

## EFFECTO DE CICLODEXTRINAS EN LA BIODEGRADACIÓN NATURAL DE DIURÓN EN UN SUELO CONTAMINADO.

Rubio-Bellido, M.; Villaverde, J.; Posada-Baquero, R.; Morillo, E.

Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología (IRNAS-CSIC), Apartado 1052, 41080 Sevilla, Spain.

Mrubio@irnase.csic.es

### RESUMEN

La estructura química del herbicida diurón le confiere un importante carácter hidrofóbico que está relacionado con su elevada persistencia en el suelo, además de la presencia de cloro que hace de este herbicida un compuesto con propiedades tóxicas y de difícil eliminación en suelos contaminados a través de la flora autóctona del mismo. Además, la biodegradación de diurón da lugar a la formación, principal metabolito, un compuesto altamente tóxico y persistente en el suelo, como es la 3,4-dicloroanilina.

Con el fin de encontrar procedimientos que podrían resultar en una mejora de la biodisponibilidad de diurón, se han utilizado moléculas biodegradables como las ciclodextrinas capaces de formar complejos de inclusión en solución con compuestos hidrofóbicos. En los estudios de solubilidad del plaguicida con las diferentes ciclodextrinas seleccionadas se obtuvieron los mejores parámetros de complejación con hidroxipropil-BCD (HPBCD) con un valor de la constante de complejación de  $207.70 \text{ M}^{-1}$ .

La biodisponibilidad del diurón fue probada en un suelo franco arenoso. Se confirmó mediante el control de la producción de  $^{14}\text{CO}_2$  que la propia flora endógena junto a una solución de micronutrientes (oligoelementos) fue capaz de mineralizar hasta un 44%. Sin embargo, se mejoró cuando se empleó una solución de HPBCD como potenciador de la biodisponibilidad, y los micronutrientes como bioestimulantes, obteniendo un 66% de mineralización.

**Palabras clave:** Ciclodextrina, Diurón, biorecuperación, biodisponibilidad, atenuación natural.

### INTRODUCCIÓN

El diurón es un herbicida biológicamente activo que se encuentra frecuentemente en suelos, agua y sedimentos. El diurón se une fuertemente a la materia orgánica del suelo, y como consecuencia, se degrada lentamente en el medio ambiente. Sin embargo, los procesos de biodegradación constituyen el principal mecanismo de disipación de diurón en suelos y en agua (Sorensen et al., 2003; Qureshi et al., 2008).

En este trabajo se han usado ciclodextrinas (CDs), oligosacáridos cíclicos constituidos por un número variable de unidades de glucosa unidas por enlaces  $\alpha$ -(1,4) capaces de formar complejos de inclusión con numerosos compuestos hidrofóbicos, debido a su conformación toroidal o de "Donut", que delimita una cavidad relativamente apolar, mientras que el exterior presenta una naturaleza hidrofílica.

El objetivo de este trabajo es encontrar correlaciones entre este aumento de la solubilidad, el porcentaje de desorción del suelo, y la biodisponibilidad por medio de ensayos de mineralización que confirmen la degradación completa de este plaguicida.

### MATERIALES

Se ha utilizado diurón en polvo (pureza > 98%), suministrado por Sigma Aldrich (Madrid, España). El diurón marcado radiactivamente (anillo -U-  $^{14}\text{C}$ ) fue suministrado por el Instituto de Isótopos Co., Ltd., (Budapest, Hungary).

Las CDs empleadas fueron  $\beta$ -CD (BCD), hidroxipropil-  $\beta$ -CD (HPBCD),  $\gamma$ -CD (GCD) e hidroxipropil- $\gamma$ -CD (HPGCD), procedentes de Cyclolab. (Budapest, Hungría), con una pureza química del 97%.

Los componentes coloidales del suelo utilizados en este trabajo fueron: el mineral de la arcilla montmorillonita (SWy), suministrado por Source Clay Minerals Repository (Missouri, USA); un ácido húmico sintético (HA), suministrado por Fluka (España) y una goetita acicular sintética (GT).

A continuación, se presenta la tabla de los dos suelos empleados con sus diferentes propiedades físico-químicas.

TABLA 1. Características de los suelos usados en este estudio.

Suelos	Clasificación textural	pH	CaCO <sub>3</sub> (%)	Materia orgánica (%)	Arena (%)	Limo (%)	Arcilla(%)
I	Franco arenoso	8.7	6.9	1.0	82.3	4.1	13.5
II	Franco arena arcilloso	5.1	0.5	14.0	69.1	7.8	23.1

## MÉTODOS

### ESTUDIOS DE SOLUBILIDAD DE DIURÓN CON LAS CICLODEXTRINAS SELECCIONADAS

El estudio de solubilidad se llevó a cabo de acuerdo con el método descrito por Higuchi y Connors (1965). El diurón se añadió en cantidades que excedían de su solubilidad teórica a 25 °C, añadiendo 5 mg a 5 mL de la solución de CD a distintas concentraciones crecientes (0-0.014M para BCD; 0-0.05M para GCD; y, 0-0.1 M para HPBCD y HPGCD). El ensayo se hizo en viales de 10 mL, los cuales se pusieron en agitación, a 25°C, durante una semana. Las soluciones de los sobrenadantes así obtenidas fueron filtradas y posteriormente analizadas por HPLC asociado a un detector UV a una longitud de onda de 230 nm. A partir de los diagramas de solubilidad se determinaron las constantes de formación de los complejos mediante la ecuación:  $K_{1:1}$  pendiente/ $S_0(1$ -pendiente).

### ISOTERMA DE ADSORCIÓN DE DIURÓN SOBRE DISTINTOS COMPONENTES COLOIDALES Y SUELOS.

Para medir la capacidad de adsorción del herbicida diurón y de los componentes coloidales se tomaron 5 g de suelo y 25 mg de los componentes coloidales y se pusieron en contacto con 10 mL para el plaguicida y con 5 mL para los componentes coloidales de un medio que contenía Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 0.01 M a 3 concentraciones distintas del herbicida (5, 10 y 15 mg L<sup>-1</sup>). Se agitaron en tubos de 30 mL durante 24 horas a 100 r.p.m y 20 ± 1 °C. Todas las experiencias se realizaron por triplicado. Posteriormente, las suspensiones fueron centrifugadas y se retiraron 5 mL del sobrenadante que fueron filtrados y finalmente analizados por HPLC.

### ENSAYOS DE MINERALIZACIÓN

En este experimento se utilizaron respirómetros, constituidos por un cuerpo principal, donde en su parte inferior se coloca la muestra de suelo y en la parte de arriba del matraz un tapón perforado con una trampa de álcali suspendida, donde se recoge la producción de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>. Los compuestos marcados y no marcados se añadieron a 10 g del suelo I para obtener una concentración final de diurón de 50 mg/Kg y una radioactividad de 900 Bq en cada respirómetro. También se le añadió un 1 mL de una solución de elementos traza.

Las cinéticas de degradación obtenidas se ajustaron al modelo propuesto por Guerin et al. (1992), basándose en la siguiente ecuación:  $P = P_{max} (1 - e^{-Kt})$ .

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### DIAGRAMAS DE SOLUBILIDAD DE DIURÓN CON LAS CICLODEXTRINAS SELECCIONADAS

En la figura 1, se muestran los diagramas de solubilidad de diurón con las distintas CDs empleadas. Se puede observar un claro incremento lineal en la solubilidad del herbicida con

el aumento en la concentración de CDs, no llegando a alcanzar un límite de solubilidad en el rango de concentraciones empleadas. De acuerdo con Higuchi y Connors (1965), se trata de diagramas de solubilidad del tipo  $A_L$ , siendo el aumento de solubilidad consecuencia de la formación de un complejo de inclusión entre diurón y las diferentes ciclodextrinas empleadas. El hecho de que los diagramas sean líneas rectas con pendientes menores a 1 indica que los complejos formados en solución presentan una estequiometría 1:1.

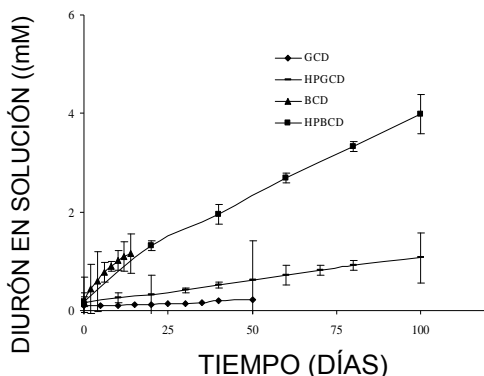


TABLA 2. Constantes de estabilidad ( $K_c$ ) e incremento de solubilidad ( $\Delta S$ ) obtenido en el diagrama de solubilidad.

CDs	$\Delta S$	$K_c (M^{-1})$	$R^2$
HPBCD	$23,3 \pm 1.3$	$207,7 \pm 3.6$	0,9886
BCD	$6,7 \pm 1.0$	$175,9 \pm 4.2$	0,9577
HPGCD	$6,8 \pm 0.9$	$58,7 \pm 1.1$	0,9336
GCD	$2,3 \pm 0.4$	$25,7 \pm 2.9$	0,9985

FIGURA 1. Diagramas de solubilidad de diurón en presencia de las CDs estudiadas.

Las constantes de estabilidad de dichos complejos ( $K_c$ ) y el incremento de solubilidad ( $\Delta S$ ) fueron calculados según la ecuación de Higuchi y Connors (1965), y sus valores se incluyen en la Tabla 2. Los valores más altos, para los parámetros de complejación calculados, se obtuvieron cuando se empleó HPBCD.

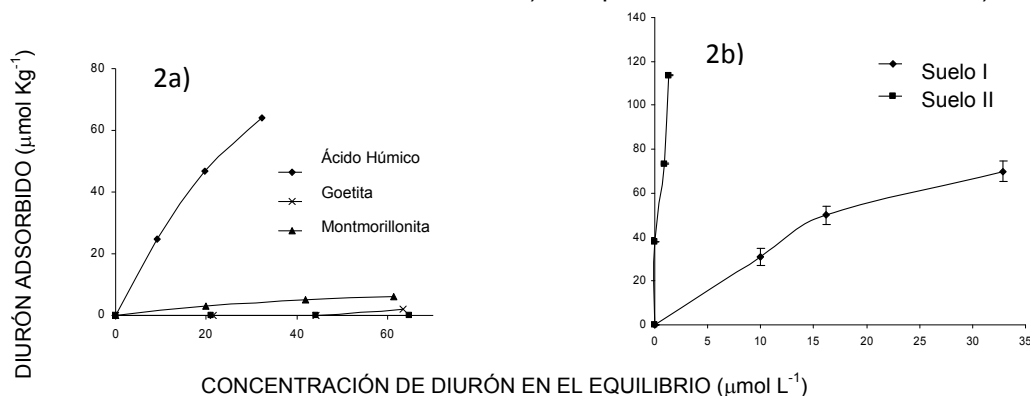
El tamaño de la cavidad de la CD resulta determinante para la efectividad del proceso de complejación. Debido al mayor diámetro interno de GCD, se produciría un proceso fácil tanto de entrada como de salida de la molécula huésped, lo que se traduce en un valor menor de  $K_c$  para la formación del complejo en solución, el cual resultó ser el menor de todas las CDs estudiadas  $25,7 M^{-1}$ . La  $K_c$  para BCD fue alta, lo que indica una fuerte tendencia a formar un complejo con diurón, pero sin embargo, el valor para  $\Delta S$  fue bajo debido a su baja solubilidad (16 mM), concluyendo que HPBCD será la mejor candidata para obtener los mejores resultados en los ensayos de descontaminación.

#### ISOTERMA DE ADSORCIÓN-DESORCIÓN EN LOS SUELOS SELECCIONADOS Y LOS COMPONENTES COLOIDALES.

En la figura 2a, se muestran las isotermas de adsorción de diuron sobre los ácidos húmicos, montmorillonita y goetita. Se puede observar claramente que el ácido húmico es el mejor componente responsable de la adsorción de diurón, seguido de la montmorillonita. Concluyéndose la importancia de la materia orgánica del suelo y los minerales de la arcilla, estando la fracción disponible del herbicida disminuida para ser biodegradado en suelos con alto contenido de algunos de estos componentes.

En la figura 2b se muestran las isotermas de adsorción en los suelos estudiados. Se observa una mayor adsorción en el suelo II, indicando la fuerte influencia del contenido de materia orgánica del mismo. La constante  $K_f$  de Freundlich se utiliza para comparar la capacidad de adsorción del plaguicida en los diferentes suelos. Los valores de  $K_f$  fueron de 4.34 (Suelo I) y  $92,47 Kg^{-1} mol$  (Suelo II), indicando la fuerte influencia de las propiedades del suelo con respecto a la adsorción de diurón, sobre todo el contenido de materia orgánica.

FIGURA 2. Isotermas de adsorción de diurón: a) Componentes coloidales del suelo. b) Suelos.



### EXPERIMENTO DE MINERALIZACIÓN EN PRESENCIA DE HPBCD Y MICRONUTRIENTES

En la figura 3, se representan las graficas de mineralización después de aplicarle al suelo I micronutrientes y HPBCD. El enriquecimiento de la actividad microbiana del propio suelo con micronutrientes provoca una mineralización del 44,15%, siendo éstos esenciales para una estimulación natural del suelo, pero el uso de una solución de HPBCD 10 veces la concentración equimolar del diurón actuó como un potenciador de la biodisponibilidad y biaccesibilidad del herbicida. Estos efectos inducen a un aumento hasta el 66.02% en la mineralización y por lo tanto se reduce tanto la presencia de diurón como de su principal metabolito tóxico y persistente 3,4-DCA, en la solución del suelo.

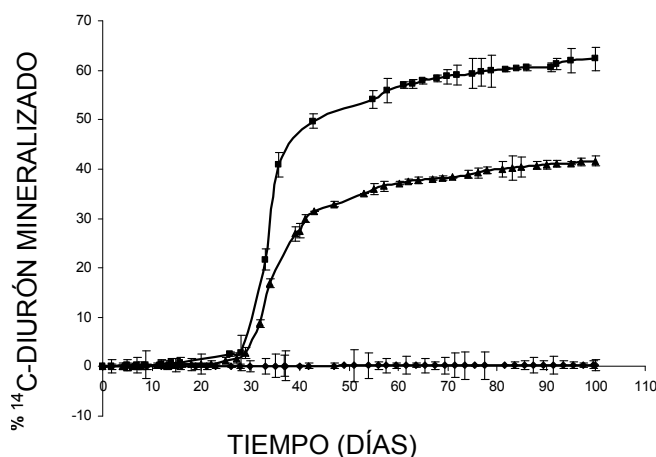


TABLA 3. Efecto de la HPBCD y micronutrientes en la mineralización de diurón en el suelo I.

Tratamientos	Velocidad de mineralización 10 <sup>2</sup> (d <sup>-1</sup> )	Porcentaje mineralizado
HPBCD+micronutrientes	0.87 ± 0.01	66.02 ± 2.56
Micronutrientes	1.94 ± 0.32	44.15 ± 3.44

FIGURA 3. Experimento de mineralización en el suelo I con diferentes tratamientos: sin tratamiento (♦); Sólo micronutrientes (▲); micronutrientes + HPBCD (■).

### REFERENCIAS

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

Qureshi A.; Mohan M.; Kanade G. S.; Kapley A.; Purohit H. J. 2008. In situ bioremediation of organochlorine-pesticide-contaminated microcosm soil and evaluation by gene probe. *Pest. Manag. Sci.* 65, p. 798-804.

Guerin W. F.; Boyd, S. A. 1992 Differential Bioavailability of soil- sorbed Naphthalene to two bacterial species. *Am. Soc. Microbiol.* 58, p. 1142-1152.

Higuchi T.; Connors K. A. 1985. Phase-solubility techniques. *Adv. Anal. Chem. Instr.* 4, p. 117-212.