

Interacciones Montmorillonita-Fosfatidilcolina para el Desarrollo de Formulaciones de Liberación Lenta de Herbicidas

/ TOMÁS UNDABEYTIA LÓPEZ (1, *), TRINIDAD SÁNCHEZ VERDEJO (1), SHLOMO NIR (2), CELIA MAQUEDA PORRAS (1), ESMERALDA MORILLO GONZÁLEZ (1).

(1) Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla, CSIC. Reina Mercedes 10. Apdo. 1052. 41080 Sevilla (España)

(2) Faculty of Agricultural, Food Environmental Quality Sciences, Hebrew University of Jerusalem, Rehovot 76100 (Israel)

INTRODUCCIÓN.

El uso de plaguicidas es esencial para la producción necesaria de alimentos a nivel mundial. Al alcanzar el suelo, los plaguicidas pueden sufrir pérdidas por procesos de disipación, escorrentías superficiales, lixiviación a lo largo del perfil del suelo, etc. Esto implica una reducción en la eficacia de las formulaciones convencionales que deben ser usadas a mayores dosis para minimizar estas pérdidas, con los consiguientes costes tanto económicos como medioambientales.

El diseño de formulaciones de liberación controlada de plaguicidas tiene como finalidad el mantener por un mayor tiempo el umbral de concentración de ingrediente activo para el control de la plaga en el suelo o planta mediante su liberación a la velocidad adecuada, reduciendo de esta forma su nivel en el medioambiente porque son necesarias cantidades inferiores o menores aplicaciones para conseguir el efecto biológico deseado.

El objetivo principal de este estudio ha sido el diseño de formulaciones de liberación lenta del herbicida alaclor mediante el empleo de un sistema liposoma-arcilla, en el que los liposomas (vesículas) están formados por el fosfolípido neutro fosfatidilcolina (PC) y el mineral montmorillonita. La ventaja de estos materiales reside en que son considerados respetuosos con el medio ambiente por su nula toxicidad. En un primer momento se procedió a la caracterización de las interacciones montmorillonita-PC mediante por una parte, adsorción y difracción de rayos X

a tiempos largos de incubación, y por otra parte con técnicas fluorescentes que proveen información sobre los mecanismos que tienen lugar a escala de tiempos cortos.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Materiales.

La arcilla usada fue montmorillonita sódica de Wyoming (SWy-2). PC fue suministrada por Lipoid GMBH, y las pruebas fluorescentes N-NBD-PE y Rhodamine B (RhB) por Merck. Alachlor analítico fue comprado de Sigma, y la formulación de alachlor comercial ALANEX (48% ingrediente activo, i.a.) fue provista por Makhteshim Agan.

Métodos.

Preparación de liposomas.

Los liposomas de PC se prepararon disolviendo PC en metanol, evaporando el disolvente con una corriente de nitrógeno, y se pasó la solución a través de un extruder cuyos filtros eran de tamaño de poro 0.1 µm, de forma que se transformaron en vesículas unilaminares.

Adsorción de PC en montmorillonita.

La adsorción de liposomas se llevó a cabo por duplicado en tubos de polipropileno mezclando 10 mL de soluciones de lípidos, con concentraciones de hasta 12 mM, con 5 mL de suspensión de arcilla, y manteniendo en agitación durante 3 días, al final de los cuales se centrifugaron y se analizó la concentración de PC por HPLC equipado con detector de fluorescencia.

Difracción de rayos X.

Se realizó la difracción de rayos X a ángulos bajos de muestras PC-arcilla y de una solución 6 mM de PC secada al aire sobre un soporte de vidrio.

Transferencia de energía.

Se preparó una solución stock de liposomas de PC conteniendo 0.56% mol de la prueba N-NBD-PE, y suspensiones de la arcilla sin cargar y cargada hasta el 0.5% de la CEC con RhB. Se preparó un complejo PC-arcilla con y sin RhB añadiendo en una cubeta de cuarzo 1 mL de la suspensión de arcilla a 1 mL de PC alcanzándose concentraciones finales de 0.1 mM de lípido y 1 g/L de arcilla. Se monitorizó la fluorescencia de NBD-PE a las longitudes de onda de excitación y emisión de 465 y 530 nm, respectivamente.

Preparación de formulaciones arcilla - liposomas de alaclor.

Se prepararon formulaciones mediante la disolución de 1.5 y 14.0 mM del herbicida en una suspensión 6 mM de PC por sonicación y posterior adición a la arcilla a una concentración de 1.6 g/L, y también de 5 g/L para la concentración mayor de alaclor. Tras agitación durante 24 h se centrifugaron las suspensiones, se retiró el sobrenadante y se liofilizó el precipitado obteniéndose la formulación final. Se analizó el herbicida en el sobrenadante por HPLC-PDA.

Experimentos de liberación.

Se siguió la liberación de alaclor de formulaciones comercial y basadas en PC-arcilla en embudos Büchner de 9.5 cm de diámetro en los que se añadió suelo arenoso hasta alcanzar una altura

palabras clave: formulaciones, herbicidas, arcilla, lípido, suelo.

key words: formulations, herbicides, clay, lipid, soil.

de 0.5 cm. Se aplicó una dosis de herbicida de 1 kg ha⁻¹, y se irrigaron 60 veces con 15 mL de agua, intervalos de 20 min, en los que cada lavado equivalía a 2.12 mm de lluvia. En el volumen recogido tras cada adición se determinó la cantidad de herbicida eluido.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Adsorción de PC en Montmorillonita.

La isoterma de adsorción de liposomas de PC es del tipo L que es indicativo de una interacción relativamente fuerte de las moléculas del lípido con la superficie del mineral (Fig. 1). Esta interacción puede ser a través de un mecanismo electrostático entre las láminas cargadas negativamente con el grupo polar en que el grupo trimetilamino cuaternario con carga positiva se encuentra orientado de forma más próxima a la superficie que el grupo negativo fosfato.

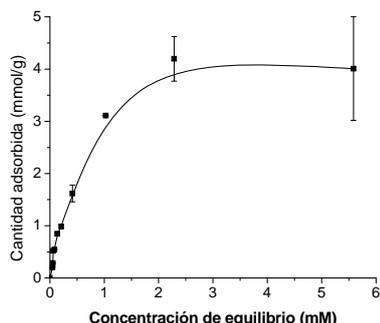


fig. 1. Isoterma de adsorción de PC en montmorillonita.

El cálculo del área de empaquetamiento aparente de las moléculas de PC en el plateau de adsorción es de 30 Å² que, que es próximo a la mitad del área por monómero en monocapas de PC en la interfase agua-aire. Esto sugiere una deposición en bicapas de las vesículas de PC sobre la superficie de la montmorillonita.

De la isoterma de adsorción de escogió una concentración inicial para trabajar de 6 mM de PC (3.11 mmol/g adsorbido), ya que se adsorbe el 83% de la cantidad añadida con lo que se maximiza su adsorción. De igual forma se determinó que incrementando la concentración de arcilla a 5 g/L el 95% de los liposomas se adsorbían, por lo que se usaron estas dos relaciones para la preparación de las formulaciones.

Difracción de Rayos X.

La preparación de solo vesículas de PC para registrar su difracción incluía la deposición de las vesículas sobre un soporte de cristal, con lo que se formará directamente una bicapa planar soportada (SPB). Esta difracción daba un pico de difracción con un espaciado basal de 6.21 nm, que es mayor de la longitud esperada de 4.77 nm para una única bicapa de lípidos (Fig. 2). La presencia de una capa de agua de 1.44 nm entre la superficie y la SPB sería responsable de esta diferencia.

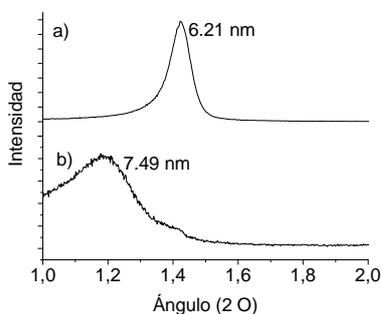


fig. 2. Difracción de rayos X a bajos ángulos de (a) PC secada al aire de una solución 6 mM y (b) 6 mM PC añadida a 1.6 g/L de arcilla.

En el caso del complejo PC-arcilla, la formación de una SPB daría un pico de difracción a 5.73 nm por adición de 0.96 nm correspondiente a un espesor de la lámina de arcilla a 4.77 nm de la bicapa de PC. La diferencia con el valor de 7.49 es debido a agua de hidratación (en este caso la unidad repetitiva incluiría 2 moléculas de agua entre los grupos polares opuestos y el plano basal). Esto significa un espesor ligeramente diferente de esta agua en los dos extremos de la bicapa soportada (0.88 nm) dentro de la lámina de arcilla frente al de la SPB sobre la superficie de cristal.

Transferencia de Energía.

Se siguió la cinética de la reducción de la intensidad de fluorescencia de la prueba NBD-PE (donador) incorporada en los liposomas debido a transferencia de energía a RhB (aceptor) preadsorbido a las láminas de arcilla (Tabla 1). Tras una 1h de incubación la intensidad decrecía de 46.2 a 23.0 unidades al usar RhB-arcilla (disminución fraccional del 50%). Un experimento control en el que la arcilla no estaba marcada daba un reducción a 31.4 unidades que se

mantenía constante, debido a dispersión de la luz. De aquí que la diferencia entre 31.4 y 23.0 refleje el efecto de transferencia de energía. Tras 24 h, las intensidades de fluorescencia usando arcilla no marcada y marcada eran 23 y 16 unidades o 50 y 34% del valor inicial. A 24 h la adsorción era completa por lo que la caída adicional a 26 y 21% a 48 y 72 h, respectivamente, indica reordenamientos adicionales en la superficie de la arcilla, debido al incremento de contactos entre sitios de la arcilla y liposomas.

Tiempo de incubación (h)	Intensidad de fluorescencia fraccional	
	Arcilla no marcada	Arcilla marcada
1	67	50
24	50	34
48	41	26
72	29	21

Tabla 1. Disminución fraccional en la intensidad de fluorescencia de NBD-PE para liposomas incubados con montmorillonita marcada y sin marcar.

Los valores iniciales de intensidad de fluorescencia eran: liposomas marcados: 46.2; arcilla no marcada: 0.6 y arcilla marcada con RhB: 19.2.

Experimentos de Liberación.

La Fig. 3 muestra las curvas de liberación de alaclor para la formulación comercial y aquellas basadas en PC.

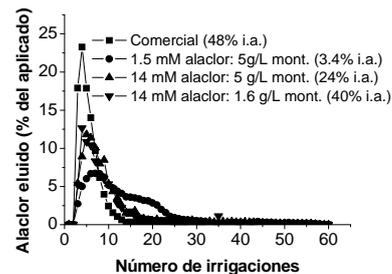


fig.3. Curvas de elución en embudos de formulaciones comercial y PC-arcilla de alaclor.

La formulación comercial eluía completamente tras 23 irrigaciones mientras que aquellas basadas en PC tras 58 irrigaciones, indicando que todo el herbicida está disponible para el control de malas hierbas. Tras 8 irrigaciones, el 89.0% de alaclor se liberaba de la formulación comercial mientras que únicamente el 34.5, 55.6 y 54.9% para las formulaciones de PC con contenidos de i.a. de 3.4, 24 y 40%, respectivamente.