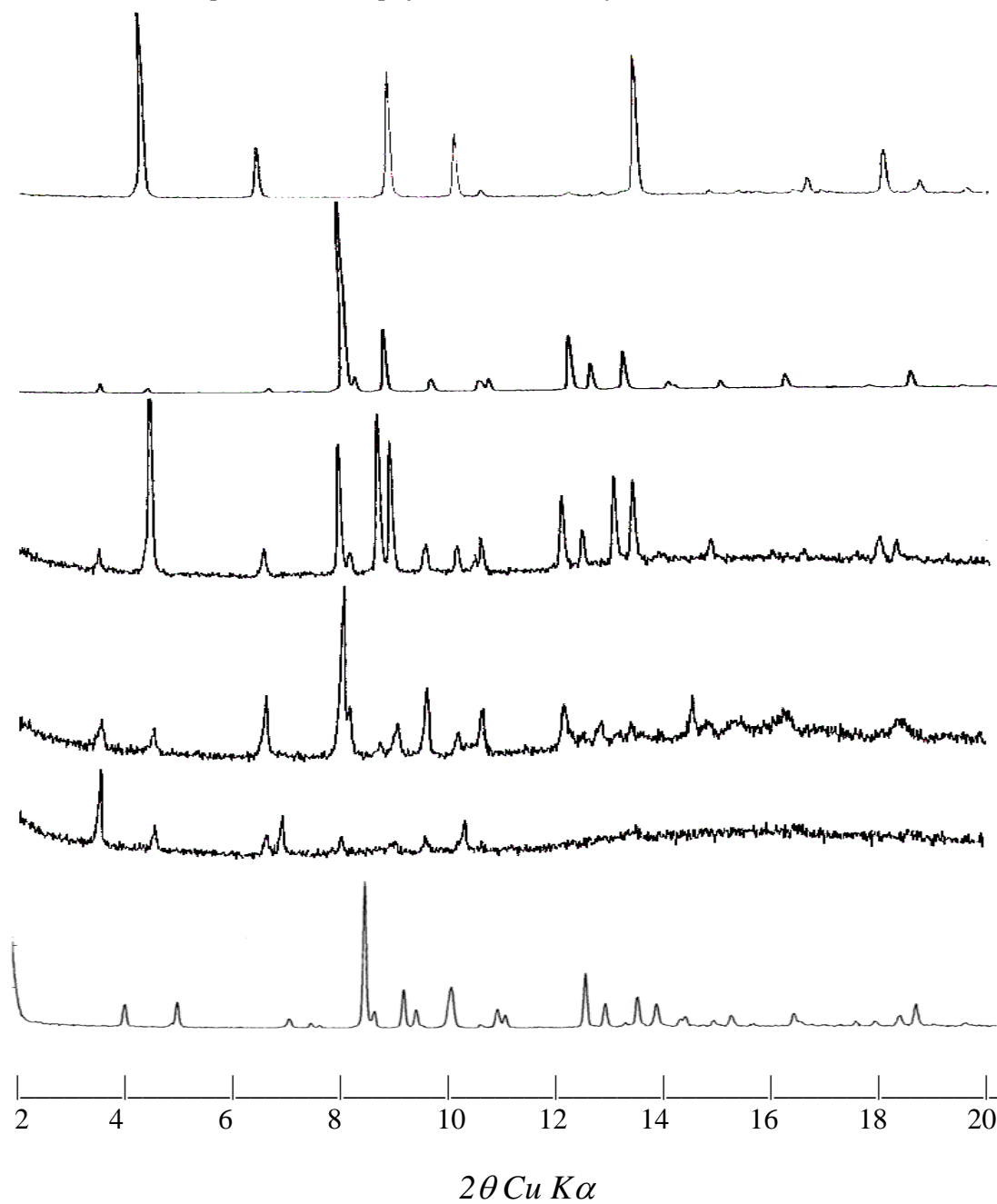
En las figuras 10, 11 y 12 se muestran los distintos difractogramas de rayos X obtenidos para los distintos sistemas binarios elaborados.

Los resultados obtenidos por difracción de rayos X ponen de evidencia que la norflurazona (Fig. 10a) presenta un carácter cristalino, puesto de manifiesto por los picos que aparecen en su difractograma. De igual manera los diagramas de las tres CDs (Fig. 10b, 11b y 12b) indican también un carácter cristalino por la aparición de numerosos picos de difracción.

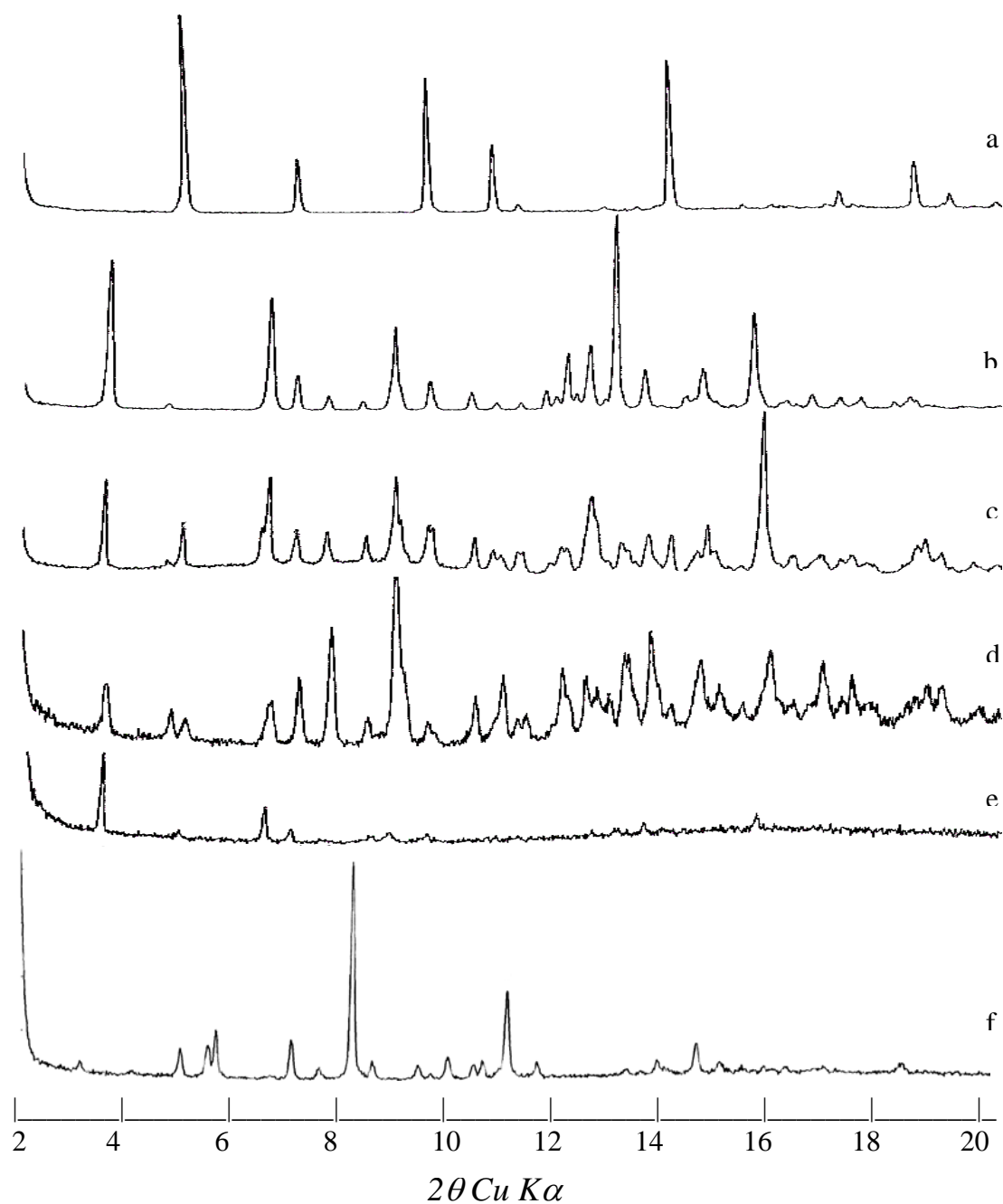
Al estudiar el espectro de las mezclas físicas (Fig. 10c, 11c y 12c) se puede observar la aparición de un efecto de apantallamiento entre los picos de difracción de la norflurazona y de la CD, permaneciendo el marcado carácter cristalino de ambas sustancias, en todos los casos. Esto indica la ausencia de interacción en estado sólido de ambos componentes, resultados que concuerdan con los obtenidos mediante la técnica de DSC para estas muestras.

En los sistemas binarios obtenidos con  $\alpha$ -CD, sólo en el caso del empleo de la técnica del *rotavapor* (Fig. 10f) se confirmó la obtención de un complejo de inclusión, ya que su espectro de difracción difiere del correspondiente a la mezcla física, con la aparición de nuevos picos y desaparición de otros, aunque se observan algunos correspondientes a la norflurazona pura, confirmando los resultados obtenidos mediante DSC donde se observó una complejación de parte del plaguicida.

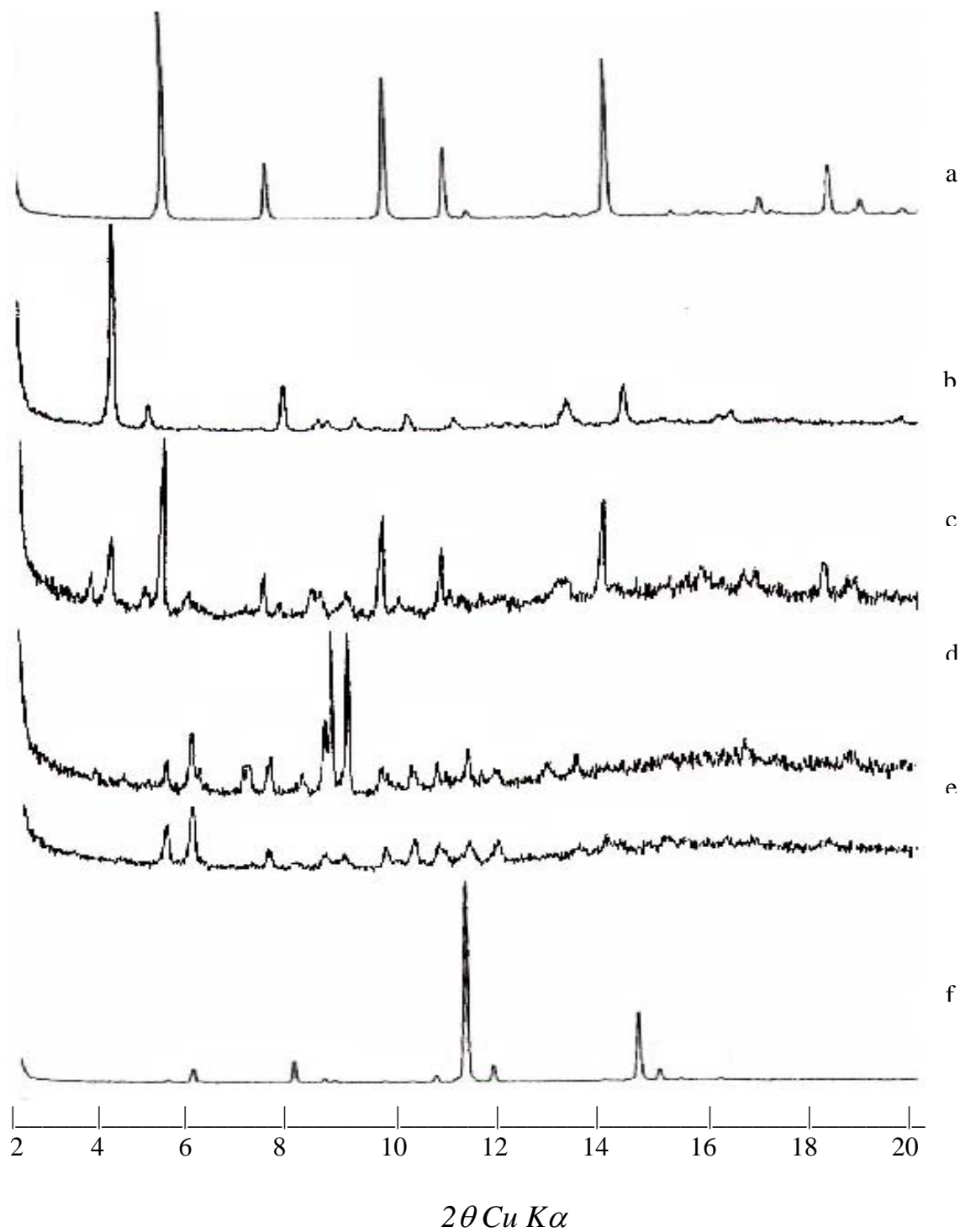
En el caso del sistema elaborado mediante la técnica de *amasado* (Fig. 10d), los cambios en su difractograma respecto al de la mezcla física fueron mínimos, indicando la escasa interacción entre los componentes cuando se utiliza esta técnica. Tan solo se observa una disminución en las intensidades relativas de los picos debido probablemente a la diferente orientación de los cristales de cada componente al preparar la muestra para su estudio por DRX.



*Figura 10. Difractogramas de rayos X correspondientes al sistema norflurazona- $\alpha$ -CD: a) norflurazona, b)  $\alpha$ -CD, c) mezcla física, d) amasado, e) atomizado y f) rotavapor.*



*Figura 11. Difractogramas de rayos X correspondientes al sistema norflurazona- $\beta$ -CD: a) norflurazona, b)  $\beta$ -CD, c) mezcla física, d) amasado, e) atomizado y f) rotavapor.*



*Figura 12. Difractogramas de rayos X correspondientes al sistema norflurazona- $\gamma$ -CD: a) norflurazona, b)  $\gamma$ -CD c) mezcla física, d) amasado, e) atomizado y f) rotavapor*



*Comportamiento del herbicida norflurazona en el sistema suelo-agua. Obtención, caracterización y aplicación de complejos de inclusión norflurazona-ciclodextrina.*

Para el sistema elaborado mediante *atomizado* (Fig. 10e), se observó una fuerte disminución de la cristalinidad del sistema, junto a algunos picos de difracción correspondientes a la  $\alpha$ -CD pura. En el estudio de este sistema por DSC, se propusieron dos posibles explicaciones. Una de ellas era que la técnica de procesado empleada condujera a una muestra heterogénea donde no hubiera complejo y el herbicida y la CD estuvieran por separado. Si hubiese ocurrido eso, el diagrama 10e debería parecerse al 10a o al 10b pues ya se ha demostrado que la  $\alpha$ -CD y la norflurazona sometidas a la técnica de atomizado conservan sus picos de difracción sin alteración observable. Ello lleva a concluir que la segunda posibilidad que se daba en el estudio por DSC, que era la de la formación de un complejo norflurazona- $\alpha$ -CD amorfo, parece ser la más factible en este caso. En el caso del amasado, aunque posea un termograma similar al del atomizado se continúan observando algunos picos de difracción, es decir, sin amorfizarse completamente no siendo complejo todo el producto formado, hecho que podría ser debido a la técnica de procesado (manual) la cual no llega a ser tan efectiva para poder conseguir una amorfización completa del producto, como podría ser la de atomizado tal y como ocurre con el resto de sistemas obtenidos empleando las otras dos CDs. En el caso del sistema obtenido por rotavapor se observa la obtención de un difractograma similar al que se obtiene con la norflurazona pura corroborando el resultado de DSC donde solo se observó una ligera disminución del efecto endotérmico de la norflurazona llevando a pensar en una inclusión de una baja cantidad de herbicida en la cavidad de la CD, por lo tanto, lo que observamos en este difractograma es lo que mayoritariamente compone el producto obtenido, es decir, norflurazona pura.

En la figura 11 se observan los difractogramas de los diferentes sistemas binarios elaborados con la  $\beta$ -CD. En el caso del sistema elaborado por *amasado* (Fig. 11d) el diagrama se corresponde con el de la mezcla física, tal como se puso de manifiesto también mediante la técnica de DSC.

Por el contrario para la muestra obtenida por *atomizado* con  $\beta$ -CD (Fig. 11e), se observa una fuerte disminución en el número de picos de difracción, lo que indica una

disminución de la cristalinidad de la muestra obtenida, situación que podría corresponder con la obtención de un complejo de inclusión, ya que la aplicación de este método de procesado a la norflurazona pura y a la  $\beta$ -CD pura por separado no produjo disminución alguna en sus picos de difracción.

En el caso de la muestra obtenida mediante la técnica de *amasado* (Fig. 12d), la aparición de nuevos picos de difracción diferentes de los correspondientes a la mezcla física nos confirma que se ha obtenido una nueva estructura cristalina. Confirmándose de esta manera los resultados obtenidos mediante la técnica calorimétrica.

Para los sistemas binarios obtenidos mediante el empleo de la  $\gamma$ -CD, cuando se aplicó la técnica de *atomizado* (Fig. 12e) se confirmó la formación de un nuevo complejo de inclusión amorfo, ya que se observa una pérdida de cristalinidad, debido a la casi desaparición de picos de difracción en su difractograma, quedando algunos picos de difracción correspondientes a la CD y a la norflurazona. Como se ha visto anteriormente, la aplicación de la técnica de atomización a los sistemas binarios de norflurazona con las tres CDs estudiadas dio como resultado la disminución de los picos de difracción del herbicida y de las CDs. Ello indica la formación de un complejo de inclusión de carácter amorfo, pues ni la norflurazona pura ni ninguna de las CDs puras sometidas a atomización llegaron a amorfizarse. En realidad hay que tener en cuenta que en esta técnica de procesado se parte de una solución hidroalcohólica donde interaccionan previamente la CD con el herbicida, y están formando complejo en solución antes de proceder a su atomización.

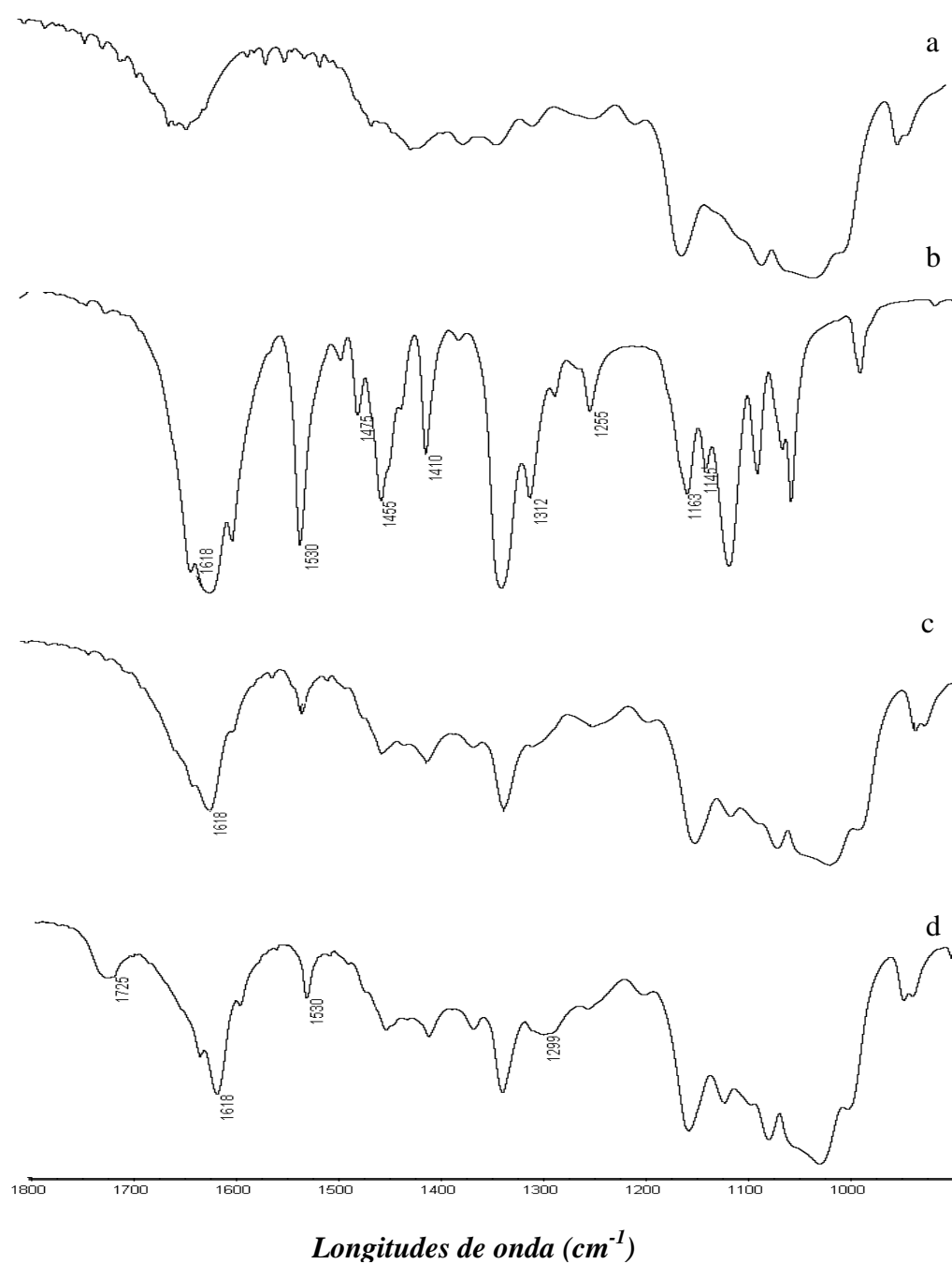
En el caso del producto obtenido por *rotavapor* (Fig. 12f), se confirmó la formación de un complejo de inclusión con el herbicida debido a que se observó en su difractograma unos intensos picos de difracción distintos de aquellos que se observan en la mezcla física, este resultado indica la obtención de una nueva estructura marcadamente cristalina.

#### **4.1.2.3. Espectroscopía de infrarrojos (IR)**

La formación de complejos de inclusión plaguicida-CD, puede demostrarse en algunos casos mediante este tipo de espectroscopía, a partir del estudio y seguimiento de las bandas características de la molécula huésped, debido a que la parte de la molécula incluida producirá un desplazamiento de las frecuencias e intensidades de sus grupos funcionales y enlaces, apareciendo por ello alteradas.

El espectro de la norflurazona (figura 13b y 14b), muestra bandas de absorción debidas a los modos de vibración del anillo de piridazinona a 1410 y 1530  $\text{cm}^{-1}$ , la frecuencia de elongación del C aromático-N aparece a 1255  $\text{cm}^{-1}$  y la del C-F a 1312, 1163 y 1145  $\text{cm}^{-1}$  (Undabeytia et al. 2000). Las bandas a 1475 y 1455  $\text{cm}^{-1}$  pueden atribuirse a modos de respiración del esqueleto del anillo. Aunque el grupo carbonilo en cetonas exhibe una fuerte banda sobre 1725-1705  $\text{cm}^{-1}$  (Bellamy, 1975), en  $\beta$ -amino cetonas  $\alpha$ -,  $\beta$ - insaturadas, como es el caso de la norflurazona, se ha descrito un efecto quelatante que da lugar a un desplazamiento considerable de la frecuencia del grupo carbonilo. En su lugar, una banda muy ancha, aproximadamente cien veces más fuerte que la vibración del carbonilo se observa en el rango 1639-1538  $\text{cm}^{-1}$ , que en el caso de la norflurazona aparece a 1618  $\text{cm}^{-1}$ . Esta absorción surge de un grupo carbonilo que ha reducido su carácter de doble enlace por resonancia entre los grupos amino y cetona, en los cuales el N y O pueden actuar como donadores y aceptores de electrones. Las bandas producidas son mucho más fuertes que los enlaces de H normales, por esta razón, la frecuencia de elongación N-H (3335  $\text{cm}^{-1}$ ) es inferior a lo normal para aminas secundarias. La vibración de deformación del grupo metilo unido al N se observa a 1412  $\text{cm}^{-1}$ .

En cuanto a los espectros de IR de las CDs (Fig. 13a y 14a) se observan algunas bandas intensas y agudas en la región 1030-1160  $\text{cm}^{-1}$  que pueden asociarse con las vibraciones extendidas de los grupos C-OH primarios o secundarios.



*Figura 13. Espectros de IR correspondientes al sistema norflurazona- $\beta$ -CD: a)  $\beta$ -CD, b) norflurazona, c) mezcla física y d) rotavapor.*

*Comportamiento del herbicida norflurazona en el sistema suelo-agua. Obtención, caracterización y aplicación de complejos de inclusión norflurazona-ciclodextrina.*

En el estudio de los diferentes sistemas binarios, hay que tener en cuenta que el porcentaje de principio activo es como mínimo el 20% del total del producto, lo que dará lugar a que numerosas bandas de la norflurazona se encuentren enmascaradas por el espectro de la CD, componente mayoritario de los sistemas.

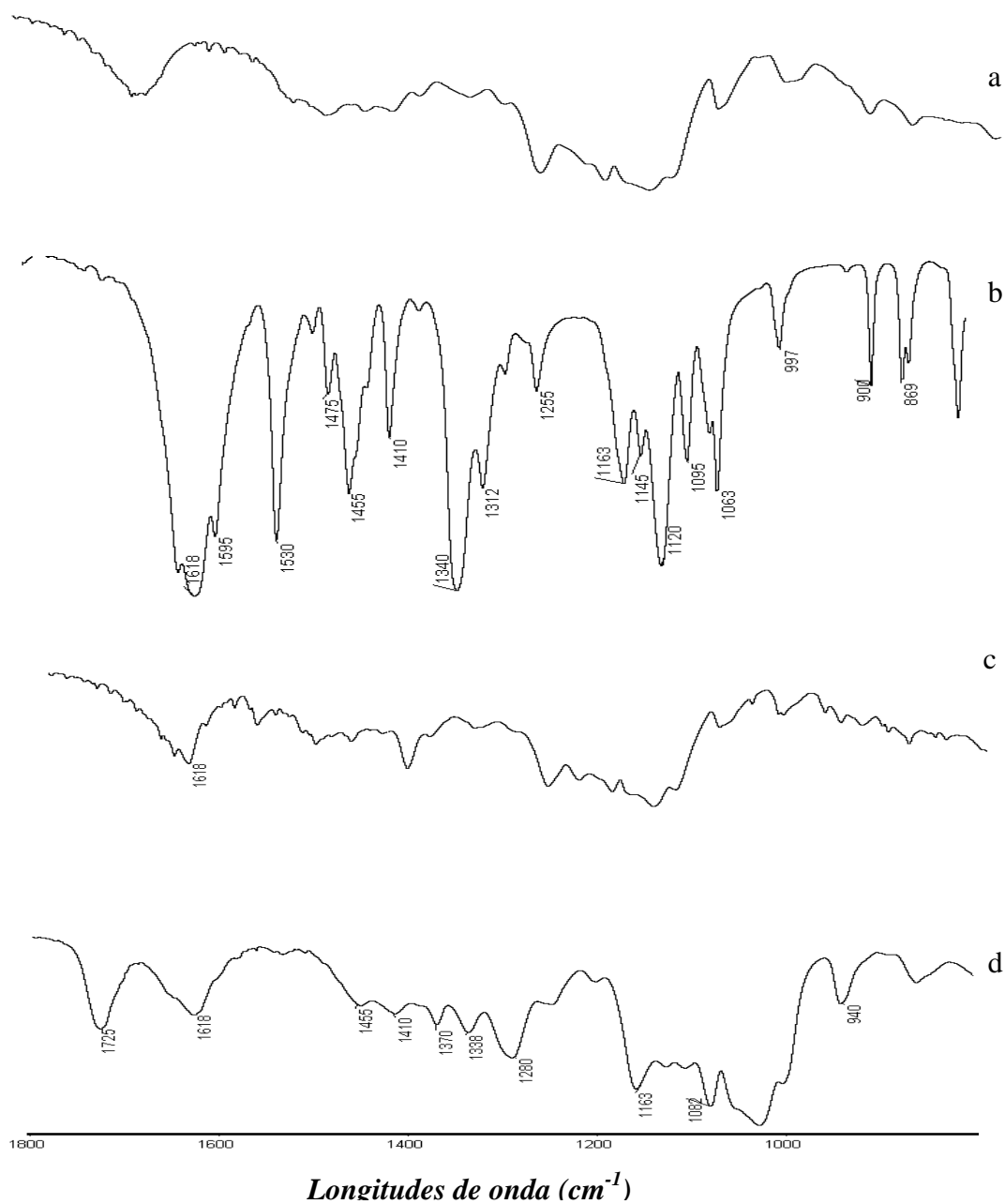
Así el estudio se basará en la observación de los posibles cambios presentes en las bandas de absorción características y visibles de la norflurazona (Dailey, 1993).

Dentro de las técnicas utilizadas para la obtención del complejo, en el caso del espectro de la muestra obtenida mediante la técnica del *rotavapor* se encontraron las más claras evidencias de la formación del complejo con  $\gamma$ - y  $\beta$ -CD, los cuales pasamos ahora a analizar.

En el espectro de IR correspondiente a la técnica de *rotavapor*, utilizando la  $\beta$ -CD (Fig. 13c) se observa claramente la aparición de una nueva banda de absorción a  $1725\text{ cm}^{-1}$ , esta nueva banda podría corresponder a la formación del complejo de inclusión, pues su presencia indica que la quelación entre los grupos carbonilos y amino no se está produciendo debido a que posiblemente el grupo amino secundario se encuentra envuelto en la formación de un complejo con CD, con lo que la frecuencia de vibración del grupo carbonilo revierte a su valor normal de  $1725\text{ cm}^{-1}$ .

Debido a que la banda a  $1618\text{ cm}^{-1}$  no desaparece completamente, esto indicaría una complejación parcial de la molécula huésped en la cavidad de la CD, es decir, algunas moléculas de norflurazona estarían formando complejo con CD. También aparece una nueva banda a  $1299\text{ cm}^{-1}$  lo que indicaría de nuevo una formación de un complejo de inclusión, ya sea a través del grupo  $\text{CH}_3\text{-N-}$  ó a través del grupo  $\text{CF}_3$ , ya que en ambos casos las bandas correspondientes a los mismos ( $1255$  y  $1312\text{ cm}^{-1}$ ) han desaparecido con el empleo de la técnica de procesado, apareciendo esta nueva banda a  $1299\text{ cm}^{-1}$ .

*Comportamiento del herbicida norflurazona en el sistema suelo-agua. Obtención, caracterización y aplicación de complejos de inclusión norflurazona-ciclodextrina.*



*Figura 14. Espectros de IR correspondientes al sistema norflurazona- $\gamma$ -CD:  $\gamma$ -CD, b) norflurazona, c) mezcla física y d) rotavapor.*

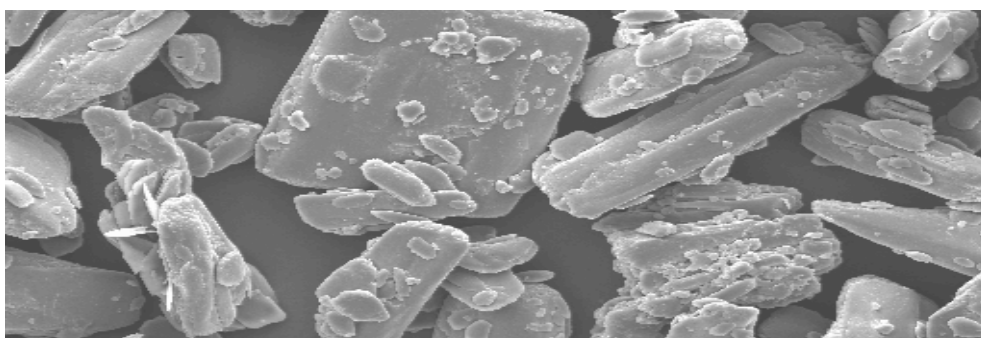
*Comportamiento del herbicida norflurazona en el sistema suelo-agua. Obtención, caracterización y aplicación de complejos de inclusión norflurazona-ciclodextrina.*

El espectro correspondiente al sistema con  $\gamma$ -CD obtenido mediante *rotavapor* (Fig. 14c) muestra igualmente evidencias de la formación de un nuevo complejo de inclusión.

En el espectro de la muestra obtenida aparece claramente una nueva banda de absorción a  $1725\text{ cm}^{-1}$ , la cual indica que no se está dando la quelación entre los grupos carbonilo y amino de la molécula del herbicida, debido a que la amina secundaria está envuelta en la formación del complejo de inclusión. Al igual que ocurre con el producto obtenido mediante *rotavapor* con la  $\beta$ -CD, la banda a  $1618\text{ cm}^{-1}$  no desaparece completamente, lo cual podría indicar que el complejo se está formando a través de una complejación parcial del herbicida en el interior de la CD. A diferencia del espectro obtenido para la  $\beta$ -CD, se pueden apreciar numerosos desplazamientos aproximadamente de  $30\text{ cm}^{-1}$  de las bandas características del espectro de la norflurazona correspondientes a las frecuencias de vibración del C-N aromático, C-F aromático y del C-N alifático ( $1370$ ,  $1338$  y  $1280\text{ cm}^{-1}$ ), lo cual es debido a la formación de puentes de hidrógeno entre ambas moléculas. Junto a estos resultados se observa una nueva banda desplazada a  $940\text{ cm}^{-1}$  que confirmaría una nueva formación de puentes de hidrógeno entre el grupo C-OH ( $900\text{ cm}^{-1}$ ) de la CD y la molécula del herbicida.

#### **4.1.2.4. Microscopía electrónica de barrido (SEM)**

Se puede observar en la figura 15 la microfotografía electrónica de barrido de norflurazona pura, que aparece como partículas cristalinas de grandes dimensiones. Esta microfotografía servirá de referencia sobre los cambios que pudiese sufrir dicha estructura por las distintas técnicas empleadas, que a su vez puedan influir sobre su hidrosolubilidad. De la misma forma se hicieron microfotografías a las CDs naturales empleadas en este estudio, observándose como éstas cristalizaban en forma poliédrica (figuras no mostradas).

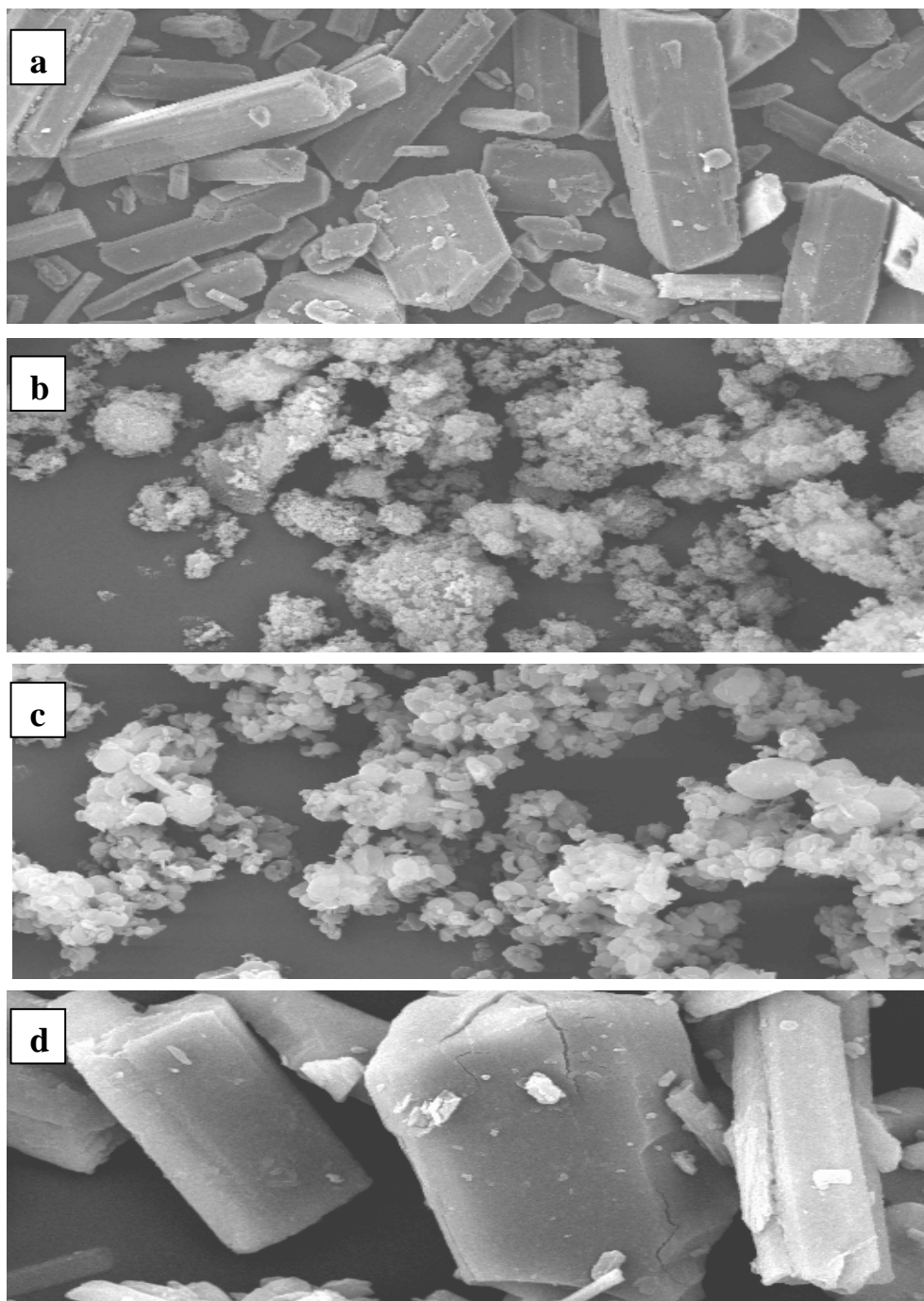


*Figura 15. Microfotografía por SEM correspondiente a norflurazona pura (x200).*

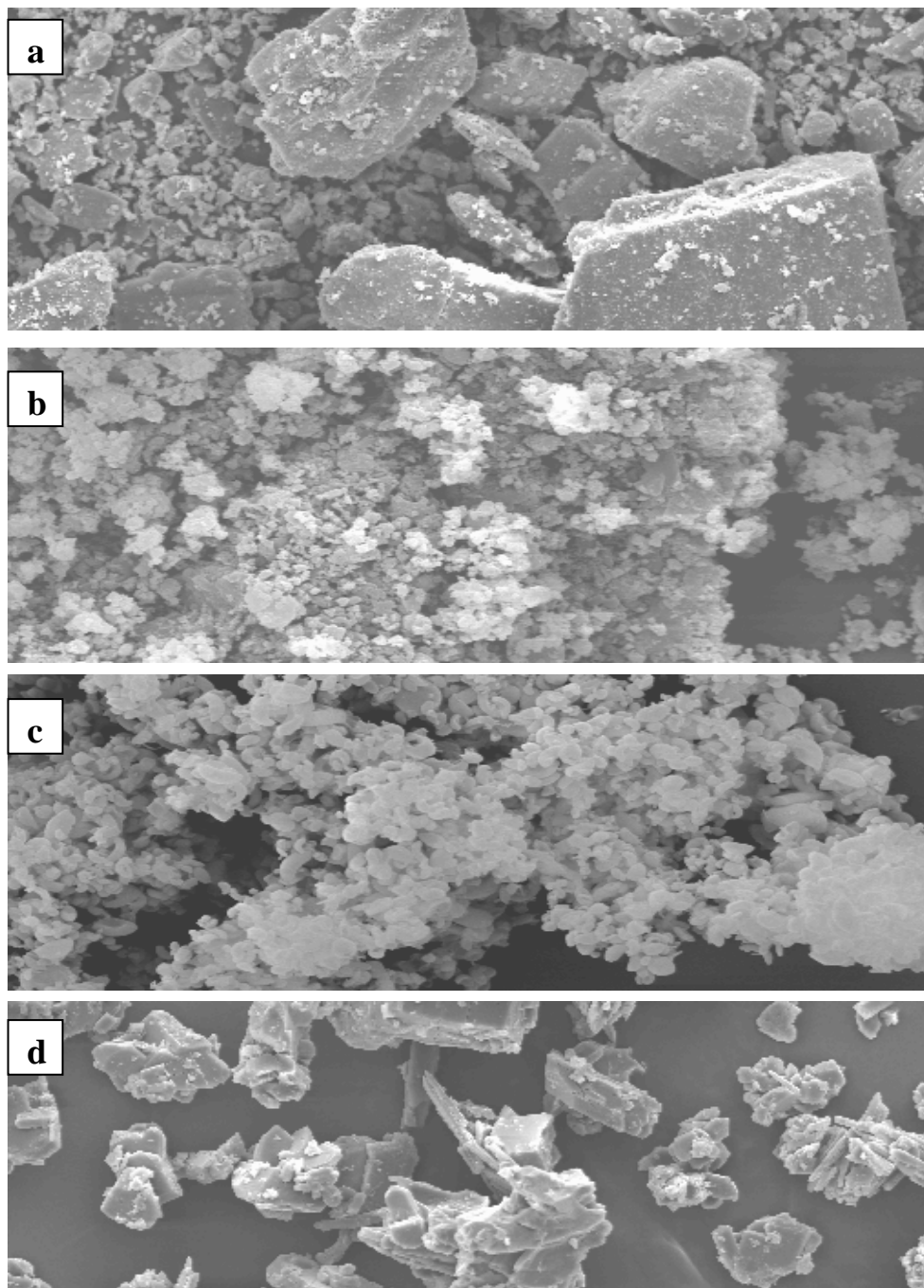
En la mezcla física de los tres sistemas (Fig. 16a, 17a, y 18a) se observó por SEM la presencia de ambos componentes cristalinos, sin que se aprecie interacción entre ellos. A pesar del vigoroso mezclado de los componentes, las moléculas de norflurazona no muestran una marcada tendencia a adherirse sobre las partículas de CDs.

Esta técnica aplicada al estudio de los sistemas binarios no puede por sí misma demostrar la presencia de un compuesto de inclusión, sólo permite confirmar la existencia de uno o varios componentes en la muestra bajo estudio y aportar información sobre el tamaño y forma de cada uno de los componentes. De esta forma, dicha técnica adquiere un carácter complementario de otros métodos de caracterización más concluyentes, recogidos en la presente memoria.



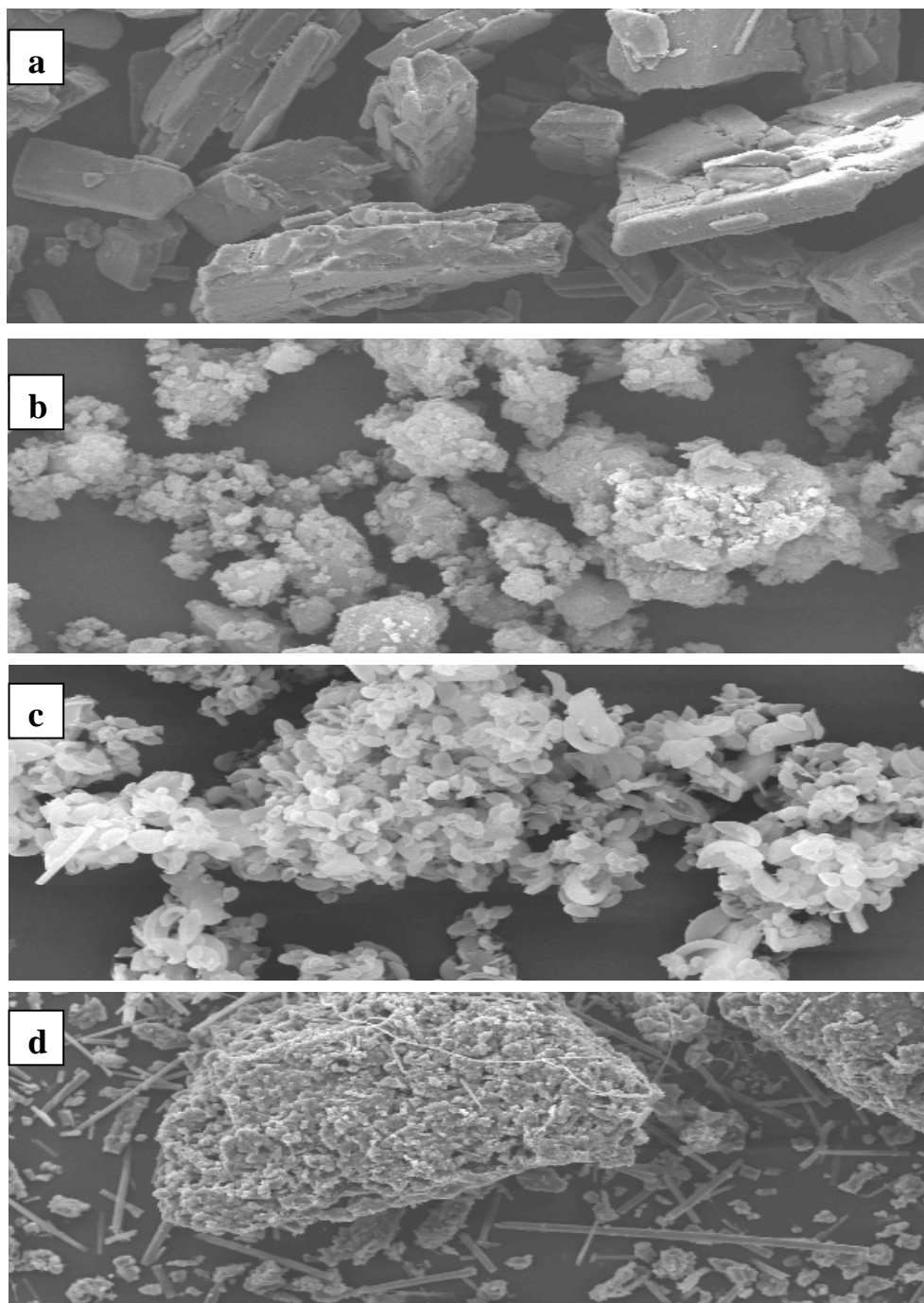


*Figura 16. Microfotografía por SEM correspondiente al sistema norflurazona- $\alpha$ -CD: a) mezcla física; b) amasado; c) atomizado y d) rotavapor (x200).*



*Figura 17. Microfotografía por SEM correspondiente al sistema norflurazona- $\beta$ -CD: a) mezcla física; b) amasado; c) atomizado y d) rotavapor (x200).*

*Comportamiento del herbicida norflurazona en el sistema suelo-agua. Obtención, caracterización y aplicación de complejos de inclusión norflurazona-ciclodextrina.*



*Figura 18. Microfotografía por SEM correspondiente al sistema norflurazona- $\gamma$ -CD: a) mezcla física; b) amasado; c) atomizado y d) rotavapor (x200).*

*Comportamiento del herbicida norflurazona en el sistema suelo-agua. Obtención, caracterización y aplicación de complejos de inclusión norflurazona-ciclodextrina.*

Las microfotografías correspondientes a los sistemas binarios obtenidos por *amasado* (Fig. 16b, 17b y 18b) muestran una mayor agregación, observándose una importante disminución del tamaño de partícula, lo cual podría influir en una mayor humectabilidad de los distintos sistemas. Esta disminución del tamaño de los cristales de norflurazona y las distintas CDs se reflejaba en el estudio por difracción de rayos X en una pérdida de cristalinidad o amorfización de las muestras, tal y como se ha puesto de manifiesto en el apartado anterior.

Los productos elaborados por atomización (Fig. 16c, 17c y 18c) no difieren demasiado de los obtenidos por *amasado*, presentando una reducción en el tamaño de partícula y una marcada tendencia a la agregación. Sin embargo se observa una morfología diferente en las partículas ya que presentan una forma más o menos ovalada o esférica en todos los casos.

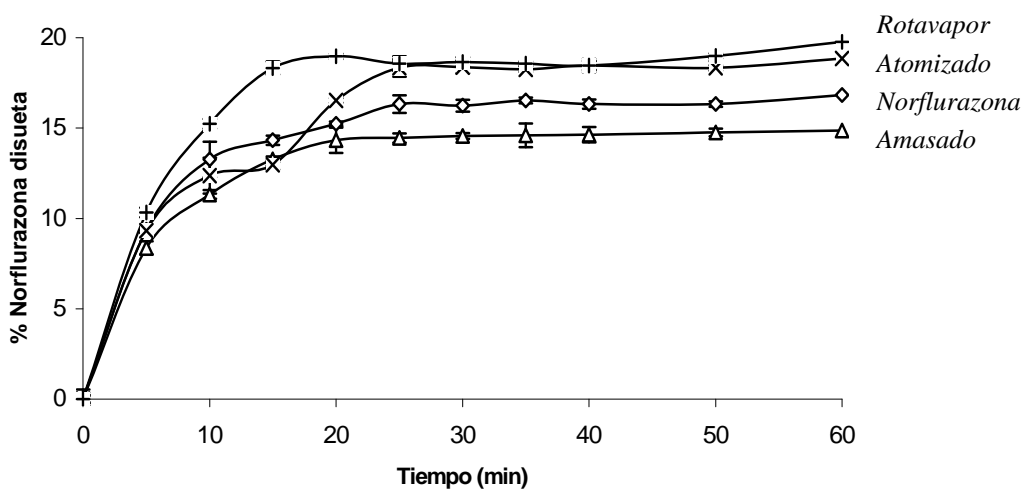
Las microfotografías de las muestras obtenidas mediante el *rotavapor* (Fig. 16d, 17d y 18d) evidencian unas partículas con un marcado carácter cristalino. Hecho que ya se puso de manifiesto en el estudio por DRX. Es de destacar los diferentes tamaños y formas de partículas obtenidas mediante la técnica de rotavapor dependiendo de que se utilice  $\alpha$ -,  $\beta$ - o  $\gamma$ -CD. Como puede observarse, los cristales obtenidos al emplear  $\alpha$ -CD (fig. 16d) son de un tamaño mayor que los de norflurazona pura (fig. 15) y mucho mayor que los observados en la mezcla física (fig. 16a), presentando también distinta cristalinidad. Sin embargo, los cristales obtenidos por rotavapor empleando  $\beta$ -CD (fig. 17d) son de menor tamaño que los de norflurazona pura, aunque su forma quizás sea más parecida la de ésta. Por último, los cristales obtenidos al emplear  $\gamma$ -CD son de un tamaño de partícula muy pequeño y presentan gran tendencia a la agregación. Es la técnica de procesado que produce un menor tamaño de partícula cuando se utiliza la  $\gamma$ -CD (fig. 18), siendo digno de mención la presencia de unos cristales con forma de filamentos que podrían ser responsables en parte de la formación de los agregados de partículas observados.

Es importante destacar el hecho de que para cada método de procesado se han obtenido sistemas morfológicamente homogéneos en todos los casos, excepto en el obtenido por rotavapor con la  $\gamma$ -CD, debido a la agregación de sus partículas como ya se comentó anteriormente.

#### **4.1.3. Estudios de velocidad de disolución**

Antes de estudiar los perfiles de disolución de los distintos complejos de inclusión o sistemas binarios sólidos obtenidos, se estudiará si las diferentes técnicas de procesado ejercen algún tipo de influencia sobre la velocidad de disolución del plaguicida puro, comparando los ensayos de disolución de la norflurazona tras ser sometida a los mismos tratamientos que se han utilizado para la obtención de los complejos de inclusión.

Así en la figura 19 se recogen los perfiles de velocidad de disolución del plaguicida puro y de éste tras ser procesado por las distintas técnicas. En la figura se muestran también las barras de error correspondientes a cada punto obtenido.

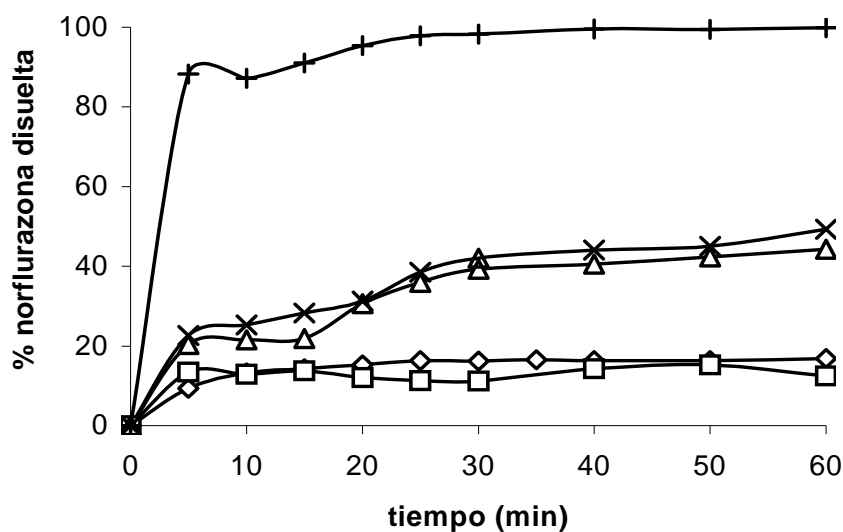


*Figura 19. Perfiles de velocidad de disolución correspondientes a: norflurazona (◇) y norflurazona sometida a distintos tratamientos: amasado (Δ), atomizado (x), rotavapor (+).*

Dichos resultados muestran que las técnicas provocan leves modificaciones en la velocidad de disolución del producto. Así, cuando las técnicas empleadas son *atomizado* o *rotavapor* el producto obtenido presenta una leve mejora en su disolución, mientras que si es la técnica de *amasado* su cinética se ralentiza levemente. Estas diferencias son muy leves, y en el caso del *atomizado* y *rotavapor* se puede deber al aumento de la superficie de contacto que producen estas técnicas debido a una disminución en el tamaño de la partícula. Por el contrario, aunque la técnica de *amasado* conduce a una fuerte disminución del tamaño de partícula, también es frecuente que se produzcan fenómenos de agregación y aglomeración de las partículas, lo que explicaría que el perfil de liberación sea similar o incluso más bajo que el de la norflurazona pura.

#### **4.1.4. Sistemas binarios**

En la figura 20, se recogen los perfiles de disolución para la mezcla física y los distintos sistemas binarios elaborados con  $\alpha$ -CD.



*Figura 20. Perfiles de velocidad de disolución correspondientes a: norflurazona ( $\diamond$ ) y sistemas norflurazona- $\alpha$ -CD: mezcla física ( $\square$ ) amasado ( $\Delta$ ), atomizado (x) y rotavapor (+).*

*Comportamiento del herbicida norflurazona en el sistema suelo-agua. Obtención, caracterización y aplicación de complejos de inclusión norflurazona-ciclodextrina.*

Resulta evidente que en los primeros minutos del proceso de disolución, el sistema elaborado mediante la técnica de *rotavapor* es el que conduce a una mejora más efectiva en el perfil de disolución del herbicida. Ello indica que el nuevo compuesto cristalino formado, a pesar de tener un mayor tamaño de partícula (fig. 16d), presenta una mayor solubilidad que la norflurazona pura.

Estos resultados se corroboran al realizar el estudio de los valores de eficacia de disolución (tabla 5), donde la técnica de *rotavapor* conlleva a una mejora significativa tras los primeros 5 minutos ( $ED_5$ ).

*Tabla 5. Valores de la eficacia de disolución (ED) tomados a los 5, 25 y 40 minutos para los sistemas de  $\alpha$ -CD-norflurazona.*

	<b>ED<sub>5</sub></b>	<b>ED<sub>25</sub></b>	<b>ED<sub>40</sub></b>
<b>Norflurazona</b>	0.009	0.011	0.011
<b>Métodos de procesado</b>			
<b>Mezcla física</b>	0.011	0.010	0.010
<b>Amasado</b>	0.022	0.036	0.038
<b>Atomizado</b>	0.023	0.038	0.039
<b>Rotavapor</b>	0.075	0.081	0.081

Cuando se analizan los tramos finales del perfil de disolución sí se observa una cierta mejora con los sistemas elaborados por *amasado* y *atomizado*, respecto al plaguicida puro y a la mezcla física. Esta diferencia puede deberse a la menor cristalinidad de la muestra del *atomizado*, constatada por DRX y a su menor tamaño de partícula, puesto en evidencia mediante el estudio de SEM, tanto en el caso del *atomizado* como en el del *amasado*.

*Comportamiento del herbicida norflurazona en el sistema suelo-agua. Obtención, caracterización y aplicación de complejos de inclusión norflurazona-ciclodextrina.*

En efecto, al realizar los análisis de ED<sub>25</sub> y ED<sub>40</sub>, los valores obtenidos para los sistemas elaborados por *amasado* y *atomizado* son 4 veces superiores a los de la correspondiente mezcla física (tabla 5).

Por último, hay que señalar que la mezcla física no supone mejora alguna en la velocidad de disolución del plaguicida, lo que concuerda con el estudio de solubilidad, que conduce a una muy baja constante de complejación en medio líquido, situación que se correlaciona con el pequeño tamaño de cavidad de esta CD.

En la figura 21 se muestra el perfil de disolución de los sistemas elaborados con  $\beta$ -CD en comparación con la norflurazona pura. Resulta evidente como para ésta CD, a diferencia de la anterior, la simple mezcla física del plaguicida con la CD, sí induce a una mejora notable en el perfil de disolución del plaguicida. Estos resultados se explican en base a la complejación de ambos en solución. En efecto, los estudios de solubilidad mostraron cómo para esta CD se obtenía la mayor constante de complejación en medio líquido ( $360 \text{ M}^{-1}$ ), del orden de siete veces superior a las otras CDs. Estos resultados indicaban la formación de un complejo en solución sin límite de solubilidad, bajo las condiciones estudiadas, dado que esta CD presentaba un tamaño de cavidad adecuado para complejar al plaguicida.

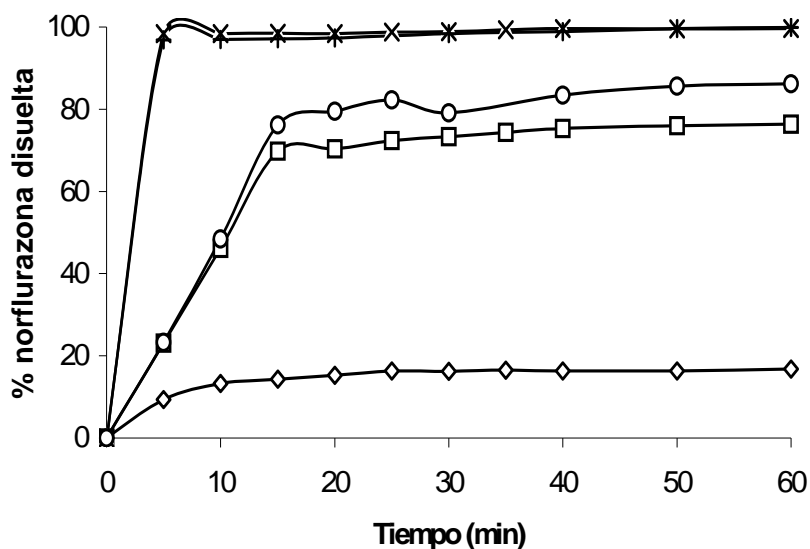
Los sistemas elaborados por *amasado*, *rotavapor* y *atomizado*, conducen a velocidades de disolución todavía superiores a la mezcla física, llegándose a disolver el 100% del plaguicida. El complejo para los sistemas obtenidos por *atomizado* y *rotavapor* también existe en estado sólido, presentando menor cristalinidad (*atomizado*) y menor tamaño de partícula (*amasado* y *atomizado*), como se ha puesto de manifiesto con las diferentes técnicas de caracterización utilizadas.

Para terminar de corroborar la formación del complejo de inclusión cuando se emplea la técnica de *atomizado*, se llevó a cabo un ensayo de velocidad de disolución a partir de la mezcla física de cada uno de los componentes del sistema binario, norflurazona- $\beta$ -CD, pero previamente *atomizados* por separado, obteniéndose un perfil de disolución por debajo del obtenido por el complejo *atomizado*, quedando claro que no



*Comportamiento del herbicida norflurazona en el sistema suelo-agua. Obtención, caracterización y aplicación de complejos de inclusión norflurazona-ciclodextrina.*

sólo la reducción en el tamaño de partícula y la disminución de la cristalinidad son las responsables de la obtención del perfil de solubilidad cercano al 100% del herbicida sino que se confirma así la presencia de un verdadero complejo de inclusión.



*Figura 21. Perfiles de velocidad de disolución correspondientes a: norflurazona (◇) y sistemas norflurazona-β-CD: mezcla física (□), amasado (Δ), atomizado (x), rotavapor (+) y mezcla física de los atomizados (o).*

En la tabla 6 se observan valores marcadamente superiores, para los sistemas binarios norflurazona-β-CD, de eficacia de disolución a distintos tiempos, con respecto a la mezcla física y norflurazona pura.

En la figura 22 se muestran los perfiles de velocidad de disolución correspondientes a la norflurazona pura y a los sistemas binarios elaborados con γ-CD.

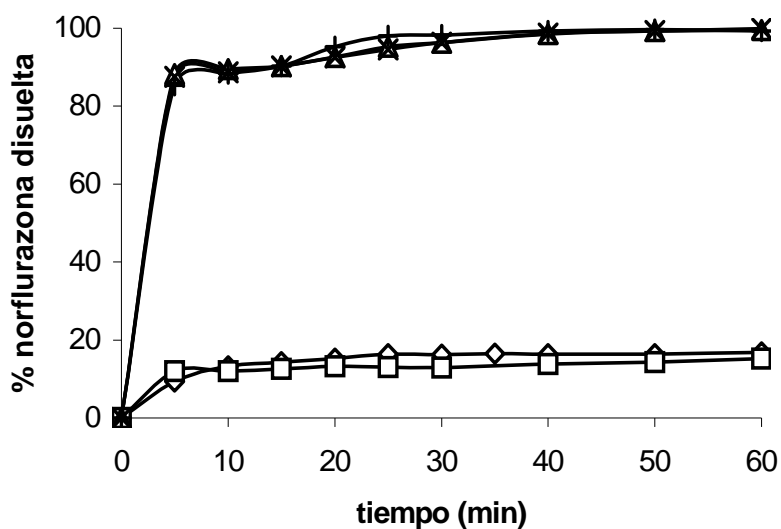
Para los sistemas binarios de amasado, atomizado y rotavapor se obtienen perfiles de disolución cercanos al 100%, siendo similares los correspondientes a la mezcla física y a la norflurazona pura. Esto indica que la formación del complejo en solución (mezcla física) no se realiza de manera muy eficaz, corroborando el bajo valor obtenido para su

*Comportamiento del herbicida norflurazona en el sistema suelo-agua. Obtención, caracterización y aplicación de complejos de inclusión norflurazona-ciclodextrina.*

constante de complejación y a su vez confirmando la formación del complejo en estado sólido cuando se emplearon las técnicas de procesado bajo estudio.

*Tabla 6. Valores de la eficacia de disolución (ED) tomados a los 5, 10 y 15 minutos para los sistemas de  $\beta$ -CD-norflurazona.*

	ED <sub>5</sub>	ED <sub>10</sub>	ED <sub>15</sub>
<b>Norflurazona</b>	0.009	0.010	0.011
<b>Mezcla física</b>	0.016	0.024	0.048
<b>Amasado</b>	0.078	0.079	0.080
<b>Atomizado</b>	0.080	0.080	0.082
<b>Rotavapor</b>	0.080	0.081	0.081



*Figura 22. Perfiles de velocidad de disolución correspondientes a: norflurazona (◇) y sistemas norflurazona- $\gamma$ -CD: mezcla física (□) amasado (Δ), atomizado (x) y rotavapor (+).*

*Comportamiento del herbicida norflurazona en el sistema suelo-agua. Obtención, caracterización y aplicación de complejos de inclusión norflurazona-ciclodextrina.*

A pesar de que el complejo norflurazona- $\gamma$ -CD era difícil de obtener en solución, parece ser que mediante distintas técnicas de procesado puede conseguirse en estado sólido, aunque en algunos casos solo parcialmente. Así, por ejemplo, en la técnica de *amasado* se observó por DSC la disminución, respecto a la mezcla física, de los efectos de hidratación y fusión de la  $\gamma$ -CD y de norflurazona, respectivamente, así como la aparición de un efecto exotérmico que podría corresponder a un nuevo componente del sistema, que sería el complejo de inclusión. Un comportamiento similar se obtenía también en el caso del *atomizado*, observándose además por DRX una amorfización de la muestra tras la técnica de procesado.

El caso más claro de obtención de un complejo de inclusión en el sistema norflurazona- $\gamma$ -CD se observó tras aplicar la técnica de procesado del *rotavapor*, pues se obtuvo un compuesto cristalino, tal como se puso de manifiesto por DRX, que no producía efectos térmicos en DSC en el rango de temperaturas estudiado, y que además producía nuevas bandas de absorción en el infrarojo distintas de las de los componentes de partida.

El alto porcentaje de plaguicida disuelto tras su interacción con  $\gamma$ -CD al aplicarle estas técnicas de procesado corroboran efectivamente la obtención de complejos de inclusión con la citada CD.

En la tabla 7 se observa todo lo comentado anteriormente alcanzándose una eficacia de disolución de 0.075 en los primeros 5 minutos de ensayo en el caso de los procesados por *amasado*, *atomizado* y *rotavapor*.

*Comportamiento del herbicida norflurazona en el sistema suelo-agua. Obtención, caracterización y aplicación de complejos de inclusión norflurazona-ciclodextrina.*

*Tabla 7. Valores de la eficacia de disolución (ED) tomados a los 5, 25 y 40 minutos para los sistemas de  $\gamma$ -CD-norflurazona.*

	<b>ED<sub>5</sub></b>	<b>ED<sub>25</sub></b>	<b>ED<sub>40</sub></b>	
	<b>Norflurazona</b>	0.009	0.010	0.010
<b>Métodos de procesado</b>	<b>Mezcla física</b>	0.011	0.011	0.011
	<b>Amasado</b>	0.075	0.078	0.038
	<b>Atomizado</b>	0.075	0.078	0.079
	<b>Rotavapor</b>	0.075	0.081	0.082

## **4.2. ESTUDIO DE LA INTERACCION CON SUELOS DE NORFLURAZONA Y SUS COMPLEJOS CON CICLODEXTRINAS**

Una vez que se ha puesto de manifiesto la formación de un complejo de inclusión del herbicida con las distintas CDs seleccionadas, se va a proceder al estudio de las ventajas y/o inconvenientes de la aplicación de dicho complejo al suelo. Las experiencias se han realizado con seis suelos de diferentes características. La selección de estos suelos se ha llevado a cabo en función de los distintos componentes que podrían influir en la adsorción de norflurazona, como son: materia orgánica, minerales de la arcilla, carbonatos y otros componentes como los óxidos amorfos, así como también otras características del suelo como el pH o su capacidad de cambio catiónico.

Se han llevado a cabo experiencias de adsorción-desorción del herbicida en sistemas cerrados (batch), así como experiencias de transporte y movilidad de norflurazona en columnas de suelo. Los experimentos de adsorción-desorción y de columnas de suelos se realizaron fundamentalmente con  $\beta$ -CD, que, tanto por sus características físico-químicas y mayor asequibilidad, como por los resultados obtenidos en los análisis previos de caracterización del complejo de inclusión, conduce a pensar que exista una mayor posibilidad para su uso en el futuro. Con solo dos de los suelos seleccionados se emplearon las otras dos CDs naturales, para dejar constancia del efecto que produce la formación del complejo con todas las CDs empleadas en este trabajo.

Para comprobar la bioeficacia del herbicida y cómo podrían afectar los posibles procesos que la norflurazona sufre en el suelo por la presencia de la  $\beta$ -CD, se han realizado bioensayos determinándose su bioeficacia en función de la inhibición que el herbicida provoca en el contenido de clorofila de ciertas plantas.

Por último también se han llevado a cabo experiencias de fotodegradación del herbicida en agua destilada y en suspensiones acuosas con distintos componentes del suelo (minerales de la arcilla, óxidos, materia orgánica), con objeto de estudiar el efecto que los componentes más importantes del suelo pueden ejercer en esa fotodegradación, y

si la presencia de CDs aporta una cierta protección frente a la misma, centrando este estudio en el empleo de la  $\beta$ -CD. Sólo se han empleado la  $\alpha$ - y  $\gamma$ -CD para los ensayos realizados en agua destilada.

#### **4.2.1. Caracterización de los suelos**

En la tabla 8 se presentan las características físico-químicas generales de los suelos estudiados. Estos presentan características muy diversas tanto por su material geológico original como por sus propiedades físico-químicas. Uno de los factores más importantes que se ha tenido en cuenta a la hora de realizar la elección de los suelos ha sido la diversidad de su fracción coloidal, ya que ésta es la que tiene mayor reactividad en la adsorción de plaguicidas y de distintos compuestos orgánicos.

El pH de los suelos varía de 4.8 hasta 8.0, siendo los suelos con un mayor carácter básico CR y TM, coincidiendo con la presencia de carbonatos en los mismos (6.9% y 24.1 %, respectivamente). Debido a la importancia de la cantidad de materia orgánica presente en los suelos a la hora de predecir la posible adsorción de compuestos hidrofóbicos, como es el caso del herbicida bajo estudio, se han seleccionado suelos con diferentes contenidos de materia orgánica en un margen de 0.79% y 0.51% para los suelos CR y SR hasta 5.34% para ST, con el fin de poner en evidencia la influencia de este factor que a priori se supone.

Otro de los factores que también se suponen determinantes para la adsorción de plaguicidas en suelos es el contenido en fracción arcilla de los mismos, por lo que se han empleado suelos con contenidos que van desde 65.9% hasta 2.5% para TM y SR, respectivamente.

La capacidad de cambio catiónico (CCC) también se recoge en la tabla 8, apreciándose los valores más elevados para los suelos TM y ST. Esta capacidad viene determinada en el suelo ST por el alto contenido en materia orgánica del mismo en comparación con los restantes, tal como puede apreciarse atendiendo a su composición.

*Comportamiento del herbicida norflurazona en el sistema suelo-agua. Obtención, caracterización y aplicación de complejos de inclusión norflurazona-ciclodextrina.*

Para el caso del suelo TM el valor elevado para su CCC se debe a otro factor relevante relacionado con la adsorción, como es el porcentaje de fracción arcilla, siendo éste el más alto de todos los suelos seleccionados.

*Tabla 8. Características de los suelos estudiados.*

	<b>CR</b>	<b>TM</b>	<b>ST</b>	<b>SR</b>	<b>P-27</b>	<b>AL</b>
<b>pH</b>	8.0	8.0	4.8	6.5	5.7	7.6
<b>CaCO<sub>3</sub> (%)</b>	6.9	24.1	0.0	0.0	0.0	0.0
<b>CCC (Cmol Kg<sup>-1</sup>)</b>	4.8	39.0	20.1	3.5	5.8	17.2
<b>M.O. (%)</b>	0.79	1.76	5.34	0.51	1.38	1.9
<b>Arena (%)</b>	87.6	2.7	61.1	92.8	56.7	16.4
<b>Limo (%)</b>	4.0	31.5	29.0	4.4	23.8	61.2
<b>Arcilla (%)</b>	8.4	65.9	9.8	2.5	19.5	22.6

Los resultados del análisis químico total de estos suelos se muestran en la tabla 9. Lo más notable de todo es el alto contenido en óxidos de hierro y manganeso del suelo AL, con unos valores del 24.17% y 3.58%, respectivamente. Estos datos son extremadamente altos con relación a los encontrados normalmente en suelos de distinto origen y procedencia. El contenido en óxido de titanio también es el mayor de los suelos estudiados (0.83%). Esto está en concordancia con las correlaciones muy significativas encontradas entre este elemento y los sexquióxidos (Jiménez, 1990). Por otro lado, tanto para el suelo AL como ST se observa una elevada cantidad en óxidos de aluminio. En cuanto a los elementos minoritarios, son destacables los elevados valores de Zn y sobre todo de Pb detectados para el suelo AL, para los que no se encontró explicación. Los valores altos de Cr de los suelos ST y AL están correlacionados con la presencia de geles y agregados de hierro (Maqueda y col., 1974). Lo mismo ocurre para los elementos Ni y

*Comportamiento del herbicida norflurazona en el sistema suelo-agua. Obtención, caracterización y aplicación de complejos de inclusión norflurazona-ciclodextrina.*

Co en los suelos TM, ST y AL, cuyos valores más altos están altamente correlacionados con altos porcentajes de Fe, Al o de contenido en fracción arcilla (Jimenez, 1990).

*Tabla 9. Elementos mayoritarios y minoritarios de los suelos.*

	<b>CR</b>	<b>TM</b>	<b>ST</b>	<b>P-27</b>	<b>SR</b>	<b>AL</b>
<b>Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>(%)</b>	5.32	11.64	15.26	7.52	2.37	16.10
<b>Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>(%)</b>	1.14	4.39	6.69	1.83	0.83	24.17
<b>TiO<sub>2</sub>(%)</b>	0.16	0.57	0.72	0.29	0.43	0.83
<b>MgO(%)</b>	0.41	1.37	0.63	0.27	0.05	3.61
<b>CaO(%)</b>	2.98	12.85	0.26	0.89	0.10	0.70
<b>Na<sub>2</sub>O(%)</b>	0.58	0.38	1.84	1.93	0.39	0.2
<b>K<sub>2</sub>O(%)</b>	1.74	1.53	3.32	1.18	1.60	1.15
<b>MnO(%)</b>	0.02	0.07	0.03	0.03	0.01	3.58
<b>SiO<sub>2</sub>(%)</b>	82.70	67.27	61.50	82.21	93.06	58.83
<b>Ni(mg/Kg)</b>	6.92	43.00	44.13	1.22	11.41	76.25
<b>Zn(mg/Kg)</b>	20.19	61.43	49.22	26.82	23.21	758.20
<b>Cu(mg/Kg)</b>	12.99	24.06	36.19	17.19	4.12	76.64
<b>Co(mg/Kg)</b>	6.60	33.20	27.30	7.71	1.83	52.16
<b>Pb(mg/Kg)</b>	35.19	n.d.	46.14	33.53	13.89	1756.8
<b>Cr(mg/Kg)</b>	18.28	n.d.	54.32	8.72	n.d	74.33

**n.d.: no determinado.**



#### **4.2.2. Cinéticas de adsorción**

Antes de proceder al estudio de la adsorción de norflurazona en los suelos SR, CR, ST, P-27, TM y AL, se realizaron los estudios cinéticos para conocer el tiempo mínimo de contacto entre el adsorbato y los suelos para alcanzar el equilibrio. Las curvas de cinética de adsorción se obtuvieron representando la cantidad total adsorbida por el suelo frente al tiempo de agitación. De los resultados obtenidos se dedujo que la concentración de equilibrio se había alcanzado en todos los casos con 24 horas de tratamiento (figuras no mostradas).

#### **4.2.3. Isotermas de adsorción de norflurazona en suelos**

En la figura 23 se presentan las isotermas de adsorción del herbicida norflurazona sobre los distintos suelos empleados. En orden creciente, la adsorción para los distintos suelos quedó como sigue:  $SR \leq CR < ST < P-27 < TM < AL$ .

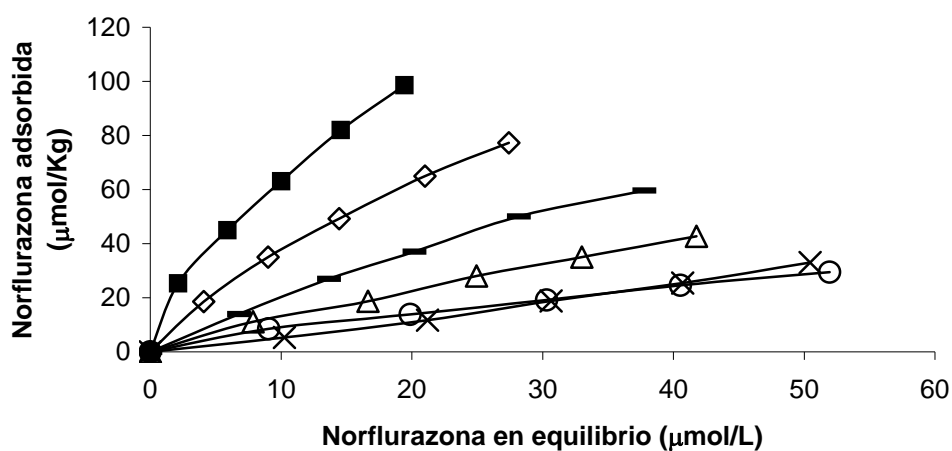


Figura 23. Isotermas de adsorción de norflurazona correspondientes a los suelos: AL ( ), TM (◇), P-27 (-), ST (Δ), CR (O) y SR (X).

**Comportamiento del herbicida norflurazona en el sistema suelo-agua. Obtención, caracterización y aplicación de complejos de inclusión norflurazona-ciclodextrina.**

Se observó que en todos los casos la isoterma de adsorción se ajustó a la ecuación de Freundlich, ya definida en el apartado de materiales y métodos de esta memoria, como confirman los coeficientes de correlación obtenidos después de aplicarla (tabla 10).

*Tabla 10. Coeficientes de correlación ( $r^2$ ) y parámetros de la ecuación de Freundlich ( $K_f$  y  $n$ ), coeficientes de distribución ( $K_d$ ) y coeficientes de distribución referidos a carbono orgánico ( $K_{oc}$ ) correspondientes a la adsorción de norflurazona sobre los distintos suelos usados.*

	$K_f$	$n$	$r^2$	$K_d$	$K_{oc}$
<b>SR</b>	0.35±0.02	1.15±0.02	0.999	0.51	174
<b>P-27</b>	2.80±0.26	0.85±0.03	0.999	1.98	247
<b>AL</b>	15.54±0.54	0.61±0.02	0.998	6.43	691
<b>ST</b>	2.00±0.21	0.81±0.03	0.995	1.29	42
<b>CR</b>	1.70±0.16	0.72±0.02	0.995	0.89	167
<b>TM</b>	7.34±0.25	0.75±0.01	0.998	3.70	363

Aplicando dicha ecuación se calcularon los valores de  $K_f$  (constante relacionada con la capacidad de adsorción) para las correspondientes isotermas de adsorción, los cuales aparecen recogidos, junto a “n” (constante relacionada con la intensidad de enlace).

Si  $K_f$  es una medida de la capacidad de adsorción del herbicida por un suelo determinado, observando los valores obtenidos se puede decir que éstos corroboran la secuencia de capacidad de adsorción anteriormente mencionada. Si se tiene en cuenta que para la adsorción de herbicidas no iónicos uno de los factores más importantes a la hora de predecir su adsorción es la cantidad de materia orgánica que posee el suelo, según los porcentajes de materia orgánica para los distintos suelos se observan discrepancias con respecto a la adsorción para los mismos. Este hecho lleva a pensar que no solo la materia orgánica será la responsable única de la adsorción de norflurazona

sobre los suelos. Así por ejemplo, en el caso del suelo ST, el cual posee la mayor cantidad de materia orgánica, la adsorción no es la mayor y sin embargo para los suelos TM y AL que poseen un porcentaje de materia orgánica tres veces menor que el suelo ST, la adsorción es bastante más alta. González-Pradas y col. (1998) observaron un valor de  $K_f$  de 2.17 para un suelo con un contenido en carbono orgánico de 0.18%, y de 34.28 para ese mismo suelo después de ser enriquecido con materia orgánica (turba), corroborándose en este caso un incremento en la adsorción del herbicida diuron sobre el suelo bajo estudio a medida que se incrementaba la cantidad de materia orgánica presente en ese suelo.

El papel que juegan los enlaces hidrofóbicos con la materia orgánica en la adsorción de herbicidas no polares en suelos puede ser comparado utilizando el coeficiente de distribución de un herbicida en un suelo determinado ( $K_d$ ), pero referido al porcentaje de carbono orgánico del suelo. A dicho coeficiente normalizado se le denomina  $K_{oc}$ .

Los valores de  $K_d$  y  $K_{oc}$  vienen recogidos en la tabla 10. Para la adsorción de norflurazona sobre los distintos suelos bajo estudio el rango de valores de  $K_d$  que se obtuvo fue entre 0.51 (SR) y 6.43 (AL). El rango obtenido para los valores de  $K_d$  sugiere de una débil a una moderada capacidad de unión de estos suelos con norflurazona.

Los valores de  $K_d$  obtenidos en este estudio fueron similares a aquellos publicados por otros autores. Reddy y col. (1992) encontraron valores para  $K_d$  entre 0.63 y 2.2. Resultados similares fueron obtenidos por Hubbs y Lavy (1990), con valores para  $K_d$  desde 0.54 hasta 2.75. Alva y Singh (1990) observaron una  $K_d$  con un valor de 16 en el caso de la adsorción de norflurazona sobre un suelo con un contenido en materia orgánica de 3.4%, sin embargo  $K_d$  presentó valores entre 0.4 y 2.3 para suelos con un contenido en materia orgánica del 1.4%. Suba y Essington (1999) obtuvieron valores de  $K_d$  entre 2.04 y 12.15.

Mientras más hidrofóbica sea una molécula más alta será la probabilidad para que se reparta desde la fase acuosa a la fase orgánica del medio.  $K_{oc}$  puede ser utilizado como una medida de esta propiedad de los suelos y es independiente de otras. Cuando las uniones hidrofóbicas son las responsables de la adsorción del herbicida,  $K_{oc}$  debe tomar valores más o menos constantes para los distintos suelos bajo estudio, es decir, se trata de un factor que sirve como herramienta para determinar si el factor que más influye en la adsorción de un plaguicida es la materia orgánica del suelo.

Aunque el valor medio de  $K_{oc}$  dado para norflurazona fue de 248 (Alva and Singh, 1991), los valores obtenidos en este estudio para los distintos suelos van desde 42 hasta 691. Valores similares a algunos de los obtenidos fueron observados por Reddy y col. (1992) ( $K_{oc}$  desde 144 a 373), Hubbs y Lavy (1990) con un valor de  $K_{oc}$  medio de 78, Alva y Singh (1990), con un valor medio de 122. Suba y Essington (1999) publicaron valores más altos de  $K_{oc}$  (desde 456 a 551) los cuales no variaron mucho con la cantidad de carbono orgánico en el suelo, mostrando la influencia de este parámetro sobre la adsorción de la norflurazona. En nuestro caso, el rango de valores obtenidos para  $K_{oc}$  fue muy amplio, corroborando que el mecanismo de adsorción está relacionado con otras propiedades del suelo además del contenido en carbono orgánico. No obstante, hay que tener en cuenta que dentro de la materia orgánica que pudiera poseer un determinado suelo existen distintos componentes que podrían actuar de distinta forma a la hora de producirse la interacción entre el absorbente y el adsorbato, debido a la dispar composición que dicha materia orgánica pudiese poseer.

En los suelos SR, P-27 y CR, con valores de  $K_{oc}$  174, 247 y 167, respectivamente, podría considerarse que el factor principal que influye en la adsorción del plaguicida es la materia orgánica. Sin embargo, hay dos suelos, AL y TM, con valores de  $K_{oc}$  elevados (691 y 363, respectivamente) y el suelo ST con un valor de  $K_{oc}$  muy bajo (42). En relación con la distribución de tamaño de partículas, los dos suelos que presentan altos  $K_{oc}$  presentan también los mayores porcentajes de fracciones finas (limo+arcilla): 83.8% y 97.4%, para los suelos AL y TM, respectivamente. Además el

*Comportamiento del herbicida norflurazona en el sistema suelo-agua. Obtención, caracterización y aplicación de complejos de inclusión norflurazona-ciclodextrina.*

suelo AL presenta altos porcentajes de Fe, Al y Mn totales (tabla 9), lo que podría indicar que también los porcentajes de óxidos amorfos podrían ser altos. En la tabla 11 se muestran dichos porcentajes correspondientes a los 6 suelos bajo estudio.

*Tabla 11. Óxidos amorfos de Fe, Mn y Al correspondientes a los suelos seleccionados ( $g\ Kg^{-1}$ ).*

<b>Suelos</b>	<b>Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub></b>	<b>MnO</b>	<b>Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub></b>
<b>SR</b>	0.28	0.02	0.33
<b>P-27</b>	1.43	0.05	0.32
<b>AL</b>	10.8	9.81	9.43
<b>ST</b>	23.31	0.02	12.32
<b>CR</b>	0.36	0.04	0.25
<b>TM</b>	0.81	0.19	3.47

A pesar de que el contenido en óxidos cristalinos en un suelo es mayor que el de óxidos amorfos, el área de estos últimos es mayor, pudiendo jugar este componente un papel muy importante en los procesos de adsorción. El suelo AL presenta un contenido extremadamente alto de óxidos amorfos de Fe, Al y Mn, con una elevada área superficial que podría ser una buena superficie adsorbente para norflurazona. El suelo TM presenta también un contenido moderadamente alto en óxidos de Al amorfos. Además, el suelo TM presenta un alto contenido en minerales de la arcilla, incluyendo illita, kaolinita, y una mayor proporción de smectita (Morillo y col., 2002) y, de acuerdo con Reddy y col. (1992) y Hubbs y Lavy (1990), el contenido en minerales de la arcilla estaba correlacionado con la adsorción de norflurazona en suelos. El caso del suelo ST es diferente, pues, a pesar de presentar un contenido muy alto de óxidos amorfos de Fe y Al y un alto contenido en materia orgánica (5.34 %), la adsorción de norflurazona en él no fue muy alta y por ello el valor de  $K_{oc}$  obtenido fue tan bajo (42). Para dilucidar el

*Comportamiento del herbicida norflurazona en el sistema suelo-agua. Obtención, caracterización y aplicación de complejos de inclusión norflurazona-ciclodextrina.*

comportamiento de este suelo se realizaron nuevos experimentos de adsorción del herbicida sobre el suelo ST al que previamente se le habían eliminado los óxidos amorfos. Algunos autores han observado que los procesos de interasociación entre diferentes componentes del suelo pueden bloquear grupos funcionales adsorbentes sobre las superficies tanto orgánicas como minerales del mismo (Celis y col., 1999). Los óxidos amorfos de Fe y Al tan abundantes en el suelo ST pueden estar recubriendo las superficies orgánicas de este suelo, decreciendo la adsorción por bloqueo de los sitios de adsorción específicos para norflurazona. Después de eliminar los óxidos amorfos siguiendo el método de McKeague y col. (1971), los experimentos de adsorción fueron llevados a cabo del mismo modo que se explicó en el apartado de materiales y métodos. Para la máxima concentración inicial de norflurazona usada ( $20 \text{ mg L}^{-1}$ ) la cantidad adsorbida por el suelo ST fue de  $42.72 \text{ } \mu\text{mol Kg}^{-1}$  (figura 23), pero después de eliminar los óxidos amorfos, la adsorción obtenida fue de  $72.10 \text{ } \mu\text{mol Kg}^{-1}$ . Ello indica que los óxidos amorfos estaban impidiendo en parte la adsorción del herbicida en éste suelo.

Para terminar de dilucidar qué parámetros son más relevantes a la hora de la adsorción del herbicida, se realizaron estudios de aproximación estadística. En la tabla 12 se muestran las ecuaciones de regresión lineal en función de las variables más significativas.

*Tabla 12. Ecuaciones de regresión para los coeficientes de distribución de norflurazona ( $K_d$ ) en función de las variables significativas.*

$r^2$	Ecuaciones de la regresión lineal
0.85	$K_d = -0.91 + 2.14 \text{ MO } (\%)$
0.91	$K_d = 0.17 + 2.23 \text{ MO } (\%) - 3.78 \text{ Fe}_2\text{O}_3 (\%)$
0.96	$K_d = -0.90 + 2.22 \text{ MO } (\%) - 10.98 \text{ Fe}_2\text{O}_3 (\%) + 12.60 \text{ Al}_2\text{O}_3 (\%)$

Este estudio estadístico se realizó usando las isotermas de adsorción de un total de 17 suelos con propiedades diversas, estando incluidas las isotermas de los 6 suelos

estudiados en la presente memoria. Las variables significativas estadísticamente fueron el contenido en materia orgánica (MO) y el contenido en óxidos de hierro ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) y de aluminio ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ). Entre estas propiedades del suelo la más significativa fué la cantidad de materia orgánica, que responde de un 85% de la varianza. Pero si se incluyen los óxidos de hierro y de aluminio, la ecuación de regresión múltiple da un 11%, alcanzándose hasta el 96% de la varianza.

Hay que tener en cuenta que el suelo ST tiene  $35.65 \text{ g Kg}^{-1}$  de óxidos amorfos totales, es decir, un 3.56 %, frente a un 5.34 % de materia orgánica. Aunque ambos componentes se ha demostrado anteriormente que favorecían la adsorción de norflurazona en suelos, la contribución de la materia orgánica respondía de un 85 % de la adsorción, mientras que los óxidos amorfos de Fe y Al respondían sólo de un 11 %. Si estos últimos están recubriendo la materia orgánica, es lógico que la adsorción disminuya.

Todo esto podría llegar a explicar el hecho de que para los suelos TM y AL se observe una mayor adsorción que para el ST, aunque éste posea el mayor contenido en materia orgánica.

#### **4.2.4. Isotermas de desorción**

##### **4.2.4.1. Desorción con nitrato cálcico 0.01 M**

En la figura 24 se presentan las isotermas de desorción de norflurazona de los 6 suelos estudiados obtenidas empleando soluciones de nitrato cálcico 0.01 M. Las isotermas de desorción obtenidas fué posible describirlas mediante la ecuación de Freundlich, y los coeficientes de histéresis (H) fueron calculados usando “n”, constante de Freundlich. La desorción de norflurazona de los suelos presentó histéresis en todos los casos, es decir, los resultados de desorción se desviaban marcadamente de aquellos correspondientes a las isotermas de adsorción, indicando que la adsorción de norflurazona en suelos no era totalmente reversible. En la tabla 13 se muestran los coeficientes de histéresis (H) y los porcentajes totales de norflurazona desorbida (%D) a

*Comportamiento del herbicida norflurazona en el sistema suelo-agua. Obtención, caracterización y aplicación de complejos de inclusión norflurazona-ciclodextrina.*

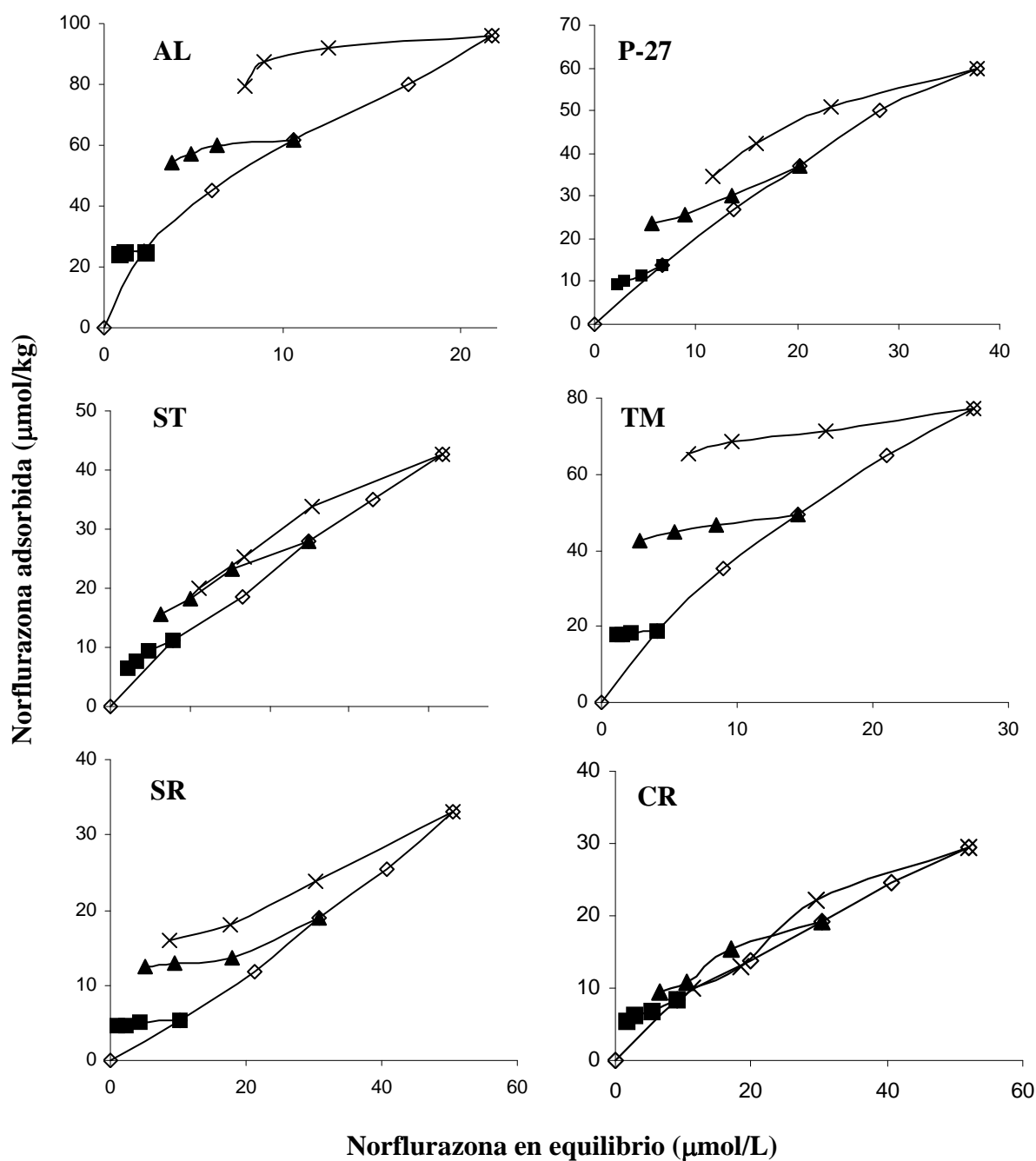


Figura 24. Isotermas de adsorción-desorción de norflurazona empleando solución de nitrato cálcico 0.01M correspondientes a los suelos: AL, P-27, ST, TM, SR y CR: (◇) adsorción; (x) desorción 20 ppm; (▲) desorción 12 ppm; (■) desorción 4 ppm.



**Comportamiento del herbicida norflurazona en el sistema suelo-agua. Obtención, caracterización y aplicación de complejos de inclusión norflurazona-ciclodextrina.**

las concentraciones iniciales de 4, 12 y 20 ppm, cuando se emplea solución de nitrato cálcico para desorber el herbicida.

*Tabla 13. Porcentaje total desorbido de norflurazona (%D) y coeficiente de histéresis calculado (H) para la desorción de norflurazona con soluciones de nitrato cálcico 0.01 M en los distintos suelos empleados.*

<b>Suelos</b>	<b>%D</b>			<b>H</b>		
	<b>4</b>	<b>12</b>	<b>20</b>	<b>4</b>	<b>12</b>	<b>20</b>
<b>SR</b>	31.5±4.42	97.6± 5.58	83.6±5.55	3.2±0.8	2.1±0.5	1.8±0.47
<b>P-27</b>	34.1±2.00	36.6±1.97	58.1±1.62	2.5±0.72	2.4± 0.57	1.9±0.93
<b>AL</b>	2.0±0.94	11.7±0.26	13.7±0.20	18.9±1.52	3.3±0.77	2.2±0.64
<b>ST</b>	41.8±0.47	44.4±0.38	53.0±1.02	1.9±0.43	1.8±0.32	1.4±0.21
<b>CR</b>	31.9±5.66	54.3±3.54	72.3±7.96	2.5±0.22	1.5±0.17	0.9±0.13
<b>TM</b>	8.2±1.70	13.8±0.33	15.3±1.43	19.5±1.04	8.2±1.16	6.9±0.98

En todos los casos se observó histéresis, siendo especialmente marcada en el suelo TM, el cual presenta los valores más altos de H, y casi no se aprecia en el suelo CR, con valores de H muy cercanos a la unidad, tanto más cuanto mayor es la concentración inicial.

En general se puede observar que los valores de %D no están relacionados directamente con la afinidad de la molécula de herbicida por el suelo ( $K_d$ ), como ocurre en el suelo P-27 donde se da una alta adsorción pero también un elevado %D (58.1%) en relación con el resto de los suelos estudiados. Esto sería debido a que la desorción solo estaría en función de la fuerza de enlace mediante la cual el herbicida permanece adsorbido al suelo y la adsorción se da en función de los diversos factores anteriormente comentados (contenido de la fracción fina, materia orgánica, óxidos, minerales de la arcilla, etc.....).

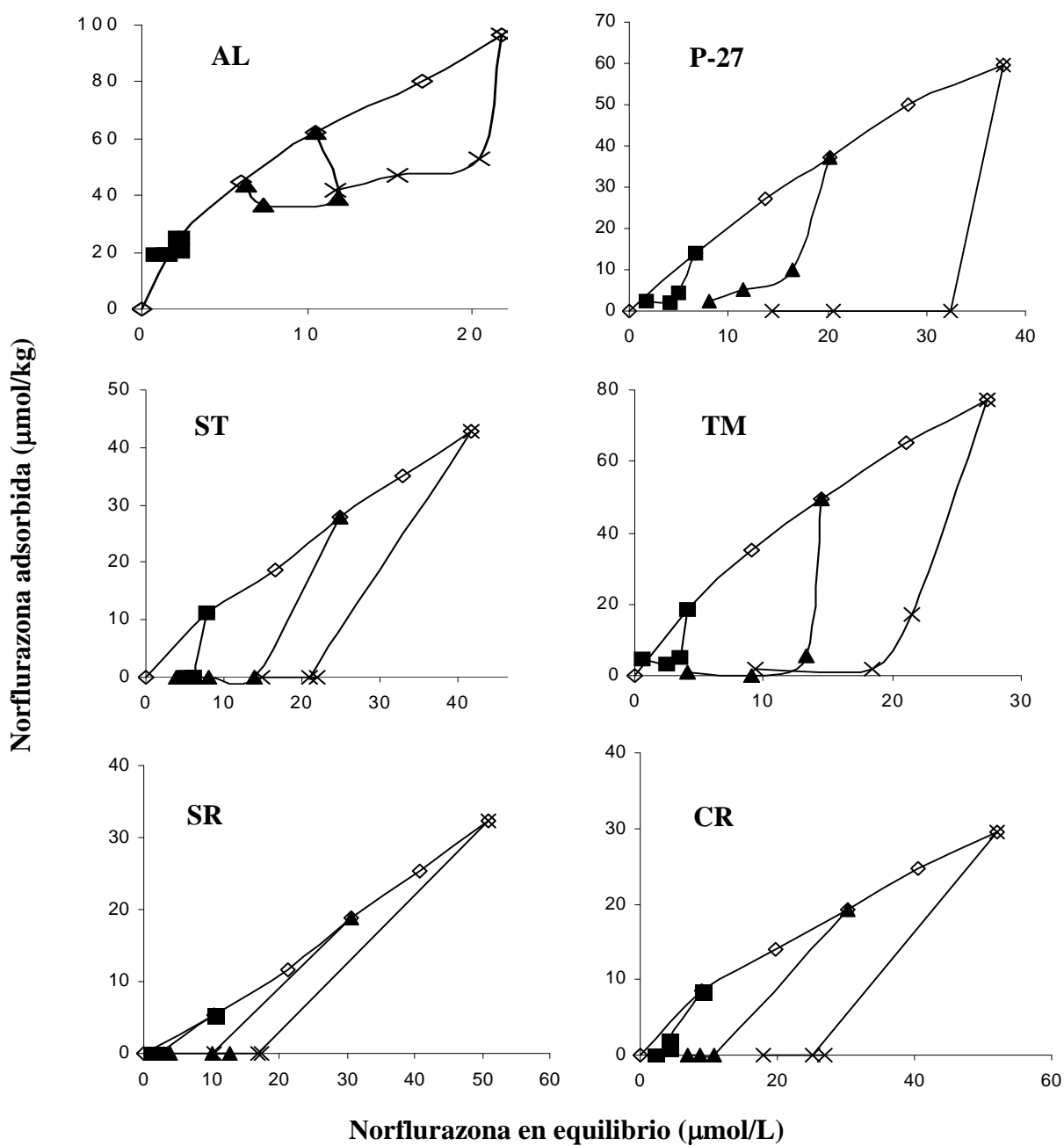
La adsorción de norflurazona es más irreversible (menores %D) a menores concentraciones iniciales empleadas, lo que se traduce en un más bajo recubrimiento superficial con el herbicida, debido a que hay más puntos de adsorción en el adsorbato disponibles. Esto queda reflejado en la tabla 13 donde los %D se incrementan a medida que se emplean mayores concentraciones iniciales. Sea cual sea la concentración inicial de norflurazona usada, los valores más bajos de %D corresponden al suelo AL, seguidos por el suelo TM. O sea, los dos suelos que presentaban una mayor adsorción son también los que presentan los menores porcentajes de desorción. Teniendo en cuenta que dichos suelos no eran los que presentaban mayores cantidades de materia orgánica, como ya se ha comentado anteriormente, ello indica que tampoco en la desorción es la materia orgánica el principal factor que la controla.

Es de destacar de nuevo el comportamiento del suelo ST ahora respecto de la desorción de norflurazona. Como ya se dijo anteriormente, a pesar de su alto contenido en materia orgánica (5.34 %), la adsorción de norflurazona era muy baja, pero además, la cantidad de herbicida desorbido es muy alta. Una posible razón para este comportamiento podría ser el hecho de que la adsorción en superficies altamente adsorptivas como las de la materia orgánica estaba impedida debido al recubrimiento de las mismas por óxidos amorfos, tal como se comentó anteriormente, de los cuales la desorción del herbicida parece ser mucho más fácil, aunque en el caso del suelo AL la desorción es la menor a pesar de su alto contenido en óxidos de hierro y manganeso.

#### **4.2.4.2. Desorción con $\beta$ -CD 0.01 M**

En la figura 25 se muestran las isotermas de adsorción-desorción de norflurazona empleando solución de  $\beta$ -CD. En la tabla 14 se muestran los valores de %D obtenidos, pero no se muestran ni los valores de H ni los parámetros que se obtienen mediante la ecuación de Freundlich ya que estas isotermas de desorción no se ajustaron a dicha ecuación. Se observa que en todos los casos existe también histéresis, pues los resultados de desorción se desvían marcadamente de la isoterma de adsorción, pero se trata de una

*Comportamiento del herbicida norflurazona en el sistema suelo-agua. Obtención, caracterización y aplicación de complejos de inclusión norflurazona-ciclodextrina.*



*Figura 25. Isothermas de desorción de norflurazona empleando solución de  $\beta$ -CD 0.01M correspondientes a los suelos: AL, P-27, ST, TM, SR, y CR: ( $\diamond$ ) adsorción (x); desorción 20 ppm; ( $\blacktriangle$ ), desorción 12 ppm; ( $\blacksquare$ ), desorción 4 ppm.*

*Comportamiento del herbicida norflurazona en el sistema suelo-agua. Obtención, caracterización y aplicación de complejos de inclusión norflurazona-ciclodextrina.*

histéresis negativa, es decir, se desorbe más cantidad de norflurazona de la que sería de esperar según la isoterma de adsorción.

Es destacable que incluso en el suelo TM, donde las adsorciones fueron muy altas y los %D con  $(\text{NO}_3)_2\text{Ca}$  bajos, se consiguiera también una histéresis negativa, comprobándose de nuevo el importante poder desorbente de la  $\beta$ -CD.

*Tabla 14. Valores del porcentaje desorbido (%D) para la desorción de norflurazona de los distintos suelos empleando soluciones de  $\beta$ -CD 0.01M.*

Concentración inicial de Norflurazona ( $\text{mg L}^{-1}$ )	SR	P-27	AL	ST	CR	TM
4	100±3.2	83.87±3.8	25.52±2.4	100±3.8	89.00±18.5	92.85±19.0
12	100±4.3	94.98±7.5	49.15±0.8	100±3.3	100±3.6	98.17±2.6
20	100±2.7	100±1.7	61.63±0.4	100±2.7	100±2.1	99.47±3.3

Para el caso de los suelos CR y SR se observó un fuerte efecto de desorción (100% en ambos casos), algo que en principio era de esperar, ya que sus ensayos de adsorción demostraron una muy baja capacidad de adsorción del herbicida.

Por otro lado el suelo ST, que resultó presentar una ligera mayor adsorción que los suelos CR y SR también sufre un radical efecto desortivo de la norflurazona cuando se aplica la solución de  $\beta$ -CD.

En conclusión, el hecho de que la desorción de norflurazona de los distintos suelos sea mayor al desorber con  $\beta$ -CD se debe a que este herbicida tiende a formar un complejo de inclusión con dicha CD en solución, por lo que ésta puede estar actuando como un extractante hacia la norflurazona adsorbida. Pérez-Martínez y col., (2000) demostraron como la formación de un complejo de inclusión con HP- $\beta$ -CD (hidroxipropil- $\beta$ -CD) provocaba un incremento en la desorción del herbicida 2,4-D con

*Comportamiento del herbicida norflurazona en el sistema suelo-agua. Obtención, caracterización y aplicación de complejos de inclusión norflurazona-ciclodextrina.*

respecto al empleo de agua desionizada para la desorción. Igualmente, Pérez-Martínez y col., (1999) obtuvieron un efecto similar cuando emplearon la  $\beta$ -CD con 2,4-D, achacándose el mismo a la formación de un complejo de inclusión con la CD, con estequiometría 1:1 obtenida a partir del ensayo de solubilidad.

Con respecto a la influencia de la concentración inicial de norflurazona en la desorción, en general, tanto con nitrato cálcico como con  $\beta$ -CD, la desorción es mucho más difícil cuanto menor es la concentración inicial de norflurazona empleada, o sea, cuanto menor es la cantidad de norflurazona adsorbida, lo que puede observarse bien sobre todo en el suelo AL, que es el único donde no se consigue desorber el total de herbicida retenido. Ello demuestra de nuevo que existen componentes en este suelo donde la adsorción de norflurazona se da con gran afinidad, y con los que la interacción es más fuerte que la interacción con  $\beta$ -CD, por lo que no tiende a desorberse.

Por último, se realizaron también experimentos empleando las otras dos CDs naturales (figura 26) a las que se les realizó, en la primera parte de este trabajo, un estudio de caracterización y análisis de la formación de complejos de inclusión en el cual se obtuvieron resultados satisfactorios respecto a la formación de dicho complejo en solución.

Para este ensayo se empleó el suelo CR, obteniéndose unos resultados similares a los obtenidos para la  $\beta$ -CD, es decir, incrementándose claramente el %D, además de la aparición, de nuevo, de una H negativa a las tres concentraciones de herbicida aplicadas (4, 12 y 20 ppm). Este dato apoya la tesis de que la formación del complejo de inclusión en solución entre las distintas CDs naturales y la norflurazona favorece la desorción de la misma del suelo.

De los resultados obtenidos de los ensayos de solubilidad estudiados en el apartado 4.1 se obtuvieron distintos valores para la constante de complejación de las distintas ciclodextrinas con el herbicida, obteniéndose el valor más bajo para aquel formado en presencia de  $\alpha$ -CD ( $38.42 \text{ M}^{-1}$ ) y el más alto para el formado con  $\beta$ -CD

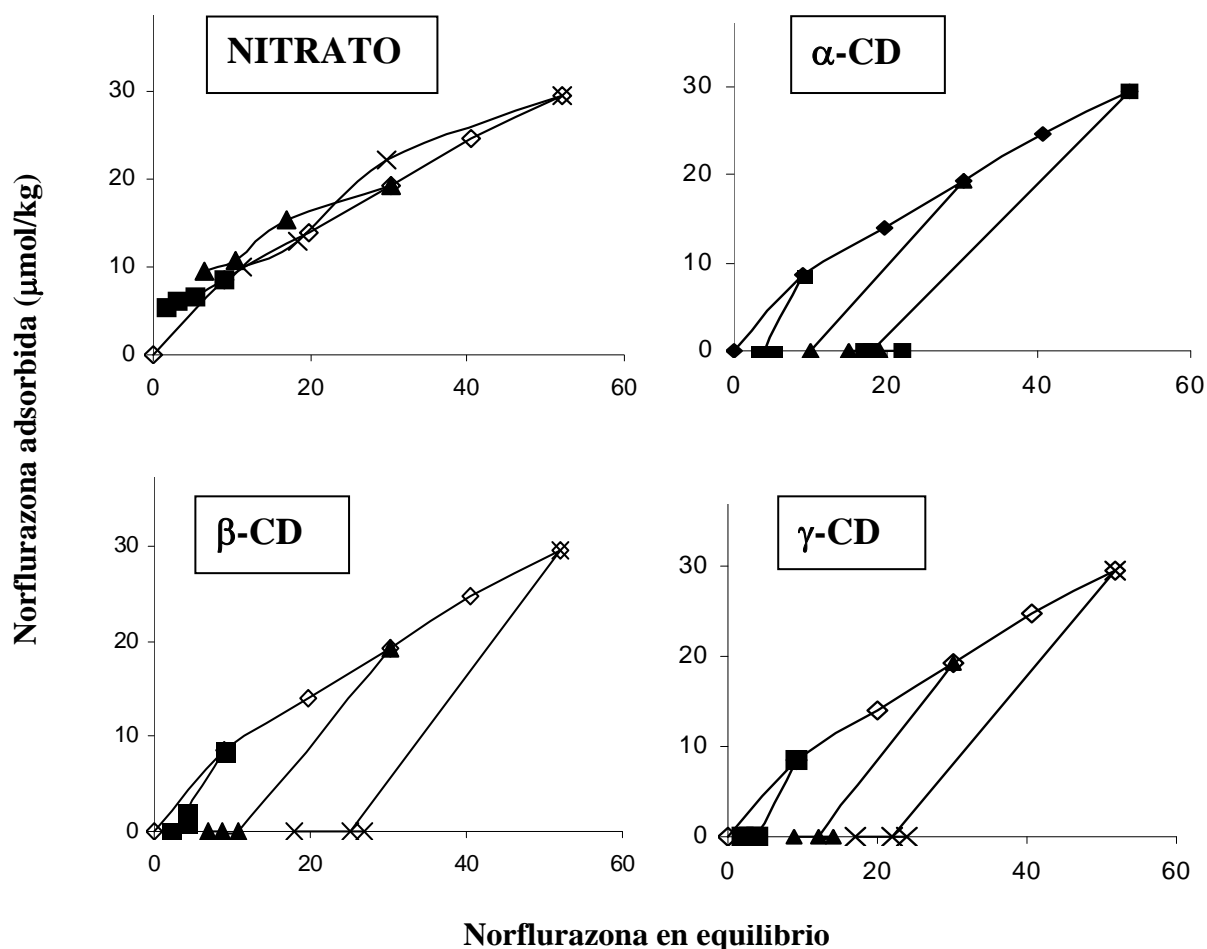


Figura 26. Isothermas de adsorción-desorción para el suelo CR, obtenidas mediante el empleo de soluciones de nitrato cálcico,  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ -CD 0.01 M: adsorción ( $\diamond$ ); desorción 20 ppm (x), desorción 12 ppm ( $\blacktriangle$ ), desorción 4 ppm ( $\blacksquare$ ).

( $360 \text{ M}^{-1}$ ), sin embargo se obtuvo el mismo efecto desorbente cuando las soluciones acuosas de las mismas se aplicaron sobre el suelo CR, lo que indica que con una ligera interacción entre la norflurazona y la CD se obtiene el efecto desorbente sobre el suelo, a pesar de las bajas constantes de complejación de algunas de ellas debido a factores estéricos que se pudiesen dar respecto al tamaño de la cavidad interna de cada ciclodextrina para formarse el complejo.

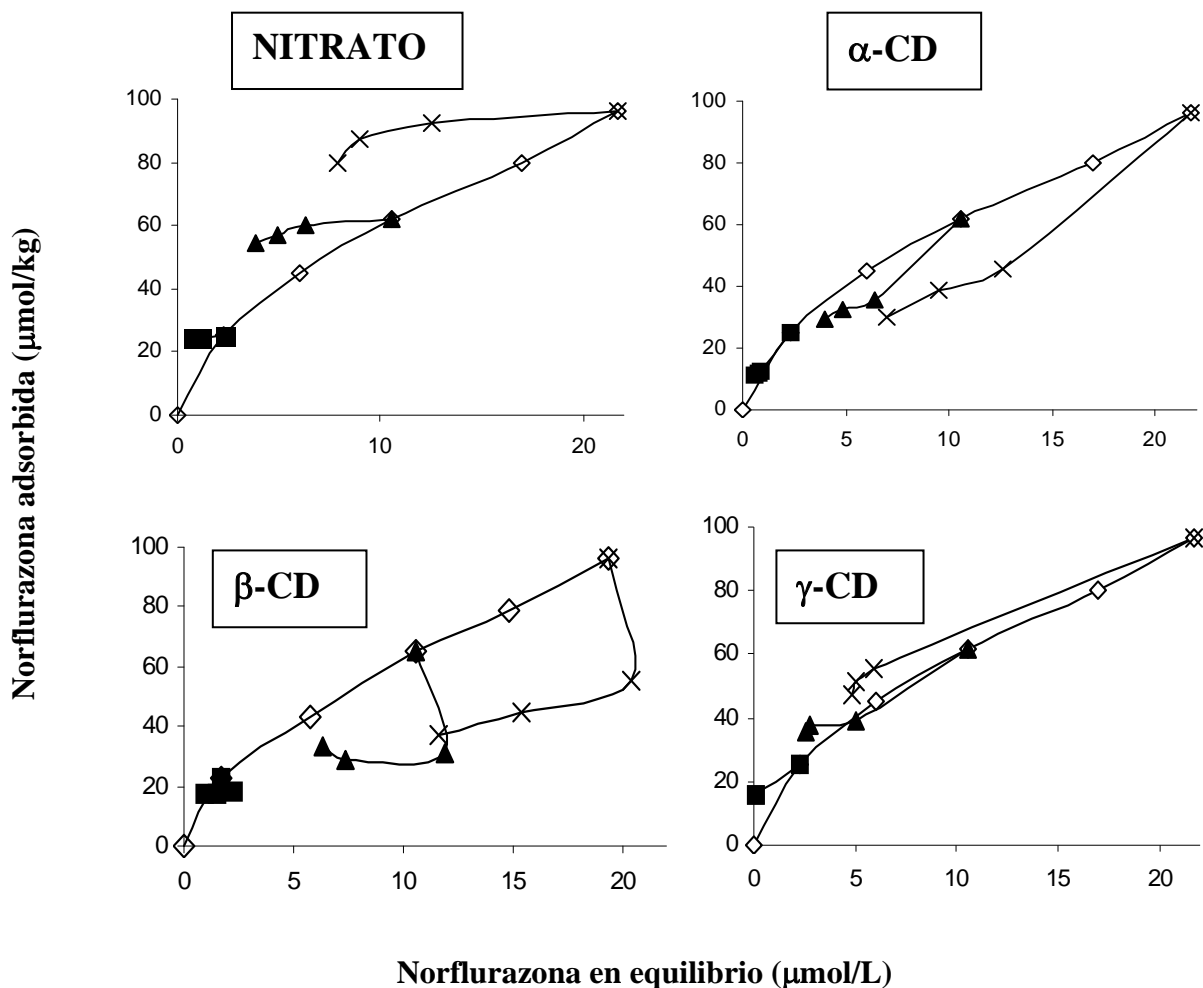


Figura 27. Isothermas de adsorción-desorción para el suelo AL, obtenidas mediante el empleo de soluciones de nitrato cálcico,  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ -CD 0.01 M; adsorción ( $\diamond$ ); desorción 20 ppm (x); desorción 12 ppm ( $\blacktriangle$ ); desorción 4 ppm ( $\blacksquare$ ).

Con objeto de poder comprobar más efectivamente el efecto de las diferentes CDs naturales en la desorción de norflurazona de suelos, se ha realizado una experiencia similar a la anterior pero utilizando el suelo AL, que fue el único de los suelos estudiados en el que la  $\beta$ -CD no pudo desorber completamente el herbicida.

En la figura 27 se observan las isothermas de adsorción-desorción para el suelo AL empleando las CDs naturales bajo estudio. En este caso, a diferencia de lo que ocurrió con el suelo CR, se obtienen distintos efectos dependiendo de la CD empleada.

*Comportamiento del herbicida norflurazona en el sistema suelo-agua. Obtención, caracterización y aplicación de complejos de inclusión norflurazona-ciclodextrina.*

Los mayores porcentajes de desorción (tabla 15) se obtuvieron cuando se empleó la  $\beta$ -CD respecto al empleo de las otras dos CDs naturales, observándose igualmente una histéresis negativa cuando se empleó  $\alpha$ -CD. Para este suelo se observa como no se producen desorciones cercanas al 100%, como ocurrió con los demás suelos. Dicho hecho concordaría con los resultados de adsorción donde la elevada cantidad de óxidos de Fe y Al fue la responsable de esa fuerte adsorción para el herbicida, lo que impide igualmente obtener desorciones del total de la norflurazona empleada. Sin embargo, sí se observa como la  $\beta$ -CD muestra el mayor efecto desorbente ya que también fue ésta la que mostró una mayor afinidad por la molécula del herbicida, obteniéndose la mayor constante de complejación,  $360 \text{ M}^{-1}$ .

*Tabla 15. Valores del porcentaje desorbido (%D) para la desorción de norflurazona del suelo AL empleando soluciones de  $\beta$ -CD 0.01M.*

	$\alpha$ -CD	$\beta$ -CD	$\gamma$ -CD
<b>4</b>	20.50	25.52	0.30
<b>12</b>	39.70	49.15	25.61
<b>20</b>	55.55	61.63	33.67

Esta propiedad de las CDs respecto a su capacidad de desorber plaguicidas y distintos componentes contaminantes orgánicos en el suelo se ha empleado como una herramienta para conseguir la remediación de estos. Fenyvesi y col., (1996) desarrollaron un método para conseguir la movilización de contaminantes orgánicos en suelos, empleando para ello soluciones de derivados sintéticos de CDs (HP- $\beta$ -CD) y polímeros de CDs. Estos contaminantes fueron el pireno y el pentaclorofenol, explicándose este hecho a través de la formación de un complejo de inclusión con las CDs del estudio. Por otro lado, Wang y col., (1995), aprovecharon la capacidad de complejación de un derivado de la  $\beta$ -CD (carboximetil- $\beta$ -CD) con metales como el  $\text{Cd}^{2+}$  o el  $\text{Ca}^{2+}$  y con compuestos orgánicos como antraceno, triclorobenceno, bifenilo e incluso DDT, consiguiéndose un método útil para la remediación de suelos y acuíferos



*Comportamiento del herbicida norflurazona en el sistema suelo-agua. Obtención, caracterización y aplicación de complejos de inclusión norflurazona-ciclodextrina.*

contaminados. Además de estos trabajos se han empleado CDs para conseguir distintos complejos con otros contaminantes como PAHs y metales potencialmente contaminantes de aguas subterráneas y suelos (Bizzigotti y col., 1997).

#### **4.2.5. Movilidad en columnas de suelos**

Aunque las técnicas de adsorción-desorción permiten evaluar mecanismos individuales de adsorción, estos resultados no pueden ser directamente extrapolados al régimen de flujo dinámico que se produce a través del suelo. Esto se debe, por un lado, a la presencia de múltiples mecanismos de adsorción, por otro, a las variaciones localizadas en la química de la solución, y por último, a la adsorción en condiciones de no equilibrio a lo largo del paso de flujo. Por ello se han realizado experiencias en columnas de suelo, que reflejan mejor las condiciones reales.

En general, la movilidad de un herbicida puede depender de múltiples factores como la cantidad de agua a la que la zona de cultivo se encuentre sometida, al estado de la superficie del suelo, la cantidad de agua que posea el mismo e incluso la temperatura del medio. Un ejemplo de esta última característica fue estudiado por Comfort y col. (1992) con el herbicida dicamba para el cual llegó a la conclusión de que en suelos sometidos a bajas temperaturas se incrementaba la lixiviación del mismo. Tener en cuenta todos estos factores nos acercaría aún más a lo que ocurre en realidad, pero en este apartado, nos vamos a centrar fundamentalmente en las propiedades físico-químicas tanto del suelo como del herbicida bajo estudio.

Este tipo de experimentos son de una gran relevancia, ya que se encuentran directamente relacionados con el importante impacto medioambiental que pueden provocar este tipo de compuestos, los cuales pueden llegar a contaminar las aguas subterráneas si poseen por sus características un potencial alto para ser lixiviados.

Tres suelos, AL, CR y SR, fueron seleccionados para el estudio de la movilidad de norflurazona en columnas de suelos. La elección de estos suelos se realizó basándose en la adsorción que presentaron respecto al herbicida. Por un lado se escogió el suelo AL, que fue el de mayor adsorción, y por otro dos suelos, CR y SR que fueron los que adsorbieron menos norflurazona por ser arenosos. Aunque ya en el apartado anterior se vieron cuales eran los componentes que más influían en su adsorción (materia orgánica y

óxidos de hierro y aluminio) es interesante comprobar como éstos mismos componentes pueden afectar en la retención del herbicida bajo unas condiciones de aplicación más próximas a la realidad.

Para el estudio de movilidad se empleó solamente la  $\beta$ -CD, dado que, sus resultados de complejación con norflurazona habían sido los mejores.

Los resultados obtenidos a partir de la realización de estas experiencias en columnas de suelos han sido representados en la forma de curvas de elución, donde en el eje de abscisas se representa el número de volúmenes de poro y en el de ordenadas la concentración relativa de norflurazona eluida de la columna de suelo, respecto a la inicialmente añadida ( $C/C_0$ ). Los volúmenes de poro determinados para los distintos suelos empleados fueron: 41.00, 88.00 y 57.45 mL, para los suelos SR, AL y CR respectivamente.

La figura 28 muestra las curvas de elución de norflurazona, aplicada como solución de norflurazona en  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  0.01 M, o en solución de  $\beta$ -CD 0.01 M, a través de los suelos CR, SR y AL, empleando agua destilada como eluyente. En la curva de elución del herbicida en solución de nitrato a través del suelo AL se obtuvo sólo un 3.21 % de elución. Sin embargo, para los suelos CR y SR se obtuvieron unas eluciones cercanas al 100% del herbicida empleado. Kookana y col. (1995) llevaron a cabo estudios de percolación a través de columnas de suelos, empleando un suelo arenoso (96% de arena) con 9 plaguicidas, obteniendo una mayor lixiviación para aquellos que mostraron un menor poder de adsorción, apareciendo un elevado porcentaje, por ejemplo, de fenamifos a profundidades de 40-45 cm, suponiendo estos resultados un potencial peligro de contaminación para aguas subterráneas en este tipo de suelos. Aquellos suelos que presentaron unos valores elevados de  $K_{oc}$  presentaron una mayor retención.

*Comportamiento del herbicida norflurazona en el sistema suelo-agua. Obtención, caracterización y aplicación de complejos de inclusión norflurazona-ciclodextrina.*

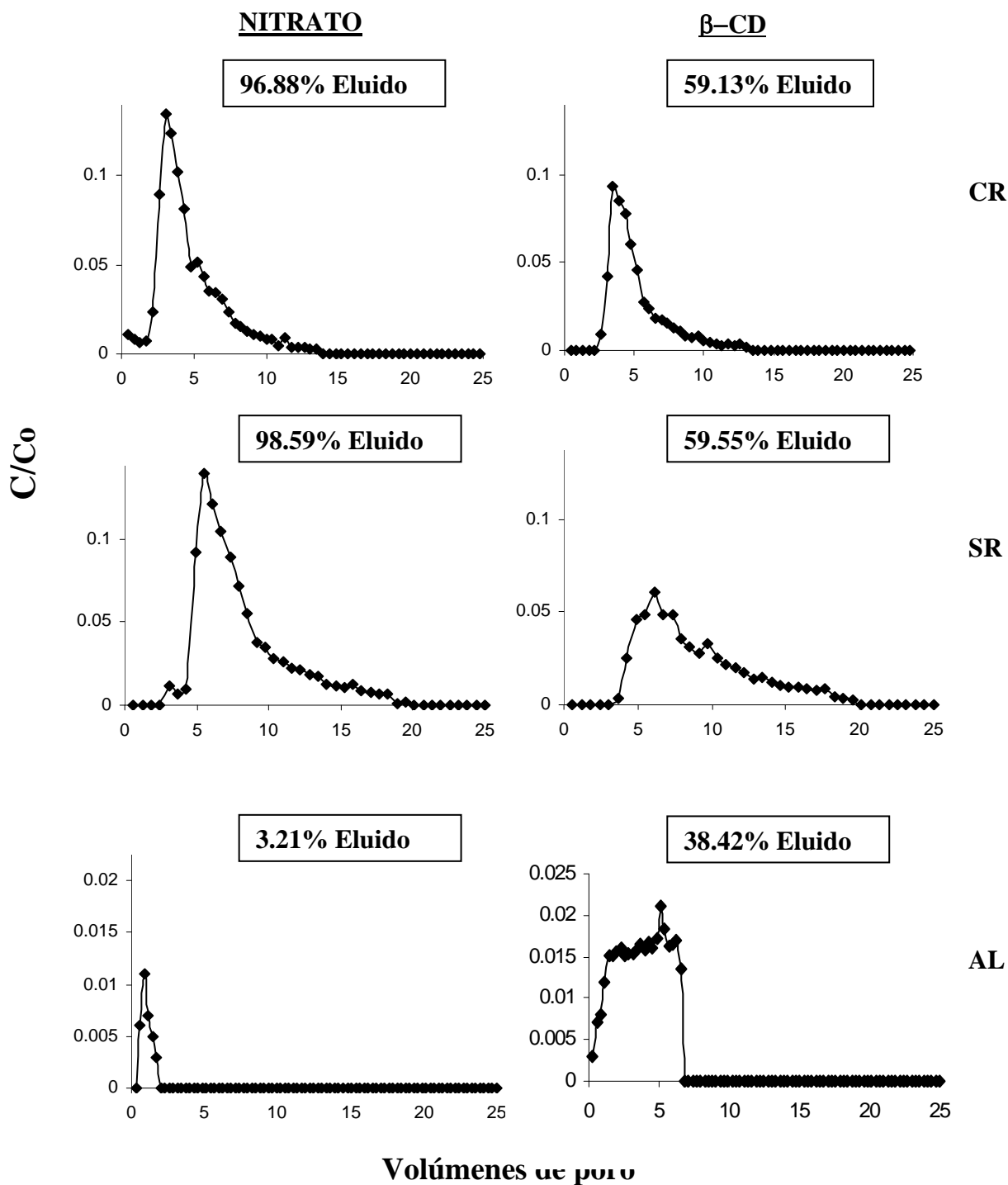


Figura 28. Curvas de elución de norflurazona, de los suelos CR, SR y AL empleando soluciones de nitrato cálcico 0.01 M o  $\beta$ -CD 0.01 M y agua destilada como eluyente.

*Comportamiento del herbicida norflurazona en el sistema suelo-agua. Obtención, caracterización y aplicación de complejos de inclusión norflurazona-ciclodextrina.*

Claramente estos resultados se encuentran en concordancia con los obtenidos con el suelo CR y SR con valores de  $K_{oc}$  de 167 y 174, respectivamente, frente a la  $K_{oc}$  de 691 del suelo AL en el que se observó una retención prácticamente total del herbicida aplicado. Por otro lado, Weber (1993), observó una mayor movilidad de los herbicidas fomesafen y atrazina cuando para los experimentos en columnas de suelos empleó un suelo limoarcilloso frente a un suelo arcilloso, con un 66% de arcilla, poniendo de manifiesto el efecto sobre la retención que provoca la mayor o menor cantidad de fracción arcilla que posea un determinado suelo. En nuestro caso ocurrió algo similar, ya que se intentaron hacer estudios de movilidad en columnas del suelo TM, que contiene un 65.9 % de fracción arcilla, pero no se pudieron llevar a cabo debido a que no se producía percolación en absoluto en este suelo, a diferencia de lo que ocurría en el suelo AL, que solo posee un 22.6 % de fracción arcilla, aunque la fracción limo sea muy alta (61.2 %).

La norflurazona lixivió rápidamente a través de los dos suelos arenosos, tal y como era de esperar, debido al bajo contenido en materia orgánica y a su alta porosidad (baja cantidad en fracción fina). El máximo observado en las curvas de elución de norflurazona con solución de nitrato aparece sobre 3 y 6 volúmenes de poro, para los suelos CR y SR, respectivamente, es decir, hay una ligera mayor retención del herbicida en el suelo CR.

La tabla 16 muestra el porcentaje de norflurazona eluida y también la distribución de las cantidades residuales de norflurazona extraídas de cada anillo de las columnas de suelos después del lixiviado de las mismas, en función de la profundidad de la columna. La extracción del herbicida del suelo fue obtenida empleando metanol, tal y como se describió en el apartado de Materiales y Métodos. Los residuos de norflurazona extraídos de las columnas de los suelos CR y SR, cuando el herbicida se había aplicado como solución de nitrato cálcico, fueron insignificantes, debido a que prácticamente el 100% del herbicida aplicado fue eluido de la columna. Para el suelo AL las cantidades más altas de norflurazona residual fueron extraídas de los tres primeros anillos de la

*Comportamiento del herbicida norflurazona en el sistema suelo-agua. Obtención, caracterización y aplicación de complejos de inclusión norflurazona-ciclodextrina.*

columna, no siendo detectado a profundidades por debajo de 16 cm, indicando una alta retención del herbicida en los horizontes superficiales de este suelo. La cantidad total recuperada fue del 89.37% de la inicialmente añadida, muy cercana a la cantidad total de herbicida retenido por la columna de suelo (96.79%).

*Tabla 16. Porcentaje de norflurazona eluida y extraída de las columnas de suelos, empleando soluciones del herbicida en nitrato cálcico 0.01M o en  $\beta$ -CD 0.01 M.*

Profundidad (cm)	SR		CO		AL	
	Nitrato	$\beta$ -CD	Nitrato	$\beta$ -CD	Nitrato	$\beta$ -CD
<b>0-4</b>	0.30	5.02	0.60	5.36	30.73	10.94
<b>4-8</b>	0.11	5.31	0.22	6.10	27.69	10.36
<b>8-12</b>	0.09	5.61	0.19	6.11	25.94	10.70
<b>12-16</b>	0.14	5.79	0.28	6.36	5.01	11.20
<b>16-20</b>	0.15	6.28	0.30	6.76	0.00	10.37
<b>20-24</b>	0.26	8.87	0.50	9.50	0.00	9.92
<b>Total extraído</b>	1.05	36.88	2.09	40.19	89.37	62.49
<b>Total eluido</b>	98.59	59.55	96.88	59.13	3.21	38.42
<b>Total recuperado</b>	99.64	96.43	98.97	99.32	92.58	100.91

Cuando la norflurazona se aplicó a las columnas de suelo como solución 0.01 M de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  para los tres suelos empleados se observa, en la tabla 16, que la suma de las cantidades eluidas y extraídas hacen un total de prácticamente el 100% del herbicida inicialmente aplicado, lo que indicaría que no se ha sufrido pérdida alguna del herbicida por degradación, algo que era de esperar debido a que la vida media de la norflurazona está entorno a 45-180 días y para estos suelos las experiencias en columnas duraron 33, 35 y 30 días para los suelos SR, AL y CR, respectivamente. El suelo que presentó un

*Comportamiento del herbicida norflurazona en el sistema suelo-agua. Obtención, caracterización y aplicación de complejos de inclusión norflurazona-ciclodextrina.*

menor porcentaje de recuperación fue el AL cuando se empleó solución de nitrato cálcico, probablemente debido a la alta retención que el herbicida presentaba.

Con el fin de poder observar el efecto de la  $\beta$ -CD complejada con norflurazona, se realizaron experiencias de movilidad de este herbicida en columnas de suelos empleando una solución de la CD junto al herbicida, con una concentración de CD igual a la empleada para los ensayos de adsorción-desorción (0.01 M).

En la figura 28 también se pueden observar las gráficas de elución de norflurazona correspondientes a los suelos CR, SR y AL, cuando se aplicó ésta con solución de  $\beta$ -CD. En el suelo CR se puede observar un máximo de la curva de elución similar a cuando no se emplea la  $\beta$ -CD, de alrededor de unos 3 volúmenes de poro, pero una menor cantidad de herbicida lixiviado (tabla 16).

En el suelo SR disminuye mucho el máximo de la curva de elución de la norflurazona cuando se emplea la CD, y la cantidad de herbicida lixiviado es bastante inferior a cuando se empleó la solución de nitrato cálcico (tabla 16).

En el suelo AL se observa la lixiviación de más del 38% del herbicida aplicado, hecho que no se daba al aplicarla con la solución de nitrato cálcico, siendo destacable que no se termina de liberar todo el herbicida de la columna de suelo, debido a la gran afinidad del mismo por este suelo, algo de lo que ya quedó constancia en las isothermas de adsorción-desorción, donde se obtuvieron los resultados más altos de retención.

Si se observan los resultados que se muestran en la tabla 16, correspondientes la cantidad de herbicida extraído, cuando se emplean soluciones de  $\beta$ -CD se obtienen resultados semejantes para los dos suelos arenosos (36.88 y 40.19%). Para el suelo AL se observa un valor más elevado del total extraído (62.49%), reflejo de la afinidad de este herbicida por el suelo.

Son destacables los resultados obtenidos para los suelos arenosos cuando se le aplica la solución de  $\beta$ -CD y norflurazona, hecho que podría ser debido al efecto de adsorción de la  $\beta$ -CD sobre el suelo, que en el momento en que se encuentre complejada

con el herbicida en solución provocará una fijación indirecta de la norflurazona sobre el suelo, incrementando así el efecto adsorbente y la afinidad del herbicida. Esta reducción en la lixiviación del herbicida, en principio no esperada, llevó a plantearse el uso de esta misma solución con otro suelo de similares características para así poder confirmar este nuevo efecto sobre la lixiviación de la norflurazona, y así se pudo observar que al aplicarla sobre el suelo SR los resultados obtenidos fueron similares, aunque reteniéndose algo menos de herbicida (36.88%).

Este comportamiento se ha observado en la adsorción de otros plaguicidas en suelos en presencia de distintos surfactantes (moléculas que contienen una parte hidrofílica y otra hidrofóbica al igual que las CDs), atribuyéndose el aumento en la adsorción de los plaguicidas a la previa adsorción de estas moléculas en el suelo (Cserhati y col., 2002; Krogh y col., 2003). La adsorción de estas moléculas anfifílicas en suelos puede modificar las características superficiales de los mismos así como actuar como moléculas “puente” entre el suelo y los plaguicidas. Sánchez-Camazano y col. (2000) observaron que un surfactante adsorbido en el suelo podía aumentar la afinidad de atrazina por el mismo, mientras que el surfactante presente en solución aumenta la afinidad del herbicida por la solución. El efecto neto dependerá de la cantidad de surfactante adsorbido respecto a la cantidad de plaguicida que permanece en la solución.

La adsorción de  $\beta$ -CD en suelos había sido previamente demostrada tanto en experimentos de adsorción (Pérez-Martínez y col.), como en experimentos de lixiviación del plaguicida 2,4-D a través de columnas de suelos (Morillo y col., 2001), observando que la adsorción de  $\beta$ -CD en el suelo dio como resultado una mayor adsorción de 2,4-D, y, por tanto, un mayor factor de retardo en la lixiviación del mismo. Sin embargo, en el caso de HP- $\beta$ -CD, Brusseau y col., (1994) no observaron retardo de dicha CD a su paso por columnas de suelo, concluyendo que la adsorción de HP- $\beta$ -CD al suelo no se estaba produciendo.

Cuando la solución de  $\beta$ -CD se empleó con el suelo AL se observó un aumento en la lixiviación de norflurazona, situación contraria a la observada en los casos



anteriores. De nuevo en este caso el fuerte efecto adsorbente de este herbicida por este suelo provocó que no se pudiese conseguir una lixiviación del 100% del herbicida aplicado, pero si una cantidad importante con respecto a cuando se empleó la solución de nitrato cálcico (38.42 % frente a 3.21 %, respectivamente).

Los resultados obtenidos con los distintos suelos empleados indican que la CD podría poseer una doble función, actuando por un lado como adsorbente en aquellos suelos que no reúnan unas condiciones óptimas para que se de la adsorción de este tipo de plaguicidas. Crini y col. (1998) observaron cómo macropolímeros de vinilamina y ciclodextrina provocaron una fuerte retención en suelos de compuestos aromáticos, especialmente de clorofenoles, por la formación de un complejo de inclusión con  $\beta$ -CD, suponiendo una interacción de tipo molecular entre ambos compuestos. La ventaja fundamental sería la reducción de la lixiviación de norflurazona a través de ese tipo de suelos con poca capacidad de adsorción de plaguicidas hidrófobos, consiguiéndose resolver uno de los mayores problemas con que se enfrenta la aplicación de fitosanitarios sobre el suelo como es el paso de los plaguicidas a las aguas subterráneas, y por otro lado, al reducirla, conseguimos que el herbicida no se aleje de la zona superficial del suelo donde llevará a cabo su acción biológica, es decir, sobre las raíces de las malas hierbas, suponiendo por todo esto un resultado altamente ventajoso desde el punto de vista del impacto medioambiental que puede provocar el empleo de este tipo de compuestos. De hecho Singh y col., (2002) llevaron a cabo estudios con norflurazona con el objetivo de conseguir una reducción en su lixiviación a través del empleo de surfactantes catiónicos, obteniendo buenos resultados en el caso del surfactante catiónico monazolina C aplicado en columnas de suelos en una razón 0.25:1 monazolina:norflurazona. También,

Chandran y Singh (1999) observaron una reducción en la lixiviación del herbicida norflurazona cuando emplearon varios tipos de surfactantes. Dicha reducción en su lixiviación fue achacada a las posibles modificaciones que sobre el suelo pudieron provocar el empleo de estos adyuvantes respecto a las propiedades de infiltración del

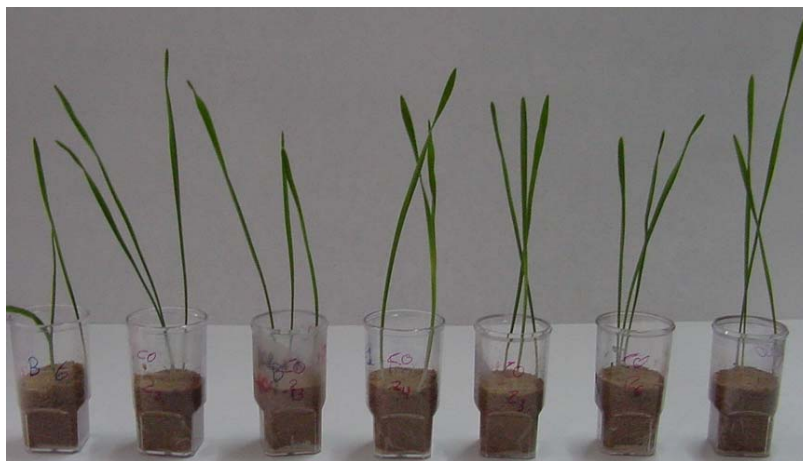
agua a través del mismo, además de ser capaces de alterar la tensión superficial y la capacidad humectable del herbicida (Walker, 1980).

Por otro lado, ejerce un efecto de arrastre de contaminantes orgánicos en aquellos suelos que sí poseen unos componentes implicados en la adsorción del herbicida, que como ya se determinaron, en el caso de norflurazona, fueron los óxidos y la materia orgánica. Así por ejemplo, Fenyvesi y col. (1996), emplearon la encapsulación molecular con distintas CDs para la recuperación de suelos contaminados con PAHs y diversos compuestos aromáticos. Reid y col. (2000) emplearon hidroxipropil- $\beta$ -CD como técnica para la bioremediación de suelos contaminados por PAHs. Boving y Brusseau (2000), consiguieron un incremento de la solubilidad de un contaminante organoclorado, tricloroeteno, empleando ciclodextrinas metiladas, Hidroxipropil- $\beta$ -CD y Metil- $\beta$ -CD como agentes complejantes, enfocándose a un empleo para la recuperación de suelos contaminados.

El resultado obtenido se puede analizar desde dos puntos de vista; por un lado se trataría de un resultado ventajoso en el caso de la aplicación de CDs para la recuperación de suelos, en el caso de compuestos que se mantuvieran fuertemente adsorbidos sobre el suelo, incrementando la biodisponibilidad del herbicida frente al ataque de agentes microbianos procedentes de la propia flora bacteriana del suelo; pero, por otro lado, el hecho de conseguir arrastrar al plaguicida en aquellos suelos con gran capacidad adsorptiva podría aumentar el potencial riesgo de contaminación de aguas subterráneas. Foy (1992) verificó cómo el efecto que pudiesen provocar estos adyuvantes sobre el lixiviado de los herbicidas en el suelo iba a depender de distintos factores como el tipo de suelo, la concentración del herbicida empleada y de las condiciones generales del ensayo de lixiviación.

#### **4.2.6. Bioensayos**

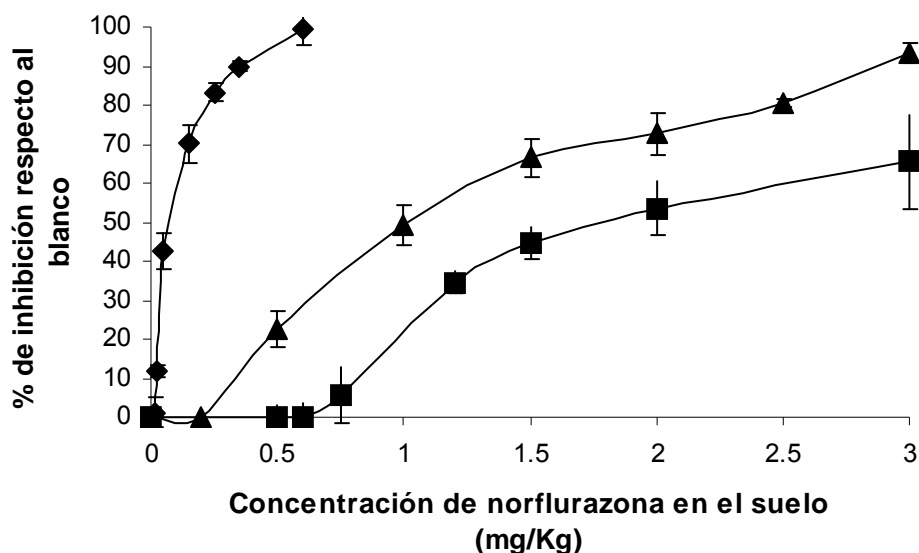
Debido a que la norflurazona es un herbicida de aplicación sobre suelos, se han seleccionado suelos de diferentes características para la determinación de su actividad biológica. Si se tiene en cuenta la relación entre la adsorción de un herbicida por parte del suelo y la capacidad para desarrollar su actividad biológica, sería lógico llevar a cabo bioensayos con aquellos suelos que presentaron una muy alta o baja adsorción de norflurazona, por lo tanto se han seleccionado, por un lado, los suelos AL y CR debido a que fueron los que mayor y menor capacidad adsorbente presentaron por la norflurazona, respectivamente, además de ser dos suelos en los que ya se ha estudiado el efecto que provocan en la lixiviación del herbicida, observándose para AL una fuerte retención de la norflurazona y para CR una lixiviación cercana al 100% del herbicida inicialmente aplicado. Por otro lado, también se ha escogido el suelo TM, con un alto contenido en fracción arcilla, debido a que, como se pudo observar, presentaba una fuerte adsorción a la vez que una difícil desorción, incluso cuando se empleó la  $\beta$ -CD. Este suelo no pudo ser usado para los estudios de lixiviación debido a que no permitía la percolación.



*Foto 1. Bioensayos llevados a cabo para determinar la bioeficacia de norflurazona.*

*Comportamiento del herbicida norflurazona en el sistema suelo-agua. Obtención, caracterización y aplicación de complejos de inclusión norflurazona-ciclodextrina.*

Para observar el efecto que tiene la cantidad de herbicida presente en cada suelo sobre la actividad biológica en plantas, se han determinado los porcentajes de inhibición de la presencia de clorofila en plantas de soja a través del efecto decolorante que provoca la norflurazona sobre los tallos, en comparación con blancos sin la presencia del herbicida. La presencia en los ensayos del blanco de solución de  $\beta$ -CD 0.01 M no provocó ningún efecto significativo en el crecimiento de la planta en comparación con el blanco sin  $\beta$ -CD. En las figuras correspondientes a los bioensayos se representó el porcentaje de inhibición, respecto al blanco, frente a la concentración de herbicida aplicado al suelo.

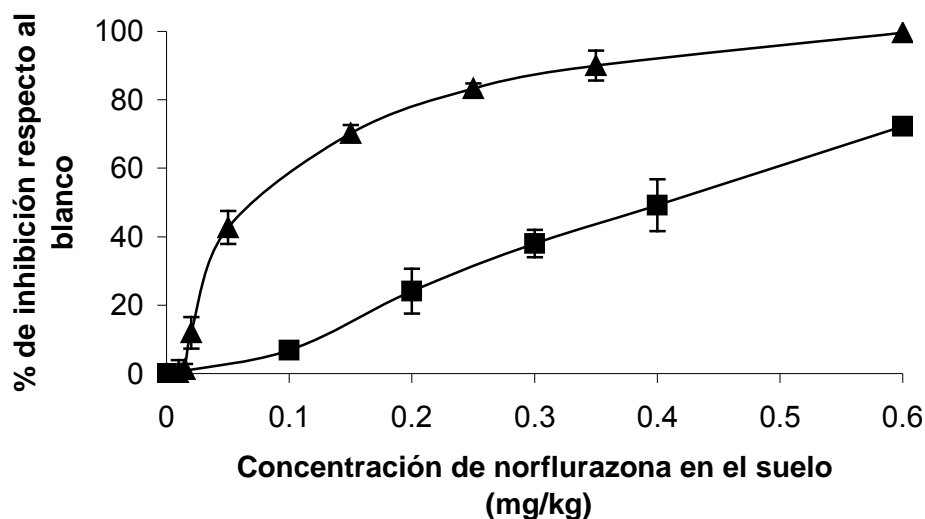


*Figura 29. Curvas de inhibición de clorofila obtenidas en los suelos: CR (◆), TM (▲) y AL (■).*

En la figura 29 se observan las curvas de inhibición de la clorofila para los tres suelos bajo estudio cuando se empleó norflurazona pura. Se observa claramente como en el suelo CR la actividad herbicida se hace patente desde pequeñas dosis aplicadas de norflurazona. Por el contrario, para el suelo AL se observa como a pequeñas dosis aplicadas no se observa inhibición necesitándose prácticamente la misma concentración que produce una completa inhibición para el suelo CR, para poder comenzar a

observarse la inhibición. Para el suelo TM se observa una situación intermedia entre los otros dos suelos, encontrándose menos disponible la norflurazona que para el suelo CR debido a su mayor carácter arcilloso.

En la figura 30 se puede observar como la actividad herbicida de norflurazona sobre el suelo arenoso CR fue muy alta, ya que resultó ser efectivo a concentraciones muy bajas de herbicida aplicado, alcanzando casi el 100% de inhibición a  $0.6 \text{ mg Kg}^{-1}$ . Este hecho pone de manifiesto la disponibilidad del herbicida en este suelo para llevar a cabo su actividad, con lo que queda demostrado el potencial de actividad de este herbicida en este tipo de suelos.



*Figura 30. Curvas de inhibición de clorofila obtenidas en el suelo CR sin  $\beta$ -CD ( $\blacktriangle$ ) y con  $\beta$ -CD ( $\blacksquare$ ).*

Por otro lado, en la misma figura se aprecia cómo en presencia de  $\beta$ -CD la actividad herbicida se encuentra reducida, hecho relacionado con los resultados obtenidos en los anteriores ensayos, en los que disminuía la lixiviación de norflurazona en presencia de  $\beta$ -CD, provocando un efecto adsorbente del herbicida sobre el suelo. Aunque es cierto que en los ensayos de adsorción-desorción, en presencia de  $\beta$ -CD se observó un intenso efecto desorbente, en este caso la solución de CD se le añadió al

suelo después de que el herbicida ya estuviera adsorbido, de manera distinta a cuando se empleó para la realización de los ensayos en columnas y bioensayos, donde se empleó directamente la solución del herbicida junto con la CD. Este hecho parece influir de una manera determinante en el efecto que pudiera provocar el empleo de la  $\beta$ -CD, cuando ésta se aplica al suelo. Morillo y col., (2001), demostraron como dependiendo del momento en que se empleara la  $\beta$ -CD se obtenía un aumento en la lixiviación si se empleaba después de la adsorción del herbicida 2,4-D, o una disminución si la CD ya estaba adsorbida previamente en el suelo.

En la figura 31 se presentan las curvas de inhibición de la clorofila para el suelo AL, siendo interesante observar como para las mismas concentraciones de herbicida empleadas para el suelo CR, no se observó ninguna inhibición. La explicación de este hecho estaría en que la mayor adsorción que sufre la norflurazona sobre este suelo provocaría una menor disponibilidad del herbicida, viéndose mermada su bioeficacia a bajas concentraciones, pero cuando las concentraciones son más elevadas se consigue una cantidad ya disponible para ejercer la actividad herbicida. Por otro lado, cuando se empleó la  $\beta$ -CD en los ensayos de lixiviación se observó un incremento de la misma, ya que el herbicida formaba complejo con la CD y se mantenía en solución; pero sin embargo, en presencia de  $\beta$ -CD la bioeficacia del herbicida se observa mermada respecto a la de norflurazona sin complejar. Aunque en un principio se podría pensar que se observaban diferencias, a través del análisis de la desviación estándar no se observaron diferencias significativas entre ambas curvas de inhibición.

En general, en el momento de aplicación de un plaguicida se emplean dosis muy altas, y posiblemente tóxicas, que frecuentemente decrecen rápidamente en el campo hasta concentraciones por debajo del nivel de efectividad mínimo, por lo que esta situación podría llegar a ser una forma deseable de actuación para la norflurazona. Gwen y col. (1992) llevaron a cabo estudios sobre la bioeficacia del herbicida atrazina con diferentes encapsulaciones con almidón, llegando a la conclusión de que el único factor que afectaba a la bioeficacia del herbicida era el tamaño de la cápsula de almidón,

*Comportamiento del herbicida norflurazona en el sistema suelo-agua. Obtención, caracterización y aplicación de complejos de inclusión norflurazona-ciclodextrina.*

demostrándose de esta forma la potencial influencia de la sustancia encapsulante sobre la bioeficacia de un herbicida.

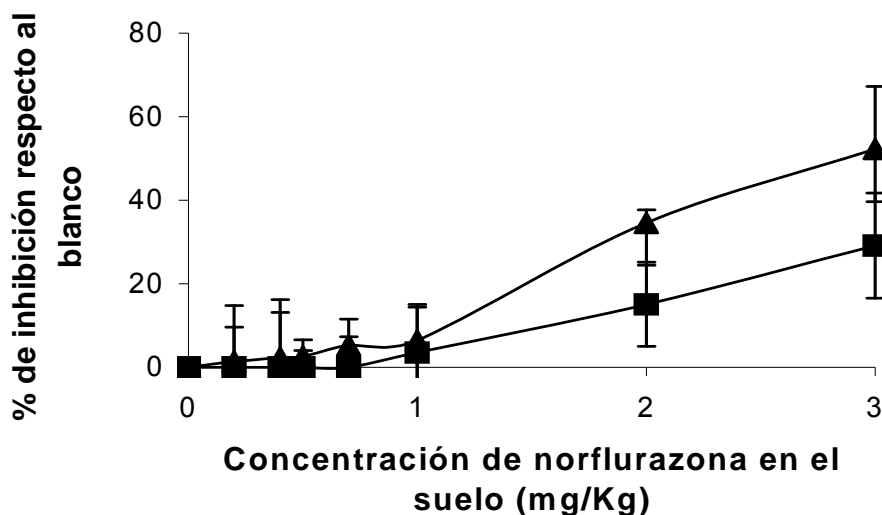
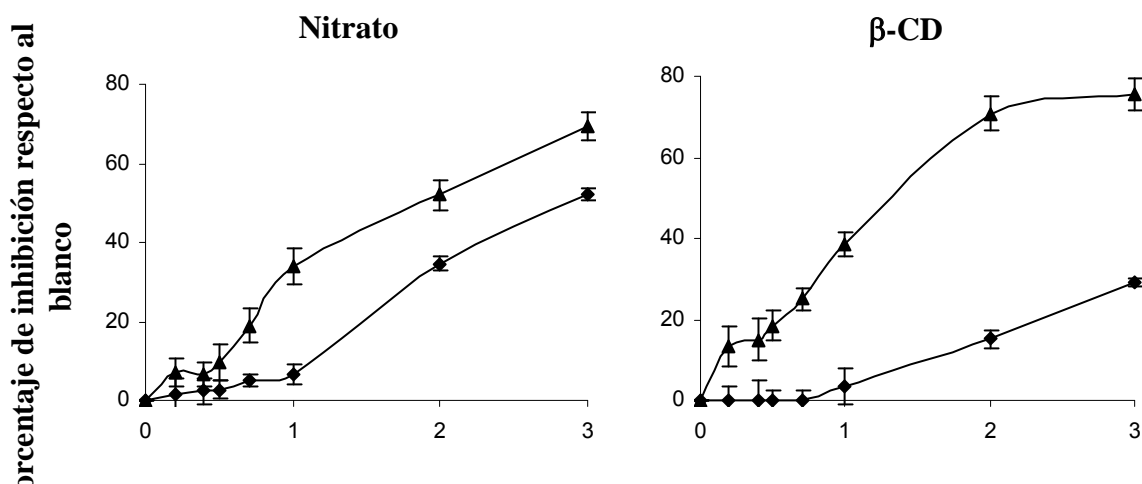


Figura 31. Curvas de inhibición de clorofila obtenidas en el suelo AL sin  $\beta$ -CD (▲) y con  $\beta$ -CD (■).

Para poner de manifiesto que la actividad de la norflurazona en ningún caso se ve sensiblemente disminuida en presencia de  $\beta$ -CD, lo cual lógicamente no sería un efecto deseable, se procedió a la realización de un bioensayo donde después del crecimiento de la planta durante 10 días se cortaron los tallos y se prosiguió con una resiembra de la semilla después de 20 días más, o sea, a los 30 días de la primera siembra, observándose los perfiles de inhibición obtenidos, en la figura 32. En esta figura se observa como, tanto en presencia como en ausencia de  $\beta$ -CD, la inhibición se incrementa, concluyéndose que de alguna forma con el riego y el paso del tiempo la biodisponibilidad de la norflurazona se encuentra incrementada para así llevar a cabo su efecto herbicida. Sin embargo, en presencia de la  $\beta$ -CD, no sólo se observa un incremento de esta bioeficacia sino que éste es mayor, concluyéndose que realmente la CD lo que provocaría sería una mayor disponibilidad de la norflurazona.

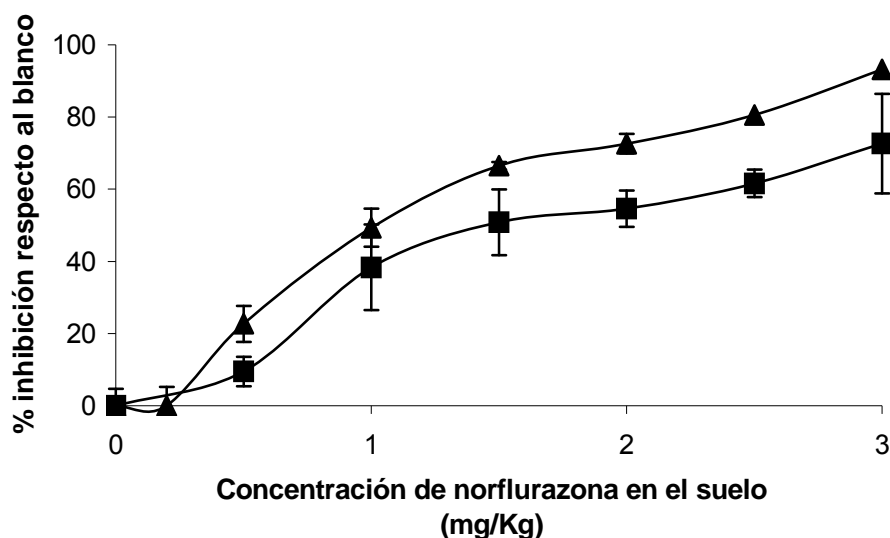


*Figura 32. Curvas de inhibición de clorofila obtenidas en el suelo AL después de 10 (■) y 30 días (▲).*

En la figura 33 se observan las curvas de clorofila correspondientes al suelo TM en presencia y en ausencia de  $\beta$ -CD, observándose un comportamiento muy similar en ambos casos, aunque se puede observar una ligera disminución en la bioeficacia que se produce cuando el herbicida se aplica en presencia de CD. Un dato importante hubiese sido llevar a cabo un ensayo de movilidad en columnas con este suelo para ver si la lixiviación se veía afectada por la presencia de CD, algo que fue imposible debido a que no se obtenían lixiviados después de añadir las soluciones en cabeza de columna, ya que el porcentaje en arcilla que dicho suelo contiene es muy elevado.

En conclusión, se puede decir que, en general, en un principio la presencia de la  $\beta$ -CD provoca una ligera disminución en la bioeficacia de norflurazona, tanto por su efecto de retención del herbicida, para el caso del suelo CR, como por la propia formación del complejo de inclusión, pero esto no se convierte en una desventaja, ya que esa disminución no llega a ser significativa y además desaparece a medio plazo, como se ha comprobado con los resultados experimentales obtenidos con el suelo AL, donde se ha conseguido una casi total inhibición de las malas hierbas (casi un 80%), esperándose incluso mayor duración de la bioeficacia de la norflurazona debido al efecto, fotoprotec-





*Figura 33. Curvas de inhibición de clorofila obtenidas en el suelo TM sin  $\beta$ -CD ( $\blacktriangle$ ) y con  $\beta$ -CD ( $\blacksquare$ ).*

tor de la  $\beta$ -CD (como se verá en el siguiente apartado). Con todo esto se puede llegar a la conclusión de que lo que se obtiene con la encapsulación del herbicida es una formulación de liberación controlada, reduciéndose en un principio la actividad biológica debido a este hecho, junto a un incremento de la actividad a lo largo del tiempo. Oliver y col. (1990) llevaron a cabo una evaluación de complejos con  $\beta$ -CD de los herbicidas atrazina, metribuzín y simazina. A la hora de llevar a cabo los bioensayos observaron como con las formulaciones de CD con los herbicidas simazina y atrazina se producía una inhibición en la bioeficacia de los mismos (después de 7 días) y no así cuando se empleaba el metribuzín. Este hecho se achacó por un lado a la propia formulación, lo cual produciría un retraso en la liberación del herbicida, y por otro, a las condiciones en las cuales habían sido obtenidos los complejos, concluyendo que en aquellos casos donde se emplearon condiciones más drásticas (simazina y atrazina) la bioeficacia disminuyó y viceversa. Las condiciones de obtención de la formulación con metribuzín se asemeja a las de la formulación de  $\beta$ -CD con norflurazona, donde las condiciones empleadas fueron 25°C bajo simple agitación durante 7 días, obteniéndose

igualmente una disminución de la bioeficacia en un principio (10 días) y posteriormente un incremento de ésta a lo largo del tiempo, debida a la liberación controlada provocada por la formación del complejo de inclusión.

En la tabla 17 se pueden observar las ecuaciones que mejor se ajustaron a cada curva de inhibición obtenida, junto a los coeficientes de correlación ( $r^2$ ) correspondientes a cada una de ellas, los cuales demostraron la adecuación a dichas curvas. La inhibición, en todos los casos, como se observa en las figuras, incrementó a medida que se incrementaron las concentraciones de herbicida aplicado, pero no observándose una relación lineal, por lo que se obtuvieron las ecuaciones que más se aproximaban a los valores obtenidos experimentalmente, respondiendo a distintos tipos de relaciones: lineal, exponencial o polinómica. En todos los casos se obtuvieron unos coeficientes de correlación de entre 0.991-0.996, lo que demuestra la óptima adecuación de los resultados obtenidos experimentalmente con el tipo de función a la que se ajustaron.

A partir de dichas ecuaciones se calculó la concentración necesaria para provocar el 25% de inhibición de clorofila en la planta para cada uno de los suelos ( $CI_{25}$ ).

En la tabla 17 se pueden apreciar importantes diferencias en la  $CI_{25}$  correspondiente a cada suelo, hecho que no resulta sorprendente, ya que la elección de dichos suelos se realizó basándose en sus características y comportamientos contrapuestos con respecto a la interacción con el herbicida bajo estudio.

El bajo valor del  $CI_{25}$  obtenido para el suelo CR pone en evidencia la alta disponibilidad de la norflurazona presente en el mismo y por otro lado es destacable el  $CI_{25}$  del suelo AL, ya que el valor de 1.15 mg/Kg de herbicida aplicado, indica la baja disponibilidad de la norflurazona en este suelo comparándola con suelos menos favorables para su adsorción. Cuando se empleó la  $\beta$ -CD en todos los casos se observó un valor de  $CI_{25}$  superior, es decir, se necesitó más cantidad de herbicida presente en la muestra para llevar a cabo su función biológica observándose en principio una ligera disminución de la bioeficacia, pero alargándose ésta a lo largo del tiempo debido a su efecto protector sobre la norflurazona.

*Comportamiento del herbicida norflurazona en el sistema suelo-agua. Obtención, caracterización y aplicación de complejos de inclusión norflurazona-ciclodextrina.*

*Tabla 17. Ecuaciones que relacionan el porcentaje de inhibición de clorofila con respecto a la concentración de herbicida empleada y  $CI_{25}$  para cada uno de los suelos seleccionados, en ausencia y en presencia de  $\beta$ -CD.*

Suelo	Ecuación	$CI_{25}$ (mg/Kg)	$r^2$
<b>CR</b>	$y = 26.938 \ln(x) + 118.38$	0.03	0.991
<b>CR+<math>\beta</math>-CD</b>	$y = 125.01x - 1.623$	0.21	0.992
<b>TM</b>	$y = 6.2708(x)^4 - 35.069(x)^3 + 49.584(x)^2 + 29.675(x) - 2.5987$	0.58	0.995
<b>TM+<math>\beta</math>-CD</b>	$y = 8.4202x^4 - 43.541x^3 + 57.373x^2 + 23.307x - 0.2062$	0.6	0.999
<b>AL</b>	$y = 11.825(x)^4 - 75.801(x)^3 + 149.42(x)^2 - 63.571(x) + 0.275$	1.15	0.996
<b>AL+<math>\beta</math>-CD</b>	$y = 20.011x + 0.3419$	1.26	0.996

## **5. CONCLUSIONES**

1. Los estudios de interacción en medio acuoso norflurazona-ciclodextrinas han mostrado que las ciclodextrinas de origen natural,  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -, conducen a diagramas de solubilidad del tipo  $A_L$  de Higuchi, es decir, los complejos formados entre el plaguicida y estas CDs no poseen un límite de solubilidad definido, por lo que queda descartada la posibilidad de obtención de complejos en estado sólido por coprecipitación para las mismas. La estequiometría de los complejos norflurazona-ciclodextrinas formados es 1:1.
2. El cálculo de las constantes de estabilidad de los complejos norflurazona-ciclodextrinas obtenidos en medio acuoso ha puesto de manifiesto la siguiente secuencia  $\beta$ -CD >  $\gamma$ -CD >  $\alpha$ -CD. Estos resultados confirman la importancia de la dimensión de la cavidad de la ciclodextrina en el proceso de complejación del plaguicida.
3. El empleo de la técnica de *amasado* para la obtención de los complejos de inclusión norflurazona-ciclodextrinas en estado sólido no ofreció buenos resultados, excepto cuando se empleó la  $\gamma$ -ciclodextrina, obteniéndose una complejación parcial del herbicida confirmada a través de las técnicas de DSC y difracción de rayos X.
4. A través de la técnica de *atomizado* se consiguieron obtener complejos de inclusión (parcial en el caso de  $\alpha$ - y  $\gamma$ - y total para  $\beta$ -CD). En todos los casos se obtuvieron complejos amorfos evidenciados mediante las técnicas de DSC y difracción de rayos X.

*Comportamiento del herbicida norflurazona en el sistema suelo-agua. Obtención, caracterización y aplicación de complejos de inclusión norflurazona-ciclodextrina.*

5. La técnica de *rotavapor* conduce a la formación de complejos de inclusión cristalinos, puestos en evidencia mediante DSC, y a través de la espectroscopía IR.

6. Los ensayos de velocidad de disolución demostraron que los perfiles de disolución de las mezclas físicas de norflurazona con cada una de las tres ciclodextrinas resultaron ser similares al del herbicida puro, excepto para  $\beta$ -ciclodextrina, donde se obtuvo un incremento en el perfil de disolución, alcanzándose casi un 80% del herbicida disuelto.

7. Los estudios de velocidad de disolución de los complejos obtenidos en estado sólido muestran que la presencia de las tres ciclodextrinas conduce a un fuerte incremento en la velocidad de disolución, alcanzándose hasta el 100% del plaguicida disuelto, respecto al correspondiente a la norflurazona pura, donde solo se disolvió un 15%. Incluso en los casos donde sólo se obtuvo una complejación parcial de la norflurazona en el interior de la cavidad de las ciclodextrinas se obtuvo un perfil de velocidad de disolución del 100%.

8. El herbicida norflurazona se adsorbe en todos los suelos estudiados dando lugar a isothermas de tipo L según la clasificación de Giles y col. (1960). El estudio de la correlación entre la adsorción del herbicida y las distintas características de los suelos indicó que las variables estadísticamente significativas eran el contenido en materia orgánica, que contribuye con un 85% al valor de la varianza, y el contenido en óxidos de hierro y aluminio, que contribuyen con un 11%.

9. Los estudios de desorción de norflurazona mostraron histéresis positiva en todos los suelos estudiados, siendo especialmente marcada en el suelo TM. Cuando la desorción se realizó empleando una solución de  $\beta$ -ciclodextrina, la histéresis disminuyó, llegando incluso a ser una histéresis negativa, lo que puso de manifiesto el gran efecto que ejercen

*Comportamiento del herbicida norflurazona en el sistema suelo-agua. Obtención, caracterización y aplicación de complejos de inclusión norflurazona-ciclodextrina.*

las ciclodextrinas para aumentar la desorción de norflurazona, así como su potencial aplicación a la descontaminación de suelos.

10. En suelos arenosos la lixiviación de norflurazona fue del 100% de la cantidad inicialmente aplicada, pero cuando el herbicida se aplicó junto con una solución de  $\beta$ -ciclodextrina, se observó un efecto de retención del mismo, reduciéndose su lixiviación en un 60%, aproximadamente. En cambio, en columnas de suelos con alto contenido en óxidos donde el herbicida quedó totalmente retenido, la presencia de  $\beta$ -ciclodextrina permitió eluir una gran parte del mismo.

11. El herbicida norflurazona sufre fotodegradación en medio acuoso. La presencia en solución de  $\beta$ -ciclodextrina provocó un efecto fotoprotector del herbicida, mientras que la  $\alpha$ -ciclodextrina aumentó mucho más su degradación. La presencia de  $\gamma$ -ciclodextrina no afectó ni positiva ni negativamente a la fotodegradación de norflurazona.

12. La fotodegradación de norflurazona aumenta cuando existe montmorillonita o goetita en suspensión, pero la presencia de  $\beta$ -ciclodextrina en solución protege al herbicida, haciendo que su degradación disminuya. Las sustancias húmicas en suspensión protegen al herbicida de su fotodegradación, pero solo en las primeras horas de irradiación.

## **6. BIBLIOGRAFÍA**

AHRENS, W. Ed. Norflurazon. *In herbicide handbook 7<sup>th</sup> ed. Weed Science Society of America. Champaign, IL, (1994) 218-220.*

ALVA, A.K. y SINGH, M. “Sorption of bromacil, diuron, norflurazon, and simazine at various horizons in two soils”. *B. Environ. Contam. Toxicol.*, **45**, (1990), 365-374.

ALVA, A.K. y SINGH, M. “Adsorption-desorption of herbicides in soil as influenced by electrolite cations and ionic strength”. *J. Environ. Sci. Hea B*, **26**, (1991), 147-163.

AMATO, M.E., DJEDAINI, F., PAPPALARDO, G.C., PERLY, B. y SCARLATA, G., “Molecular modeling of  $\beta$ -cyclodextrin complexes with nootropic drugs”. *J. Pharm. Sci.*, **81**, (12) (1992) 1157-1161.

ANGUIANO-IGEA S., OTERO-ESPINAR F.J., VILA-JATO J.L. y BLANCO-MENDEZ J. “Evaluation of sealed heating method for the obtention of a clofibrate- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex”. *S.T.P. Pharm. Sci.*, **2**, (1992), 325-331.

ANTONIO C. S. LINO, YUJI TAKAHATA y CARLOS JAIME. “ $\beta$  and  $\alpha$ -cyclodextrin complexes with *n*-alkyl carboxylic acids and *n*-alkyl *p*-hydroxy benzoates. A molecular mechanics study of 1:1 and 1:2 associations”. *J. Mol. Struct.*, **594**, (2002), 207-213.

ARIAS, M. J., GINES, J. M., RABASCO, A. M., CHEMTOB, C. y SANCHEZ-SOTO, P. J. Characterisation by SEM/EDX of triamterene- $\beta$ -cyclodextrin inclusion compounds”. *Proceedings 13<sup>th</sup> International Congress on Electron Microscopy*, París, July, (1994), 51-52.

*Comportamiento del herbicida norflurazona en el sistema suelo-agua. Obtención, caracterización y aplicación de complejos de inclusión norflurazona-ciclodextrina.*

ASHTON, F. M. y CRAFTS, A. S. "Mode of action of herbicides". *John Wiley and Sons, Inc.*, New York. 1981.

ATKINS, P. W. "The rates of chemical reactions". *Phys. Chem. W. H. Freeman*: New York, (1994), 870-872.

BACKENSFELD T., MULLER B.W. y KOLTER K., "Interaction of NSA with cyclodextrins and hydroxypropyl cyclodextrin derivatives". *Int. J. Pharm.*, **74**, (1991), 85-93.

BEKERS O., UIJTENDAAL E.V., BEIJNEN J.H., BULT A. y UNDERBERG W.J.M. "Cyclodextrins in the pharmaceutical field". *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **17**, (1991), 1503-1549.

BELLAMY, L. J. "The infrared spectra of complex molecules". *Ed. Chapman and Hall London*, **1**, (1978), 542.

BERTRAND, N. y BARCELO, D. "Photodegradation of the carbamate pesticides aldicarb, carbaryl and carbofuran in water". *Anal. Chim. Acta*, **254**, (1991), 235-244.

BETTINETTI, G., GAZZANIGA, A., GIORDANO, F. y SANGALLI, M.E., "Thermal properties and mechanical stress of  $\beta$ -cyclodextrin". *Eur. J. Pharm Sci.*, **40**, (1994), 209-212.

BIZZIGOTTI, O. G., REYNOLDS, D. A. y KUEPER, B. H. "Enhanced Solubilization and Destruction of Tetrachloroethylene by Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin and Iron". *Environ. Sci. Technol.*, **31**, (1997), 472-478.



*Comportamiento del herbicida norflurazona en el sistema suelo-agua. Obtención, caracterización y aplicación de complejos de inclusión norflurazona-ciclodextrina.*

BLUMHORST, M. R. y WEBER, J. B. "Cyanazine dissipation as influenced by soil properties". *J. Agr. Food Chem.* **40**, (1992), 894-897.

BLUMHORST, M. R. y WEBER, J. B. "Chemical versus microbial degradation of cyanazine and atrazine in soils". *Pestic. Sci.* **42**, (1994), 79-84.

BODE, J.L. HAZEN y D.G. CHASIN, Eds., American Society for Testing and Materials, Philadelphia, 1990.

BORGGAARD, O.K. y STREIBIG, J.C. "Chlorsulfuron adsorption by humic acid, iron oxides, and montmorillonite." *Weed Sci.*, **36**, (1988) 530-34.

BORTOLUS, P. y MONTI, S. "Photochemistry in cyclodextrin cavities". *Adv. Photochem.*, **21**, (1996), 1-133.

BOVING, T. B. y BRUSSEAU, M.L. "Solubilization and removal of residual trichloroethene from porous media: comparison of several solubilization agents". *J. Cont. Hydrol*, **42**, (2000), 51-67.

BOYDSTON, R.A. "Controlled release starch granule formulations reduce herbicide leaching in soil columns". *Weed Technol.*, **6**, (1992), 317-321.

BROSSEAU, M. L., WANG, X. y HU, Q. "Enhanced transport of low-polarity organic compounds through soil by cyclodextrin". *Environ. Sci. Technol.*, **28**, (1994), 952-956.

BUHLER, D.D., KOSKINEN, W.C., SCHREIBER, M. y GAN, J. "Dissipation of alachlor, metolachlor and atrazine from starch-encapsulated formulations in a sandy loam soil". *Weed Sci.* **42**, (1994) 411-417.

*Comportamiento del herbicida norflurazona en el sistema suelo-agua. Obtención, caracterización y aplicación de complejos de inclusión norflurazona-ciclodextrina.*

BROWN N.D., BUTLER D.L. y CHIANG P.K., "Stabilization of thymopentin and preservation of its pharmacological properties by 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin". *J. Pharm. Pharmacol.*, **45**, (3), (1993), 666-667.

CARRIZOSA, M.J., KOSKINEN, W.C., HERMOSÍN, M.C. y CORNEJO, J. "Dicamba adsorption-desorption on organoclays". *Applied Clay Sci.*, **18**, (2001), 223-231.

CALVET, R., "Adsorption of organic chemicals in soils." *Environ. Health Persp.*, **88**, (1989), 145-177.

CELIS, R., HERMOSÍN, M.C., COX, L y CORNEJO, J. "Sorption of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid by model particles simulating naturally occurring soil colloids". *Environ. Sci. Technol.*, **33**, (1999), 1200-1206.

CHANDRAN, R. S. y SINGH, M. "Reduction of norflurazon leaching in a sandy soil by adjuvants". *B. Environ. Contam. Toxicol.*, **62**, (1999), 315-323.

CHAROENCHAITRAKOOL, M., DEGHANI F. y FOSTER N. R. "Utilization of supercritical carbon dioxide for complex formation of ibuprofen and methyl-cyclodextrin". *Int. J. Pharm.*, **239**, (2002), 103-112.

CHATTERJEE, S., SARKAR, S. y BHATTACHARYYA, N. "Photodegradation of phenol by visible light in the presence of colloidal  $Fe_2O_3$ ". *J. Photochem. Photobiol. A:Chem.*, **81**, (1994), 199-203.

CHOUDHURY S. y NELSON K.F., "Improvement of oral bioavailability of carbamazepine by inclusion in 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin". *Int. J. Pharm.*, **85**, (1992), 175-180.

*Comportamiento del herbicida norflurazona en el sistema suelo-agua. Obtención, caracterización y aplicación de complejos de inclusión norflurazona-ciclodextrina.*

CLAUDY, P., LETOFFE, J. M., GERMAIN, P., BASTIDE, J. P., BAYOL, A., BLASQUEZ, S., RAO, R. C. y GONZALEZ, B. “ Physicochemical characterisation of cholesterol-beta cyclodextrin complexes”. *J. Therm. Anal.*, **37**, (1991), 2497-2506.

COMFORT, S. D., INSKEEP, W. P. y MACUR, R. E. “Degradation and transport of dicamba in a clay soil”. *J. Environ. Qual.*, **21**, (1992), 653-658.

CONNORS, K.A. y ROSANSKE, T.W. “Trans-cinnamic acid- $\alpha$ -cyclodextrin system as studied by solubility, spectral and potentiometric techniques”. *J. Pharm. Sci.*, **69**, (2), (1980), 173-179.

COTTERILL, J.V. y WILKINS, R.M. “Controlled release of phenylurea herbicides from a lignin matrix: release kinetics and modification with urea”. *J. Agr. Food Chem.*, **44**, (1996), 2908-2912.

COTTERILL, J.V., WILKINS, R.M. y SILVA, F.T. “Controlled release of diuron from granules based on a lignin matrix system”. *J. Control Release*, **40**, (1996), 133-142.

COX, L., HERMOSÍN, M., C., CORNEJO, J. y MANSOUR, M. “Photolysis of metamitron in water in the presence of soils and soil components”. *Chemosphere*, **33**, (1996), 2057-2064.

CROMMELIN, D.J.A. y SCHREIER, H. “Liposomes. En: Kreuter”, *J. Ed. Colloidal Drug Delivery System. Marcel Dekker*, New York: (1994 ), 73-190.

CRINI G., BERTINI S., TORRI G., NAGGI A., SFORZINI D., VECHHI C., JANUS L., LEKCHIRI y MORCELLET M. “Sorption of Aromatic Compounds in Water Using Insoluble Cyclodextrin Polymers”. *J. Appl. Polym. Sci.*, **68**, (1998), 1973-1978.

*Comportamiento del herbicida norflurazona en el sistema suelo-agua. Obtención, caracterización y aplicación de complejos de inclusión norflurazona-ciclodextrina.*

CSERHATI, T., FORGAES, E. y OROS, G. “Biological activity and environmental impact of anionic surfactants”. *Environ. Int.*, **28**, (2002), 337-348.

CUNNINGHAM, K. M., GOLDBERG, M. C. y WEINER, E. R. “Mechanism for aqueous photolysis of adsorbed benzoate, oxalate, and succinate on iron oxyhydroxide (goethite) surfaces”. *Environ. Sci. Technol.*, **22**, (1988), 1090-1097.

DAILEY, O., D., DOWLER, C., C. y MULLINIX B. G.”Polymeric microcapsules of the herbicides atrazine and metribuzin: preparation and evaluation of controlled-release properties”. *J. Agr. Food Chem.*, **41**, (1993), 1517-1522.

DAILEY, O.D., BLAND, J.M. y TRASK-MORRELL, B.J., “Preparation and characterization of cyclodextrin complexes of the insecticides aldicarb and sulprofos”. *J. Agr. Food Chem.* **41**, (1993) 1767- 1772.

DAILEY, O., D. y DOWLER, C. C.” Polymeric microcapsules of cyanazine: preparation and evaluation of efficacy”. *J. Agr. Food Chem.*, **46**, (1998), 3823-3827.

DARVARI, R. y HASIRCI, V. “Pesticide and model drug release from carboxymethylcellulose microspheres”. *J. Microencapsul.* **13**, (1996), 9-24.

DAVIS, R.F., WAUCHOPE, R.D., JOHNSON, A.W., BURGOA, B., y 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.*, **44**, (1996), 2900-2907.

*Comportamiento del herbicida norflurazona en el sistema suelo-agua. Obtención, caracterización y aplicación de complejos de inclusión norflurazona-ciclodextrina.*

DIMOU, A. D., MANTIS, G. P., SAKKAS, V. A. y ALBANIS, T. A. "Photodegradation study of four selected pesticides in three different types of soil". 2<sup>a</sup> *European Conference on Pesticides and Related Organic Micropollutants in the Environment*, (1992).

DJEDAINI, F. y PERLY, B. "Nuclear magnetic resonance investigation of the stoichiometries in  $\beta$ -cyclodextrin: steroid inclusion complexes". *J. Pharm. Sci.*, **80**, (12), (1991), 1157-1161.

DJEDAINI, F., LIN, S.Z., PERLY, B. y WOUESSIDJEWE, D. "High-field nuclear magnetic resonance techniques for the investigation of a  $\beta$ -cyclodextrin: indomethacin inclusion complex". *J. Pharm. Sci.*, **79**, (7), (1990), 643-646.

EL AZZOUZI, M., MOUNTACER, H. y MANSOUR, M. "Kinetics of photochemical degradation of imazapyr in aqueous solution". *Fresenius Envir. B.*, **8**, (1999), 709-717.

EL-NAHHAL, Y., NIR, S., POLUBESOVA, T., MARGULIES, L. y RUBIN, B. "Leaching phytotoxicity and weed control of new formulations of alachlor". *J. Agr. Food Chem.*, **46**, (1998), 3305-3313.

EL-NAHHAL, Y., NIR, S., MARGULIES, L. y RUBIN, B. "Reduction of photodegradation and volatilization of herbicides in organo-clay formulations". *Appl. Clay Sci.*, **14**, (1999a), 105-149.

EL-NAHHAL, Y., NIR, S., POLUBESOVA, T., MARGULIES, L. y RUBIN, B. "Movement of metolachlor in soil: Effect of new organoclay formulations". *Pestic. Sci.*, **55**, (1999b), 1-8.

ERDEN, N y ÇELEBI, N. "A study of the inclusion complex of naproxen with  $\beta$ -cyclodextrin". *Int. J. Pharm.*, **48**, (1988), 83-89.

FENYVESI E., SZEMÁN J. Y SZEJTLI J. "Extraction of pahs and pesticides from contaminated soils with aqueous ciclodextrin solutions". *J. Inclus. Phenom. Mol.*, **25**, (1996), 229-232.

FERNÁNDEZ-PÉREZ, M., GONZÁLEZ-PRADAS y UREÑA-AMATE, M.D. "Controlled release of imidacloprid from a lignin matrix: water release kinetics and soil mobility study". *J. Agric. Food Chem.*, **46**, (1998), 3828-3834.

FERNÁNDEZ-PÉREZ, M., GONZÁLEZ-PRADAS, E., VILLAFRANCA-SÁNCHEZ, M. y FLORES-CÉSPEDES, F. "Mobility of isoproturon from an alginate-bentonite controlled release formulation in layered soil". *Chemosphere*, **41**, (2000a), 1495-1501.

FERNÁNDEZ-PÉREZ, M., GONZÁLEZ-PRADAS, E., VILLAFRANCA-SÁNCHEZ, M., FLORES-CÉSPEDES, F. y UREÑA-AMATE, M.D. "Bentonite and humic acid as modifying agents in controlled release formulations of diuron and atrazine". *J. Environ. Qual.*, **29**, (2000b), 304-310.

FERNÁNDEZ-PÉREZ, M., GONZÁLEZ-PRADAS, E., VILLAFRANCA-SÁNCHEZ, M. y FLORES-CÉSPEDES, F. "Mobility of isoproturon from an alginate-bentonite controlled release formulation in layered soil". *Chemosphere*, **41**, (2000), 1495-1501.

FERNÁNDEZ-PÉREZ, M., GONZÁLEZ-PRADAS, E., VILLAFRANCA-SÁNCHEZ, M. y FLORES-CÉSPEDES, F. "Mobility of atrazine from alginate-bentonite controlled release formulations in layered soil". *Chemosphere*, **43**, (2001), 347-353.

FERNÁNDEZ-URRUSUNO, R. GINÉS, J.M. y MORILLO, E. "Development of controlled release formulations of alachlor in ethylcellulose". *J. Microencapsul.*, **37**, (2000), 367-374.

FERRAZ, A., SOUZA, J.A., SILVA, F.T., GONCALVES, A.R., BRUNS, R.E., COTRIM, A.R. y WILKINS, R.M. "Controlled release of 2,4-D from granule matrix formulations based on six lignins". *J. Agr. Food Chem.*, **45**, (1997), 1001-1005.

FOY, C. L. "Influence of certain surfactants on the mobility of selected herbicides on soil". In: C. L. Foy (ed) *Adjuvants for Agrichemicals*, CRC Press, Boca raton, Florida, 349-366.

FRANCI, M., FUSI, P. y RISTORI, G. G. "The influence of structural characteristics of two smectites on linuron adsorption." *Agrochimica.*, **34**, (1990), 405-410.

FRIJLINK, H.W., SCHOONEN, A.J.M. y LERK, C.F. "The effects of cyclodextrins on drug absorption. I. *In vitro* observations". *Int. J. Pharm.*, **49**, (1989), 91-102.

FRONZA, G., MELE, A., REDENTI, E. y VENTURA, P. "Proton nuclear magnetic resonance spectroscopy studies of the inclusion complex of piroxicam with  $\beta$ -cyclodextrin". *J. Pharm. Sci.*, **81**, (12), (1992), 1162-1165.

FUOCO, R. y COLOMBINI, M. P. "Electrochemical and spectral evidence of the inclusion of the herbicide difenzoquat by cyclodextrins in aqueous solution". *J. Elec. Chem.*, **368**, (1994), 149-154.

GERBER, H.R., ZIEGLER, P. y DUBACH, P. "Leaching as a tool in the evaluation of herbicides". *Proc. Br. Weed Control Conf.*, **10**, (1970), 18-125.

*Comportamiento del herbicida norflurazona en el sistema suelo-agua. Obtención, caracterización y aplicación de complejos de inclusión norflurazona-ciclodextrina.*

GERSTL, Z., NASSER, A. y MINGELGRIN, U. "Controlled release of pesticides into soils from clay-polymer formulations". *J. Agr. Food Chem.*, **46**, (1998), 3797-3802.

GILES, C. H., MACEWAN, T. H., NEKHWA, S. N. y SMITH, D. "Studies in adsorption. Part: XI. A system of classification of solution adsorption isotherm, and its use in diagnosis of adsorption mechanisms and measurement of specific surface area of solids". *J. Chem. Soc.*, (1960), 3973-3993.

GINÉS, J.M., ARIAS, M.J., PÉREZ-MARTÍNEZ, J.I., MOYANO, J.R., MORILLO, E. y SÁNCHEZ-SOTO, P.J. "Determination of the stoichiometry of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid- $\beta$ -cyclodextrin complexes in solution and in solid state". *Thermochim. Acta*, **321**, (1998), 53-58.

GIORDANO, F., PAVAN, M., LA MANNA, A., BETTINETTI, G. P., PAVESI, L. y BOVIS, G. "Complexation behaviour of vinburnine with  $\beta$ - and  $\gamma$ -cyclodextrins in aqueous solution and in the solid state". *Il Farmaco ed. Pr.*, **43**, (1988), 345-355.

GIORDANO F. y LA MANNA A. "Molecular inclusion complexes with  $\beta$ -cyclodextrin". *J. Drug Dev.*, **4**, (1991), 13-15.

GLOMOT, F., BENKERROUR, L., DUCHENE, D. y POELMAN, M.C., "Improvement in availability and stability of a dermocorticoid by inclusion in  $\beta$ -cyclodextrin". *Int. J. Pharm.*, **46**, (1988), 49-55.

GOMEZ DE BARREDA y GAMÓN, M., LORENZO, E. y SÁEZ, A. "Residual herbicide movement in soil columns". *Sci. Total Environ.*, **132**, (1993), 155-165.



*Comportamiento del herbicida norflurazona en el sistema suelo-agua. Obtención, caracterización y aplicación de complejos de inclusión norflurazona-ciclodextrina.*

GONZALEZ-PRADAS, E., VILLAFRANCA-SANCHEZ, M., FERNANDEZ-PEREZ, M., SOCIAS-VICIANA, M. y UREÑA-AMATE, M. D. "Sorption and leaching of diuron on natural and peat-amended calcareous soil from Spain". *Wat. Res.*, **32**, (1998), 2814-2820.

GREEN, A.R., MILLER, E.S. y GUILLORY, J.K. "Physical properties of the complexes formed between heptakis (2,6-di-O-methyl)- $\beta$ -cyclodextrin and chlorambucil". *J. Pharm. Sci.*, **80**, (2), (1991), 186-189.

GWEN F. F., LOYD M. W. y WILLIAM SIMMONS F. "Leachability and efficacy of starch-encapsulated atrazine". *Weed Tech.*, **6**, (1992), 297-302.

HARTLEY, G. S. y GRAHAM-BRYCE, I. J. "Physical principles of pesticides behaviour". Academic Press, London (2 Vols.), 1980.

HELLING, C. S. "Pesticide mobility in soils. II. Applications of soil thin-layer chromatography". *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, **35**, (1971), 732-737.

HERBICIDE HANDBOOK. *Weed Science Society of America*. Seventh Edition (1994).

HICKMAN, M.V., VAIL, G.D. y SCHREIBER, M.M. "Controlled release formulations reduce atrazine leaching". *Weed Technol.*, **28**, (1999), 73-79.

HIGUCHI T. y CONNORS K.A. "Phase-solubility techniques". *Adv. Anal. Chem. Instr.*, **4**, (1965), 117-212.

*Comportamiento del herbicida norflurazona en el sistema suelo-agua. Obtención, caracterización y aplicación de complejos de inclusión norflurazona-ciclodextrina.*

HIRAYAMA, F., UTSUKI, T., UEKAMA, K., YAMASAKI, M. y HARATA, K. "Prominent inclusion effect of dimethyl- $\beta$ -cyclodextrin on photoisomerization of the thromboxane synthetase inhibitor (E)-4(1-imidazolylmethyl)cinnamic acid". *J. Pharm. Sci.*, **81**, (1992), 817-822.

HUBBS, C.W. y LAVY, T.L. "Dissipation of norflurazon and other persistent herbicides in soil". *Weed Sci.*, **38**, (1990), 81-88.

HULPKE, H., STEGH, R. y WILMES, R. "Light-induced transformation of pesticides on silica gel as a model for photodegradation in soil". *Pest. Chem. Human Welf. Environ.*, **3**, (1983), 265-316.

ISHIWATA, S. y KAMIYA, M. "Cyclodextrin inclusion: catalytic effects on the degradation of organophosphorus pesticides in neutral aqueous solution". *Chemosphere*, **39**, (1999), 1595-1600.

ISHIWATA, S. y KAMIYA, M. "Structural study on inclusion complexes of cyclodextrins with organophosphorus pesticides by use of rotational strength analysis method". *Chemosphere*, **41**, (2000), 701-704.

ISMAIL, S. "Interaction of anticonvulsivant drugs with alpha- and beta-cyclodextrins I. Methsuximide". *S.T.P. Pharma Sciences*, **1**, (5), (1991), 321-325.

ISMAIL, S. "Interaction of anticonvulsivant drugs with alpha- and beta-cyclodextrins II. Phensuximide". *S.T.P. Pharma Sciences*, **2**, (2), (1992), 181-185.

JACINTHE, P. A. y PICHTEL, J. R. "Interaction of nitrapyrin and dicyandiamide with soil humic compounds". *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **56**, (1992), 465-470.

*Comportamiento del herbicida norflurazona en el sistema suelo-agua. Obtención, caracterización y aplicación de complejos de inclusión norflurazona-ciclodextrina.*

JANA, T. K y DAS, B. "Sorption of carbaryl (1-naphthyl N-methyl carbamate) by soil". *B. Env. Contam. Tox.*, **59**, (1997), 65-71.

JIMÉNEZ, P. R. "Contenidos de elementos mayoritarios y minoritarios y su relación con propiedades fisico-químicas en perfiles de suelos de la provincia de Huelva". *Tesis doctoral, Universidad de Sevilla*, (1990).

JOB, P. "Recherches sur la formation de complexes minéraux en solution et sur leur stabilité". *Ann. Chim.*, **10**, (1928), 113-203.

JONES, M. N. y BRYAN, N. D. "Colloidal properties of humic substances". *Adv. coll. Interfac.*, **78**, (1999), 1-48.

JOHNSON, R.M. y PEPPERMAN, A.B. "Soil Column mobility of metribuzin from alginate-encapsulated controlled release formulations". *J. Agr. Food Chem.*, **43**, (1995), 241-246.

JOHNSON, R.M. y PEPPERMAN, A.B. "Release of atrazine and alachlor from clay-oxamide controlled-release formulations". *Pest. Sci.*, **53**, (1998), 233-240.

KAMIYA, M. NAKAMURA, K. y SASAKI, C. "Inclusion effect of cyclodextrins on photodegradation rate of parathion and paraoxon in aquatic medium". *Chemosphere*, **28**, (1994), 1961-1966.

KAMIYA, M. y NAKAMURA K. "Cyclodextrin inclusion effects on photodegradation rates of organophosphorus". *Environ. International*, **21**, (1995), 299-304.

*Comportamiento del herbicida norflurazona en el sistema suelo-agua. Obtención, caracterización y aplicación de complejos de inclusión norflurazona-ciclodextrina.*

KAMIYA, M., KAMEYAMA, K. y ISHIWATA, S. "Effects of cyclodextrins on photodegradation of organophosphorus pesticides in humic waters". *Chemosphere*, **42**, (2001), 251-255.

KANAZAWA, J. "Relationship between the soil sorption constants for pesticide adsorption and their physico-chemical properties". *Environ. Toxicol. Chem.*, **8**, (1989), 477-484.

KARAMETAXAS, G., HUG S. y SULZBERGER, B. "Photodegradation of EDTA in the presence of lepidocrocite". *Environ. Sci. Technol.*, **29**, (1995), 2992-3000.

KATAGI, T. "Photodegradation of the pyrethroid insecticide esfenvalerate on soil, clay minerals and humic acid surfaces". *J. Agr. Food Chem.*, **39**, (1993), 1351-1356.

KAWAHARA, K., UEDA, H., TOMONO, K. y NAGAI, T. "Effect of diethyl  $\beta$ -cyclodextrin on the release and absorption behaviour of indomethacin from ointment bases". *S.T.P. Pharma Sciences*, **2**, (6), (1992), 506-513.

KHAN, S. U. y SCHNITZER, M. "Irradiation of atrazine in aqueous fulvic acid solution". *J. Environ. Sci. Health B13*, **3**, (1978), 299-310.

KOHATA, S., JYODOI, K. y OHYOSHI, A. "Thermal decomposition of cyclodextrins ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -, and modified  $\beta$ -CyD) and of methal-( $\beta$ -CyD) complexes in the solid phase". *Thermochim. Acta*, **217**, (1993), 187-198.

KOK, F.N., WILKINS, R.M., CAIN, R.B., ARICA, M.Y., ALAEDDINOGLU, G. y HASIRCI, V. "Controlled release of aldicarb from lignin loaded ionotropic hydrogel microspheres". *J. Microencap.*, **16**, (1999), 613-623.

*Comportamiento del herbicida norflurazona en el sistema suelo-agua. Obtención, caracterización y aplicación de complejos de inclusión norflurazona-ciclodextrina.*

KOOKANA, R. S., DI, H. J. y AYLMOORE A. G. "A field study of leaching and degradation of nine pesticides in a sandy soil". *Aust. J. Soil Res.*, **33**, (1995), 1019-1030.

KRENN, M., GAMCSIK, M.P., VOGELSANG, G.B. y COLVING, O.M. "Improvements in solubility and stability of thalidomide upon complexation with hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin". *J. Pharm. Sci.*, **81**, (1992), 685-689.

KROGH, K. A., HALLING-SORENSEN, B., MOGSEN, B. B. y VEJRUP, K. V. "Environmental properties and effects of nonionic surfactant adjuvants in pesticides". A review, *Chemosphere*, **50**, (2003), 871-901.

LALAH, J. O. y WANDIGA, S. O. "Adsorption/desorption and mobility of carbofuran in soils samples from Kenya". *B. Environ. Contam. Tox.*, **59**, (1996), 575-586.

LEROY-LECHAT, F., WOUESSIDJEWE, D., HERRENKNECHT, C. y DUCHENE, D. "Preparation and stability of iodine/ $\alpha$ -ciclodextrin inclusion complex". *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **18**, (17), (1992), 1853-1863.

LIN, S.Y. "Effect of humidity on the formation and stability of acetaminophen- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complexes". *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **16**, (15), (1990), 2221-2241.

LIU, F. Y., KILDSIG, D. O. y MITRA, A. K. "Complexation of 6-acyl-O- $\beta$ -cyclodextrin derivatives with steroids. Effects of chain length and substitution degree". *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **18**, (1992), 1599-1612.

LIVERI, V.T., CAVALLARO, G., GIAMMONA, G., PITARRESI, G., PUGLISI, G. y VENTURA, C. "Calorimetric investigation of the complex formation between surfactants and  $\alpha$ - and  $\beta$ -cyclodextrins". *Thermochim. Acta*, **199**, (1992), 125-132.

*Comportamiento del herbicida norflurazona en el sistema suelo-agua. Obtención, caracterización y aplicación de complejos de inclusión norflurazona-ciclodextrina.*

LOHMANN, D.G. “Biodegradable polymers and additives in agricultural controlled release systems”. *Proceed. Int. Symp. Contamrol Rel. Bioact. Mater.*, **19**, (1992), 170-171.

LOUX, M.M.; LIEBL, R.A y SLIFE, F.W. “Adsorption of imazaquin and imazathapyr on soils, sediments, an selected adsorbents.” *Weed Sci.*, **37**, (1989), 712-18.

MA, L., SOUTHWICK, L.M., WILLIS, G.H. y SELIM, M. “Hysteretic characteristic of atrazine adsorption-desorption by a sharkey soil”. *Weed Sci.*, **41**, (1993), 627-633.

MADRID, L. y DÍAZ-BARRIENTOS, E. “Effect of phosphate on the adsorption of 2,4-D on lepidocrocite”. *Aust. J. Soil Res.*, **29**, (1991), 15-23.

MAQUEDA, C., PEREZ-RODRIGUEZ, J.L., MARTIN, F. y HERMOSIN, M.C. “A study of the interaction between chlordimeform and humic acid from a typic chromoxerert soil”. *Soil Sci.*, **136**, (1983), 75-81.

MAQUEDA, C., MORILLO, E. y PÉREZ-RODRÍGUEZ, J. L. “Interaction in aqueous solution of certain pesticides with fulvic acids from a podsol soil”. *Soil Sci.*, **148**, (1989), 336-345.

MAQUEDA, C., MORILLO, E., PÉREZ-RODRÍGUEZ, J. L. y JUSTO, A. “Adsorption of chlordimeform by humic substances from different soils.” *Soil Sci.*, **150**, (1990), 431-437.

MAQUEDA, C., LACHICA, M., DELGADO, M. y PEREZ-RODRIGUEZ, J.L. “Determinación de elementos traza y distribución en las distintas fracciones del suelo”. *Anal. Edaf. Agro.*, **33**, (1974), 663-678.

*Comportamiento del herbicida norflurazona en el sistema suelo-agua. Obtención, caracterización y aplicación de complejos de inclusión norflurazona-ciclodextrina.*

MAQUEDA, C., MORILLO, E., MARTÍN, F. y UNDABEYTIA, T. "Interaction of pesticides with the soluble fraction of natural and artificial humic substances." *J. Environ. Sci. Health*, **B28**, (1993), 655-670.

MAQUEDA, C., PEREZ-RODRIGUEZ, J., L. y EUGENIO, P. "Interaction of chlordimeform with the clay fraction of a variable-charge soil". *Soil Sci.*, **141**, (1986), 138-148.

MAQUEDA, C., MORILLO, E. y UNDABEYTIA, T. "Cosorption of glyphosate and copper (II) on goethite". *Soil Sci.*, (2002), **21**, 452-463.

MAQUEDA, C. Y MORILLO, E. "Sorption of chlormequat on montmorillonite as affected by dissolved copper. Influence of background electrolytes". *Clay Min.*, **36**, (1998), 473-481.

MANUNZA, B., DEIANA, S., PINTORE, M. y GESSA, C. "A molecular modeling study on the interaction between beta-cyclodextrin and the organophosphorothioate pesticide parathion". *J. Glyc.*, **2**, (1996), 1-8.

MANSOUR, M. y FEICHT, E. A. "Transformation of chemical contaminants by biotic and abiotic processes in water and soil". *Chemosphere*, **28**, (1994), 323-332.

MARGULIES, L., ROZEN, H. y COHEN, E. "Energy transfer at the surface of clays and protection of pesticides from photodegradation". *Nature*, **315**, (1985), 658-659.

MARGULIES, L., STERN, T., RUBIN, B. y RUZO, L.O. "Photostabilisation of trifluralin adsorbed on a clay matrix". *J. Agr. Food Chem.*, **40**, (1992), 152-155.

*Comportamiento del herbicida norflurazona en el sistema suelo-agua. Obtención, caracterización y aplicación de complejos de inclusión norflurazona-ciclodextrina.*

MARGULIES, L., ROZEN, H., STERN, T., RYTWO, G., RUBIN, B., RUZO, L.O. NIR, S. y COHEN, E. "Photostabilization of pesticides by clays and chromophores". *Arch. Insect. Biochem. Physiol.*, **22**, (1993), 467-486.

MARSHALL, M., WELLINGHOFF, S., BRAZEL, C., ALEXANDER, M. y AKATAGAWA, S. "Controlled delivery of pesticides through synthetic biodegradable polymer compositions. En: *Controlled Release Delivery Systems for Pesticides* (Scher, Ed.) Marcel Dekker, New York.,**4**, (1999), 117-212.

MATHEW, R. y KHAN, U. "Photodegradation of metolachlor in water in the presence of soil mineral and organic constituents". *J. Agr. Chem.*, **44**, (1996), 3996-4000.

MATSUDA, H., ITO, K., TANAKA, M., TAKI, A. y SUMIYOSHI, H. "Inclusion complexes of various fragrance materials with 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin". *S.T.P. Pharma. Sciences*, **1**, (3), (1991), 211-215.

MATSUYAMA, K., EL-GIZAWY, S. y PERRIN, J.H. "Thermodynamics of binding of aromatics aminoacids to  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -cyclodextrin". *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **13**, (15), (1987), 2687- 2691.

MAZA, J., JIMENEZ-LOPEZ, A. y BRUQUE, S. "Interaction of chlorocholine chloride with montmorillonite". *Soil Sci.*, **147**, (1989), 11-16.

MAZZI, G., VINCIERI, F.F., FORNI, F., MULINACCI, N. y CELLI, S. "Formation of inclusion complex between the non-steroidal anti-inflammatory drug (RS)-2-(4-isobutylphenyl)-propiohydroxamic acid and  $\beta$ -cyclodextrin". *Acta Pharm. Technol.*, **34**, (1), (1988), 17 -21.



*Comportamiento del herbicida norflurazona en el sistema suelo-agua. Obtención, caracterización y aplicación de complejos de inclusión norflurazona-ciclodextrina.*

MC. CRAY J. E. y BRUSSEAU M. L. "Cyclodextrin-Enhanced in situ Flushing of Multiple-Component Immiscible Organic Liquid Contamination at the Field Scale: Mass Removal Effectiveness". *Environ. Sci. Technol.*, **32**, (9), (1998), 1285-1293.

MC KEAGUE, J. A., BRYDON, J. E. y MILES, N. M. "Differentiation of forms of extractable iron and aluminium in soils". *Soil. Sci. Soc. Am. Proc.*, **35**, (1971), 33-38.

MERVOSH, T.L., STOLLER, E.W., SIMMONS, F.W., ELLSWORTH, T., y SIMS, G.K. "Effects of starch encapsulation on clomazone and atrazine movement in soils and clomazone volatilization". *Weed Sci.*, **43**, (1995), 445-453.

MICHOT, L.J. y PINNAVAIA, T.J. "Adsorption of chlorinated phenols from aqueous solution by surfactant modified pillared montmorillonites". *Clays Clay Miner.*, **39**, (1991), 634-641.

MILLS, M.S. y THURMAN, E.M. "Reduction of nonpoint-source contamination of surface and groundwater by starch encapsulated atrazine". *Environ. Sci. Technol.*, **28**, (1994), 73-79.

MISHAEL, G.Y., RYTWO, G., NIR, S., CRESPIAN, M., ANNABI-BERGAYA y F. VAN DAMME, H. "Interactions of monovalent organic cations with pillared clays". *J. Colloid. Interface Sci.*, **209**, (1999), 123-129.

MISHAEL, G. Y., UNDABEYTIA, T., RABINOVITZ, O., RUBIN, B y NIR, S. "Slow-release formulations of sulfometuron incorporated in micelles adsorbed on montmorillonite". *J. Agric. Food Chem.*, **50**, (2002a), 2864-2869.

*Comportamiento del herbicida norflurazona en el sistema suelo-agua. Obtención, caracterización y aplicación de complejos de inclusión norflurazona-ciclodextrina.*

MISHAEL, G.Y., UNDABEYTIA, T., RYTWO, G., PAPABADPOPOULOS-STENBERG, B. y RUBIN, B. y NIR, S. "Sulfometuron incorporation in cationic micelles adsorbed on montmorillonite". *J. Agric. Food Chem.*, **50**, (2002b), 2856-2863.

MOREAU-KERVEVAN, C. y MOUVET, C. "Adsorption and desorption of atrazine, deethylcatriazine, and hydroxyatrazine by soil components". *J. Environ. Qual.*, **46**, (1998), 46-53.

MORILLO, E., PÉREZ-RODRÍGUEZ, J. L. y MAQUEDA, C. "Mechanisms of interaction between montmorillonite and 3-aminotriazole." *Clay Miner.*, **26**, (1991), 269-279.

MORILLO, E. y MAQUEDA, C. "Simultaneous adsorption of chlordimeform and zinc on montmorillonite". *Sci. Total Environ.*, **123/124**, (1992), 133-143.

MORILLO, E., PEREZ-RODRIGUEZ, J. L., RODRIGUEZ-RUBIO, P. y MAQUEDA, C. "Interaction of aminotriazole with montmorillonite and Mg-vermiculite at p-44". *Clay Min.*, **32**, (1997a), 307-313.

MORILLO, E., UNDABEYTIA, T. y MAQUEDA, C. "Adsorption of glyphosate on the clay mineral montmorillonite: effect of Cu (II) in solution and adsorbed on the mineral". *Environ. Sci. Technol.*, **31**, (1997b), 3588-3592.

MORILLO, E., FERNÁNDEZ-URRUSUNO, R., ARIAS, M.J., PÉREZ-MARTÍNEZ, J.I. y GINÉS, J.M. "Study of complexation between the pesticide chlorpyrifos and  $\beta$ - and HP- $\beta$ -cyclodextrins". *Proc. 9th Int. Symp. on Cyclodextrins. Torres Labandeira and Vila Jato (eds.). Kluwer Academic Publishers: (1998), 595-599.*

MORILLO, E., UNDABEYTIA, T., MAQUEDA, C. y RAMOS, A. "Glyphosate adsorption on soils of different characteristics. Influence of copper addition", *Chemosphere*, **40**, (2000), 103-107.

MORILLO, E., PÉREZ-MARTÍNEZ, J.I. y GINÉS, J.M. "Leaching of 2,4-D from a soil in the presence of  $\beta$ -cyclodextrin: laboratory columns experiments". *Chemosphere*, **44**, (2001), 1065-1069.

MORILLO, E., MAQUEDA, C., REINOSO, R., y UNADABEYTIA, T. (2002). "Effect of two organic amendments on norflurazon retention and release by soils of different characteristics". *Environ. Sci. Technol.*, **36**, (2002), 4319-4325.

MORTLAND, M.M. "Pyridinium montmorillonite complexes with ethyl N,N-di-n-propylthiocarbamate (EPTC)". *J. Agr. Food Chem.*, **16**, (1968), 706-707.

MOYANO, J. R., GINES, J. M., ARIAS, M. J. y RABASCO, A. M. " Evaluation of dissolution characteristic of Oxacepam-2-Hydroxypropyl cyclodextrin binary system". *Pharm. Acta Helv.*, **69**, (1994), 81-90.

MOYANO J.R., ARIAS-BLANCO M.J., GINÉS J.M. y GIORDANO F. "Study of complexation behaviour of gliclazide with partially methylated  $\beta$ -cyclodextrin in solution and solid state". *Int. J. Pharm.*, **157**, (1997), 239-243.

MUÑOZ-BOTELLA, S., MARTÍN, M. A., DEL CASTILLO, B., MENÉNDEZ, J. C., VÁZQUEZ, L. y LERNER, D. A. "Analytical applications of retinoid-cyclodextrin inclusion complexes. 1. Characterization of a retinal-beta-cyclodextrin complex". *J. of Pharm. and Biom. Anal.*, **14**, (1996), 909-915.

*Comportamiento del herbicida norflurazona en el sistema suelo-agua. Obtención, caracterización y aplicación de complejos de inclusión norflurazona-ciclodextrina.*

NAKAI, Y., YAMAMOTO, K., TERADA, K. y EL-GENDY, G.A. "Effects of solid dispersion with Heptakis-(2,6-di-O-methyl)- $\beta$ -cyclodextrin on the dissolution and sublimation of naphthalene". *Chem. Pharm. B.*, **36**, (1988), 4039-4044.

NIR, S., BENTZ, J., WILSCHUT, J. y DUZGUNES, N. "Aggregation and fusion of phospholipid vesicles". *Progress in Surface Science, Vol 13. Pergamon Press:* (1983), 1-124.

NIR, S., UNDA BEYTIA, T., YARON-MARCOVICH, D., EL-NAHHAL, Y., POLUBESOVA, T., SERBAN, C., RYTWO, G., LAGALY, G. y RUBIN, B. "Optimization of adsorption of hydrophobic herbicides on montmorillonite preadsorbed by monovalent organic cations: Interaction between phenyl rings". *Environ. Sci. Technol.*, **42**, (2000), 645-659.

NOVAK, C., ARIAS, M.J., GINES, J.M., IZVEKOV, V. y POKOL, G. "Investigation of the cyclodextrin complexes of mandelic acid derivatives". *Proceedings 7<sup>th</sup> International Cyclodextrins Symposium, Tokyo, Abril, (1994), 206-209.*

OLIVER, D.D., CLYDE, C.D. y NORMAN, C.G. "Evaluation of cyclodextrin complexes of pesticides for use in minimization of groundwater contamination". *Pesticide Formulations and Applications Systems: 10<sup>th</sup> Volume, ASTM STP 1078, L.E.*

ORR, G.L. y HOGAN, M.E. "UV-A photooxidation of b-carotene in Triton X-100 micelles by nitrodiphenyl ether herbicides". *J. Agr. Food Chem.* **33**, (1985), 968-972.

PEPPERMAN, A.B. y KUAN, J.W. "Slow release formulations of metribuzin based on alginate-kaolin-linseed oil". *J. Control Rel.*, **26**, (1993), 21-30.

*Comportamiento del herbicida norflurazona en el sistema suelo-agua. Obtención, caracterización y aplicación de complejos de inclusión norflurazona-ciclodextrina.*

PEREZ-MARTINEZ J.I., GINES J.M., ARIAS M.J., MOYANO J.R., RABASCO A.M. y MORILLO E. "Preparation and characterization of 2,4-D complexes with beta-cyclodextrin", *Proceedings of 14<sup>th</sup> Pharmaceutical Technology Conference, Barcelona, Abril*, (1995), 235-251.

PÉREZ-MARTÍNEZ. J. I., ARIAS, M. J., GINÉS, J. M, MOYANO, J. R, MORILLO, E, SÁNCHEZ-SOTO, P. J. y NÓVÁK Cs. "2,4-D- $\alpha$ -Cyclodextrin complexes, preparation and characterisation by thermal analysis". *J. Therm. Anal.*, **51**, (1998), 965-972.

PÉREZ-MARTÍNEZ. J. I., GINÉS, J. M., MORILLO, E. y MOYANO, J. R. "<sup>1</sup>H-Nuclear magnetic resonance and phase solubility studies of the stoichiometries in 2,4-D:  $\alpha$ - and  $\beta$ -cyclodextrins inclusion complexes". *J. Inclus. Phenom. Macr. Chem.*, **37**, (2000a), 171-178.

PÉREZ-MARTÍNEZ. J. I., GINÉS, J. M., MORILLO, E., ARIAS, M. J. y MOYANO, J. R. "Improvement of the desorption of the pesticide 2,4-D via complexation with HP- $\beta$ -Cyclodextrin". *Pestic. Sci.*, **56**, (2000b), 425-430.

PÉREZ-MAQUEDA, L. J., CRIADO, M., REAL, C. y SUBRT, J. "The use of constant rate thermal analysis (CRTA) for controlling the texture of the hematite obtained from the thermal decomposition of goethite". *J. Mater. Chem.*, **9**, (1999a), 1839-1845.

PÉREZ-MAQUEDA, L. J., CRIADO, M., SUBRT, J. y REAL, C. "Syntesis of acicular hematite catalyst with humic substances and its iron complex". *Catal. Lett.*, **60**, (1989), 51-156.

PICCOLO, A., CELANO, G. y CONTE, P. "Interactions between herbicides and humic substances." *Pestic. Outlook*, **7**, (1996), 21-24.

*Comportamiento del herbicida norflurazona en el sistema suelo-agua. Obtención, caracterización y aplicación de complejos de inclusión norflurazona-ciclodextrina.*

PITHA, J., ANAISSIE, E.J. y UEKAMA, K. "γ-cyclodextrin: testosterone complex suitable for sublingual administration". *J. Pharm. Sci.*, **76**, (10), (1987), 788-790.

POLUBESOVA, T., UNDABEYTIA, T., NIR, S., CHERTKOVA, L. VAN DAMME, H. y ANNABI-BERGAYA, F. "Adsorption of sulfometuron and other anions on pillared clay". *J. Environ. Qual.* **29**, (2000), 948-954.

PRASAD, M.P. y KALYANASUNDARAM, M. "Effect of the incorporation of gelatin, an interactive polymer, on the matrix stability and release of fenthion from crosslinked matrices of carboxymethylcellulose". *J. Control Rel.*, **27**, (1993), 219-225.

PUGLISI, G., SANTAGATI, N.A., PIGNATELLO, R., VENTURA, C., BOTTINO, F.A., MANGIAFICO, S. y MAZZONE, G. "Inclusion complexation of 4-biphenylacetic acid with β-cyclodextrin". *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **16**, (3), (1990), 395-413.

PUSINO, A., MICERA, G. y GESSA, C. "Interaction of herbicide acifluorfen with montmorillonite: formation of insoluble Fe (III), Al (III) and Ca (II) complexes." *Clay Clay Miner.*, **39**, (1991), 50-53.

REDDY, K.N., SINGH, M. y ALVA, A.K. "Sorption and desorption of diuron and norflurazon in Florida citrus soils". *Water Air Soil Poll.* **64**, (1992), 487-494.

REID, B.J., STOKES, J.D., JONES, K.C. y SEMPLE, K.T. "Nonexhaustive cyclodextrin-based extraction technique for the evaluation of PAH bioavailability". *Environ. Sci. Technol.*, **34**, (2000) 3174-3179.

ROLDÁN, I., HERMOSÍN, M. C. y CORNEJO, J. "Interaction of a pyridazine herbicide with montmorillonite and lepidocrocite." II. Workshop Pesticides-soils. Alicante, (1991).

*Comportamiento del herbicida norflurazona en el sistema suelo-agua. Obtención, caracterización y aplicación de complejos de inclusión norflurazona-ciclodextrina.*

ROLDÁN, I.; HERMOSÍN, M.C. y CORNEJO, J. “Interaction of pyridazine herbicide with montmorillonite and lepidocrocite.” II. Work shop Pesticides soils. Alicante, (1991).

ROOF, A.A.M. “Basic principles of environmental photochemistry”. *The handbook of Environmental Chemistry*, **2**, (1982), Part. B.

SÁNCHEZ-CAMAZANO, M. J. SÁNCHEZ-MARTÍN, E. POVEDA y E. IGLESIAS-JIMÉNEZ. “Study of the effect of exogenous organic matter on the mobility of pesticides in soils using soil thin-layer chromatography”. *J. Chrom. A*, **754**, (1996), 279-284.

SANCHEZ-CAMAZANO, M., SANCHEZ-MARTIN, M. J. y RODRIGUEZ-CRUZ, M. S. “Sodium dodecyl sulphate-enhanced desorption of atrazine: effect of surfactant concentration and of organic matter content of soils”. *Chemosphere*, **41**, (2000), 1301-1305.

SÁNCHEZ-MARTÍN, M. J. y SÁNCHEZ-CAMAZANO, M. “Adsorption of chloridazon by montmorillonite”. *Chemosphere*, **16**, (1987), 937-944.

SCOTT, R.L. “Some comments on the Benesi-Hildebrand equation”. *Rec. Trav. Chim.* **75**, (1956), 787-789.

SHANGRAW, R.F., PANDE, G.S. y GALA, P. “Characterisation of the tableting properties of  $\beta$ -cyclodextrin and the effects of processing variables on inclusion complex formation, compactibility and dissolution”. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **18**, (1992), 1831-1851.

*Comportamiento del herbicida norflurazona en el sistema suelo-agua. Obtención, caracterización y aplicación de complejos de inclusión norflurazona-ciclodextrina.*

SCHER, H.B. (ED.) "Controlled-Release Delivery Systems for Pesticides". Marcel Dekker, New York", (1999).

SINGH, M. y AGARWAL, S. P. "Preparation and characterization of sparfloxacin-beta-cyclodextrin complexes" *Die Pharm.*, **57**, (2002), 505-506.

SINGH, M., TAN, S. y SHARMA, D. "Leaching and sorption of norflurazon in soils as affected by cationic surfactants". *B. Environ. Contam. Toxicol.*, **68**, (2002), 901-907.

SINGH, M., SHARMA, R. y BANERJEE, U. C. "Biotechnological applications of cyclodextrins". *Biotech. Adv.*, **20**, (2002), 341-359.

SMITH, A. E. y AUBIN, A. J. "Degradation of [<sup>14</sup>C] amidosulfuron in aqueous buffers and in acidic soil". *J. Agr. Food. Chem.*, **22**, (1993), 2400-2403.

SOCIAS-VICIANA, M.M., HERMOSÍN, M.C. y CORNEJO, J. "Removing prometryn from water by clays and organic clays". *Chemosphere*, **37**, (1998), 289-300.

SRINIVASAN, K.R. y FOGLER, H.S. "Use of inorgano-organoclay in the removal of priority pollutants from industrial waste waters". *Clay Clay Miner.* **38**, (1990), 277-293.

STEFFAN, B., FISCHER, W., CORDES, G., HABON, I. y MÜLLER, R. "<sup>1</sup>H-nuclear magnetic resonance (NMR) studies on the inclusion complex of prostaglandin E<sub>1</sub> (PGE<sub>1</sub>) with α-cyclodextrin". *Pharm. Res.*, **9**, (4), (1992), 575-577.

SUBA, J.D. y ESSINGTON, M.E. "Adsorption of fluometuron and norflurazon: effect of tillage and dissolved organic carbon". *Soil Sci.*, **164**, (1999), 145-155.



*Comportamiento del herbicida norflurazona en el sistema suelo-agua. Obtención, caracterización y aplicación de complejos de inclusión norflurazona-ciclodextrina.*

SUENAGA, A., BEKERS, O., BEIJNEN, J.H., UNDENBERG, W.J.M., TANIMOTO, T., KOIZUMI, K. y OTAGIRI, M. "Stabilisation of daunorubicin and 4-demethoxydaunorubicin on complexation with octakis(2,6-di-*O*-methyl)- $\gamma$ -cyclodextrin in acidic aqueous solution". *Int. J. Pharm.*, **82**, (1992), 29-37.

SUN, Y., y PIGNATELLO, J. J. "Photochemical reactions involved in the total mineralization of 2,4-D by  $\text{Fe}^{3+}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$ ". *Environ. Sci. Technol.*, **27**, (1993), 304-310.

SUNDARAM, K. M. S., y CURRY J. "Effect of some UV light absorbers on the photostabilization of azadirachtin, a neembased biopesticide". *Chemosphere*, **32**, (1996), 649-659.

SZAFRANEK, A. y SZAFRANEK, J. "Thermogravimetric properties of inclusion complexes of  $\beta$ -cyclodextrin with benzene, acetylsalicylic acid and methyl salicylate". *J. Inclus. Phenom.*, **15**, (1993), 351-358.

SZEJTLI, J. "Cyclodextrins and their Inclusion Complexes". Akadémiai Kiadó, Budapest, (1982).

SZEJTLI, J. "Cyclodextrins in pesticides". *Cyclodextrin Technology*. Reidel, Dordrecht, (1988).

SZENTE, L. "Stable controlled-release organophosphorous pesticides entrapped in  $\beta$ -cyclodextrin". *J. Therm. Anal.*, **51**, (1998), 957-963.

TABOADA, E. R., DEKKER, A., VAN KAMMEN-POLMAN, A., SMELT, J. H., BOESTEN, J. y LEISTRA, M. "Adsorption, degradation and leaching of pirimicarb in orchard soils". *Sci. Total Environ.*, **153**, (1994), 253-260.

*Comportamiento del herbicida norflurazona en el sistema suelo-agua. Obtención, caracterización y aplicación de complejos de inclusión norflurazona-ciclodextrina.*

TAN, X. y LINDENBAUM, S. "Studies on complexation between  $\beta$ -cyclodextrin and bile salts". *Int. J. Pharm.*, **74**, (1991), 127-135.

UEKAMA, K., NARISAWA, S., HIRAYAMA, F., OTAGIRI, M., KAWANO, K., OHTANI, T. y OGINO, H. "Improvement of thermal and photochemical stability of benzaldehyde by cyclodextrin complexation". *Int. J. Pharm.*, **13**, (1983), 253-261.

UEKAMA, K., IKEGAMI, K., WANG, Z., HORIUCHI, Y. y HIRAYAMA, F. "Inhibitory effect of 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin on crystal growth of nifedipine during storage: superior dissolution and oral bioavailability compared with polyvinylpyrrolidone K-30". *J. Pharm. Pharmacol.*, **44**, (1992), 73-78.

UKRAINCZYK, L. y AJWA, H.A. "Pimisulfuron adsorption on minerals and soils." *Soil Sci. Am. J.*, **60**, (1996), 460-67.

UNDABEYTIA, T. MORILLO, E. y MAQUEDA C. "Simultaneous adsorption of cadmium and a cationic pesticide on montmorillonite". *Toxicol. Environ. Chem.*, **43**, (1994), 77-84.

UNDABEYTIA, T., NIR, S., POLUBESOVA, T., RYTWO, G., MORILLO, E. Y MAQUEDA, C. "Adsorption-desorption of chlordimeform on montmorillonite: effect of clay aggregation and competitive adsorption with cadmium". *Environ. Sci. Technol.*, **33**, (1999), 864-869.

UNDABEYTIA T., NIR S. y RUBIN B. "Organo-clay formulations of the hydrophobic herbicide norflurazon yield reduced leaching". *J. Agr. Food Chem.*, **48**, (2000a), 4767-4773.

UNDABEYTIA T., NIR S., TEL-OR E y RUBIN B. "Phoestabilization of the herbicide norflurazon by using organoclays". *J. Agr. Food Chem*, **48**, (2000b), 4774-4779.

VAN DOORNE, H. y BOSCH, E.H. "Stability and in vitro activity of nystatin and its  $\gamma$ -cyclodextrin complex against *Candida albicans*". *Int. J. Pharm.*, **73**, (1991), 43-49.

VAN GENUCHTEN, M.T., WIERENGA, P.J. y O'CONNOR, G.A. "Mass transfer studies in sorbing porous media: III experimental evaluation with 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid". *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **41**, (1997), 278-285.

VAN OLPHEN, H y FRIPIAT, J. J. *Data Handbook for Clay Minerals and other Non-metallic Minerals*. Pergamon, Oxford. (1979).

VIALATION, D., BAGLIO, D., PAYA-PÁEZ, A. y RICHARD C. "Photochemical transformation of acifluorfen under laboratory and natural conditions". *Pestic. Sci.*, **57**, (2001), 372-379.

VILLEDIEU, J.C., SAVIGNAC, A. y CALMON, J.P. "Kinetics and mechanisms of hydrolysis of dicarboximide fungicides in micellar media". *J. Agr. Food Chem.*, **43**, (1995), 1948-1953.

WANG, X. y BRUSSEAU, M.L "Solubilization of some low polarity organic compounds by HP- $\beta$ -CD". *Environ. Sci. Technol.*, **27**, (1993), 2821-2825.

WANG, X. y BRUSSEAU, M. L. "Simultaneous Complexation of Organic Compounds and Heavy Metals by a Modified Cyclodextrin". *Environ. Sci. Technol.*, **29**, (1995), 2632-2635.

*Comportamiento del herbicida norflurazona en el sistema suelo-agua. Obtención, caracterización y aplicación de complejos de inclusión norflurazona-ciclodextrina.*

WALKER, A. "Activity and selectivity in the field". In: RJ Hance (ed), *Interactions between herbicides and the soil*. Academic press, New York, 203-235.

WEBER, J. B., SHEA, P. J. y WEED, S. B. "Fluridone retention and release in soils". *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* **50**, (1986), 582-588.

WEBER, J. B. y SWAIN, L. R. "Sorption of diniconazole and metolachlor by four soils, calcium-organic matter and calcium-montmorillonite". *Soil Sci.*, **156**, (1993) 171-177.

WEBER, J. B. "Mobility of fomesafen and atrazine in soil columns under saturated- and unsaturated- flow conditions". *Pestic. Sci.*, **39**, (1993), 39-46.

WEBER, J. B. "Properties and behaviour of pesticides in soil. En: Mechanisms of pesticide movement into groundwater". *Honeycutt & Schabacker (eds). Lewis Publishers*, (1994).

WHITE, R. E., DYSON, J. S., GERSTL, Z. y YARON, B. "Leaching of herbicides through undisturbed cores of a structured clay soil". *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **50**, (1986), 277-283.

WIETERSEN, R. C., DANIEL, T. C., FERMANICH, K. J., LOWERY, B. y MCSWEENEY, K. "Irrigation and polymer effects on herbicide transport through the unsaturated zone of Sparta." *Sand. J. Environ. Qual.*, **22**, (1993), 819-824.

WILKINS, R.M. "Lignins as formulating agents for controlled release in agriculture". *Brit. Polymer. J.*, **17**, (1983), 177-178.

*Comportamiento del herbicida norflurazona en el sistema suelo-agua. Obtención, caracterización y aplicación de complejos de inclusión norflurazona-ciclodextrina.*

WORRALL, F., FERNANDEZ-PEREZ, M., JOHNSON, A. C., FLORES-CESPEREDES y GONZALEZ-PRADAS, E. "Limitations on the role of incorporated organic matter in reducing pesticide leaching". *J. Cont. Hydrol.*, **49**, (2001), 241-262.

YAW-JIAN, L., MAKESH, K., ANUGRAH, S. y GIAN, G. "Effect of simulated sunlight on atrazine and metolachlor toxicity of surface waters". *Ecotox. Environ. Safe*, **43**, (1999), 35-37.

ZEPP, R.G. "Experimental approaches to environmental photochemistry". *The handbook of Environmental Chemistry*, **2**, (1982), Part. B.

ZEPP, R.G., SCHLOTZHAUER, P. F., y SINK, R. M. "photosensitized transformations involving electronic energy transfer in neutral waters: role of humic substances". *Environ. Sci. Technol.*, **19**, (1985), 74-81.

ZHAO, J. y WILKINS, R.M. "Controlled release of a herbicide from matrix granules based on solvent-fractionated organosolv lignins". *J. Agric. Food Chem.*, **48**, (2000), 3651-3661.

ZHU, Z. y ZHUO, R. "Slow release behavior of starch-g-poly(vinylalcohol) matrix for 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid herbicide". *European Polymer J.*, **37**, (2001), 1913-1919.

ZIELKE, R.C. y PINNAVAIA, T.J. "Modified clay for the adsorption of environmental toxications: binding of chlorophenols to pillared, delaminated and hydroxyinterlayered smectites". *Clay Clay Miner.*, **36**, (1988), 403-406.