



Universitat de Girona

DESENVOLUPAMENT DE METODOLOGIA ANALÍTICA PER A LA DETERMINACIÓ DE GLIFOSAT I ADJUVANTS

Marta CORBERA MAS

ISBN: 978-84-691-4044-4
Dipòsit legal: GI-635-2008



Departament de Química
Àrea de Química Analítica

Tesi Doctoral

**DESENVOLUPAMENT DE METODOLOGIA ANALÍTICA PER A LA
DETERMINACIÓ DE GLIFOSAT I ADJUVANTS.**

Memòria presentada per
Marta Corbera Mas per
optar al grau de Doctora per la
Unversitat de Girona

Girona, 2007



Chemistry Department
Analytical Chemistry Unit

Doctoral Thesis

DEVELOPMENT OF ANALYTICAL METHODOLOGY FOR THE DETERMINATION OF GLYPHOSATE AND ADJUVANTS.

PhD Dissertation presented by
Marta Corbera Mas in
candidacy for the degree of
Doctor at the University of Girona

Girona, 2007



Departament de Química
Àrea de Química Analítica

Manuela Hidalgo Muñoz, Professora Titular de Química Analítica de la Universitat de Girona i
Victòria Salvadó Martín, Catedràtica d'Universitat de Química Analítica de la Universitat de Girona,

CERTIFIQUEM:

Que els estudis recollits en aquesta memòria sota el títol **“Desenvolupament de metodologia analítica per a la determinació de glifosat i adjuvants”**, han estat realitzats sota la nostra direcció per **Marta Corbera Mas**, llicenciada en Química, per optar al grau de Doctora en Ciències (menció de Doctor Europeu) per la Universitat de Girona.

I perquè així consti, signem la present certificació.

Girona, 20 de juliol de 2007

Dra. Manuela Hidalgo Muñoz

Dra. Victòria Salvadó Martín

Els estudis que es recullen en aquesta memòria s'han desenvolupat en el marc dels projectes d'investigació:

- "Evaluación de la situación actual y la posible afección a la calidad de las aguas subterráneas en base a los procesos naturales producidos por la aplicación de las aguas residuales tratadas" (Ref. HID99-0438-C02-01).
- "Técnicas de separación avanzadas. Procesos integrados de purificación de productos químicos y tratamiento de aguas y suelos contaminados" (Ref. PPO2002-04267-C03-02)
- "Desarrollo de procesos químicos de separación para la caracterización y remedio de sistemas contaminados" (Ref. CTQ2005-09430-C05-03)

Marta Corbera vol agrair la concessió d'una beca de recerca de la Universitat de Girona (Ref. BR00/10), i d'una ajuda per a la mobilitat d'investigadors de la Universitat de Girona (Ref. 4E200304) per una estada a l'Institut de Química de la Universitat d'Opole (Polònia).

Els estudis exposats en aquest treball han donat lloc a les següents publicacions:

- M. Corbera, M. Hidalgo, V. Salvadó, P.P. Wiczorek, "Determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in natural water using the capillary electrophoresis combined with enrichment step", *Analytica Chimica Acta*, 540 (2005) 3-7
- M. Corbera, M. Hidalgo, V. Salvadó, "Extraction and preconcentration of the herbicide Glyphosate and its metabolite AMPA using anion-exchange solid phases", *Microchimica Acta*, 153 (2006) 203-209
- M. Corbera, B.M. Simonet, V. Salvadó, M. Hidalgo, "Characterization of ethoxylated alkylamines (ANEOs) in commercial herbicide formulations using liquid chromatography-electrospray mass spectrometry", submitted to *Journal of Chromatography A*.
- M. Corbera, R. Rodríguez, S. Fabregat, L. Candela, A. Cortés, V. Salvadó, M. Hidalgo, "Glyphosate sorption in soils of Begur (Girona, Spain). Laboratory and field studies", submitted to *Chemosphere*.

ÍNDEX

RESUM DE LA TESI	1
SUMMARY	4
INTRODUCCIÓ	7
▪ PLAGUICIDES EN EL MEDI AMBIENT	10
- <i>HERBICIDES</i>	12
• Formulacions Comercials De Glifosat	15
▪ PREPARACIÓ DE LA MOSTRA	25
- <i>PRESA, PRETRACTAMENT I CONSERVACIÓ DE LA MOSTRA</i>	25
• Presa de Mostra	25
• Pretractament de la Mostra	25
• Conservació de la Mostra	26
- <i>TRACTAMENT DE LA MOSTRA</i>	28
• Mètodes d'Extracció i Preconcentració en Mostres Aquoses	28
• Mètodes d'Extracció per a Mostres de Sòls	42
▪ DETERMINACIÓ ANALÍTICA	46
- <i>TÈCNiques ANALÍTiques PER A LA DETERMINACIÓ DE GLIFOSAT I AMPA</i>	46
• Tècniques Cromatogràfiques	46
• Tècniques No Cromatogràfiques	50
- <i>TÈCNiques ANALÍTiques PER A LA DETERMINACIÓ DE TENSIOACTIUS NO IÒNICS</i>	53
• Cromatografia de Gasos (CG)	54
• Cromatografia amb Fluid Supercrític (SFC)	55
• Electroforesi Capil·lar (CE)	56
• Cromatografia Líquida (CL)	56
▪ TRANSPORT I DESTÍ DE L'HERBICIDA GLIFOSAT	62
- <i>PROCESSOS D'ADSORCIÓ / DESORCIÓ</i>	64
• Estudis en Equilibri o en <i>Batch</i> : Isotermes d'Adsorció	65
• Estudis en Condicions Dinàmiques: Experiments en Columnes	71
• Estudis de Camp	72
OBJECTIUS DEL TREBALL	75
BIBLIOGRAFIA	77
CHAPTER 1	
OUTLINE AND OBJECTIVES	85
1.1 PESTICIDES IN THE ENVIRONMENT	87
1.1.1 <i>COMMERCIAL FORMULATIONS OF GLYPHOSATE</i>	88
1.2 ANALYTICAL DETERMINATION	92
1.3 TRANSPORT AND FATE OF GLYPHOSATE IN THE ENVIRONMENT	97
1.4 OBJECTIVES	101
1.5 REFERENCES	103

**CHAPTER 2
EXTRACTION AND PRECONCENTRATION OF THE HERBICIDE GLYPHOSATE AND ITS
METABOLITE AMPA USING ANION-EXCHANGE SOLID PHASES..... 107**

2.1	ABSTRACT	109
2.2	INTRODUCTION.....	110
2.3	EXPERIMENTAL.....	112
2.3.1	<i>CHEMICALS</i>	112
2.3.2	<i>INSTRUMENTATION</i>	112
2.3.3	<i>PREPARATION OF SOLID-PHASE COLUMNS</i>	112
2.3.4	<i>PRECONCENTRATION PROCEDURE</i>	113
2.3.5	<i>HPLC ANALYSIS</i>	113
2.4	RESULTS AND DISCUSSION	114
2.4.1	<i>PARAMETERS AFFECTING ADSORPTION AND ELUTION PROCEDURES</i>	114
2.4.2	<i>EXTRACTION AND PRECONCENTRATION PROCESS</i>	116
2.4.3	<i>SPIKED NATURAL WATER SAMPLES</i>	117
2.5	CONCLUSIONS.....	119
2.6	REFERENCES.....	120

**CHAPTER 3
DETERMINATION OF GLYPHOSATE AND AMINOMETHYLPHOSPHONIC ACID IN
NATURAL WATER USING THE CAPILLARY ELECTROPHORESIS COMBINED WITH
ENRICHMENT STEP..... 121**

3.1	ABSTRACT	123
3.2	INTRODUCTION.....	124
3.3	EXPERIMENTAL.....	126
3.3.1	<i>CHEMICALS AND REAGENTS</i>	126
3.3.2	<i>CE ANALYSIS</i>	126
3.3.3	<i>HPLC ANALYSIS</i>	126
3.3.4	<i>ENRICHMENT SYSTEM</i>	127
3.4	RESULTS AND DISCUSSION	128
3.4.1	<i>ENRICHMENT SYSTEM</i>	128
	• Influence of sample concentration on extraction efficiency	129
	• Influence of sample conductivity on extraction efficiency.....	130
3.4.2	<i>COMPARISON OF CE VERSUS HPLC</i>	131
3.5	REFERENCES.....	133

CHAPTER 4	
CHARACTERIZATION OF ETHOXYLATED ALKYLAMINES (ANEOS) IN COMMERCIAL HERBICIDE FORMULATIONS USING LIQUID CHROMATOGRAPHY-ELECTROSPRAY MASS SPECTROMETRY..... 135	
4.1	ABSTRACT 137
4.2	INTRODUCTION..... 138
4.3	EXPERIMENTAL..... 140
4.3.1	<i>MATERIALS</i> 140
4.3.2	<i>INSTRUMENTAL ANALYSIS</i> 140
•	Chromatography 140
•	Electrospray mass spectrometry. 140
4.4	RESULTS AND DISCUSSION 142
4.4.1	<i>CHROMATOGRAPHY</i> 142
4.4.2	<i>MASS SPECTROMETRY</i> 145
4.4.3	<i>ANALYTICAL FEATURES</i> 145
4.4.4	<i>ANALYTICAL APPLICATIONS</i> 148
4.5	REFERENCES..... 151
CHAPTER 5	
GLYPHOSATE SORPTION IN SOILS OF BEGUR (GIRONA, SPAIN). LABORATORY AND FIELD STUDIES. 153	
5.1	ABSTRACT 155
5.2	INTRODUCTION..... 156
5.3	EXPERIMENTAL..... 158
5.3.1	<i>CHEMICALS</i> 158
5.3.2	<i>INSTRUMENTATION</i> 158
5.3.3	<i>SOIL SAMPLING</i> 158
5.3.4	<i>SOIL CHARACTERIZATION</i> 159
5.3.5	<i>GLYPHOSATE AND AMPA DETERMINATION</i> 160
5.3.6	<i>HPLC ANALYSIS</i> 160
5.3.7	<i>BATCH SORPTION EXPERIMENTS</i> 160
5.3.8	<i>MISCIBLE DISPLACEMENT EXPERIMENTS (COLUMN EXPERIMENTS)</i> 161
5.3.9	<i>FIELD STUDY</i> 162
5.4	RESULTS AND DISCUSSION 163
5.4.1	<i>SOIL PROFILE CHARACTERISATION</i> 163
5.4.2	<i>SORPTION ISOTHERMS</i> 164
5.4.3	<i>MISCIBLE DISPLACEMENT EXPERIMENTS</i> 169
•	Tracer 170
•	Glyphosate..... 170

5.4.4	<i>FIELD STUDY</i>	173
	• Tracer	173
	• Glyphosate and AMPA	173
5.5	CONCLUSIONS.....	176
5.6	REFERENCES.....	177

CHAPTER 6

DISCUSSIO GLOBAL DELS RESULTATS..... 179

6.1	DESENVOLUPAMENT DE METODOLOGIA PER A LA DETERMINACIÓ DE GLIFOSAT I AMPA.....	182
	6.1.1 <i>CROMATOGRAFIA LÍQUIDA</i>	182
	6.1.2 <i>ELECTROFORESI CAPIL·LAR</i>	183
6.2	EXTRACCIÓ I PRECONCENTRACIÓ DE GLIFOSAT I AMPA EMPRANT FASES BESCANVIADORES DE IONS	185
	6.2.1 <i>RESINES POLIMÈRIQUES</i>	186
	6.2.2 <i>ADSORBENT DE SÍLICA MODIFICADA</i>	188
6.3	COMPARACIÓ RESULTATS: HPLC VERSUS CE.....	189
6.4	CARACTERITZACIÓ D'ALQUILAMINES ETOXILADES EN FORMULACIONS COMERCIALS D'HERBICIDES MITJANÇANT CROMATOGRAFIA LÍQUIDA - ELECTROSPRAI - ESPECTROMETRIA DE MASSES.....	190
	6.4.1 <i>MÈTODE D'ANÀLISI</i>	190
	6.4.2 <i>APLICACIONS</i>	192
6.5	ESTUDI DEL TRANSPORT I MOBILITAT DE GLIFOSAT EN SÒLS DE BEGUR.....	194
	6.5.1 <i>EXTRACCIÓ I PURIFICACIÓ</i>	194
	6.5.2 <i>CARACTERITZACIÓ DEL SÒL</i>	195
	6.5.3 <i>ESTUDIS DE SORCIÓ DE GLIFOSAT EN SÒLS EN CONDICIONS D'EQUILIBRI</i>	195
	6.5.4 <i>EXPERIMENTS EN COLUMNA</i>	197
	6.5.5 <i>ESTUDI DE CAMP</i>	198
6.6	BIBLIOGRAFIA.....	201

CONCLUSIONS.....203

CONCLUDING REMARKS.....205

AGRAÏMENTS / ACKNOWLEDGEMENTS.....207

A l'Abel

RESUM DE LA TESI

El glifosat, N-(fosfometil) glicina, és un herbicida no selectiu de gran espectre d'aplicació àmpliament utilitzat en cultius agrícoles i zones no agrícoles que requereixen un control de la vegetació. Tot i que la toxicitat del glifosat en si mateix és molt baixa, la seva aplicació es realitza emprant formulacions comercials que contenen substàncies auxiliars que milloren l'eficàcia de l'herbicida, però modifiquen la toxicitat del producte final. Tot i els nombrosos beneficis que aporta la utilització d'aquests productes, el seu ús indiscriminat pot ocasionar problemes a llarg termini. En aquest sentit és necessari un millor coneixement dels components dels productes comercials i dels processos de transport i degradació dels mateixos en aigües i sòls, des de la determinació de quantitats a nivell de traça en qualsevol matriu ambiental fins a predir el seu comportament en el medi.

Aquest treball s'ha centrat en els dos aspectes que s'acaben de mencionar: la determinació de components de formulacions comercials d'herbicides i el seu comportament en el sòl. La primera part del treball s'ha dedicat al desenvolupament de mètodes d'anàlisi per a la determinació de glifosat i el seu principal metabòlit, l'àcid aminometilfosfònic (AMPA), en matrius aquoses i sòls. A continuació s'ha desenvolupat un mètode d'anàlisi per les substàncies auxiliars addicionades més freqüentment en les formulacions comercials de glifosat, tensioactius no iònics. Finalment s'ha estudiat la mobilitat de l'herbicida en sòls de la zona mediterrània, incidint en els processos d'adsorció i degradació que pateix el glifosat. En aquesta darrera part s'ha comparat el comportament de diversos herbicides comercials que contenen glifosat.

A causa de les baixes concentracions de glifosat i AMPA que es troben en el medi, els procediments per a l'anàlisi de mostres ambientals requereixen, encara que el sistema de detecció sigui molt sensible, del desenvolupament de mètodes de preconcentració i/o purificació previs a la determinació d'aquestes substàncies per cromatografia líquida (LC) o per electroforesi capil·lar (CE). La preconcentració de glifosat i AMPA no és gens senzilla a causa de la polaritat i caràcter hidrofílic d'ambdós anàlits. Pel que fa a l'etapa de determinació, s'han optimitzat dos mètodes cromatogràfics ja descrits a la bibliografia, emprant detecció UV-vis i fluorescència, i un mètode per electroforesi capil·lar amb detecció UV-vis, obtenint-se una millor sensibilitat en el cas de la detecció per fluorescència. Per tal de disminuir al màxim els límits de detecció dels anàlits, es desenvolupa un mètode d'extracció i preconcentració assajant diferents sorbents de bescanvi aniónic (extracció sòlid-líquid), atesa la formació d'espècies anióniques dels anàlits en funció del pH del medi. En primer lloc s'han estudiat les condicions d'extracció i elució de glifosat emprant una resina microporosa, Amberlite®IRA-416, i a continuació s'han comparat els resultats obtinguts amb els d'altres sorbents: dues resines de bescanvi iònic, Amberlite®IRA-416 (microporosa, tipus II) i Amberlite®IRA-900 (macroporosa, tipus I), i un cartutx de sílica funcionalitzada, Isolute-NH₂.

Els millors resultats per a l'extracció conjunta de glifosat i AMPA s'assoleixen treballant amb 1 gram de resina, un flux de càrrega i elució de $5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ i emprant 15 mL de NaCl 1M com a eluent en el cas de l'anàlisi per LC i 15 mL de NaCl 0,1M en el cas de l'anàlisi per CE. Pel que fa a les resines polimèriques, l'extracció quantitativa d'ambdós anàlits en aigües ultrapures només s'assoleix emprant la resina macroporosa, mentre que la resina microporosa només permet la recuperació completa del glifosat. El diferent grau d'extracció pels dos anàlits es pot explicar pel tamany dels anàlits, ja que el glifosat és més voluminós que el seu metabòlit, i pel tipus de matriu dels adsorbents, ja que la resina de tipus I presenta una major basicitat i una interacció més forta. Quant a l'aplicació d'aquestes resines a l'anàlisi d'aigües naturals, s'ha observat una disminució de l'eficàcia en l'extracció dels anàlits a causa de l'escassa selectivitat que presenten aquest tipus de sorbent i la presència d'anions interferents en les mostres. Els millors resultats s'obtenen també en aquest cas amb la resina Amberlite®IRA-900, que proporciona bones recuperacions de glifosat en mostres amb conductivitats de fins a $800 \mu\text{S}$ i permet establir una relació lineal entre la recuperació d'AMPA i la conductivitat de la mostra, posant de manifest l'important efecte d'aquest paràmetre en el rendiment de l'extracció. L'ús de l'adsorbent de sílica modificada amb un grup amino només és adequat per a l'extracció de glifosat en mostres molt netes, ja que permet aconseguir uns factors de preconcentració molt superiors als assolits amb les resines polimèriques a causa del poc volum de l'adsorbent. L'extracció d'AMPA emprant aquest adsorbent no és factible a causa de la poca afinitat d'aquest compost tan hidrofílic per la matriu de sílica.

Aplicant el mètode de preconcentració descrit emprant la resina Amberlite®IRA-900 combinat amb la determinació per LC amb detecció fluorescent, els límits de detecció obtinguts són de $0,1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ per glifosat i $0,3 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ per AMPA. Emprant els mètodes d'anàlisi que impliquen detecció UV-vis, LC i CE, s'assoleixen límits de detecció de $2 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ per ambdós anàlits en el primer cas i $85 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ pel glifosat i $60 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ per l'AMPA en CE. La principal avantatge del mètode per CE és la no necessitat de derivatitzar els anàlits per a la seva detecció, tot i que per LC s'obtenen límits de detecció d'un ordre de magnitud inferiors.

En la segona part del treball s'ha desenvolupat un mètode d'anàlisi per a la determinació i caracterització de les substàncies auxiliars presents en les formulacions comercials de glifosat, que generalment contenen tensioactius no iònics de tipus alquilamina etoxilats (ANEOs) derivats del *tallow* (greix animal). La determinació d'aquests tensioactius és força complexa, ja que són barreges de diversos homòlegs alquilics i etoxilats, de manera que requereix una primera separació dels diversos homòlegs per cromatografia líquida seguida de la identificació inequívoca de cadascun d'ells mitjançant espectrometria de masses. Les mostres es dilueixen en HCl 0,1M i la separació s'assoleix emprant una fase mòbil que conté amoníac i àcid acètic en les fases aquoses i orgàniques. En el gradient utilitzat, de 60 minuts de durada, es parteix d'un percentatge elevat de fase aquosa i es va augmentant el percentatge de fase orgànica, per recuperar finalment les condicions inicials. Per a la caracterització de la distribució oligomèrica de les mostres s'ha treballat en mode *Full Scan*, mentre que la determinació quantitativa dels diversos homòlegs d'ANEOs s'ha

realitzat extraient la massa corresponent als ions $[M+H^+]$. El mètode desenvolupat s'ha caracteritzat pel que fa a sensibilitat, precisió i repetitivitat. Per tal de millorar la sensibilitat del mètode, cal treballar amb mode *Single Ion Monitoring* (SIM), amb la possibilitat d'aplicar una tècnica de preconcentració on-line desenvolupada que permet assolir uns límits de detecció de fins a 50 vegades inferiors. El mètode ha estat validat mitjançant assatjos de recuperació basats en l'addició de patró a diversos herbicides comercials que contenen glifosat (*Compo*, *Atila*, *RoundUp* i *RoundUp Energy*). S'ha comprovat que els productes *Compo* i *RoundUp* contenen ANEOs derivats del *tallow* en la seva formulació i se n'ha quantificat el seu contingut (99,4 i 98,1 g·L⁻¹, respectivament).

Finalment, s'ha estudiat la mobilitat de l'herbicida glifosat en sòls de la zona mediterrània. En primer lloc ha calgut desenvolupar un mètode d'anàlisi de glifosat i AMPA en sòls. S'ha comprovat que l'extracció d'ambdós anàlits emprant KOH 0,6M és quantitativa, tot i que per sòls amb alt contingut de matèria orgànica cal una etapa de purificació emprant una resina de tipus XAD prèvia a la seva anàlisi cromatogràfica. A continuació s'han caracteritzat els processos d'adsorció i desorció del glifosat en sòls de diferents característiques, determinant les corresponents isoterms d'adsorció i desorció i comparant el comportament del glifosat pur amb el de diversos herbicides comercials. S'ha observat una adsorció lineal pel glifosat en sòls quan es treballa amb ratios de sòl:solució de 1:5. Pel que fa als diversos herbicides, no s'han observat diferències significatives quant a l'adsorció/desorció de glifosat. El principal metabòlit del glifosat, l'AMPA, només es detecta en aquells estudis d'una durada superior a les 24 h. En els estudis en continu realitzats, s'ha observat un major grau d'adsorció del glifosat pur en sòls comparat amb el *RoundUp* quan es treballa a fluxos semblants a la realitat, tot i que l'adsorció s'igualava en el cas de treballar a fluxos més elevats. Per últim, s'ha realitzat una aplicació de l'herbicida comercial en un camp de Begur (Girona, Espanya) regat amb aigua tractada provinent d'una estació depuradora d'aigües residuals. En aquest estudi s'ha observat una gran tendència del glifosat a quedar adsorbit en l'horitzó més superficial del sòl, on destaca l'alt contingut en matèria orgànica i elevada capacitat de bescanvi iònic. En aquest mateix horitzó, el glifosat és ràpidament degradat a AMPA pels microorganismes presents, que es detecta de forma important l'endemà mateix de l'aplicació.

SUMMARY

Glyphosate, N-(phosphonomethyl) glycine, is a non-selective broad-spectrum herbicide widely used both in agriculture and in the control of vegetation in nonagricultural land. The toxicity of pure glyphosate is low but commercial formulations usually contain auxiliary substances to enhance the effectiveness of the active ingredient which modify the toxicity of the final product. Given the potentially harmful effects of these herbicides, it is important to determine trace levels in water, soil and sediments in order to understand the behaviour and fate of the herbicides' components in the environment.

The first part of this study is devoted to the development of analytical methods for the determination of glyphosate and its main metabolite, aminomethylphosphonic acid (AMPA), in aqueous and soil samples. An analytical method for the determination of non-ionic surfactants, auxiliary substances, generally added to commercial formulations, is then developed. In the second part the mobility of the herbicide in soils located in the Mediterranean area is investigated with special focus in those aspects related to the sorption and degradation processes. Finally, a comparison of the behaviour of different glyphosate-containing commercial herbicides is made.

The development of analytical procedures for the analysis of environmental samples is a difficult task because of the low concentrations at which glyphosate and AMPA are found in the environment. As a result it is necessary to undertake preconcentration steps prior to the determination of analytes by liquid chromatography (LC) or capillary electrophoresis (CE). Furthermore, the high polarity and hydrophilic character of the two analytes makes the extraction of the analytes more difficult. In the case of liquid chromatography, both UV-vis and fluorescence detectors were used, with maximum sensibility being obtained using fluorescent detection ($0,3 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ for both analytes). In order to improve detection limits, an extraction and preconcentration method using solid-phase extraction (SPE) was developed. Since glyphosate and AMPA are ionisable species, ion exchange adsorbents are suitable for this purpose and a microporous resin, Amberlite[®]IRA-416, a macroporous resin, Amberlite[®]IRA-900, and a modified silica cartridge, Isolute-NH₂, were evaluated. The best extraction conditions were achieved working with 1 g of resin, a loading and elution flow-rate of 5 mL/min and using 5 mL of 1M NaCl solution in the case of LC determination and 15 mL of 0,1M NaCl solution in the case of CE determination. Only the use of the macroporous polymeric resin allowed quantitative extraction of both analytes in ultrapure samples whereas the microporous resin, only in the case of glyphosate a quantitative recovery was obtained. The different rate of extraction for both analytes can be explained by their different sizes, as glyphosate is more voluminous than its metabolite, and also by the adsorbent properties, which presents a major basicity and adsorption strength in the case of Amberlite[®]IRA-900. In the analysis of natural waters, the extraction efficiency of the resins was lower because of the low selectivity of this kind of material. Moreover, better results are achieved with the macroporus resin,

and satisfactory recoveries are obtained in water samples of up to 800 μS conductivity values. Besides, this resin allows a lineal correlation to be established between the recovery of AMPA and sample conductivity, showing the important role of this parameter in extraction efficiency. The silica cartridge is only appropriate for the extraction of glyphosate in clean samples. This adsorbent gives higher preconcentration factors than resins despite the amount of sorbent used being much lower.

By preconcentrating the analytes with Amberlite[®] IRA-900 limits of detection (LODs) of 0,1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ and 0,3 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ are attained using fluorescent detection for glyphosate and AMPA, respectively. When UV-vis detection is used, the detection limits achieved are 2 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ for both analytes in the case of LC, and 85 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ for glyphosate and 60 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ for AMPA in the case of CE. The main advantage of the CE method is that it is not necessary a derivatization step of the analytes before detection.

A method for the characterization and determination of adjuvants present in commercial formulations of glyphosate has been developed. The complexity of these surfactants, which are mixtures of various alkylic and ethoxylated homologues, makes it necessary to previously separate the homologues by liquid chromatography and then to identify them using mass spectrometry. The samples are first diluted in 0,1M HCl and the mobile phase was prepared with ammonia and acetic acid in the aqueous and organic phases. The 60-minute gradient employed starts with a high percentage of aqueous phase which progressively decreases, with the consequent increase in the organic phase, until the initial conditions are recovered. The Full Scan mode was used to perform the characterization of the oligomeric distribution, but the quantification of ANEOs homologues was carried out by the extraction of mass corresponding to the $[\text{M}+\text{H}^+]$ ions. The developed method was found to be sensitive, accurate and repeatable. In order to increase sensitivity, the Single Ion Monitoring (SIM) mode is recommended. The sensitivity can be further enhanced by a factor of 50 by an on-line preconcentration step using a silica sorbent. The method was validated by recovery assays based on the addition of standard analytes to various commercial herbicides containing glyphosate (Compo, Atila, RoundUp and RoundUp Energy). The presence of ANEOs derived from tallow fat was confirmed in Compo and RoundUp commercial formulations. The concentrations of ANEOs were found to be 99.4 and 98.1 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively.

The behaviour of glyphosate in soils of the Mediterranean area was studied. In order to conduct this investigation it was necessary to develop an analytical method for the determination of glyphosate and AMPA in soil samples. Quantitative extraction of both analytes was obtained using 0,6M KOH. However, a purification step with XAD resins prior to the chromatographic analysis was required for samples with high organic matter content. We then proceeded to perform batch experiments, in order to characterize the adsorption and desorption isotherms of pure glyphosate and various commercial herbicides. The linear adsorption of glyphosate was observed in soils using a 1:5 soil:solution ratio. No significant differences were found in the commercial herbicides with regards to the adsorption and desorption of glyphosate. The main metabolite of

glyphosate, AMPA, is only detected in studies lasting longer than 24 hours. In flow conditions, a major adsorption of pure glyphosate in soils was observed compared to RoundUp at lower flow-rates. However, as flow-rate increases, the adsorption levels of the two analytes become similar. Finally, a large-scale study was carried out by the application of a commercial herbicide in an experimental field of Begur (Girona, Spain) irrigated with reclaimed water from a wastewater treatment plant. In this study, glyphosate was found to be adsorbed in the most superficial soil, which has high organic matter content and a high ion-exchange capacity. In this soil, the microorganisms present readily degrade glyphosate to AMPA, which was first detected the day after the application of the herbicide.

INTRODUCCIÓ

INTRODUCCIÓ	7
▪ PLAGUICIDES EN EL MEDI AMBIENT	10
- <i>HERBICIDES</i>	12
▪ PREPARACIÓ DE LA MOSTRA	25
- <i>PRESA, PRETRACTAMENT I CONSERVACIÓ DE LA MOSTRA</i>	25
- <i>TRACTAMENT DE LA MOSTRA</i>	28
▪ DETERMINACIÓ ANALÍTICA	46
- <i>TÈCNiques ANALÍTiques PER A LA DETERMINACIÓ DE GLIFOSAT I AMPA</i>	46
- <i>TÈCNiques ANALÍTiques PER A LA DETERMINACIÓ DE TENSIOACTIUS NO IÒNICS</i>	53
▪ TRANSPORT I DESTÍ DE L'HERBICIDA GLIFOSAT	62
- <i>PROCESSOS D'ADSORCIÓ / DESORCIÓ</i>	64
▪ OBJECTIUS DEL TREBALL	75
▪ BIBLIOGRAFIA	77

Durant els darrers 100 anys s'han produït grans avenços en el camp de la química. Actualment vivim en una societat moderna que utilitza una gran varietat de substàncies químiques sintètiques, entre les quals en destaquen els plàstics, els fàrmacs, els productes derivats del petroli, els fertilitzants i els plaguicides. La producció i ús d'aquestes substàncies han millorat les condicions de vida humana i han propiciat un enorme creixement de la població. El desenvolupament de la indústria química sintètica però, té implicacions importants en el medi ambient, ja que ha portat a l'alliberament de grans quantitats de substàncies orgàniques de les quals moltes vegades se'n desconeixen els seus efectes en el medi.

Entre els contaminants ambientals, els plaguicides formen un grup molt extens que requereix un control prioritari a causa de la seva toxicitat demostrada, del seu elevat ús en tot el planeta, així com de les possibilitats de contaminació directa en productes de consum humà com aliments i aigua.

PLAGUICIDES EN EL MEDI AMBIENT

L'Agència de Protecció Ambiental dels Estats Units d'Amèrica (*Environmental Protection Agency USA*, EPA) defineix un plaguicida com qualsevol substància o mescla de substàncies destinada a prevenir, destruir, repel·lir o controlar qualsevol plaga, incloent-hi insectes, rosegadors, fongs, males herbes o altres formes de vida nocives per la salut o pel medi ambient. També es consideren plaguicides aquelles substàncies que s'utilitzen com a reguladores del creixement de plantes, defolians o dessecants.

Tot i que des de principis del segle XX s'utilitzen plaguicides d'origen natural, l'era dels plaguicides orgànics sintètics s'inicia a finals de la dècada dels 30 amb la síntesi del DDT. Des de llavors s'ha anat avançant en el descobriment de substàncies cada vegada més selectives. L'enorme benefici del descobriment d'aquests compostos ha anat contrastant amb els greus problemes de caràcter medioambiental dels mateixos, inclosos els ocasionats sobre la pròpia salut humana [1].

L'ampli ús de plaguicides per part de granges, institucions i particulars, ha provocat que hi hagi múltiples fonts de contaminació del medi per plaguicides, tot i que la font més important n'és l'activitat agrícola. L'alliberament de plaguicides al medi ambient pot provocar una sèrie de processos o transformacions molt complexes que permeten el transport del plaguicida a través de l'aire o de l'aigua, cap al subsòl i fins i tot cap a organismes vius.

Aquests processos als quals estan sotmesos els plaguicides són transformacions físico-químiques i biològiques que poden tenir lloc amb major o menor rapidesa (veure **Figura I.1**) [2] en funció de diversos factors com el creixement del vegetal, les condicions ambientals (vent i pluja), les propietats físico-químiques del plaguicida (volatilització i solubilització) i la degradació química, que pateixen la major part de plaguicides i que pot tenir lloc a l'interior de la planta (pels plaguicides amb poder penetrant) o a la seva superfície, cas on la radiació solar juga un paper fonamental.

En el cas de la degradació química, ja sigui total o parcial, cal tenir present que condueix a la formació de nous productes que, en ocasions, poden ser més mòbils, persistents i perillosos que els compostos de partida.

Generalment, menys d'un 10% del plaguicida assoleix el seu objectiu final; la resta pot quedar-se al sòl, part pot ser volatilitzat i part pot transportar-se a través del sòl fins les aigües subterrànies [4].

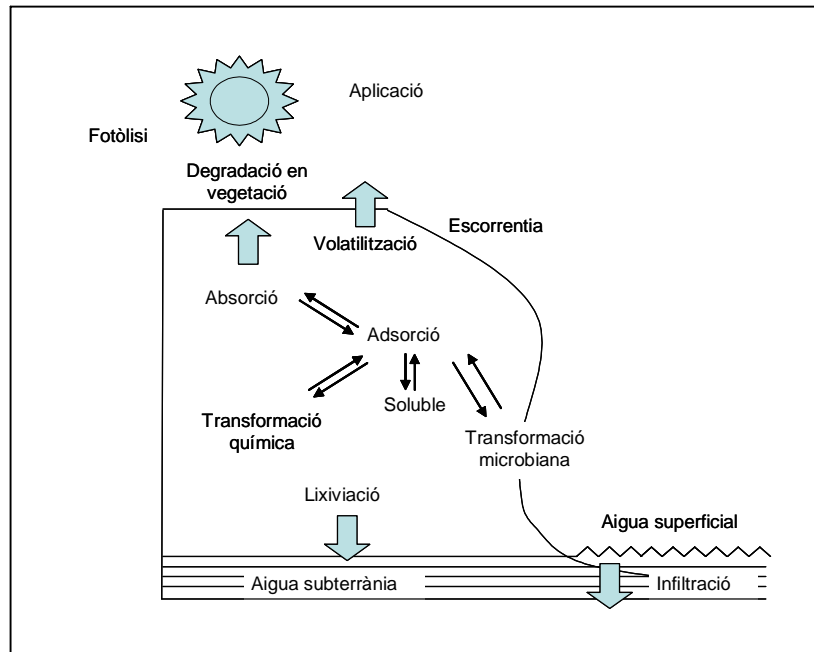


Figura I.1. Esquema dels principals processos que afecten la distribució dels plaguicides en el medi [2].

Els plaguicides es poden classificar atenent diferents criteris, per exemple segons els seu origen (natural o sintètic), naturalesa química, propietats, camp i tipus d'acció, etc. Destaca però, la classificació segons l'objectiu o camp d'acció particular al qual estan destinats:

Insecticides: tòxics per insectes

Herbicides: ataquen les males herbes

Fungicides: combaten els fongs

Antibiòtics: inhibeixen el desenvolupament de microorganismes patògens

Esterilitzants: inhibeixen la reproducció dels insectes

Altres plaguicides específics: **Acaricides** (àcars), **Raticides** (rates), **Molusquicides** (cargols), **Nematocides** (cucs), **Defoliants** (fulles de plantes).

Generalment aquesta classificació bàsica es complementa amb una divisió en sub-grups, d'acord amb les seves principals propietats fisico-químiques. Aquesta sub-classificació és interessant ja que els efectes sobre la salut humana i el medi ambient són característics i diferents per cada família de plaguicides. Des del punt de vista de la contaminació provocada pels plaguicides, cal considerar tres aspectes essencials: **toxicitat**, **persistència** i **bioacumulació**.

Un aspecte a considerar és el fet que els plaguicides gairebé mai s'utilitzen "purs", tal com s'obtenen en la indústria, sinó que es condicionen de forma adequada per tal de millorar l'efectivitat del producte final. En les **formulacions comercials** de plaguicides s'inclou la matèria

o **principi actiu**, més o menys diluïda en un suport sòlid o dissolvent líquid, juntament amb altres **substàncies auxiliars o inerts**. La EPA defineix aquests termes com:

Principi actiu: la substància química que conté un producte, utilitzat com a plaguïcida, que pot matar, repel·lir, mitigar o controlar una plaga o que pot actuar com a regulador del creixement de plantes o dessecant.

Substàncies auxiliars o inerts: són substàncies no actives, com l'aigua, destil·lats de petroli, talcs o tensioactius. Les substàncies auxiliars solen ser tensioactius que no actuen sobre cap plaga en particular, tot i que alguns d'ells poden ser actius química o biològicament, provocant problemes de salut i/o medioambientals.

Els tensioactius o surfactants (de l'anglès *surface-active agent*) són substàncies que redueixen la tensió superficial del medi en què es troben dissoltes i tendeixen a formar-hi micel·les. Aquests compostos es concentren en les interfícies entre medis aquosos i medis lípidics, de manera que actuen com agents emulsionants [4]. El seu ús com a substància auxiliar en la majoria de formulacions comercials de plaguïcides es deu a que augmenten la solubilitat del principi actiu en la formulació comercial, permeten la formació d'emulsions i/o en alguns casos augmenten l'activitat herbicida del principi actiu [5,6].

En les formulacions de productes agroquímics es solen utilitzar tensioactius no iònics entre els que trobem els alquilfenol etoxilats (APEOs), els alcohol etoxilats (AEOs) i els alquilamina etoxilats (ANEOS), entre d'altres (veure **Taula I.1.**) [7,8].

Tensioactius no iònics

Alcohol etoxilats

Alquilamina etoxilats

- *Tallow* (tipus de greix animal) amina etoxilats

Alquilfenol etoxilats

- Nonil- i Octil- fenol etoxilats

Copolímers d'òxid d'etile i òxid de propilè

Àcids grassos etoxilats

Oli de ricí etoxilats

Taula I.1. Tensioactius no iònics més utilitzats en formulacions agroquímiques.

HERBICIDES

Els herbicides són compostos químics dissenyats per destruir plantes, arbres i/o males herbes o per regular-ne el seu creixement. L'ús agrícola dels herbicides ha reemplaçat els mètodes mecànics i manuals en àrees d'agricultura intensiva i altament mecanitzada reduint els costos i

controlant més efectivament les males herbes. Els herbicides també s'utilitzen de manera exhaustiva fora de les finques, en àrees industrials, vores de carretera i vies de tren, canals de rec i de drenatge, traçats de línies d'alta tensió i zones de lleure.

Els primers productes químics utilitzats pel control de males herbes foren compostos inorgànics (sulfat de coure, arsenit sòdic, triòxid d'arsènic, sulfamat d'amoni,...), però es van anar substituint ràpidament per productes orgànics, a causa de la toxicitat i persistència d'una gran part d'aquests productes en sòls [9]. Actualment, l'EPA estima que el volum de vendes d'herbicides arreu del món al 2001 representava el 44% de les vendes totals de plaguicides, amb un volum econòmic de més de 14.000 milions de dòlars americans [10].

En la **Taula I.2.** es presenta una llista dels herbicides més utilitzats en països mediterranis, com França, Itàlia, Grècia i Espanya, on es desenvolupa una gran activitat agrícola. En aquesta taula es recullen els possibles contaminants d'estuaris i zones aquàtiques de la costa. Aquesta llista s'ha elaborat en base a criteris com l'ús, les propietats físico-químiques i la persistència de cada compost [11].

Alaclor	Diclobenil	Glifosat	Metolaclor	Prometrina
Amitrola	Diclofop-metil	Isoproturon	Metoxuron	Simazina
Atrazina	Dinoterb	Linuron	Metribuzina	Àcid tricloracètic
Bentazona	Diquat	MCPA	Molinat	Terbumeton
Bromoxinil	Diuron	Mecoporp	Napropamida	Terbutilazina
Butilat	DNOC	Metamitron	Neburon	Terbutrina
Carbetamida	EPTC	Metazaclor	Paraquat	Triat-lat
Clortoluron	Etafluralina	Metabenzthiazuron	Pendimetalin	Terbutrina
2,4-D	Etofumetasa	Metobromuron	Fenmedifan	Trifluralina
Dial-lat	Flamprop-M-isopropil			

Taula I.2. Herbicides més utilitzats en l'àrea mediterrània.

En el cas dels herbicides tampoc és possible parlar d'una única classificació, sinó que existeixen múltiples esquemes de classificació que es poden basar en la selectivitat, en el mode com actuen, en el moment en què s'apliquen, la manera com s'apliquen, i la composició química (veure **Taula I.3**). Aquestes classificacions s'utilitzen moltes vegades de forma complementària.

Es parla d'herbicides **selectius** quan s'utilitzen per eliminar maleses sense malmetre el cultiu i d'herbicides **no selectius** quan el propòsit és matar tota la vegetació. Tant els productes selectius com els no selectius es poden aplicar al fullatge de les maleses o al sòl que conté les llavors d'aquestes maleses, depenent del seu mode d'acció.

CRITERI DE CLASSIFICACIÓ	TIPUS HERBICIDA
Grau de Selectivitat	Selectiu No selectiu (o total)
Mode d'acció	De contacte Sistèmics
Moment d'aplicació	De presembra De preemergència De postemergència
Mode d'aplicació	En banda En cobertura total De tractaments puntuals D'aspersions dirigides
Composició química	Inorgànics Orgànics naturals Orgànics sintètics

Taula I.3. Criteris de classificació dels herbicides

Segons el mode d'acció els herbicides poden ser de contacte o sistèmics. Els herbicides **de contacte** ataquen les parts de la planta a les quals s'aplica el producte químic. Els herbicides **sistèmics** són absorbits bé per les arrels o per les parts aèries de les plantes i després circulen per l'interior de la planta fins arribar a teixits distants.

Un altre criteri de classificació és el moment de l'aplicació de l'herbicida respecte l'estat de desenvolupament del cultiu o malesa. El moment depèn de molts factors, incloent la classificació química del producte i la seva persistència, el cultiu i la seva tolerància a l'herbicida, l'espècie de malesa, les pràctiques culturals, el clima i la condició i el tipus de sòl. Les aplicacions de **presembra** pel control de maleses anuals es duen a terme a l'àrea en qüestió abans de sembrar el cultiu, des de pocs dies a setmanes abans de la sembra. Les aplicacions de **preemergència** s'efectuen després de la sembra però abans que les plantes comencin a emergir del cultiu o de les maleses, depenent de la definició. Les aplicacions de **postemergència** es fan després que el cultiu o les maleses hagin emergit del sòl.

I per últim, els herbicides, i els plaguicides en general, es poden classificar en funció de la seva composició química segons: **inorgànics**, **orgànics naturals** i **orgànics sintètics**. Dins del darrer grup trobem els herbicides més utilitzats en l'actualitat, per aquest motiu és interessant fer una sub-classificació addicional en funció de la família química a la qual pertanyen:

- Fenoxiàcids (2,4-D , 2,4,5-T, MCPA)
- Toluidines (Trifluralina)
- Fenil Urees (Atrazina, Simazina)
- Bipiridils (Diquat, Paraquat)
- Glicines (**Glifosat**)
- Fenoxipropionats (Mecoprop)

- Carbamats (Barban, Asulam)
- Hidroxil nitrils (Ioxinil, Bromoxidinil)
- Compostos fenòlics (Pentaclorofenol, nitrofenol)

L'exposició de la població als herbicides que s'alliberen al medi ambient i la creixent preocupació de la societat per aquest aspecte ha obligat a reemplaçar els productes utilitzats clàssicament (compostos apolars i persistents) per productes menys tòxics i menys persistents (compostos més polars i fàcilment degradables). No obstant això, aquest darrer tipus d'herbicides presenten una major mobilitat, cosa que complica el seu estudi en les diverses matrius ambientals (principalment en sòls i aigües).

Entre aquesta nova generació de plaguicides trobem el glifosat, herbicida objecte d'estudi en aquesta tesi doctoral.

• FORMULACIONS COMERCIALS DE GLIFOSAT

El glifosat fou introduït al 1974 per la companyia Monsanto i actualment és el principi actiu de molts productes comercials. Aquest compost se sol trobar en forma de sal en les formulacions comercials, majoritàriament en forma de sal d'isopropilamina [10].

La sal d'isopropilamina és el principi actiu en 53 dels 63 productes registrats als Estats Units d'Amèrica, i s'utilitza com a herbicida per controlar les plantes de fulla ampla i l'herba de molts tipus de cultiu. També s'aplica pel control de males herbes en punts varis com poden ser zones ornamentals, gespes, àrees residencials, plantacions forestals, vies de tren,...

La sal sòdica de glifosat, principi actiu de dos dels plaguicides registrats, s'utilitza com a regulador del creixement de les plantes de cacauets i canya de sucre per modificar-ne el creixement de la planta i accelerar la maduració dels fruits.

La darrera sal a considerar és la sal d'amoní, que és el principi actiu en set productes més, herbicides i/o reguladors del creixement. Aquesta forma de glifosat va ser introduïda el 1984.

Sota una gran varietat de noms, l'herbicida glifosat és comercialitzat arreu del món, ja sigui en forma líquida, sòlida o en pastilles, arribant a ser el plaguicida més utilitzat en el sector agrícola al 2001 i el segon en sectors no agrícoles [10].

A continuació es mostren alguns dels noms comercials de productes de glifosat que es poden trobar al mercat:

Roundup	Accord	Sting	Tumbleweed
Rodeo	Glycel	Spasor	Atila
Gialka	Compo	Muster	Glifonox

Les vendes de productes de glifosat es valoren actualment en uns 1.200 milions d'euros anualment, el que representa un 60% de les vendes totals d'herbicides no selectius. D'entre tots aquests productes cal destacar el RoundUp, herbicida comercialitzat per l'empresa Monsanto, amb una gran producció arreu del món.

En les formulacions d'herbicides és molt habitual l'addició de tensioactius del tipus no iònic [12] amb diferents finalitats: per augmentar la solubilitat del principi actiu en aigua, per aconseguir millors emulsions i/o en alguns casos per augmentar l'activitat herbicida del principi actiu [13]. En general però, aquests compostos permeten una distribució més eficient del principi actiu als punts claus per l'activitat de l'herbicida, especialment per compostos que s'apliquen al fullatge de la planta, com el glifosat [14]. De fet, les formulacions comercials d'aquest herbicida solen contenir tensioactius de tipus alquilamines etoxilats (ANEOS).

El paper dels tensioactius en l'adsorció foliar de les formulacions de glifosat ha estat àmpliament estudiat [15-17]. En presència de tensioactius, l'adsorció de l'herbicida depèn almenys de tres factors: de la concentració i propietats físico-químiques del principi actiu, de l'estructura química i de la concentració dels tensioactius i de la superfície foliar de l'espècie vegetal. En general s'accepta que no tots els tensioactius poden augmentar l'adsorció de qualsevol herbicida.

PRINCIPI ACTIU: GLIFOSAT

El glifosat, [N-(fosfometil)glicina], s'emmarca dins una categoria important de plaguicides que contenen grups fosfònic, amino i àcid dins la seva estructura, entre els quals també apareixen el glufosinat, el bialafos i l'amprofilos. L'estructura química d'aquest herbicida es mostra en la **Figura I.2**.

El glifosat es degrada ràpida i completament per acció de microorganismes del sòl a diòxid de carboni, fosfat i aigua. El seu principal metabòlit és l'àcid aminometilfosfònic (AMPA), que també es degrada, tot i fer-ho més lentament. L'estructura química d'aquest compost es pot veure en la **Figura I.3**.

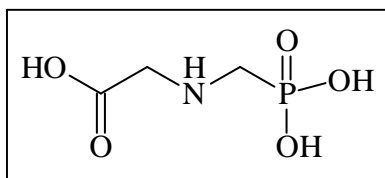


Figura I.2. Estructura química del glifosat

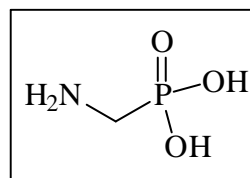


Figura I.3. Estructura química de l'AMPA

Les principals propietats físico-químiques del glifosat es mostren en la **Taula I.4**.

FÓRMULA MOLECULAR	C ₃ H ₈ NO ₅ P
NOM CIENTÍFIC	N-(fosfonometil) glicina
FORMA	cristalls blancs inodors
GRUPS QUÍMICS	fosfònic, amino i àcid
PES MOLECULAR	169,09 g·mol ⁻¹
SOLUBILITAT	12 g·L ⁻¹ (25°C) en aigua en la forma àcida insoluble en la majoria de dissolvents orgànics (acetona, etanol, xilè)
PRESSIÓ DE VAPOR, 20-25°C (Pa)	negligible (no volàtil)
COEFICIENT DE PARTICIÓ (K _{ow})	0,0006-0,0017
PUNT DE FUSIÓ	200°C (no volàtil)
COEFICIENT D'ADSORCIÓ (K _{oc})	24000 mL·g ⁻¹
VIDA MITJA	47 dies (estimació mitjana)
DOSI ORAL LD ₅₀ per rates mascles (mg·kg ⁻¹)	4230 (segons la OMS)
[19]	5600 (segons Monsanto)
METABÒLITS	àcid aminometilfosfònic (AMPA)

Taula I.4. Principals propietats físico-químiques de l'herbicida glifosat [20,21].

Les estructures d'ambdós compostos, juntament amb les dades de la **Taula I.4**, posen de manifest l'elevada polaritat d'ambdós compostos, així com el seu caràcter amfòter. Les constants d'acidesa del glifosat i l'AMPA són les següents [18]:

GLIFOSAT: pK₁ = no determinable, <2 pK₂ = 2,44 pK₃ = 5,52 pK₄ = 10,08
 AMPA: pK₁ = no determinable, <2 pK₂ = 5,49 pK₃ = 10,09

Les reaccions de ionització que pateix el glifosat es mostren en la **Figura I.4**.

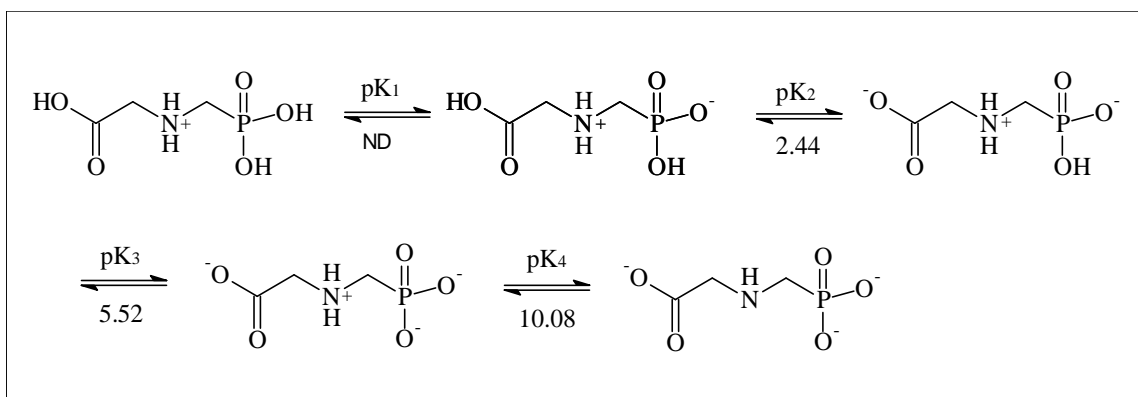


Figura I.4. Reaccions de ionització del glifosat

Aquest herbicida és absorbit principalment per les fulles i a continuació es transporta per tota la planta. Actua en varis sistemes enzimàtics que controlen la biosíntesi d'aminoàcids aromàtics essencials per les plantes i microorganismes. Pocs dies de l'aplicació de l'herbicida no hi ha cap part de la planta que sobrevisqui.

SUBSTÀNCIES AUXILIARS: TENSIOACTIUS NO IÒNICS

Les formulacions comercials de glifosat contenen habitualment un tensioactiu no iònic de tipus alquilamina etoxilat (ANEO), que té una estructura general: C_mNEO_n , on $n=x+y$.

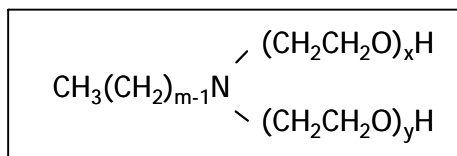
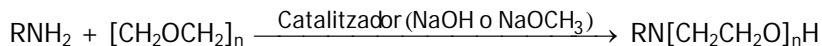


Figura I.5. Estructura química del tensioactiu de tipus alquilamina etoxilat.

Els ANEOs es preparen industrialment per reacció d'alquilamines, les quals poden provenir de diversos olis o greixos naturals (coco, lauril, *tallow*,...) amb òxid d'etilè (EO), a condicions d'elevada pressió i temperatura [22]:



El producte natural de partida és una barreja de varis àcids grassos, els quals determinen la longitud de les cadenes alquiliques de l'ANEO final. Per altra banda, el producte final comprèn una distribució típica de Poisson de varis homòlegs etoxilats al voltant de l'homòleg de pes molecular desitjat, que es pot sintetitzar treballant en les condicions de reacció adequades [23]. D'aquesta manera, els tensioactius inclosos en les formulacions comercials són barreges de múltiples homòlegs de diferent longitud de cadenes hidròfobes alquiliques i de cadenes hidròfiles etoxilades.

ÀCID GRAS	Nº àtoms Carboni: Nº insaturacions	Percentatge en massa
Àcid Oleic	18 : 1	40,8
Àcid Palmític	16 : 0	25,3
Àcid Estèàric	18 : 0	19,4
Àcid Palmítolèic	16 : 1	4,0
Àcid Mirístic	14 : 0	3,5

Taula I.5. Composició típica del greix *tallow*, amb la seva distribució d'àcids grassos.

Respecte l'herbicida glifosat, les seves formulacions solen contenir tensioactius derivats del *tallow*, un greix provinent del fetge de vaca i/o ovella. La composició d'aquest greix es mostra a la **Taula I.5**, de manera que els homòlegs de cadenes alquílques majoritaris en el tensioactiu final seran els C₁₈ (saturat i insaturat) i el C₁₆ (saturat).

En aquest treball el tensioactiu comercial estudiat ha estat el Berol 907, que està format en un 70% per *tallowamina* etoxilat, 1-5% etilenglicol i la resta, aigua. Les propietats físico-químiques d'aquest producte es mostren en la següent taula [24]:

NOM COMERCIAL	BEROL 907
DESCRIPCIÓ QUÍMICA/APLICACIÓ	Agent humidificant
COMPOSICIÓ	<i>tallowamina</i> etoxilat, 70 % etilenglicol, 1-5 % aigua, la resta
CONTINGUT TOTAL NITROGEN	1,04-1,13%
ASPECTE	Líquid
COLOR	Color tabac
OLOR	-
PUNT D'EBULLICIÓ	> 100°C
PUNT DE FUSIÓ	< 10°C
TEMPERATURA DE INFLAMACIÓ	> 100°C
PRESSIÓ DE VAPOR	-
DENSITAT DE VAPOR RELATIVA	-
DENSITAT (20°C)	~ 1055 kg·m ⁻³
VISCOSITAT (20°C)	~ 300 mPa·s
pH, 1 % en aigua	9-10,5
pKa [25]	5,8-6,2
ESTABILITAT	Normalment estable
PRODUCTES DE DESCOMPOSICIÓ	No coneguts
DL50 (oral Rata)	1569 mg·kg ⁻¹
SOLUBILITAT, 5% (25°C)	Aigua soluble Isopropanol soluble Querosè insoluble Oli Mineral insoluble Octanol soluble Xilè insoluble

Taula I.6. Principals propietats físico-químiques del tensioactiu Berol 907.

EFFECTES AMBIENTALS

Un problema actual a Europa, on generalment es practica una agricultura molt intensiva, és la contaminació de l'ecosistema, sobretot de les aigües, amb residus de plaguicides. En aquests casos, per avaluar el risc tòxic cal tenir present l'alt nivell de consum i l'efecte de concentració a l'organisme. És necessari també establir límits de seguretat molt més restrictius respecte els que s'apliquen a contactes episòdics. La definició d'aquests límits va lligada a la possibilitat de fer determinacions analítiques molt sensibles dels compostos presents a l'aigua, que avui són accessibles amb les tècniques instrumentals modernes.

A continuació s'exposen alguns aspectes importants pel que fa a regulació de glifosat i del tensioactius no iònics. Cal tenir present però, que la barreja d'aquests dos components en les formulacions comercials poden donar unes propietats diferents al producte final.

GLIFOSAT

El glifosat ha estat sotmès a centenars d'estudis toxicològics i ambientals durant els seus gairebé 30 anys d'ús. L'Agència de Protecció Ambiental dels Estats Units d'Amèrica (EPA), la Comissió Europea (EC) i altres cossos reguladors o organitzacions científiques, com l'Organització Mundial de la Salut (OMS), han revisat el conjunt de característiques toxicològiques i ambientals dels productes comercials de glifosat que ha proporcionat la comunitat investigadora (indústria, agències governamentals, universitats i institucions independents). El consens general és que l'herbicida glifosat quan s'aplica adequadament suposa un risc baix per la salut humana i el medi ambient.

El glifosat presenta una toxicitat aguda oral i dèrmica relativament baixa. Segons la EPA, se situa en la categoria de toxicitat III (Categoria de Toxicitat I indica el grau màxim de toxicitat aguda, i la Categoria IV la més baixa) [26]. D'acord amb l'Organització Mundial de la salut, la LD50 oral en rates de glifosat pur és de 4 230 mg·kg⁻¹. La OMS i l'EPA coincideixen en assenyalar que el glifosat no presenta activitat mutagènica, carcinogènica ni teratogènica [26,27]. L'EPA situa el glifosat pur en la Categoria E (evidència de no-carcinogenitat per humans), la categoria més favorable pel que fa a carcinogenitat. Pel que fa a la valoració del risc de molts aliments per l'ús de glifosat, l'EPA conclou que l'exposició i risc de la dieta humana són mínimes. Segons l'estudi dut a terme per G.M.Williams et al., el glifosat tampoc es bioacumula, no afecta la reproducció animal ni actua com a disruptor endocrí [28]. A partir d'aquests estudis, l'EPA proposa pel glifosat una dosi de referència (RfD) o exposició diària estimada que no causaria efectes adversos al llarg d'una vida de 2 mg·kg⁻¹·dia⁻¹ [26]. En general, els tests de toxicitat de glifosat només reben símptomes negatius per casos d'exposicions a dosis extremadament elevades, per exemple, varis grams per quilogram del cos humà. Pel cas de peixos, invertebrats aquàtics i abelles, el glifosat es considera pràcticament no tòxic, mentre que per aus es pot parlar de toxicitat molt baixa.

Aquesta baixa toxicitat en animals es pot atribuir, en gran part, a l'inhibició per part del glifosat d'un enzim implicat en la ruta metabòlica de l'àcid xiquímic, que només es troba en microorganismes i plantes [29].

El glifosat és principalment degradat per acció fungicida o microbiana al sòl o a l'aigua, en condicions aeròbies o anaeròbies. El seu principal metabòlit en aigües i sòls és l'àcid aminometilfosfònic (AMPA), tot i que les quantitats màximes que es troben en sòls d'aquest compost són d'aproximadament el 20% de la dosi aplicada en condicions aeròbies i del 0,5% en condicions anaeròbies. La causa n'és que aquest compost també es degrada per acció microbiana, principalment a diòxid de carboni i fosfat. La toxicitat d'aquest metabòlit també és molt baixa pels mamífers [28].

La velocitat de degradació d'un compost químic es mesura per la seva vida mitjana (el temps necessari per tal que la meitat del compost aplicat sigui degradat). Pel que fa a la degradació de glifosat en sòls té lloc bàsicament pels microorganismes presents. En funció de les propietats del sòl l'herbicida es pot degradar a diferents velocitats, de manera que en la bibliografia es troben un ampli rang de valors de vida mitjana per aquest compost en sòls (de 1 a 174 dies). En la majoria de casos, però, més del 90% del glifosat aplicat es degrada en els sis mesos posteriors a l'aplicació. Generalment, s'inclou en el grup de plaguicides de persistència moderada en sòls [21]. En medi aquàtic, la degradació també té lloc per acció biològica [28]. Les dades proporcionades en molts estudis indiquen que la vida mitjana del glifosat en aquest medi oscil·la entre els 7 i 14 dies. En les aigües superficials el glifosat és degradat contínuament per microorganismes. L'herbicida però, no té tendència a acumular-se en els organismes aquàtics.

Quant a l'adsorció de glifosat en sòls, cal dir que aquest herbicida s'adsorbeix fortament a la majoria de sòls i sediments del medi. El potencial d'adsorció al sòl d'aquest herbicida és superior a d'altres herbicides de característiques similars. El paràmetre conegut com el coeficient d'adsorció al sòl (Koc) mesura la capacitat dels compostos químics per adsorbir-se al sòl. En la següent taula es mostren els valors de Koc per varis herbicides, on els valors més alts impliquen una major adsorció del compost pel sòl:

Principi actiu	Koc
2,4-D	109
Alaclor	170
Metolaclor	200
Trifluralin	7 000
Glifosat	24 000
Pendimetalin	24 300

Taula I.7. Valors de Koc (mL·g⁻¹) per diversos herbicides. Servei de Conservació del Sòl de EEUU.

D'acord amb les dades de toxicitat de l'herbicida glifosat i dels efectes ambientals que s'acaben d'esmentar, organismes oficials com la Comissió Europea (CE), l'EPA o la OMS, entre d'altres, han fet públiques una sèrie de normes que restringeixen la concentració de glifosat en diferents àmbits regionals i en diferents matrius ambientals.

Pel que fa a la legislació europea, les normes de qualitat bàsica que han de complir les aigües destinades a consum humà estan descrites a la Directiva 98/83/CE del Consell, efectiva a partir de 25 de desembre de 2003. En aquesta directiva, s'estableix que la màxima concentració d'un plaguicida en aigües no ha de superar els $0,1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, mentre que la suma total de plaguicides ha de ser inferior als $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ [30]. En aquesta legislació no es tenen en compte les característiques individuals dels plaguicides, fet poc lògic considerant el gran esforç investigador arreu del món per determinar la toxicitat i persistència de tot tipus de plaguicides.

L'EPA estableix dues categories d'estàndards de les aigües potables: els estàndards primaris o Nivell Màxim de Contaminant (MCL, *Maximum Contaminant Level*), que són aplicables legalment als sistemes públics d'aigua, i els estàndards secundaris o Objectiu del Nivell Màxim de Contaminant (MCLG, *Maximum Contaminant Level Goal*) que són guies informatives dels contaminants que poden suposar cert risc per la salut, tot i no ser obligatoris. Els MCL sempre s'estableixen tan pròxims als MCLG com sigui possible, considerant la tecnologia més actual. Pel cas del glifosat, ambdós estàndards estan establerts en 0,7 parts per milió (ppm) [31].

L'Organització Mundial de la Salut també estableix que els màxims nivells de glifosat en aigües potables han de ser 0,7 ppm [32], coincidint doncs, amb els de l'EPA.

Així doncs, s'observa com tant l'EPA com la OMS permeten una concentració de glifosat en aigües potables 7 000 vegades superiors que la de la Unió Europea.

TENSIOACTIUS NO IÒNICS

L'estudi dels processos de degradació dels tensioactius és també molt important per tal de predir-ne la toxicitat. Tot i els escassos estudis sobre la degradació dels alquilamina etoxilats, Van Ginkel i Kroon han descrit un mecanisme de biodegradació que consisteix en dues etapes (veure **Figura I.6**) [33].

En una primera etapa té lloc un trencament ràpid central seguit de la degradació de dos dels intermedis formats. En una segona etapa més lenta es degrada l'amina secundària etoxilada, mentre que la degradació de l'aldehid té lloc mitjançant una β -oxidació. Hoey i Gadberry van confirmar més tard aquest mecanisme de biodegradació [34].

Cal destacar que en els alquilamina etoxilats (pKa: 6-7) el pH és un factor crític i que influeix de manera determinant als processos que pot patir el tensioactiu. A pHs baixos el nitrogen dels ANEOs es troba protonat, mentre que a pHs superiors, els compostos són neutres. És per aquest motiu que es creu que la degradació dels ANEOs és molt dependent de la matriu en què es

trobi, ja que l'adsorció del tensioactiu estarà directament afectada pel pH del medi. Pel que fa a dades numèriques, s'estima que el temps de vida mitjana dels alquilamina etoxilats és de l'ordre de 20 a 40 dies i fins i tot més llargs en fangs i aigües residuals. Si es comparen amb els productes orgànics persistents, els ANEOs es consideren compostos fàcilment degradables.

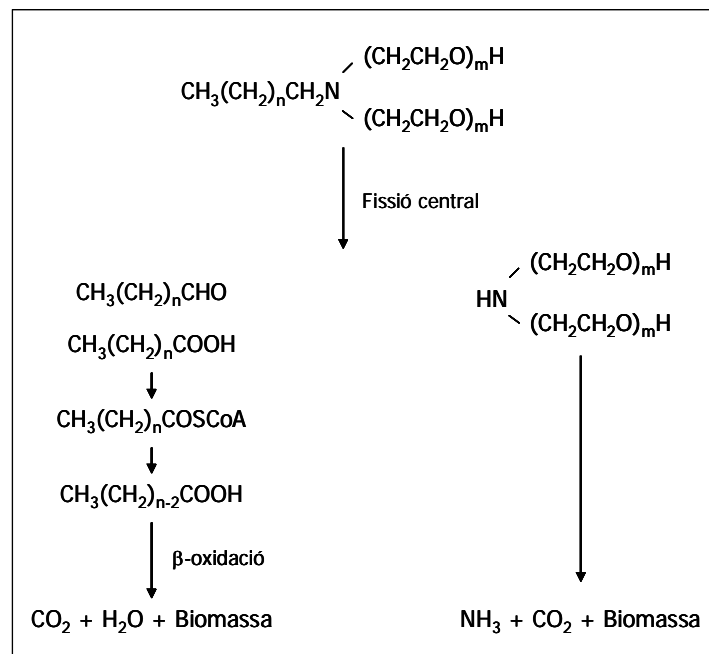


Figura I.6. Mecanisme de biodegradació dels alquilamina etoxilats.

En general, es classifica els alquilamina etoxilats com a compostos no tòxics tant per organismes aquàtics com per organismes terrestres. Els valors d'EC50 (concentració a la qual el 50% dels organismes es veuen afectats) es troben en un rang de 4,1 a 4,9 mg·L⁻¹. El que sembla clar és que la seva toxicitat generalment augmenta quan disminueix el nombre de grups etoxi i augmenta la longitud de la cadena alquilica [12].

Pel que fa als ANEOs, l'estudi fet per Williams et al. [28] sobre la seguretat i risc toxicològic de l'herbicida RoundUp® revela que el tensioactiu addicionat en aquest herbicida és lleugerament tòxic, però que no representa cap perill pel que fa a toxicitat aguda. A concentracions elevades, el tallowamina etoxilat presenta un caràcter altament irritant als ulls, però a les concentracions en què es troba en la formulació comercial aquest problema es redueix de forma dràstica.

Tot i la baixa toxicitat d'aquest tipus de tensioactiu, cal estudiar la seva toxicitat quan es combina amb el principi actiu de la formulació comercial, ja que alguns estudis demostren una resposta sinèrgica dels organismes exposats a aquests productes, o sigui, la toxicitat del producte final és superior a la suma de les toxicitats del tensioactiu i el principi actiu individualment [35].

En aquest sentit, en un estudi de toxicitat de Tsui et al.[36] es conclou que l'ordre de toxicitat de les substàncies presents en la formulació comercial, així com ella mateixa, és: alquilamina etoxilat > glifosat en RoundUp > glifosat en forma àcida > sal d'isopropilamina de

glifosat. Tot i això destaquen que la toxicitat del tensioactiu depèn en gran part de l'espècie en què s'avalua. Els mateixos autors, en un altre treball, comparen la toxicitat de diverses formulacions comercials de glifosat en medi aquós i en sediments [37]. En aquest cas els resultats mostren que la toxicitat de les diverses formulacions depèn bàsicament dels tensioactius addicionats. A la vegada s'observa una disminució de la toxicitat d'aquests productes quan s'apliquen en sediments amb un contingut de carboni orgànic més alt.

L'ús de plaguicides implica la introducció de tensioactius en forma d'esprai en sòls secs o humits, en els quals els processos de degradació i adsorció, així com la seva toxicitat, poden afectar de forma diferent, i presumiblement amb pitjors efectes, que en fangs i aigües residuals. Els processos d'escorrentia, percolació, adsorció i biodegradació són els processos que pateixen més habitualment aquestes substàncies. Les rutes de transport via aigua de la pluja poden ser tant horitzontals, acabant en aigües superficials, com verticals, per percolació a l'aigua subterrània. Una altra ruta és l'adsorció al sòl i sediments o al material biològic (biota) com poden ser plantes, arrels o microorganismes del sòl. També cal tenir en compte que els tensioactius es poden degradar de forma aeròbica o anaeròbia [12].

Es disposa de molt poques dades quantitatives pel que fa al destí dels tensioactius. Tot i això, apareixen alguns estudis en la bibliografia que quantifiquen la presència dels tensioactius de formulacions de plaguicides en àrees agrícoles, on es detecten alcohol etoxilats a nivells de $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ en aigües subterrànies i en aigües intersticials [38], i a nivells de $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ i $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ en fangs residuals tractats [39] i no tractats [40], respectivament. En cap cas s'han detectat alquilamines etoxilats.

Les propietats físico-químiques dels tensioactius determinaran els processos que poden patir durant el seu transport. En el cas dels tensioactius de tipus alquilamina etoxilats, les seves propietats àcid-base determinaran el seu destí final segons el tipus de matriu on es trobi. A més, al ser compostos fàcilment degradables es consideren compostos poc mòbils, que rarament es podran percolar per la columna de sòl fins arribar a les aigües subterrànies.

La legislació existent pel que fa a tensioactius només fa referència a l'ús d'aquestes substàncies en productes detergents (Regulació (EC) No 648/2004 del Parlament Europeu i del Consell sobre detergents del 31 de març 2004 [51]). Pel que fa als tensioactius que s'utilitzen com a substàncies auxiliars en formulacions de plaguicides, no existeix una legislació específica. La legislació ambiental referent als tensioactius amb aquesta aplicació es trobaria inclosa indirectament en la directiva europea 91/414/EEC, on s'estableixen els requeriments ambientals, com les dades de degradació i toxicitat, tant pels principis actius com per les formulacions comercials de plaguicides.

PREPARACIÓ DE LA MOSTRA

L'anàlisi de mostres reals no consisteix només en la determinació química dels anàlits, sinó que una part molt important de l'anàlisi es dedica a la preparació de la mostra, prèvia a la determinació analítica.

En l'anàlisi medioambiental és de vital importància la manipulació de mostres reals prèvia a la seva determinació analítica. Només un tractament adequat de la mostra proporcionarà resultats fiables que contribuiran, juntament amb altres paràmetres, a conèixer la distribució i el comportament de les substàncies d'interès en les diverses matrius ambientals.

Habitualment l'etapa de preparació de la mostra suposa dues-terceres parts del temps total del procediment analític i en representa la principal font d'errors. En general, les mostres aquoses requereixen menys pretractament que les mostres de sòls o aliments, i fins i tot en alguns casos pot ser que no sigui necessari cap tipus de pretractament.

En aquest apartat es comentaran els trets generals de la presa i preparació de la mostra, per tot seguit aprofundir en els anàlits i les matrius d'interès d'aquest treball: mostres aquoses i mostres de sòls. Pel que fa a la preparació de mostres que contenen tensioactius etoxilats, només es tractaran els principals mètodes d'extracció i preconcentració utilitzats en aquesta tesi [42].

PRESA, PRETRACTAMENT I CONSERVACIÓ DE LA MOSTRA

- **PRESA DE MOSTRA**

La presa de mostra és una de les etapes prèvies a qualsevol procés de mesura química. L'objectiu primordial és la reducció de la massa total del material objecte de l'anàlisi a una porció representativa que es pugui analitzar a nivell de laboratori. La problemàtica associada a aquesta etapa neix del fet que les mostres reals no són absolutament homogènies, sinó que presenten discontinuïtats tant en la seva composició (heterogeneïtat de les propietats generals de la mostra) com en el contingut de l'anàlit o anàlits objecte de la determinació.

- **PRETRACTAMENT DE LA MOSTRA**

El pretractament de la mostra és l'etapa intermèdia entre la presa i el tractament de la mostra. Aquest pretractament inclou operacions físiques sobre la mostra abans d'iniciar els processos analítics implicats en la seva dissolució o preparació per a l'anàlisi: assecat, liofilització, trituració, homogeneïtzació, etc.

En el cas de mostres aquoses, aquest pretractament sol consistir en una simple filtració de la mostra, prèviament agitada per homogeneïtzar-la, a través d'un filtre de 0,45 µm per tal d'eliminar la matèria particulada present. És important assegurar-se sempre que el material del filtre no reté els anàlits d'interès. Aquest és el procediment habitual previ a la determinació de glifosats en mostres aquoses [43-45].

Els pretractaments més habituals per mostres de sòls són l'assecat, la trituració i l'homogeneïtzació de la mostra, aplicant-se totes elles o no depenent dels objectius finals de la determinació analítica.

Una primera etapa d'assecat del sòl és recomanable, ja que la presència d'aigua o humitat pot donar lloc a alteracions no desitjades. El contingut d'aigua influeix en molts casos en l'extracció d'alguns anàlits, i en alguns casos, l'aigua de la mostra pot produir reaccions d'hidròlisi. Per aquests motius, i per la possible variació del contingut d'humitat d'una mostra segons la matriu i les condicions atmosfèriques en què es troba, és recomenable expressar els resultats obtinguts en unitats de massa seca. Això implica que o bé es determina amb precisió el contingut d'humitat en una alíquota abans de l'anàlisi o bé s'elimina abans de fer la pesada, opció més habitual.

Les etapes de trituració i homogeneïtzació de la mostra són adequades per garantir la representativitat de la mostra que s'analitzarà posteriorment. És recomanable reduir la mida de la partícula per minimitzar els errors durant l'anàlisi. Si per algun motiu interessa conèixer la mida de partícula de la mostra, és necessari tamisar la mostra amb un tamís de la mida de malla desitjada. Si es vol obtenir una mida de partícula dins d'un interval caldrà passar la mostra per dos tamisos, primer un de mida de malla major i després per un de mida inferior.

Pel que fa a sòls que contenen glifosat generalment es du a terme una etapa d'assecat a temperatura ambient [46-51] per evitar possibles pèrdues de l'anàlit a temperatures superiors. En molts casos es determina paral·lelament el grau d'humitat de les mostres [52,53]. L'etapa d'homogeneïtzació es realitza en qualsevol tipus de sòl que contingui glifosat [46,47], a causa de la gran heterogeneïtat d'aquestes mostres. El mètode més habitual és passar les mostres per un tamís de la mida de malla desitjada, generalment 1-mm [54] o 2-mm [43,53,55-57].

- **CONSERVACIÓ DE LA MOSTRA**

Durant el transport i/o emmagatzematge de mostres, la concentració dels anàlits pot variar de forma significativa, constituint una important font d'error. Idealment les mostres no s'haurien d'emmagatzemar, però desafortunadament en pocs casos es poden analitzar immediatament després de ser rebudes. La decisió de com, quant de temps i en quines condicions s'han de conservar les mostres sol recaure en l'analista, de manera que el coneixement dels anàlits i l'experiència professional són decisives per conservar la mostra de manera correcta.

La congelació de la mostra sol ser la primera opció per a la conservació de la mostra, ja que la majoria d'anàlits i de matrius són més estables a baixes temperatures. Un segon aspecte important és el risc de pèrdua o guany d'humitat de les mostres, que podria contribuir a la degradació o possibles transformacions no desitjades de compostos o anàlits d'interès. L'efecte de la llum també és ben conegut per la seva capacitat de produir reaccions fotoquímiques que poden originar transformacions importants. Per evitar-ho, sempre que existeixi risc, les mostres s'han de conservar en la foscor. Un altre aspecte important és la contaminació creuada. Finalment, les mostres amb anàlits volàtils s'han de conservar en contenidors hermètics i guardar-los preferiblement en llocs frescos, per reduir la pressió de vapor dels anàlits. Abans de l'anàlisi, totes les mostres han d'assolir la temperatura ambient, procurant evitar els riscos que s'acaben de citar.

La degradació de glifosat en mostres aquoses ve determinada per l'activitat microbiana, per la temperatura i, en menys mesura, per processos fotolítics [44]. Aquests factors, doncs, seran els que s'hauran de considerar a l'hora de conservar les mostres en l'estat original.

En general es recomana la conservació de mostres aquoses de plaguicides en recipients de vidre borosilicat amb taps de tefló [58]. En el cas del glifosat però, a causa de la seva elevada capacitat d'adsorció en les parets internes dels recipients de vidre [59], es recomana conservar les mostres en botelles de polipropilè protegides amb paper d'alumini, per evitar la degradació fotoquímica [45].

Tot i que la majoria d'autors conserven les mostres refrigerades a +4°C [60-62], Miles et al. [59] adverteixen que a aquesta temperatura les mostres no es conserven més d'un mes. En canvi, amb la congelació de mostres naturals a 0°C durant un període de 3 mesos, no s'observa la degradació de glifosat [63,64]. Alferness i Iwata [43], per tal de prevenir l'activitat microbiana, afegeixen unes gotes d'àcid clorhídric concentrat a les mostres, que també conserven a la nevera.

En les mostres de sòls, els processos que provoquen la degradació de glifosat són bàsicament els mateixos que en mostres aquoses, tot i que en aquest cas el contingut més elevat de matèria orgànica afavoreix una major activitat microbiana.

Generalment les mostres de sòls es col·lecten en bosses de plàstic [64], per la tendència del glifosat a adsorbir-se en superfícies de vidre. El transport se sol realitzar amb refrigeració a +4°C, i una vegada s'arriba al laboratori, les mostres es conserven al congelador a -20 o -40°C [46,55,63,64]. En alguns casos s'especifica que les mostres es conserven en la foscor, per evitar reaccions fotoquímiques [53].

TRACTAMENT DE LA MOSTRA

El tractament de la mostra és l'etapa que implica sotmetre la mostra a processos físics i químics amb o sense reaccions químiques per preparar-la per a l'anàlisi. L'objectiu d'aquest tractament és disposar de l'anàlit en l'estat més pur possible. Amb aquest objectiu, el tractament de la mostra engloba en general tres etapes: extracció, neteja o clean-up i preconcentració.

L'extracció permet l'aïllament de la substància a determinar separant-la de la matriu (mostres líquides i sòlides). Aquesta etapa és especialment problemàtica, ja que si l'extracció és massa suau, part de l'anàlit seguirà unit a la matriu, provocant un error en la determinació final.

La purificació o clean-up de la mostra permet l'eliminació de possibles substàncies interferents que constitueixen la matriu original, coextretes durant l'etapa d'extracció dels anàlits. Aquestes substàncies interferents podrien dificultar o impedir la determinació dels anàlits d'interès (per exemple, coelució i detecció a la mateixa longitud d'ona en un detector UV-vis) o podrien tenir alguna influència en l'instrument (per exemple, ionització de l'anàlit en l'interfase d'un detector d'espectrometria de masses)... Aquesta etapa pot ser una font important d'error si es produeixen pèrdues dels anàlits.

Tot i el gran desenvolupament dels mètodes analítics, és freqüent que la seva aplicació directa no tingui una sensibilitat suficient per detectar i/o quantificar concentracions baixes de l'anàlit. En aquests casos l'aplicació d'una tècnica de preconcentració prèvia permet augmentar la concentració dels anàlits, i així poder ser determinats mitjançant la tècnica disponible.

Cal tenir en compte que els anàlits d'interès finalment hauran d'estar en un medi compatible amb el sistema analític, cosa que implica la presència de solvents volàtils en cromatografia de gasos i solvents miscibles amb la fase mòbil en cromatografia líquida.

Aquestes etapes es poden realitzar simultàniament en alguns casos, generalment en mostres aquoses.

- **MÈTODES D'EXTRACCIÓ I PRECONCENTRACIÓ EN MOSTRES AQUOSES**

A continuació es comenten les diferents tècniques disponibles i la seva aplicació en la determinació de glifosat, AMPA i tensioactius no iònics en mostres d'aigua.

EXTRACCIÓ LÍQUID-LÍQUID (LLE)

L'extracció líquid-líquid (LLE) és una tècnica de separació clàssica. Aquesta tècnica es basa en un procés de transferència d'una o varies substàncies des d'una fase líquida a una altra, immiscible amb la primera. L'extracció es pot dur a terme en un sol pas (extracció simple) o en diversos passos consecutius (extracció múltiple), sent aquesta darrera l'opció més utilitzada, ja que

s'obté una millora considerable del rendiment de l'extracció [65]. Les principals desavantatges d'aquesta tècnica són els grans volums de dissolvents orgànics que s'utilitzen (hexà, diclorometà), cars i totalment indesitjables pel medi ambient, la dificultat d'automatització i la formació d'emulsions que impedeixen una extracció eficient.

Aquesta tècnica és poc aplicada a l'extracció de glifosat, ja que aquest compost presenta una elevada solubilitat en aigua i és insoluble en la majoria de dissolvents orgànics. No obstant, existeixen diverses publicacions recentment reportades [66] on es descriu la purificació d'extractes de glifosat provinents d'aliments mitjançant LLE.

En el cas dels tensioactius no iònics, el principal inconvenient d'aquesta tècnica és la formació d'emulsions estables, les quals dificulten l'etapa de separació [67]. Boyer et al. [68] van descriure al 1976 un dels primers mètodes d'extracció per tensioactius etoxilats, el qual consisteix en una extracció en quatre etapes amb acetat d'etil, mitjançant la tècnica anomenada subllació amb dissolvent. Aquesta tècnica es basa en la tendència dels tensioactius a acumular-se en les interfícies, per exemple, interfícies aire-aigua. En aquesta tècnica, es dispersen bombolles molt fines d'un gas inert, generalment nitrogen o heli, en la mostra aquosa, transferint els tensioactius no iònics cap a la capa superior d'acetat d'etil. Aquesta tècnica ha estat utilitzada posteriorment per altres autors, prèvia a l'anàlisi cromatogràfica [69].

Un mètode posterior proposa una modificació de la força iònica i el pH de la solució a ser extreta, que permet una separació més senzilla i eficient. En aquest mètode es barregen 300 mL d'aigua residual amb 5 mL d'àcid clorhídric concentrat, i a continuació s'afegeixen 40 g de NaCl. La mostra resultant s'agita. Tot seguit s'afegeixen 10 mL de diclorometà i es torna a agitar. Finalment se separa la fase orgànica [70]. Altres mètodes semblants, amb l'aplicació de volums diferents de mostra i diferents dissolvents orgànics, com acetat d'etil o dietil éter, també han permès l'extracció i/o purificació de tensioactius no iònics amb èxit, obtenint-se recuperacions del 45 al 100% [71,72].

Recentment, s'han aplicat algunes tècniques innovadores relacionades amb la LLE. Un mètode destacable, tot i que ser desenvolupat per a tensioactius catiónics, és el descrit per Morberg i col·laboradors [73]. Aquest mètode implica l'ús d'una membrana microporosa per realitzar una extracció líquid-líquid donant lloc a la tècnica anomenada extracció líquid-líquid amb membrana microporosa (MMLLE). El potencial d'aquesta tècnica és la possible automatització de les típiques aplicacions de la LLE tradicional. La membrana hidrofòbica s'impregna amb un dissolvent orgànic, de manera que els porus queden plens del dissolvent. La membrana actua de suport entre la solució de mostra aquosa i el dissolvent orgànic de la fase extractora. A causa de l'elevada solubilitat dels anàlits en el dissolvent impregnat a la membrana, aquests es poden transferir d'una fase a l'altra amb facilitat. Aquesta tècnica fou inicialment combinada amb cromatografia de gasos [74], però el seu ús s'ha extès actualment a la cromatografia líquida. Les avantatges d'aquesta tècnica són la no formació d'emulsions, típiques en LLE, el mínim consum de

dissolvents orgànics, la facilitat per connectar el dispositiu on-line amb el cromatògraf i els factors de preconcentració elevats que s'obtenen, de fins a 300 en alguns homòlegs del tensioactiu estudiat.

MEMBRANES LÍQUIDES

L'extracció i preconcentració mitjançant la tècnica de membranes líquides és una alternativa a l'extracció líquid-líquid tradicional. Aquesta tècnica combina la selectivitat i preconcentració de la LLE amb l'eficiència en l'eliminació d'interferències de la matriu característica de la tècnica de diàlisi [75].

Un tipus de membrana líquida que s'ha utilitzat recentment per l'extracció de glifosat i AMPA són del tipus suportades (MLS) (**Figura I.7**), en les quals la membrana consisteix en un dissolució d'agent extractant que impregna un suport microporós inert. Fins ara, el mètode només s'ha aplicat a mostres sintètiques, afegint un transportador catiònic (sal d'amoni quaternari) a la fase membrana. L'aplicació d'aquesta metodologia analítica en l'anàlisi de mostres reals encara no s'ha comprovat [76,77].

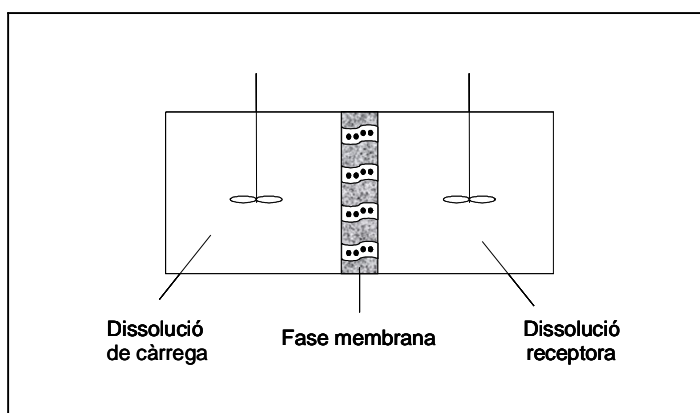


Figura I.7. Esquema d'una membrana líquida suportada.

MICROEXTRACCIÓ EN FASE SÒLIDA (SPME)

Tot i que la microextracció en fase sòlida (SPME) s'ha aplicat sobretot a la cromatografia de gasos, des que Chen et al. van descriure un mètode de SPME / HPLC [78] s'estan desenvolupant cada vegada més mètodes que inclouen ambdues tècniques. En aquesta tècnica els anàlits es difonen directament en la fibra del dispositiu de SPME, on són concentrats. A continuació, aquest dispositiu és transferit al port d'injecció de l'HPLC, mitjançant una interfície dissenyada especialment, on els anàlits són desorbitats per l'eluent i dipositats al principi de la columna cromatogràfica.

Tot i que aquesta tècnica encara no ha estat descrita per a l'extracció de glifosat, l'opció d'extreure i preconcentrar tensioactius no iònics mitjançant SPME per ser analitzats per HPLC ha estat escollida ja per diversos autors.

Boyd-Boland et al. [79] fan un estudi comparatiu entre diverses fases de recobriment de la fibra per veure quin tipus de material proporciona un millor extracció de tensioactius de tipus alquilfenol etoxilat. La fibra experimental anomenada Carbowax/resina *template* (CWAX/TR), de Supelco, és la que permet obtenir una major extracció dels anàlits, en 50 min. També cal destacar que amb aquesta fibra es manté la distribució de cadenes etoxilades abans i després de l'extracció. Aquesta tècnica s'acobla a HPLC en fase normal amb un detector UV, obtenint-se un rang de linealitat de 0,1 a 100 mg·L⁻¹.

Aranda i Burk [80] han descrit un mètode de SPME-HPLC-FL amb derivatització on-line per determinar alcohol etoxilats en aigües. La fibra emprada en aquest cas és de polidimetilsiloxà-divinilbenzè. Aquest mètode presenta un límit de detecció de 0,1 mg·L⁻¹.

Finalment, Chee et al. [81] també apliquen aquesta tècnica per a l'extracció de nonilfenol etoxilats en mostres aquoses, tot i que en aquest cas és acoblada a un cromatògraf de gasos amb detector FID. S'utilitza una fibra de polidimetilsiloxà i el límit de detecció obtingut també és de 0,1 mg·L⁻¹.

EXTRACCIÓ EN FASE SÒLIDA (SPE)

Donat que aquesta tècnica ha estat emprada en una part important del present treball, es desenvoluparà més extensivament, tant a nivell teòric com en les seves aplicacions pràctiques per als anàlits d'interès.

L'extracció en fase sòlida (SPE) és actualment una de les tècniques més emprades en la preparació de la mostra a causa de la seva rapidesa i selectivitat. La seva versatilitat permet que pugui ser utilitzada amb nombrosos propòsits, entre els quals es troben l'extracció, la neteja de la mostra (o *clean-up*) i la concentració de traces, entre d'altres. És un mètode de preparació de mostra que concentra i purifica els anàlits que estan en solució per adsorció en una fase sòlida, que són posteriorment dessorbitats amb un eluent adequat.

La SPE ha anat substituint l'extracció líquid-líquid, que com s'ha comentat presenta desavantatges importants. En extracció en fase sòlida s'utilitzen volums petits de dissolvents orgànics i és una tècnica ràpida i senzilla, fàcilment automatitzable i que permet l'acoblament amb tècniques cromatogràfiques. També s'ha de destacar que amb aquesta tècnica es poden assolir factors de preconcentració molt elevats, característica molt important en l'anàlisi de traces.

La fase sòlida generalment consisteix en un material polimèric o de sílica modificada, amb unes característiques físiques i propietats químiques adequades. La naturalesa d'aquest material i els grups funcionals addicionals determinen el mode d'actuació del sorbent.

L'extracció pot realitzar-se en discontinu, on el sòlid extractant està íntimament mesclat amb la solució líquida de mostra, o en continu, on el sòlid s'empaqueta en un tub petit i es passa la mostra líquida a través seu, essent aquesta darrera opció la més utilitzada en anàlisi química. Segons la configuració de la fase sòlida la SPE pot tenir lloc en columnes de vidre amb empaquetament manual del sòlid adsorbent, cartutxos comercials o discs.

El procés d'extracció en fase sòlida es pot dividir en quatre etapes [82]: (1) condicionament, (2) adsorció dels anàlits, (3) rentat, i (4) elució dels anàlits. Aquests passos es veuen esquematitzats en la **Figura I.8**.

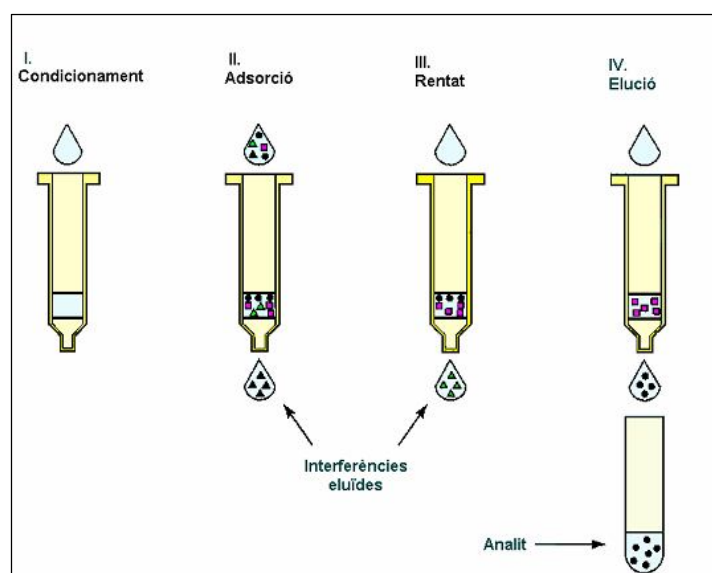


Figura I.8. Etapes del procés d'extracció en fase sòlida (SPE).

I. CONDICIONAMENT DE LA COLUMNA

Abans de començar l'adsorció dels anàlits a la fase estacionària, l'adsorbent s'ha de preparar i fer compatible amb la solució líquida. Per exemple, en una extracció de substàncies hidrofòbiques d'una solució de polaritat mitjana ha d'existir un contacte molt íntim entre la fase apolar (tal com sílica C18) i la solució polar. El pretractament necessari implica l'ús d'un solvent de polaritat intermitja que permeti un millor contacte superficial entre les fases. Aquest solvent humiteja el material empaquetat i solvata els grups funcionals de l'absorbent, el que dona lloc a l'anomenada activació de la fase estacionària [83]. D'aquesta manera també s'elimina l'aire present a la columna i els espais buits s'omplen de solvent. Els típics solvents de condicionament són el metanol o l'n-hexà, seguits d'un rentat amb aigua o amb tampó aquós.

Després del condicionament sovint es realitza una etapa de rentat que consisteix en passar el dissolvent d'elució dels anàlits o una altre dissolvent el més semblant possible (pH, força iònica) per tal d'eliminar possibles impureses del material adsorbent. Aquesta etapa també permet

maximitzar la retenció dels anàlits a la fase sòlida, sobretot pel cas de mostres aquoses, ja que s'equilibra el sòlid amb les condicions posteriors.

Determinats sorbents, com alguns sòlids extractants de matriu polimèrica, a causa de les seves característiques físico-químiques, no requereixen aquest pas.

II. APLICACIÓ DE LA MOSTRA / ADSORCIÓ DELS ANÀLITS

Depenent del tipus de mostra, es pot aplicar des de 1 mL a 1 L de dissolució a la columna d'adsorbent, ja sigui per gravetat, amb bombes, aplicant el buit o amb un sistema automatitzat. És important que els anàlits quedin retinguts quantitativament a la columna mentre es va passant la mostra. Per aquest motiu, una part molt important en el desenvolupament del mètode de SPE és l'optimització del flux de càrrega de la mostra, que hauria de ser raonablement constant. Aquest flux dependrà de les dimensions de la columna i de la mida de partícula del sòlid adsorbent. Les columnes empaquetades amb partícules molt petites (~10µm) són molt més eficients que les empaquetades amb partícules més grans (~50µm).

Els mecanismes de retenció inclouen interaccions de Van der Waals (també anomenades no polars, hidrofòbiques, de partició o de fase invertida), ponts d'hidrogen, dipol-dipol, exclusió per tamany, i bescanvi aniónic o catiónic. Durant l'etapa d'adsorció, els anàlits es concentren en l'adsorbent. De la mateixa manera, alguns components de la matriu també poden quedar retinguts en la fase sòlida.

III. RENTAT / ELIMINACIÓ D'INTERFERÈNCIES

L'objectiu d'aquesta etapa és eliminar selectivament els compostos no desitjats adsorbits a la fase sòlida (interferències) sense eluir els anàlits. Idealment, es selecciona un dissolvent que sigui miscible amb la matriu de la mostra i en el qual els anàlits hi siguin poc solubles. Aquesta elecció no sol ser fàcil.

En la majoria de casos, el dissolvent de rentat adequat està format per aigua que conté un 5-20% d'un dissolvent orgànic. El típic volum de solució de rentat és 1-2 mL per cada 100 mg d'adsorbent. El flux de rentat s'hauria d'ajustar a aquell en que el dissolvent estigui en contacte amb l'adsorbent durant 1-2 minuts [83].

En aquest pas pot ser necessària una etapa d'assecat del cartutx per eliminar aigua si el dissolvent d'elució és immiscible amb aquesta. L'assecat es pot dur a terme amb nitrogen, per aplicació de buit o per centrifugació (útil en cas d'anàlits volàtils). Aquest temps d'assecat pot variar de 30 segons a 30 minuts, segons les característiques del sistema. En cas que l'eluent sigui miscible en aigua, l'etapa d'assecat es pot reduir o eliminar, assumint que part de l'aigua serà eluïda en el següent pas. Alguns adsorbents no permeten aquest assecat, ja que la presència d'aire malmet l'empaquetament de forma irreversible.

IV. ELUCIÓ DELS ANÀLITS

En aquesta etapa els anàlits extrets són eluïts del sòlid adsorbent amb un dissolvent adequat específicament escollit per trencar els diferents tipus d'interaccions anàlit-adsorbent. L'elecció del dissolvent d'elució adequat és crítica, ja que ha de permetre l'elució completa dels anàlits i la no elució dels interferents retinguts amb el mínim volum possible.

També s'han de considerar altres factors. El dissolvent d'elució ha de ser compatible amb el mètode analític que s'utilitzi a continuació; per exemple, si l'anàlisi es fa per cromatografia de gasos, el dissolvent d'elució hauria de tenir un punt d'ebullició baix. També ha de ser el més pur possible, per no distorsionar els pics cromatogràfics. Finalment, l'eluent hauria de ser barat i poc tòxic.

Un volum típic d'elució és 250 μL per 100 mg d'adsorbent. El flux d'elució també és important per tal d'assegurar la reproductibilitat. S'aconsella fer l'elució amb volums petits d'eluent permetent un contacte entre eluent-fase sòlida d'entre 1 i 4 minuts, ja que l'eficiència és més gran respecte l'ús d'una sola alíquota d'elució major [83].

SORBENTS EN SPE

L'extracció en fase sòlida es pot dur a terme utilitzant diferents tipus de sorbents, la naturalesa del qual i dels grups funcionals addicionals en determinaran els seus usos.

Les propietats desitjables d'aquests sòlids per ser útils per SPE es comenten a continuació:

- **Porositat i àrea superficial.** L'extracció d'anàlits de la mostra depèn d'un equilibri entre els anàlits i el sòlid adsorbent. Aquest equilibri es desplaça més fortament cap al sòlid si l'àrea superficial és més gran. Per tal que la SPE sigui efectiva generalment calen àrees superficials superiors a $100 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$. Actualment les partícules que s'usen tenen àrees superficials entre 200 i $800 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$.

La mida de porus del sòlid i la seva àrea superficial sol estar relacionada inversament, o sigui, l'àrea superficial disminueix quan el tamany de porus augmenta.

- **Adsorció reversible.** En SPE interessa que un percentatge alt i reproducible d'anàlits siguin extrets pel sòlid adsorbent, però després han de ser eluïts fàcil i completament del sòlid.
- **Puresa.** Les partícules sòlides han d'estar lliures d'impureses, ja que podrien ser extretes durant l'elució dels anàlits i interferir en l'anàlisi cromatogràfica.
- **Estabilitat química.** En alguns casos pot interessar treballar amb mostres o eluents àcids o bàsics. Els adsorbents de sílica són poc estables a pHs superiors a 8 i a pHs molt àcids. En canvi, les resines polimèriques són bastant estables en tot el rang de pH. També cal que les partícules sòlides siguin estables en medi aquós o en dissolvents orgànics, en cas que siguin emprats en l'etapa d'elució.

- **Factor de capacitat (k).** Es defineix com la relació entre la quantitat d'anàlit que es troba extret en la fase sòlida respecte la quantitat que resta en la fase líquida. En SPE interessarà sempre que sigui el més alt possible.

Actualment tots els adsorbents es fabriquen en unes condicions dissenyades per produir materials molt porosos però rígids, amb una gran àrea superficial.

Els sòlids adsorbents més habituals són [82]:

SÒLIDS SORBENTS DE CARBÓ

Dins d'aquest tipus s'inclouen els materials de carbó actiu i els de carbó grafititzat, que estan esdevenint cada vegada més populars. Les seves propietats varien bastant d'un tipus de carbó a un altre. La característica d'aquest tipus de material és la seva elevada àrea superficial i les fortes propietats d'adsorció. No obstant, l'elució dels anàlits adsorbits sol ser lenta i incompleta. A més, l'activitat catalítica de la superfície del carbó també pot ser problemàtica.

RESINES DE MÀTRIU POLIMÈRICA

Els polímers orgànics estan formats per una matriu de poliestirè-divinilbenzè (PS-DVB) o de poliàcrilat, les característiques de la qual determinaran les seves aplicacions. En SPE aquests polímers presenten diverses avantatges respecte els carbons actius i les síliques de fase lligada. Respecte la sílica, les resines polimèriques permeten treballar gairebé sempre a qualsevol pH, ja que no contenen els problemàtics grups silanol, i l'àrea superficial sol ser més gran que la de les partícules de sílica, de manera que l'extracció de compostos orgànics sol ser més completa. Si es comparen amb els adsorbents de carbó, generalment els anàlits retinguts són eluïts més fàcilment dels sorbents polimèrics amb un volum petit de dissolvent orgànic. Les resines polimèriques són hidrofòbiques i ofereixen un mecanisme de retenció simple i no selectiu.

Aquestes resines presenten unes propietats comunes que afecten de forma important als mecanismes de retenció [84]:

- Mida de partícula: Segons la mida de partícula les resines es classifiquen en perles o grànuls (entre 0,04 i 1 mm), pols (~30µm) i resines ultrafines (entre 0,5 i 1,5µm). La mida de partícula es tria segons el procés al que s'apliqui, ja que pot tenir una influència important en la cinètica de processos de bescanvi iònic. És recomanable que la mida de les partícules sigui el més homogènia possible.
- Grau d'entrecreuament: es refereix al percentatge d'agent entrecreuant, generalment divinilbenzè (DVB) que s'ha addicionat al poliestirè (PS) en el procés de polimerització. Les resines comercials acostumen a contenir entre un 1% i un 32% d'agent entrecreuant. Té una gran influència en les característiques físiques de la resina (porositat, estabilitat mecànica i química, capacitat d'inflament). Els sorbents amb un baix grau d'entrecreuament són mecànicament inestables, mentre que els que tenen un alt grau d'entrecreuament són durs i tenen una major

resistència. La capacitat d'inflament augmenta en disminuir el grau d'entrecruament, mentre que la selectivitat disminueix.

– Porositat: la porositat d'una resina i l'estructura de la xarxa polimèrica formada estan directament relacionades amb el grau d'entrecruament. Per descriure el caràcter porós d'un material polimèric s'usen els termes macrorreticular o macroporós i microporós o tipus gel. El terme macroporós es refereix a estructures en les quals els porus són superiors a les distàncies atòmiques i, per tant, no formen part de l'estructura del polímer. En canvi, el terme microporós es refereix a la porositat aparent de dimensions atòmiques (10Å), que depèn de la capacitat d'inflament del polímer i de les condicions que l'envolten.

– Capacitat d'inflament: els adsorbents polimèrics poden variar de volum a causa de la penetració en la seva estructura del solvent on està submergit. El canvi de volum que experimenta depèn de la composició de la dissolució envoltant, de la naturalesa de la matriu polimèrica i el seu grau d'entrecruament, la densitat de càrrega i el tipus de contraïns. Aquests canvis de volum que experimenten les resines quan són transferides d'un medi a un altre es coneix com a inflament (*swelling*).

Tot i que les resines polimèriques s'han utilitzat àmpliament sense cap mena de modificació (el material XAD ha tingut un enorme impacte en SPE), també s'han introduït grups funcionals en la seva estructura per tal d'ampliar la seva aplicabilitat. La possibilitat d'afegir grups hidrofílics a la superfície del material adsorbent, tipus derivats $-CH_2OH$, permet millorar el poc contacte superficial entre fases líquides polars i aquest tipus de material, que és hidrofòbic.

SORBENTS DE FASE LLIGADA DE SÍLICA

Actualment els materials de sílica de fase lligada són els més utilitzats en SPE a causa de la seva àmplia disponibilitat. La superfície de les partícules és heterogènia, amb una gran varietat de grups silanol presents [82]. L'àrea superficial específica de la sílica va dels 100 als 850 $m^2 \cdot g^{-1}$, tot i que els valors més habituals per SPE són de 200 a 600 $m^2 \cdot g^{-1}$. Generalment, les partícules tenen una mida irregular amb un diàmetre mitjà de 40 μm , una mida de porus mitjà de 60 Å i una àrea superficial mitjana de 500 $m^2 \cdot g^{-1}$.

La sílica es pot utilitzar sense modificar com un adsorbent en SPE. Al igual que en les resines polimèriques però, per ampliar la seva aplicabilitat i les opcions dels científics a l'hora d'escollir el mecanisme apropiat d'extracció, la superfície del material de sílica sovint es modifica amb una gran varietat de grups funcionals. Aquests poden tenir caràcter no-polar (C18), polar (NH_2), iònic (àcid propilsulfònic) o mode mixt (C8 / bescanvi catiònic).

En general, totes les resines tenen un caràcter hidrofòbic a causa de la naturalesa de la seva matriu, mentre que la natura hidrofòbica dels adsorbents basats en sílica dependrà dels grups amb què s'hagi funcionalitzat.

MECANISMES DE RETENCIÓ

Existeixen tres mecanismes principals de separació i sorció en extracció en fase sòlida (SPE): fase invertida, fase normal i bescanvi iònic [82]. Aquests mecanismes de separació coincideixen amb els de cromatografia líquida d'alta pressió (HPLC), tot i ser tècniques diferents.

FASE INVERTIDA

Aquest mecanisme implica la partició de soluts orgànics entre una fase polar, com l'aigua, i una fase no polar, com els adsorbents C-18. El mecanisme d'extracció és una interacció no polar, de Van der Waals. El mecanisme de partició és un procés de baixa energia i és anàleg al d'una molècula que s'extreu per extracció líquid-líquid. La diferència rau en que la fase orgànica està químicament lligada a la sílica.

Els adsorbents més habituals són els de sílica modificada amb cadenes de C-8 i C-18. Els anàlits hidrofòbics tindran més tendència a adsorbir-se per aquest mecanisme, donant una major capacitat en adsorbents de fase invertida. Els dissolvents d'elució més habituals són el metanol, l'acetonitril o l'acetat d'etil.

FASE NORMAL

La SPE en fase normal es refereix a la sorció d'anàlits en fases sòlides polars. El mecanisme d'extracció és una interacció polar, com ponts d'hidrogen, interaccions dipol-dipol, interaccions π - π i intraccions dipol-dipol induïdes. El mecanisme implica la interacció dels grups funcionals dels anàlits als punts polars del material adsorbent. L'adsorció per fase normal és una interacció de tipus dèbil o moderadament forta.

Els tipus de sorbents que s'utilitzen per aquest mecanisme són fases no lligades de sílica, alúmina o silicat de magnesi (fluorisil) o també fases lligades de sílica del tipus aminopropil, cianopropil.

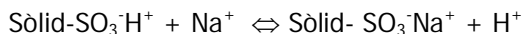
Típicament la SPE en fase normal s'utilitza per dur a terme la purificació d'extractes orgànics d'aigua, aliments o altres materials. També s'utilitza per extreure anàlits de líquids orgànics, com olis.

BESCANVI IÒNIC

Aquest mecanisme implica el bescanvi iònic d'un anàlit orgànic carregat d'un dissolvent polar o apolar en un adsorbent de bescanvi iònic de càrrega oposada [82]. Aquesta reacció segueix la teoria clàssica del bescanvi iònic. El mecanisme d'extracció és una interacció iònica d'alta energia, per això els anàlits polars poden ser extrets de dissolvents polars, incloent tant aigua com dissolvents orgànics menys polars.

Els sorbents s'anomenen bescanviadors aniònics o catiònics forts segons si tenen una càrrega permanent negativa o positiva, respectivament. Per exemple, un bescanviador catiònic

d'àcid fort conté grups sulfònics ($-\text{SO}_3^-\text{H}^+$) al final d'una cadena orgànica lligada a una matriu de sílica o a un anell de benzè en el cas d'una resina polimèrica. La part $-\text{SO}_3^-$ està lligada per un enllaç químic, però el contraió H^+ només manté interaccions electrostàtiques febles. Aquest contraió moltes vegades s'anomena també grup ionogènic del bescanviador. Un altre catió pot desplaçar el H^+ i establir el següent equilibri:



Mitjançant aquest mecanisme, els sorbents de bescanvi catiònic poden retenir tot tipus de cations orgànics o inorgànics, de manera que els anàlits d'interès entren en competència amb la resta de cations presents a la mostra.

Per altra banda, els sorbents són de bescanvi iònic feble si la càrrega del bescanviador no és fixa, sinó que pot desaparèixer per variacions de pH. Si el pH de la mostra s'ajusta al pK_a de l'anàlit, es poden adsorbir molècules orgàniques d'àcid o base feble. El pK_a d'una molècula orgànica és, doncs, un factor crític en l'ús de bescanviadors iònics.

Els grups funcionals més habituals dels adsorbents segons si es consideren forts o febles es troben resumits en la següent taula:

TIPUS BESCANVIADOR		GRUPS FUNCIONALS
Bescanviador aniònic	Fort	Grup trimetilaminopropil ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3\text{Cl}^-$).
	Feble	Grup aminopropil ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{H}_3\text{A}^-$)
Bescanviador catiònic	Fort	Grup sulfònic ($-\text{SO}_3^-\text{H}^+$)
	Feble	Grup carboximetil ($-\text{CH}_2\text{COO}^-\text{H}^+$)

Taula I.8. Principals grups funcionals dels bescanviadors iònics.

Les reaccions de bescanvi iònic tenen lloc estequiomètricament, per tant, per cada equivalent de ions que s'extreu de la solució, un equivalent de ions de la mateixa càrrega s'alliberarà del bescanviador iònic. El nombre total d'equivalents capaços de bescanviar-se per gram d'adsorbent es coneix amb el nom de capacitat de bescanvi.

Les resines de poliestirè i les resines poliacríliques es poden convertir en bescanviadores iòniques amb les reaccions químiques apropiades (funcionalització). Tot i que en general aquestes resines es consideren bescanviadores de tipus fort, segons el grup funcional que presenten es classifiquen en:

- Tipus I: presenta grups trimetilamoni [$-\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3\text{Cl}^-$]
- Tipus II: presenta una estructura dimetilhidroxietil [$-\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_2(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})\text{Cl}^-$]

En aquesta tesi s'han avaluat dues resines polimèriques, una de tipus I i una de tipus II. Les característiques principals d'aquestes resines, així com les d'un adsorbent de sílica també estudiat, es mostren en les **Taules I.9 i I.10**.

	AMBERLITE®IRA-416 (OH⁻)	AMBERLITE®IRA-900 (Cl⁻)
APARENÇA	Perles taronges	Perles beiges
POROSITAT	Microporosa o tipus gel	Macroporosa o macrorreticular
MODE BESCANVI	Aniònica de base forta	Aniònica de base forta
GRUP FUNCIONAL	Tipus II: PS-DVB-N ⁺ (CH ₂ CH ₂ OH)(CH ₃) ₂	Tipus I: PS-DVB -N ⁺ (CH ₃) ₃
CAPACITAT TOTAL	1,30 meq · mL ⁻¹ resina humida 2,12 meq · g ⁻¹ resina seca	1,16 meq · mL ⁻¹ resina humida 2,96 meq · g ⁻¹ resina seca
DENSITAT (HUMIDA)	740 g · L ⁻¹	700 g · L ⁻¹
MÀX. TEMPERATURA de TREBALL	35°C (OH ⁻) 70°C (Cl ⁻)	60°C (només Cl ⁻)
RANG pH de TREBALL	1 - 14	1 - 14
MIDA de PARTÍCULA (MESH SIZE)	14 - 52	20 - 50

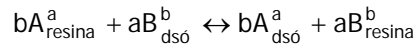
Taula I.9. Característiques de les dues resines polimèriques estudiades en aquesta tesi.

ISOLUTE®-NH₂	
APARENÇA	Pols blanca
POROSITAT (mida de porus)	60 Å
GRUP FUNCIONAL	Sílica -(CH ₂) ₃ -(NH ₂)
MODE BESCANVI	Aniònic de base feble
pKa	9,8
CAPACITAT TOTAL	0,6 meq · g ⁻¹ adsorbent sec
RANG de pH de TREBALL	2 - 8
MIDA de PARTÍCULA	50 µm
PES SÒLID ADSORBENT	100 mg

Taula I.10. Característiques de l'adsorbent de sílica emprat en aquest treball.

La competència entre els anòlits i altres ions de la mostra fa necessari estudiar la selectivitat del sistema per obtenir una màxima eficiència en el procés d'extracció. L'afinitat d'un bescanviador iònic per un ió determinat ve donada pel valor de la constant d'equilibri del bescanvi iònic o el que també s'anomena coeficient de selectivitat, *K* [84]. La manca de selectivitat dels bescanviadors iònics és la principal limitació de les seves aplicacions.

Suposant un bescanviador iònic que contingui ions A^a intercanviables per ions B^b presents en la solució exterior, on els subíndexs es refereixen a la càrrega dels ions, el procés de bescanvi ve simbolitzat per l'equilibri:



I aquest equilibri ve definit per la constant d'equilibri o coeficient de selectivitat:

$$K_{A}^B = \frac{[A^a]_{dsó}^b [B^b]_{res}^a}{[B^b]_{dsó}^a [A^a]_{res}^b}$$

on el subíndex *res* indica els ions que es troben en fase resina.

Aquests termes no són constants, ja que depenen de diferents factors, com ara la naturalesa dels ions que es bescanvien (la seva mida i càrrega), les característiques del bescanviador, la composició de la dissolució on té lloc el procés i el temps de reacció. Segons la teoria clàssica del bescanvi iònic, els ions voluminosos i carregats són els que tenen més tendència a quedar retinguts en un bescanviador iònic.

Una altra opció per millorar la selectivitat del procés consisteix en variar lleugerament el pH de la mostra, tenint en compte els pHs als quals el nostre anàlit es troba en forma iònica.

APLICACIONS

A la bibliografia es descriuen diverses possibilitats per a la preconcentració i purificació de glifosat i AMPA amb SPE mitjançant diferents mecanismes, ja sigui utilitzant resines o cartutxos. La major part d'aquests mètodes es basen en un mecanisme de bescanvi iònic, ja que ambdós compostos són ionitzables ajustant el pH de la mostra.

Mallat i Barceló [44] proposen una extracció dels anàlits en dues etapes, combinant un cartutx polimèric amb una resina de bescanvi iònic. En una primera etapa el cartutx polimèric LiChrolut EN permet l'eliminació de gran part dels interferents orgànics que competirien amb els anàlits en un adsorbent de bescanvi iònic. En la segona etapa, la mostra és aplicada a una resina polimèrica de bescanvi aniónic, AMBERLITE IRA-410 (forma OH⁻), i els anàlits són eluïts amb dissolució de citrat. Aquesta doble extracció permet la preconcentració dels anàlits amb la selectivitat desitjada, obtenint-se recuperacions d'entre el 83 i el 90%.

De forma semblant, Royer et al. [85] proposen un mètode d'extracció i purificació de glifosat i AMPA en matrius vegetals, també en dues etapes. En aquest cas s'utilitza en primer lloc una resina Chelex-100 i en segon lloc una resina de bescanvi aniónic, AG1X8. Les recuperacions obtingudes varien d'entre el 81 i el 92%. Aquesta resina de bescanvi aniónic també havia estat utilitzada anteriorment per a la purificació d'extractes de glifosat en sèrum humà [60].

Altres autors han preferit l'ús de resines de bescanvi catiònic [86-88]. Per exemple, Alferness i Iwata [89] proposen l'ús de columnes Poly-Prep empaquetades amb resina AG 50W-X8 (forma H⁺) per a la purificació d'extractes de cultius, ous, llet i teixit animal.

Cal destacar el mètode descrit per Sancho et al. [90], que implica un acoblament LC-LC, on en la primera columna té lloc la purificació i preconcentració de la mostra mitjançant SPE i en la segona columna té lloc la separació cromatogràfica dels anàlits. En aquest cas el mecanisme de l'extracció és per fase invertida, ja que l'adsorbent consisteix en una fase C18 i la mostra que conté glifosat i AMPA és aquosa. Aquesta tècnica que inicialment fou aplicada a mostres d'aigües naturals, ha estat àmpliament aplicada posteriorment per diversos tipus d'extractes, com extractes de sòls [91], extractes de cereals [92] o residus de plantes [93]. També cal dir que els límits de detecció d'aquesta tècnica han estat millorats per l'addició d'una etapa de preconcentració mitjançant una resina de bescanvi aniònic, AMBERLITE IRA-900, prèvia a l'anàlisi cromatogràfica [94].

Així doncs s'observa com la presència de resines de bescanvi iònic és molt habitual en les etapes de pretractament de mostres de glifosat, algunes vegades combinant-se també amb altres tipus d'adsorbents.

En el cas dels tensioactius no iònics, s'han avaluat una gran varietat de suports per la seva preconcentració, ja que són compostos que s'adsorbeixen ràpidament en qualsevol superfície. Els procediments més comuns validats van ser recopilats per Schmitt [95] al 2001.

Les fases d'alquil-silica, tant C8 com C18, han estat emprades en varis estudis [96-100]. Jonkers et al. [101] utilitzen cartutxos C18 on s'aplica la mostra aquosa prèviament acidificada (pH=2) i els anàlits són eluïts amb 10 mL de metanol. Aquest mètode, adequat per nonilfenol etoxilats, ha estat aplicat posteriorment per altres autors [102,103]. Evans et al. [104] empen un cartutx C8 per extreure i preconcentrar alcohol etoxilats de mostres aquoses, fent l'elució amb metanol i alcohol isopropílic.

En relació a l'ús de resines polimèriques, presenten diverses avantatges respecte les fases de silica: poden ser utilitzades en condicions de pH extremes, tenen superfície específica elevada i mostren una major adsorció dels anàlits polars. A més, es poden modificar químicament per aconseguir fases adsorbents amb elevada selectivitat. Varis autors han optat per aquesta via, utilitzant resines macrorreticulars de poliestirè-divinilbenzè (PS-DBV) [105-107]. També s'han descrit diversos mètodes que combinen un adsorbent de fase C18 amb una resina polimèrica (PS-DVB) [108-110].

En l'únic estudi de preconcentració descrit fins l'actualitat pel que fa tensioactius de tipus alquilamina etoxilades, es comparen les recuperacions obtingudes amb tres cartutxos de SPE polimèrics i dos de fase C18 [38]. En aquest estudi es comprova que les millors recuperacions per

aquest tipus d'anàlit s'obtenen amb cartutxos polimèrics, de divinilbenzè-vinilpirrolidona o de poli(divinilbenzè-co-N-vinilpirrolidona). En tots els casos s'observa, a causa dels valors de pKa dels alquilamina etoxilats al voltant de 6-7, un efecte important del pH de la mostra. A pHs entre 7 i 9 s'obtenen recuperacions baixes (per sota del 50%), mentre que ajustant el pH a 4,5 les recuperacions augmenten, especialment per aquells anàlits més polars, que arriben al 60%. També es conclou que les baixes recuperacions obtingudes es deuen a una elució insuficient, sobretot per aquells compostos amb cadenes alquiliques més llargues.

Castillo et al. proposen un mètode d'extracció en fase sòlida seqüencial (SSPE) on es combina un cartutx de fase C18 en sèrie amb un de poliestirè-divinilbenzè [108]. D'aquesta manera es permet una separació segons el tipus de tensioactiu, nonilfenol etoxilats, polietilenglicols i alcohol polietoxilats, els quals són recollits en diferents fraccions.

Alguns autors proposen l'ús de fases de carbó grafititzat per tal de preconcentrar tensioactius de diversa naturalesa [111-113]. L'avantatge d'aquest tipus d'adsorbent és que combinen els mecanismes de fase invertida i bescanvi iònic simultàniament [114]. Crescenczi et al. [112] extreuen i preconcentren alcohol etoxilats i nonilfenol etoxilats d'aigües residuals tractades i no tractades, d'aigües de riu i d'aigües de consum humà emprant un cartutx amb 1 gram de carbó grafititzat. Els centres carregats positivament de la superfície del carbó permeten el fraccionament de mesclures complexes de tensioactius duent a terme una elució diferencial segons la seva força àcida. D'aquesta manera els tensioactius no iònics són aïllats de forma senzilla de la resta de compostos àcids de la mostra inicial. Les recuperacions obtingudes varien entre un 85 i un 97 % segons el tipus de matriu estudiat.

Finalment, també es pot destacar que hi ha algunes aplicacions descrites per altres tipus de fases, com òxid d'alumini [115,116] o fases ciano [117].

• MÈTODES D'EXTRACCIÓ PER A MOSTRES DE SÒLS

En el cas de mostres de sòls, només es tractaran els mètodes d'extracció, ja que les etapes de clean-up i de preconcentració de la mostra s'efectuaran sobre els extractes obtinguts en l'etapa d'extracció. Els mètodes aplicats serien els mateixos que en mostres aquoses (veure apartat anterior).

Donat que en la majoria de mètodes analítics existents per a l'anàlisi de compostos orgànics requereixen que els anàlits estiguin en dissolució, en el cas de mostres sòlides, com les de sòls, caldrà extreure l'anàlit de la mostra sí utilitzant un líquid. En aquests casos es parla d'**extracció sòlid-líquid**. En aquest tipus d'extracció es posa en contacte una quantitat determinada de mostra amb un dissolvent adequat. Posteriorment, la mescla se sotmet a diversos processos més o menys agressius en funció de la fortalesa de les interaccions anàlit-matriu. Cal

tenir en compte que una extracció molt agressiva que assegurí l'extracció completa dels anàlits, implica sovint una extracció simultània d'una gran quantitat d'espècies interferents que poden dificultar o impedir la determinació final. Així doncs, caldrà escollir bé el mètode d'extracció emprant unes condicions de compromís que permeti la màxima eficiència pel que fa a extracció dels anàlits, però la mínima per la resta de compostos no desitjats de la matriu.

A continuació es descriuen els processos utilitzats per a l'extracció de glifosat i de tensioactius no iònics:

AGITACIÓ MECÀNICA

És un procediment d'extracció molt suau i que té lloc exclusivament sometent la mostra a l'acció del dissolvent mitjançant un procés d'agitació. Aquest procés només serà aplicable a anàlits units dèbilment a la matriu, de manera que només amb l'agitació (ja sigui manual o automàtica), l'anàlit se separa de la matriu dissolent-se en el dissolvent utilitzat. L'eficàcia de l'extracció dependrà de la polaritat del dissolvent, del temps d'agitació i del tipus de matriu.

Una vegada s'ha extret l'anàlit, el dissolvent i la matriu se separen per filtració. Sovint s'utilitzen volums grans de dissolvent, de manera que cal una evaporació prèvia a la determinació analítica per preconcentrar els anàlits.

Aquest és el mètode d'extracció més utilitzat per a l'extracció de glifosat i AMPA en sòls. S'han emprat una gran varietat de dissolvents per a l'extracció d'aquests anàlits amb resultats molt diversos. A causa de la diferent adsorció de glifosat en sòls segons el contingut argilós i/o de matèria orgànica, no es pot establir un únic dissolvent d'extracció per qualsevol tipus de sòl, sinó que segons la composició de cada sòl, cal que el mètode d'extracció sigui validat [45]. Miles i Moye [46] demostren que l'extracció de glifosat és més efectiva a pHs bàsics, tot i que a aquests pHs l'extracció de substàncies húmiques també es veu afavorida. En el mètode proposat finalment es posen en contacte 10mL de KOH 0,2M amb 2 g de sòl durant 15 minuts. A continuació la mescla es centrifuga i el líquid sobrenedant es filtra. Varis autors han optat també pel mateix dissolvent d'extracció, tot i que a diverses concentracions i relacions de sòl-dissolvent [47,118]. Altres dissolvents utilitzats amb bones recuperacions han estat la trietilamina [48], l'amoniac [119], l'hidròxid de sodi [120], àcid fosfòric [121] o mescles de NH_4OH i KH_2PO_4 [43,63]. Alguns autors opten per la combinació de l'efecte del dissolvent més temperatura, com Miller et al. que extreuen el glifosat amb KOH 0,3 M a 60°C [64].

EXTRACCIÓ ASSISTIDA PER ULTRASONS

En l'extracció assistida per ultrasons s'utilitza la radiació d'ultrasons (25-40Hz de freqüència) que provoca la vibració de les molècules augmentant l'eficàcia dels xocs entre elles. D'aquesta manera, el dissolvent difon més fàcilment en la mostra, afavorint el contacte anàlit-

dissolvent. Aquesta tècnica permet reduir considerablement el temps d'extracció, així com les quantitats de mostra i dissolvent utilitzades.

Sampedro et al. [122] fan un estudi comparatiu de l'extracció de glifosat i AMPA mitjançant diverses tècniques, la sonicació entre elles. Pel que fa aquesta tècnica, s'avaluen diferents temps d'extracció, entre 30 i 60 minuts en extraccions successives, i diferents dissolvents d'extracció, aigua i KOH 0,6 M. Els millors resultats s'obtenen per un temps d'extracció de 30 minuts amb el KOH 0,6 M, tot i que les recuperacions obtingudes són baixes, del 45% pel glifosat i del 49% per l'AMPA.

Respecte als tensioactius, s'ha descrit un mètode en què els anàlits són extrets de fangs per sonicació en tres etapes amb una barreja de dissolvents [98]. Aquest mètode permet obtenir recuperacions que varien des del 86% al gairebé 100% pels tensioactius polietoxilats originals, i del 84 al 94% pels seus productes de degradació.

EXTRACCIÓ AMB SOXHLET

La tècnica del soxhlet, tot i considerar-se una tècnica d'extracció clàssica, encara està sent usada amb freqüència en l'anàlisi ambiental. No s'han trobat mètodes que descriguin l'extracció de glifosat mitjançant aquesta tècnica, però sí que ha estat aplicada per diversos autors per a l'extracció de nonilfenol etoxilats en sediments [101-103].

EXTRACCIÓ ASSISTIDA PER MICROONES

Aquest tipus d'extracció és una alternativa recent a l'extracció soxhlet, ja que l'escalfament de la mostra s'assoleix de forma immediata i més eficient. Els equips disponibles permeten un perfecte control de la temperatura, la pressió i la potència de la radiació utilitzada, paràmetres que hauran de ser optimitzats per a cada aplicació. Tot i això, l'elecció del dissolvent és el factor més important per a una extracció eficient, havent-se de considerar el seu comportament davant la radiació electromagnètica aplicada, la seva interacció amb la matriu i la solubilitat dels anàlits en ell. En el mateix treball ja citat de Sampedro et al. [122], aquesta tècnica també és avaluada. Els resultats obtinguts no són gens bons, amb recuperacions nul·les pel glifosat i de fins al 18% per l'AMPA. En aquest cas s'avaluen diversos dissolvents d'extracció (aigua, metanol, KOH 0,6 M, entre d'altres), diferents temps d'extracció (entre 5 i 10 minuts) i diferents temperatures (entre 80 i 180°C). En cap cas s'han obtingut recuperacions acceptables.

L'extracció assistida per microones de tensioactius no iònics en sediments també ha estat descrita per Heise et al. [123], tot i que s'obtenen variacions importants pel que fa a recuperacions segons el tipus de sediment, entre 31 i 85 %.

EXTRACCIÓ AMB FLUIDS PRESSURITZATS (PFE)

Aquesta és l'única tècnica emprada per a l'extracció de tensioactius de tipus alquilamina etoxilada en sòls, anomenada també extracció amb solvents accelerada (ASE). En aquesta tècnica és important optimitzar la temperatura d'extracció, la polaritat dels dissolvents, el temps d'extracció i el contingut en aigua de la matriu [124]. La pressió és un paràmetre de poca importància en mostres seques, però esdevé crítica per mostres humides, on es requeriexen pressions elevades [125]. Així doncs, l'eficiència de l'extracció dependrà molt de les característiques del sòl, que en determinen la força d'adsorció dels anàlits a la superfície del sòl. Krogh et al. [126] apliquen aquesta tècnica en dues etapes successives amb diferents dissolvents d'extracció. Les recuperacions obtingudes pels alquilamina etoxilats van del 63 al 88%, referides als diferents homòlegs que formen el tensioactiu (*tallowamina etoxilat*). Cal dir que aquesta tècnica també s'ha aplicat a l'extracció d'altres tipus de tensioactius no iònics en matrius de sòls i sediments [97,117,123].

DETERMINACIÓ ANALÍTICA

En primer lloc es tractaran els principals mètodes de determinació de l'herbicida glifosat i el seu metabòlit, AMPA, i a continuació es tractarà la determinació dels tensioactius no iònics.

TÈCNIQUES ANALÍTiques PER A LA DETERMINACIÓ DE GLIFOSAT I AMPA

Ja s'ha comentat que la legislació europea és molt restrictiva respecte la presència de plaguicides en aigües (màxim 0,1 parts per milió), i per tant, les concentracions que es troben normalment al medi són molt baixes. Per aquest motiu calen mètodes d'anàlisi molt sensibles que permetin la monitorització d'aquests compostos a nivells extremadament baixos.

La determinació a nivells traça de glifosat i del seu metabòlit, l'AMPA, presenta moltes dificultats a causa principalment de les seves propietats químiques: elevada polaritat i elevada solubilitat en aigua, però pràcticament nul·la en dissolvents orgànics.

Des de 1974, quan la companyia Monsanto comercialitzà per primera vegada el glifosat com a herbicida, s'han desenvolupat una gran varietat de mètodes analítics per a la seva determinació, sent la cromatografia de gasos i de líquids les tècniques més habituals. A causa de les propietats químiques del glifosat i l'AMPA, compostos poc volàtils i altament hidròfils, la seva determinació sembla més senzilla per cromatografia líquida, tot i haver-hi descrits diversos mètodes per cromatografia de gasos. Aquestes tècniques requereixen un pas de derivatització dels anàlits: en el cas de la cromatografia de gasos (CG) per obtenir una bona separació, mentre que en cromatografia líquida (CL) per millorar la detecció, ja sigui amb detecció de fluorescència o UV. L'espectrometria de masses acoblada a les tècniques cromatogràfiques és un altre mètode de detecció àmpliament utilitzat. No obstant, l'aplicació de tècniques alternatives, com l'immunoassaig o l'electroforesi capil·lar, és cada vegada més freqüent.

Stalikas et al. van publicar al 2001 un recull dels mètodes més habituals per a la determinació de glifosat i AMPA [45], tot i que des d'aleshores ja han aparegut nombroses propostes per a la seva determinació. A continuació es revisaran alguns d'aquests mètodes, destacant aquells que permeten assolir uns nivells de concentració més exigents.

- **TÈCNIQUES CROMATOGRÀFIQUES**

CROMATOGRAFIA DE GASOS (GC)

Tot i que la cromatografia de gasos és una de les tècniques més aplicades a la determinació de plaguicides en matrius aquoses, en el cas del glifosat i l'AMPA, aquesta tècnica es veu limitada per l'escassa volatilitat dels anàlits. La determinació de glifosat i AMPA requereix doncs, una etapa prèvia de derivatització per tal de convertir aquests compostos en derivats menys

polars i suficientment volàtils. Aquesta és l'etapa més crítica pel que fa a reproduïbilitat del mètode. En la **Taula I.11** es mostren diversos agents derivatitzants utilitzats amb aquesta finalitat.

DETECCIÓ	MATRIU AMBIENTAL	AGENT DERIVATITZANT	LÍMITS DE DETECCIÓ AMPA Gly	REF.
MS(EI), MS(CI)	sòls, plantes, teixits animals, aigües	TFAA-HFB	0,01 mg·kg ⁻¹ 0,01 mg·kg ⁻¹	[89,127]
FID	Aigües, sòls, vegetals	Isopropilcloroformat-diazometà	0,8 mg·L ⁻¹ 1,2 mg·L ⁻¹	[128]
MS-MS (ion trap)	Aigües	TFAA-HFB	0,05 µg·L ⁻¹ 0,05 µg·L ⁻¹	[129]
ECD, MS(EI)	Aigües	TFAA-TFE	0,09 µg·L ⁻¹ 0,36 µg·L ⁻¹	[130]
MS(EI)	Aigües	Àcid acètic-TMOA	0,29 µg·L ⁻¹ 0,65 µg·L ⁻¹	[131]
MS(EI)	Aigües, sòls	TFAA-TFE	0,05 µg·L ⁻¹ 0,003 mg·kg ⁻¹	[132]
PFPD	Cereals	TMOA	0,02 mg·kg ⁻¹ 0,03 mg·kg ⁻¹	[133]

EI = ionització per impacte electrònic; CI = ionització química; PFPD = detector fotomètric de flama pulsada (*Pulsed Flame Photometric Detector*); TFAA-HFB = anhídrid trifluoroacètic-heptafluorobulanol; TMOA = trimetil ortoacetat

Taula I.11. Principals mètodes d'anàlisi de glifosat i AMPA en matrius ambientals per GC.

Quant a les condicions cromatogràfiques i separació dels anàlits, sembla que l'ús de columnes moderadament polars suposa un guany de sensibilitat i una millora del límit de detecció del mètode respecte les columnes més apolars.

Entre els detectors emprats més habitualment en la determinació de glifosat i AMPA trobem el detector de ionització de flama (FID) i el detector de captura d'electrons (ECD). Actualment, s'està extenent l'ús d'espectròmetres de massa (MS) en anàlisis de rutina. Les avantatges d'aquest tipus de detecció són la possible identificació i quantificació a nivells traça d'herbicides amb estructures similars i dels seus metabòlits. En aquests acoblaments, les fonts de ionització més utilitzades són la ionització química i la ionització per impacte electrònic, mentre que el quadrupol i la trampa iònica són els analitzadors més habituals.

Alguns dels mètodes de cromatografia de gasos més importants per a la determinació de glifosat i AMPA es resumeixen en la **Taula I.11**.

CROMATOGRAFIA LÍQUIDA (LC)

La cromatografia líquida d'alta resolució és la tècnica més adequada per a la determinació de glifosat, ja que permet treballar amb sistemes de separació cromatogràfica en fase invertida i realitzar la derivatització en solució aquosa.

L'etapa de derivatització en LC és necessària per l'absència de grups cromòfors o fluoròfors en l'estructura del glifosat i el seu metabòlit AMPA, però també per disminuir els límits de detecció. Aquesta derivatització permet assolir la sensibilitat i/o selectivitat necessària en l'etapa de determinació, tant en el mode precolumna (derivatització abans de la separació cromatogràfica) com en el mode post columna (després de la separació cromatogràfica). Els agents derivatitzants més habituals en la determinació de glifosat i AMPA són OPA-ME (o-ftalaldehid-2-mercaptoetanol), amb derivatització postcolumna, i FMOC-Cl (cloroformat de 9-fluorenilmetil), en derivatització precolumna.

El mètode de determinació de glifosat en aigües potables proposat per la EPA es basa en una derivatització postcolumna (a 48°C) amb OPA-ME i detecció per fluorescència ($\lambda_{exc} = 340$ nm, $\lambda_{em} = 455$ nm), utilitzant una columna de separació de bescanvi catiònic [134].

La separació de glifosat i el seu metabòlit AMPA també és possible per cromatografia de bescanvi aniònic, ja que ambdós són compostos amfotèrics. L'ús de FMOC-Cl permet obtenir una bona separació, ja que ni el grup fosfonat ni l'àcid carboxílic són derivatitzats.

Sancho et al. proposen un mètode d'anàlisi innovador per glifosat i AMPA que implica un acoblament LC-LC [90]. Aquest acoblament s'havia descrit prèviament per a la determinació de l'herbicida glufosinat [135], i a causa de la similitud estructural d'aquest amb el glifosat, el mètode va ser readaptat amb èxit. L'avantatge de l'acoblament LC-LC és que permet la injecció de grans volums de mostra i que aconseguen separacions que no es poden obtenir amb una sola columna. En el primer sistema cromatogràfic té lloc la purificació i/o preconcentració de la mostra, mentre que en el segon té lloc la separació.

Pel que fa a la detecció, els detectors convencionals d'UV-vis i de fluorescència són els més freqüents en la determinació de glifosat i AMPA per cromatografia líquida, tot i ser la detecció per fluorescència sempre preferible, ja que l'espectroscopia d'emissió sovint presenta una sensibilitat de 3 ordres de magnitud major que la d'absorció [136]. No obstant, el progrés en l'acoblament CL-MS i CL-MS-MS, així com la possibilitat d'obtenir una major informació estructural, està fent cada vegada més habitual aquesta tècnica en la determinació d'herbicides i els seus metabòlits.

En aquest sentit, val la pena esmentar un sistema de detecció innovador pel que fa a aquest tipus d'anàlisis, el plasma acoblat inductivament a espectrometria de masses (ICP-MS) [137]. L'isòtop de fòsfor, $m/z=31$, és utilitzat per realitzar la determinació quantitativa dels anàlisis. Per tal de minimitzar les interferències habituals en la determinació de fòsfor en un ICP amb plasma d'argó, s'utilitza un octapol com a cel·la de col·lisió. Aquesta tècnica s'ha aplicat amb èxit a

la determinació de glifosat i glufositat, així com del metabòlit del primer, AMPA, obtenint-se límits de detecció en el rang de 25-32 ng·L⁻¹ en mostres patró. El mètode ha estat validat emprant aigua de riu, a uns nivells de concentració de 20 µg·L⁻¹.

Alguns dels mètodes més comuns per a la determinació de glifosat i AMPA es mostren a la **Taula I.12**.

DETECCIÓ	MATRIU AMBIENTAL	AGENT DERIVATITZANT	LÍMITS DE DETECCIÓ AMPA Gly	REF.
UV-Vis (240nm o 280nm)	Aigües, sòls	Clorur de p-toluensulfonil	8 µg·L ⁻¹ 10 µg·L ⁻¹	[138,139]
UV-Vis (240nm o 280nm)	Sèrum	Clorur de p-toluensulfonil	0,3 mg·L ⁻¹ 0,2 mg·L ⁻¹	[60]
UV-Vis (405 nm)	Sòls	1-fluoro-2,4-dinitrobenzè	0,1 mg·kg ⁻¹ 0,05 mg·kg ⁻¹	[48]
FL (254nm, 313nm)	Aigües, sòls	FMOC-Cl	10 µg·L ⁻¹ 5 mg·kg ⁻¹	[120]
FL (270nm, 315nm)	Aigües	FMOC-Cl	5 µg·L ⁻¹ 10 µg·L ⁻¹	[59]
FL (263nm, 317nm)	Aigües, Sòls, Vegetals	FMOC-Cl	1 µg·L ⁻¹ 10 µg·kg ⁻¹ 0,05 mg·kg ⁻¹	[90,93]
ESI / MS	Aigües, plantes	FMOC-Cl	0,3 µg·L ⁻¹ 0,06 µg·L ⁻¹	[140]
ESI / MS	Aigües residuals	FMOC-Cl	0,03 µg·L ⁻¹ 0,03 µg·L ⁻¹	[141]
ESI / MS	Aigües superficials, aigües subterrànies	FMOC-Cl	0,1 µg·L ⁻¹	[61]
ESI / MS-MS	Aigües superficials, aigües subterrànies Sòls	FMOC-Cl	5 ng·L ⁻¹ 5 µg·kg ⁻¹	[142,143]
FL (340nm, 455nm)	Aigües	OPA-ME	2 µg·L ⁻¹ 2 µg·L ⁻¹	[144]
FL (330nm, 465nm)	Aigües	OPA-ME	2 µg·L ⁻¹ 4 µg·L ⁻¹	[44]

UV-vis= ultraviolat-visible; FL=fluorescència; ESI=electrosprai; MS= espectrometria de masses

Taula I.12. Principals mètodes d'anàlisi de glifosat i AMPA en aigua per LC

CROMATOGRAFIA IÒNICA (IC)

En aquest apartat es tractaran separacions cromatogràfiques per bescanvi iònic amb detecció contínua, generalment conductomètrica, amb un sistema supressor de ions [145].

Des de la seva introducció a mitjans anys 70, aquesta tècnica ha estat una eina molt útil per determinar espècies iòniques de forma ràpida. Ja s'ha vist que el glifosat és un compost ionitzable segons el pH del medi a causa de les seves propietats àcid-base.

La cromatografia iònica ha estat emprada per Zhu et al. [146] per determinar glifosat en aigües amb detecció electroquímica, assolint un límit de detecció de $42 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Amb un sistema semblant i mitjançant la integració d'un mòdul supressor en un sistema CI-MS-MS, Bauer et al. [147] obtenen un límit de detecció en aigües de $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Sato et al. [148] proposen un mètode de detecció simultània de glufosinat, bialafos i glifosat en orina i sèrum mitjançant cromatografia de bescanvi aniónic amb detecció amperomètrica (*Integrated Pulsed Amperometric Detection, IPAD*). Aquest mètode es basa en l'oxidació del grup amino dels diferents herbicides, que provoca un corrent catalític, que permet obtenir un senyal mitjançant un elèctrode d'or. El límit de detecció obtingut amb aquesta tècnica és de $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ en orina i sèrum.

Un altre mètode per a la determinació de glifosat en cereals [149] implica la separació dels anàlits en una columna de bescanvi aniónic utilitzant bicarbonat de sodi com a eluent. A continuació, s'insereix una micromembrana supressora per eliminar els ions Na^+ prèvia detecció dels anàlits per espectrometria de masses, mitjançant una interfase d'electrosprai en mode ió negatiu. Aquest mètode permet obtenir bones recuperacions dels anàlits i límits de detecció de $0,03 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de cereal.

- **TÈCNIQUES NO CROMATOGRÀFIQUES**

ELECTROFORESI CAPIL·LAR

L'electroforesi capil·lar, tot i que inicialment semblava més indicada per molècules d'interès biològic, com pèptids, proteïnes, àcids nucleics, etc., actualment s'està utilitzant en la determinació de tot tipus de ions o compostos que presenten diferent mobilitat sota l'efecte d'un camp elèctric. Aquesta mobilitat, anomenada mobilitat electroforètica, depèn bàsicament de la càrrega dels anàlits, així com de la seva forma i mida. Aquesta tècnica, que en general permet aconseguir separacions ràpides i eficients, es pot utilitzar en diversos modes: electroforesi capil·lar en zona (CZE), cromatografia electrocinètica micel·lar (MEKC), electrocromatografia capil·lar (CEC) i isotacoforesi (CITP), entre altres.

En electroforesi capil·lar s'utilitzen bàsicament els mateixos tipus de detectors que en cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC). Pels detectors UV-Vis i fluorescència cal destacar el mode de detecció indirecta, basat en la diferència d'absorció entre un electròlit de fons, que dona un senyal base, i l'anàlit, que no absorbeix (veure **Figura 1.9**). En el cas del glifosat i el seu metabòlit, AMPA, és especialment important, ja que aquest mode de treball permet la seva determinació sense cap etapa de derivatització.

Recentment s'han publicat nombrosos mètodes d'electroforesi capil·lar (CE), incloent diverses modalitats, per a la determinació de glifosat, i en alguns casos també del seu metabòlit, AMPA.

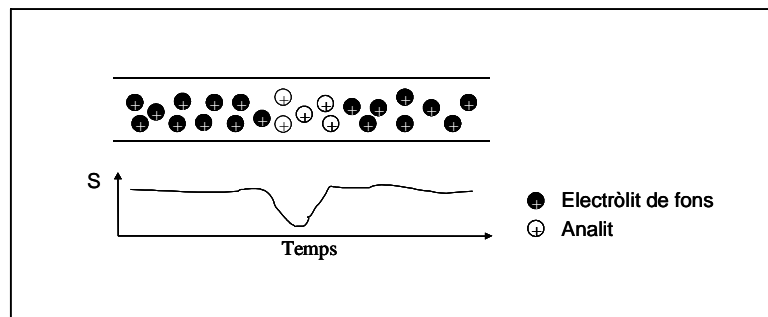


Figura I.9. Fonament de la detecció indirecta

En els primers mètodes descrits la modalitat més habitual és l'electroforesi capil·lar en zona. Shamsi et al. [150] descriuen un mètode on s'utilitzen ribonucleòtids com a electròlit de fons i dietilenetriamina com a modificador del flux electroosmòtic, amb detecció fotomètrica indirecta. En un mètode posterior, s'utilitza l'ió ftalat com a electròlit de fons i bromur de tetradeciltrimetil amoni com a modificador del flux electroosmòtic, per proporcionar més mobilitat i càrrega als anàlits [151,152]. Chang et al. [153] descriuen un mètode que permet la separació i determinació simultània de glufosinat, glifosat i AMPA mitjançant detecció indirecta per fluorescència. En aquest cas, la fluoresceïna s'utilitza com a agent fluoròfor, amb un làser de ió argó per induir la fluorescència base. Aquests mètodes són en general, poc sensibles, amb límits de detecció de l'ordre de $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Goodwin et al. [154] duen a terme una separació isotacofòrica de glifosat, glufosinat i els principals metabòlits d'aquests herbicides, l'àcid aminometilfosfònic i l'àcid metilfosfinicopropiònic, amb detecció conductomètrica, que permet la determinació simultània de fins a $25\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ dels quatre anàlits en 40 minuts.

Cada vegada són més freqüents els mètodes descrits on s'utilitza l'espectrometria de masses com a detector, mitjançant interfases de tipus electrospai. L'acoblament electroforesi-electrospai - *Condensation Nucleation Light Scattering Detector (ESI-CNLS)* permet la determinació de $0,2\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de glifosat en aigües superficials [155], mentre que l'acoblament CE-MS mitjançant una interfase *sheathless* microelectrospai permet la determinació de $0,17\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de glifosat en aigües i $0,42\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de glifosat en extractes de farina [156]. Recentment, Safarpour et al. [157] han desenvolupat un mètode per a la determinació de glifosat en formulacions comercials granulades. En aquest cas, l'anàlit es determina en menys de 10 minuts amb un límit de detecció de $10\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Molina i Silva [158] proposen un mètode molt sensible i selectiu per a glifosat i AMPA que implica l'ús de la cromatografia micel·lar electrocinètica (MECK) amb detecció per fluorescència induïda amb làser (LIF). En aquest cas es requereix la derivatització dels anàlits amb un derivat de

la fluoresceïna (5-(4,6-diclorotriazinilamino fluoresceïna, DTAF) per aconseguir una detecció ultrasensible. Els límits de detecció assolits són de $0,16 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ per a glifosat i $0,06 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ per a AMPA.

De la mateixa manera que Sadi et al. proposen l'ús del plasma acoblat inductivament a espectrometria de masses (ICP-MS) com a sistema de detecció en cromatografia líquida [137], molt recentment, Wuilloud i col·laboradors [159] també el proposen per a electroforesi capil·lar. El mètode descrit permet assolir límits de detecció de $0,76 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ per glifosat i $0,40 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ per AMPA.

MÈTODES IMMUNOQUÍMICS

L'aplicació de mètodes immunoquímics per a la determinació de contaminants ambientals és relativament recent en l'àmbit de la química analítica. Aquests mètodes es basen en l'ús d'un anticòs específic com a detector per a l'anàlit d'interès. L'immunoassaig suposa una alternativa ràpida, sensible, selectiva, i generalment de baix cost, als mètodes cromatogràfics, especialment en cas de tractar un gran nombre de mostres i/o per a les anàlisis *in-situ*.

L'introducció de tècniques immunoquímiques per a la determinació de glifosat s'ha desenvolupat ràpidament al llarg de la última dècada, a partir dels treballs de Hammock et al. [160]. Clegg et al. [161] van aplicar la tècnica ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* o assaig d'immunoabsorció lligat a enzims) per a la determinació directa de glifosat en mostres aquoses, obtenint un límit de detecció de $7,6 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, tot i que amb l'aplicació d'una tècnica de preconcentració prèvia (evaporació de la mostra), el límit de detecció millora en dos ordres de magnitud. Aquest mètode però presenta diverses limitacions: és lent, presenta límits de detecció massa alts i apareixen interferències en l'etapa de preconcentració.

Lee et al. [61] comparen un mètode innovador basat en ELISA amb un mètode on-line d'extracció en fase sòlida (SPE) amb cromatografia líquida acoblada a espectrometria de masses (HPLC-MS) per a la determinació de glifosat en aigües superficials i subterrànies. El mètode L'ELISA consisteix en una variant de l'immunoassaig que permet millorar l'afinitat de l'anticòs per l'anàlit. Els resultats obtinguts per ambdós mètodes presenten una correlació elevada, amb límits de detecció de $0,1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, tot i que el mètode immunoquímic requereix confirmació per HPLC-MS a concentracions inferiors a $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Més recentment, Rubio et al. [162] han proposat un nou mètode ELISA, que es compara amb un mètode de cromatografia líquida amb detecció fluorescent. En el cas del mètode immunoquímic, el límit de detecció que s'obté és de $0,6 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, inferior al del mètode cromatogràfic, $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. En aquest cas tampoc es troben diferències estadísticament significatives per les tres matrius aquoses estudiades. Les avantatges que ofereix aquest mètode immunoquímic són els baixos límits de detecció, el baix cost de les anàlisis i les poques interferències de matriu.

Molt recentment, González-Martínez i col·laboradors han desenvolupat un immunosensor totalment automatitzat per a la determinació de glifosat en mostres aquoses i sòls [163]. En aquest mètode, en el sensor es duu a terme una derivatització de l'anàlit on-line i empra un sèrum selectiu anti-glifosat, un enzim glifosat peroxidasa i detecció fluorescent. En condicions òptimes s'assoleix un límit de detecció de $0,021 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ en un temps de 25 minuts per mostra. Aquest immunosensor és capaç de discriminar entre el glifosat i compostos d'estructura molt semblant, com per exemple el seu metabòlit AMPA. Els resultats obtinguts es correlacionen bé amb els resultats obtinguts per LC-LC-MS.

TÈCNiques ANALÍTiques PER A LA DETERMINACIÓ DE TENSIOACTIUS NO IÒNICS

Com ja s'ha dit, la producció comercial dels tensioactius dona lloc a la formació de barreges complexes d'homòlegs i compostos isomèrics que poden diferir en la llargada de les cadenes alquíl·liques i etoxilades. La determinació i identificació d'aquests productes en els controls de qualitat durant les etapes de producció i etiquetatge pot ser relativament senzilla, però la determinació dels compostos individuals en formulacions comercials o en mostres ambientals és força complexa.

La gran activitat superficial d'aquests compostos confereix a les seves molècules, en general, una baixa o nul·la volatilitat, elevada polaritat i elevada solubilitat en aigua, característiques que en dificulten la seva determinació.

Recentment, dins la col·lecció *Comprehensive Analytical Chemistry*, s'ha dedicat un volum a l'anàlisi i detecció de tensioactius en el medi ambient, en el qual es fa un repàs molt extens dels mètodes d'anàlisi desenvolupats per tot tipus de tensioactius fins a la seva publicació, al 2003 [164]. Anteriorment, els mètodes cromatogràfics adequats per a la separació de tensioactius no iònics, havien estat revistats per diversos autors [165-167].

La determinació de tensioactius s'ha dut a terme amb una gran varietat de tècniques [95]: cromatografia líquida (LC), tant en capa fina (TLC) com d'alta resolució (HPLC) en fase normal (NP) i fase invertida (RP), cromatografia de gasos (GC) o electroforesi capil·lar en zona (CZE). La tècnica més adequada per a la seva determinació, però, sembla clar que és la cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC). L'avantatge més important d'aquesta tècnica és la seva capacitat per separar components individuals de mesclures complexes de tensioactius. L'ús de sistemes de detecció òptics com UV o fluorescència (FL) només és factible quan les molècules contenen grups cromòfors. La falta de grups d'aquest tipus es pot compensar amb l'acoblament d'un espectròmetre de masses al sistema de separació cromatogràfica. Aquest detector, a la vegada, permet la identificació inequívoca d'un pic cromatogràfic amb una sensibilitat relativament elevada. Els models de fragmentació obtinguts proporcionen també informació estructural sobre compostos desconeguts, tals com metabòlits resultants de la degradació dels tensioactius.

A causa de l'elevada solubilitat en aigua i de la poca volatilitat d'aquests compostos, l'aplicació de la cromatografia de gasos (GC) és molt limitada. La derivatització dels anàlits per augmentar la seva volatilitat sense descomposició tèrmica permetria l'aplicació d'aquesta tècnica, però el temps i el treball necessari per a dur-la a terme fa que es desestimi aquesta opció. Un inconvenient addicional, és l'especificitat dels agents derivatitzants, que s'escullen en funció dels anàlits. La presència de compostos desconeguts en la mostra inicial quedaria discriminada ja d'entrada, al no patir la reacció de derivatització necessària per poder ser determinats per GC.

A continuació es fa un recull dels mètodes d'anàlisi més representatius de les diverses tècniques aplicades.

• CROMATOGRAFIA DE GASOS (CG)

Els primers intents per aplicar la cromatografia de gasos (CG) a la determinació de tensioactius no iònics daten de la dècada dels 60, amb alguns mètodes que permetien la separació d'alquiletoxilats de fins a dues unitats etoxi (EO) [168], i alquilfenol etoxilats de fins a 7 unitats EO [169].

Pel que fa a l'anàlisi d'alquilamina etoxilats, no apareix cap mètode descrit a la bibliografia mitjançant cromatografia de gasos. No obstant, sí que hi ha una gran varietat de mètodes descrits per altres tipus de tensioactius no iònics, especialment alcohol etoxilats (AE) i alquilfenol etoxilats (APEO). Tot i que l'anàlisi directa per GC ha estat aplicada amb èxit a alguns alquilfenol etoxilats amb una o dues unitats EO [170-172] en la resta de casos els mètodes descrits impliquen la derivatització dels anàlits per formar derivats més volàtils. Alguns dels agents derivatitzants més utilitzats es mostren en la **Taula I.13**.

TIPUS D'ANÀLIT n = n ^o unitats EO	AGENT DERIVATITZANT	Ref.
AE	TMS éter	[173]
	HBr	[96,174]
	TFAA	[175]
NPEO	BSA O BSTFA	[176,177]
	PFB-Cl / HFBA	[178,179]
	PFB-Br	[180]

AE: alcohol etoxilats; NPEO: nonilfenol etoxilats; TMS: trimetilsilil; HBr: Àcid bromhídric; TFAA: Anhídrid trifluoroacètic; BSA: Bis(trimetilsilil) acetamida; BSTFA: Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida; PFB-Cl: Clorur de pentafluorobenzoil; HFBA: Anhídrid heptafluorobutíric; PFB-Br: Bromur de pentafluorobenzil.

Taula I.13. Agents derivatitzants més emprats per a l'anàlisi de tensioactius no iònics.

La retenció dels tensioactius no iònics en columnes apolars depèn bàsicament del nombre d'unitats EO. A mesura que augmenta el nombre d'unitats EO, però, la volatilitat dels oligòmers disminueix, de manera que la resposta de l'instrument també disminueix, impossibilitant l'anàlisi quantitativa dels oligòmers de pes molecular més elevat (per exemple, de més de 6 o 7 unitats EO). Aquest oligòmers només podran ser analitzats per GC després d'una etapa de derivatització i en condicions de temperatures molt elevades. En aquest cas, les columnes capil·lars han d'estar recobertes d'un film de polisiloxà que permet treballar a temperatures de fins a 400°C. Aquestes altes temperatures presenten alguns inconvenients, com el temps de vida curt de les columnes cromatogràfiques i la possible degradació de la mostra, sobretot dels tensioactius no iònics de pes molecular elevat.

Tot i que la detecció dels anàlits s'ha dut a terme amb detectors de ionització en flama (FID) [181] o de captura d'electrons (ECD) [178], per la determinació de tensioactius no iònics en matrius ambientals és indispensable l'ús de l'espectrometria de masses (MS) [172,180]. Aquest sistema de detecció permet la identificació dels etoximers individuals dins els homòlegs d'una mateixa mostra i la discriminació entre isòmers lineals i ramificats [166]. Les interfases més emprades en els acoblaments GC-MS per a l'anàlisi de tensioactius no iònics són les de tipus electrospai [182] o de ionització química [180]. En un dels mètodes descrits es realitza l'anàlisi de 4-nonilfenol com a derivat acetil i s'obtenen recuperacions en aigües residuals i fangs del 93% i límits de detecció de 0,1 µg·L⁻¹ i 0,1 µg/g, respectivament [183].

- **CROMATOGRAFIA AMB FLUID SUPERCRÍTIC (SFC)**

La cromatografia amb fluid supercrític (SFC) combina les avantatges de les separacions per cromatografia de gasos i cromatografia líquida. A més, és una tècnica útil per a l'anàlisi de tensioactius no iònics a causa de la seva gran solubilitat en CO₂ [184]. En aquest cas no es requereix cap tipus de derivatització.

La separació basada en la llargada de les cadenes etoxilades de varis tensioactius no iònics s'ha dut a terme mitjançant aquesta tècnica amb èxit [185-188]. La SFC permet l'anàlisi fins i tot dels alcohol etoxilats d'elevat pes molecular [189], tot i que presenta l'inconvenient de no resoldre completament els homòlegs alquilics més llargs [188]. S'ha demostrat que la separació oligomèrica de nonilfenols per SFC és més completa que per HPLC, amb temps d'elució inferiors. No obstant, aquesta tècnica no ha estat aplicada a mostres ambientals [190].

Tot i que l'acoblament de SFC amb espectrometria de masses encara s'està desenvolupant, ja hi ha algunes interfases disponibles al mercat, tipus FAB, ESI o APCI [166]. S'ha publicat que la sensibilitat de l'acoblament SFC-MS és adequada per a l'anàlisi ambiental [191,192], no obstant, se n'han descrit molt poques aplicacions [193-195], i cap d'elles per a mostres ambientals.

- **ELECTROFORESI CAPIL·LAR (CE)**

La determinació de tensioactius per electroforesi capil·lar és problemàtica per diferents raons. Per una banda, la tendència a la formació de micel·les provoca una gran cua en els pics, una separació insuficient i uns temps de migració irreproducible durant la separació electroforètica, ja que les micel·les tenen diferent mobilitat electroforètica que les molècules individuals de tensioactiu. Un altre problema és la forta adsorció dels tensioactius a la superfície interna dels capil·lars de sílica fosa. Ambdós fenòmens, però, es poden inhibir afegint un modificador orgànic, com acetonitril, acetona, tetrahidrofurà o metanol, a concentracions majors del 20%, al tampó electroforètic.

La determinació de tensioactius no iònics és poc freqüent per electroforesi capil·lar ja que no presenten mobilitat electroforètica. No obstant, aquests anàlits poden ser determinats per CE després de convertir-se en derivats iònics o després d'induir una associació amb dodecilsulfat de sodi (SDS).

El primer tipus de derivatització se sol realitzar amb anhídrid ftàlic [196-198]. Per forçar aquesta reacció es requereix un excés molar d'anhídrid ftàlic de 10 vegades. D'aquí en resulta un gran pic al principi del cromatograma, que correspon a l'àcid ftàlic. Aquest procediment és especialment efectiu pel cas d'alcohol etoxilats. A més, aquest tipus de derivatització produeix derivats que poden ser determinats amb detectors convencionals de UV.

L'altra possibilitat és dur a terme la separació en electròlits que continguin tensioactius aniónics (SDS) a concentracions superiors a la concentració micel·lar crítica (CMC), aplicant el mecanisme de la cromatografia electrocinètica micel·lar (MEKC). També cal afegir un percentatge elevat de modificador orgànic, que evita la formació de micel·les, però no de la interacció entre els tensioactiu SDS i l'anàlit no iònic. Aquesta associació interactiva dona lloc a una diferent mobilitat electroforètica a causa de les diferències en les forces de les associacions anàlit-SDS. Aquest mètode ha estat aplicat satisfactòriament a la separació d'octilfenol etoxilats amb 10-12 unitats EO [199].

El sistema de detecció més adequat, com en totes les tècniques en les que és possible el seu acoblament, és l'espectrometria de masses, ja que permet l'anàlisi de matrius complicades amb una gran quantitat de substàncies interferents.

- **CROMATOGRÀFIA LÍQUIDA (CL)**

Aquesta tècnica és la més adequada per la determinació de tensioactius no iònics, ja que permet la separació de barreges complexes amb una àmplia distribució d'homòlegs alquil i etoxi sense discriminació dels homòlegs de cadena més llarga, com passa en GC.

SEPARACIÓ CROMATOGRÀFICA

Ja s'ha dit que els tensioactius no iònics són molècules amfipàtiques que consisteixen en una part hidrofílica (cadena etoxilada de diferent llargada) i una part hidrofòba (alquilfenols, àcids grassos, alcohols, etc). Els tensioactius polietoxilats produïts a escala industrial contenen un gran nombre d'impureses, i representen un barreja dispersa de compostos amb diferents longituds de cadenes d'òxid d'etilè, de manera que els diferents oligòmers segueixen una distribució de Poisson. Així doncs, la separació dels tensioactius no iònics segons la llargada de les cadenes etoxilades i segons el caràcter de la part hidrofòba és de vital importància en la determinació cromatogràfica d'aquest tipus d'anàlit.

Per tal que la separació sigui efectiva, cal en primer lloc fer una tria acurada del tipus de suport més adequat per cada tensioactiu. Cserháti et al. [167] van revisar al 1997 els suports més adequats per a la separació i determinació quantitativa de tensioactius no iònics usats com a additius en plaguicides. En la **Taula I.14.** es mostren alguns dels suports avaluats, indicant per a quin tipus de tensioactiu és adequat, així com el mecanisme implicat en la separació.

MECANISME	TIPUS DE TENSIOACTIU NO IÒNIC	TIPUS DE SUPORT	REF.
FASE NORMAL	Alquilfenol etoxilats	Sílica	[200]
	Octilfenol etoxilats	Sílica modificada-NH ₂	[201]
	Octilfenol etoxilats	Sílica metilada (C1 TMS)	[190]
	Àcid grassos etoxilats	Diol	[202]
	Nonilfenol etoxilats	Alúmina	[203]
FASE INVERTIDA	Alquilbensulfonats i alquilfenol polietoxilats	C8	[204]
	Alquilbensulfonats i alquilfenol polietoxilats	C18	[100]
	Alcohol etoxilats	C18	[104]
	Nonilfenol etoxilats	C1, C2, C6, C8, C18, sílica modificada, alúmina modificada	[205]
	1,1,3,3-tetrametilbutilfenol	C1, C2, C6, C8, C18, sílica modificada, alúmina modificada	[206]
	Tributilfenol	C1, C2, C6, C8, C18, sílica modificada, alúmina modificada	[207]

Taula I.14. Suports utilitzats per a la separació cromatogràfica de diversos tensioactius no iònics.

Emprant un mecanisme de separació en fase normal, utilitzant suports polar o moderadament polars (sílica, sílica modificada amb CN, sílica modificada amb NH₂, diol, o sílica metilada), els tensioactius polietoxilats es poden separar segons la llargada de la cadena etoxilada.

Per altra banda, la cromatografia en fase invertida emprant suports no polars (C1, C2, C8, C18, sílica recoberta amb polietilè o alúmina) no sembla adequada per la separació dels diferents

oligòmers, a causa de la seva gran selectivitat per als grups alquilics. Aquest mecanisme és especialment útil quan la part hidrofòba del tensioactiu només difereix en la llargada de la cadena alquilica (separació homòleg per homòleg), ja que en aquests casos la llargada de la cadena etoxilada no afecta a la separació al contenir la mateixa part hidrofòba els diversos oligòmers, que s'elueixen en un sol pic compacte. No obstant, moltes vegades, cadenes alquílques lineals i ramificades amb el mateix nombre d'àtoms de carboni o altres isòmers estructurals poden estar en una mateixa barreja de tensioactius, cosa que dificulta o impossibilita la separació amb aquest mecanisme tot sol. En aquests casos és indispensable un sistema de detecció per espectrometria de masses. Tot i això s'han avaluat i comparat varis suports per a la separació d'aquest tipus d'anàlit (veure **Taula I.14**).

Per tal d'aconseguir una separació basada tant en el caràcter de la part hidrofòba com en la llargada de la cadena etoxilada, la solució més efectiva és l'acoblament de dues columnes cromatogràfiques en sèrie. D'aquesta manera les fraccions separades primerament en una columna de fase invertida, poden ser després separades en funció de la llargada de la cadena etoxilada en una següent columna de fase normal. Un exemple de l'ús d'aquest acoblament es troba en la separació de tensioactius alquilamina etoxilats, tensioactius objecte d'estudi en aquest treball, segons Schreuder et al. [22]. En aquest estudi s'utilitza una columna de sílica modificada amb grups ciano (CN) per determinar la distribució alquilica i una columna de sílica modificada amb grups amino (NH₂) per determinar la distribució d'unitats etoxilades. La detecció té lloc per fluorescència, de manera que aquesta doble separació és indispensable per poder determinar els diferents homòlegs alquilics.

Pel que fa a les fases mòbils més utilitzades, cal diferenciar també segons el tipus de mecanisme pel qual tingui lloc la separació. En mecanismes de fase normal són habituals les barreges de heptà-cloroform-metanol [200], isooctà-propanol-metoxietanol [201], hexà-propanol-aigua-àcid acètic [202], entre d'altres, en diferents proporcions. En canvi en mecanismes de fase invertida se solen utilitzar barreges de metanol-aigua [112,116], acetonitril-aigua [208], acetona-aigua [209] o tetrahidrofurà-aigua [104,210]. En l'elució dels anàlits de la columna cromatogràfica es pot treballar en condicions isocràtiques o en diferents gradients, afavorint segons convingui la separació dels anàlits.

En un altre mètode descrit per alquilamina etoxilades [38], la separació dels anàlits té lloc en una única columna C18, Hypersil BDS (base deactivated surface), on s'eliminen els silanols actius i per tant, la fa adequada per anàlits bàsics. Durant la separació cromatogràfica es treballa amb un gradient entre dues solucions: una barreja d'acetonitril-metanol (1:1) amb 20mM d'àcid acètic i 25mM de trietilamina i dissolució d'aigua ultrapura amb 20mM d'àcid acètic i 25mM de trietilamina. En aquest cas la detecció té lloc mitjançant espectrometria de masses (veure pròxim apartat), de manera que no cal una doble separació.

SISTEMES DE DETECCIÓ

La detecció per UV o fluorescència (FL) sense derivatització només és aplicable a tensioactius amb grups cromòfors dins la molècula (bàsicament alquilfenol etoxilats). Els diversos mètodes descrits a la bibliografia per a la determinació de nonilfenols individuals mitjançant fase normal i detecció per UV assoleixen límits de detecció en el rang de 0,5 a 5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ [79,211,212]. Tot i això, la detecció per FL és preferible a causa de la seva major sensibilitat i selectivitat [213]. Aquest tipus de detecció permet obtenir límits de detecció per sota dels $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, per exemple, Bennie et al. [214] obtenen límits de detecció de 0,02 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ per diversos nonilfenol etoxilats en aigües de riu.

Pel que fa a tensioactius que no absorbeixen aquests tipus de radiació, es poden dur a terme reaccions de derivatització. Diversos agents derivatitzants, com fenil isocianat [116,215], clorur de benzoil o clorur de 3,5-dinitrobenzoil [216], 1-antròilnitril [217] i 1-isocianat de naftil [218], han estat aplicats satisfactòriament a l'anàlisi d'alcohol etoxilats, tot i que la sensibilitat associada amb aquestes tècniques és limitada, amb límits de detecció de 3 a 5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ després de preconcentrar un litre de mostra. Aquest motiu, juntament amb la feixuga tasca de dur a terme reaccions de derivatització, limita l'aplicació d'aquestes tècniques a mostres reals, de fet, pràcticament no s'han descrit aplicacions per a mostres ambientals [116,218].

Pel cas de la determinació d'alquilamina etoxilades s'ha descrit un mètode amb detecció per fluorescència, amb un sistema d'extracció post-columna amb un parell iònic fluorescent (9,10-dimetoxiantracè-2-sulfonat) [22]. El límit de detecció obtingut és de 25 ng per alquilamina etoxilades, en presència d'alquilfenol, alcohols i èsters etoxilats, que no donen resposta en l'extracció amb parell iònic aplicada.

S'han aplicat també mètodes alternatius, com la detecció per índex de refracció (RI) [219] o *Evaporative Light Scattering* (ELSD) [196,220], que no requereixen etapes de derivatització. En el cas de RI la principal desavantatge són els alts límits de detecció que s'assoleixen, mentre que en ELSD, la reduïda linealitat de la resposta del sistema de detecció així com les interferències de compostos no volàtils en la matriu de la mostra dificulten la seva aplicació.

ESPECTROMETRIA DE MASSES

En comparació amb els sistemes de detecció descrits prèviament, un espectròmetre de masses (MS), que selecciona els ions de la mostra segons la seva relació càrrega-massa, ofereix una inigualable selectivitat i sensibilitat, a més de proporcionar informació sobre els pes molecular de les espècies. Els espectres de massa generats també proporcionen informació útil pel que fa l'estructura dels anàlits individuals i ajuden a la identificació estructural de compostos desconeguts. Aquestes característiques són molt importants en l'anàlisi de traces de tensioactius i els seus productes de degradació, especialment en el cas de matrius complexes, com són les mostres ambientals.

En l'acoblament LC-MS és important l'elecció del tipus d'interfase més adequat, ja que pot ser que sorgeixin incompatibilitats entre les dues tècniques pel que fa al flux o tipus de fase mòbil. Els sistemes més usats en la determinació de tensioactius no iònics són sistemes de ionització a pressió atmosfèrica (API) [165,166,221,222], ja sigui per ionització química a pressió atmosfèrica (APCI) o ionització per electroesprai (ESI). Aquestes tècniques de ionització es consideren suaus, de manera que es generen habitualment ions pseudo-moleculars, adductes o clusters, els quals permeten obtenir informació sobre el pes molecular. L'adequació de cada interfase per una anàlisi en particular ve determinada per la polaritat de l'anàlit i de la seva massa molecular (veure **Figura I.10**).

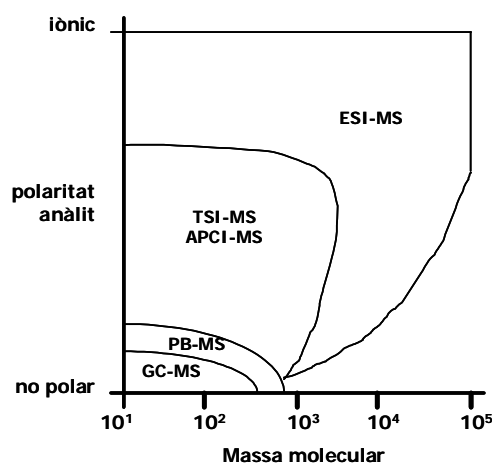


Figura I.10. Rangs d'aplicació de les diferents interfases LC-MS [223].

De les varies tècniques existents per a l'anàlisi de compostos isomèrics i homòlegs de tensioactius en productes industrials, formulacions de productes de neteja, de productes agroquímics, etc., així com mostres ambientals, l'acoblament LC-API-MS n'és el mètode de referència [40,108,112].

La identificació de tensioactius no iònics se sol dur a terme a partir dels espectres generats en mode positiu, ja que es formen més fragments de ions característics que en mode negatiu [164]. Les llibreries d'espectres de ions producte també faciliten aquesta identificació per comparació de l'espectre obtingut amb espectres generats prèviament. No obstant, la falta de patrons comercials per la generació d'espectres de ions producte i la falta de compatibilitat entre instruments de MS de diferents cases comercials, suposen un obstacle important per a la tasca de identificació.

Com a mètode d'*screening*, l'anàlisi d'injecció en flux acoblada a MS (FIA-MS), sense cap separació cromatogràfica, permet reconèixer fàcilment compostos etoxilats per les característiques senyals equidistants amb $\Delta m/z$ 44 en el seu espectre [224]. Dins d'aquest grup de tensioactius es troben els alcohol etoxilats, els alquilfenol etoxilats, les alquilamina etoxilades, entre d'altres.

Pel que fa a la determinació d'alquilamina etoxilades mitjançant MS només apareixen dos mètodes descrits a la bibliografia.

En un primer mètode s'utilitza la tècnica de ionització amb desorció làser amb matriu assistida i analitzador de temps de vol (MALDI-TOF) [225], sense dur a terme cap separació cromatogràfica prèvia. L'objectiu d'aquest estudi és la determinació amb precisió del pes molecular i del grau d'etoxilació de les alquilamina etoxilades. Els resultats obtinguts amb l'acoblament MALDI-TOF es comparen amb els obtinguts per altres tècniques alternatives, així com amb els valors certificats per la casa comercial. En general, els resultats obtinguts per aquest mètode es correlacionen bastant bé amb els valors certificats, tot i que s'observa una distorsió d'aquesta correlació quan les mostres presenten continguts elevats de polietilenglicols (PEGs), que interfereixen en l'anàlisi per MALDI-TOF.

Krogh et al. [38] duen a terme l'anàlisi d'alquilamina etoxilades mitjançant l'acoblament LC-APCI-MS en mode positiu. En el desenvolupament d'aquest mètode la ionització amb ESI també fou avaluada, tot i que les interferències de matriu són més importants que amb APCI. Per tal d'assolir la màxima sensibilitat en la determinació analítica els ions es detecten en el mode SIM (*Single-Ion Monitoring*). El mètode desenvolupat, juntament amb una etapa d'extracció i preconcentració prèvia (veure punt 1.2), permet assolir límits de detecció de 0,3 a 6 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ segons l'homòleg alquílic considerat en mostres aquoses de diferent procedència. Cal dir que aquest mètode ha estat aplicat posteriorment a l'anàlisi d'alquilamina etoxilades en sòls agrícoles, després d'una extracció dels anàlits mitjançant una extracció amb fluids pressuritzats (PLE) [126].

TRANSPORT I DESTÍ DE L'HERBICIDA GLIFOSAT

L'objectiu últim de l'estudi dels plaguicides és la predicció del seu impacte ambiental una vegada alliberats al medi. Idealment hauríem de ser capaços de fer prediccions per cada plaguicida amb els mínims experiments al laboratori i encara menys experiments de camp. No obstant, els processos medioambientals són enormement complexes i a vegades, aparentment, aleatoris. Els punts de major interès (campes, boscos, llacs,...) són ecosistemes vius subjectes a una gran variabilitat en l'espai i en el temps.

L'única manera de desenvolupar aquesta capacitat de predicció és ampliant el coneixement dels processos bàsics que porten a la dissipació i degradació dels plaguicides en les diferents matrius ambientals, i aprendre com aquests processos estan controlats per les condicions ambientals.

Pel cas de l'herbicida glifosat, les claus per determinar la seva distribució en les diverses matrius ambientals són algunes de les seves propietats físico-químiques (veure amb més detall en el punt 1.1.1):

- degradació microbiana en sòls i aigües
- forta adsorció a la majoria de tipus de sòls
- elevada solubilitat en aigua
- volatilitat molt baixa

A continuació s'aprofundirà en el comportament d'aquest herbicida en mostres aquoses i en sòls. En aquest sentit, cal destacar el treball publicat per Giesy et al. [226] en el qual es fa un ampli recull d'estudis toxicològics i de degradació de l'herbicida glifosat en el medi.

Els factors més importants implicats en la contaminació de les aigües per plaguicides són la velocitat de degradació del compost en sòls i la tendència d'aquest a quedar-hi adsorbit, però també cal tenir en compte quins processos tenen lloc des que l'herbicida és alliberat al medi.

Una vegada el glifosat és abocat al medi pot patir diversos fenòmens, com ser vaporitzat a l'atmosfera sense cap canvi químic, pot ser adsorbit pel sòl, pot ser percolat a través del sòl en forma líquida o de dissolució i ser eliminat per filtració, pot reaccionar químicament en el sòl, pot ser degradat per microorganismes o adsorbit per plantes o altres organismes vius i pot entrar a la cadena alimentària [227]. El camí que segueix qualsevol herbicida depèn bàsicament de la seva estructura química i de les característiques del sòl, les quals estan estretament relacionades amb la seva composició.

El sòl, juntament amb l'aire i l'aigua, són els suports on tenen lloc tots els fenòmens vitals que tenen lloc en el nostre planeta. La formació del sòl és el resultat d'una sèrie de processos

físics, químics i biològics sobre el medi rocós original. La composició mitjana del sòl, en percentatge en volum, és la següent: 50% de matèria sòlida, 20-30% de dissolució aquosa i 20-30% d'aire edàfic.

La **dissolució aquosa del sòl** actua d'intermediària entre la litosfera i els organismes vius. El seu paper és determinant per assegurar un equilibri químic i biològic, ja que conté els soluts necessaris pel desenvolupament de la vegetació. Aquesta dissolució conté ions provinents de la pluja, de la descomposició de matèria orgànica, processos d'intercanvi iònic entre la dissolució i el sòl, les partícules col·loïdals i la meteorització mineral.

La **fase sòlida del sòl** representa aproximadament la meitat de la composició total del sòl, i està constituïda en un 45% per una fracció inorgànica i en un 5% aproximadament per una fracció orgànica [228].

La fracció inorgànica conté partícules minerals de diverses mides: grava (>2mm), sorra gruixuda (0,2-2mm), sorra fina (0,05-0,2mm), llims o sediments (2-50mm) i argiles (<2mm). La mida de les partícules que formen el sòl determina la textura del mateix i aporta informació sobre la seva **porositat** o espais buits per unitat de volum pels que pot circular aire i aigua. La mida de porus també és important ja que determina la **permeabilitat** d'un sòl, o sigui, la velocitat amb la que l'aire i l'aigua es poden moure a través d'ell, des de les capes més superficials a les més profundes. Tots aquests factors són els que determinen la capacitat d'un sòl per retenir aigua, per airejar-se i per poder ser cultivat.

La fracció orgànica del sòl, tot i que només representa un percentatge en pes molt petit de la composició total del sòl, és de vital importància per determinar la seva fertilitat, ja que és una font d'aliments per microorganismes, participa en diversos processos químics edàfics i afecta a les seves propietats físiques. Aquesta fracció procedeix majoritàriament de residus vegetals en fase de descomposició, i en menor proporció, d'organismes vius. Com a resultat d'algunes vies de transformació dels residus vegetals, en el sòl també existeix matèria orgànica difícilment degradable, anomenada **fracció húmica**. L'humus està constituït majoritàriament per àcids húmics i fúlvics, que són una barreja complexa de macromolècules, amb pesos moleculars elevats, un alt grau d'aromaticitat i amb diferent reactivitat, derivada de la presència de grups àcids, fenòlics i carbonílics. Aquesta fracció húmica és la principal responsable dels processos d'adsorció que tenen lloc al sòl.

La composició del sòl determina les seves característiques, les quals a la vegada estan relacionades amb els processos que hi tenen lloc. Els paràmetres que generen més informació, des d'un punt de vista químic, pels fenòmens que tenen lloc al sòl són:

- El pH, que es pot relacionar amb la forma en què es troben determinades espècies químiques, així com el seu grau de mobilitat. El pH depèn de les espècies presents en el sòl i del contingut en matèria orgànica.

- El contingut de matèria orgànica, que està estretament relacionat amb la capacitat d'adsorció d'un sòl. La matèria orgànica està formada bàsicament per àcids húmics i àcids fúlvics. El contingut en matèria orgànica del sòl afecta altres propietats químiques, com el pH, la humitat,...

- La capacitat de bescanvi catiònic (CEC, de l'anglès *cation exchange capacity*), que és la capacitat d'un sòl per intercanviar ions de la fase líquida del sòl. Els cations de bescanvi més habituals són l' NH_4^+ , Na^+ , Ca^{2+} , K^+ i Mg^{2+} , els quals es mantenen units per atraccions electrostàtiques i són de fàcil assimilació per les plantes.

PROCESSOS D'ADSORCIÓ / DESORCIÓ

L'adsorció és un fenomen físico-químic que implica l'acumulació d'una substància o material en una interfície entre una superfície sòlida i una dissolució que la conté. De la mateixa manera es pot definir la desorció, que consisteix en el procés invers.

L'adsorció és un dels processos més importants que tenen lloc al sòl. Aquest procés determina la quantitat d'espècies metàl·liques, plaguicides, i altres compostos químics que són retinguts a la superfície dels sòlids i que suposen un dels factors més determinants pel que fa al transport de nutrients i contaminants en sòls. L'adsorció també afecta a les propietats electrostàtiques, per exemple, la coagulació o la sedimentació de partícules en suspensió i/o col·loides.

En l'adsorció d'anàlits en dissolució intervenen tant forces físiques com forces químiques. Les forces físiques (fisisorció) són de tipus de Van der Waals (per exemple, fraccionament) o electrostàtiques (per exemple, bescanvi iònic). Les forces químiques (quimisorció) són resultat d'interaccions que impliquen mecanismes de intercanvi de lligands, enllaços covalents o enllaços d'hidrogen [229].

La matèria orgànica del sòl exerceix una funció important en relació amb aquests processos d'adsorció [228]. L'estructura química de les espècies húmiques està formada per una part de caràcter hidròfob (anells aromàtics i cadenes hidrocarbonades), mentre que altres parts de la molècula tenen caràcter hidròfil (àcids carboxílics i fenols, funcions nitrogenades...). Aquest fet permet que puguin originar-se els següents fenòmens:

- estructura hidròfila → possibilita els processos d'adsorció superficial de cations de caràcter no específic i processos d'adsorció química (formació de complexos i quelats)

- estructura hidròfoba → correspon a les zones interiors de les macromolècules orgàniques, que es pleguen sobre sí mateixes i que poden interaccionar amb altres molècules orgàniques no solubles en aigua, donant lloc a processos d'adsorció d'aquestes en el sí de les partícules húmiques edàfiques.

Tot i que la majoria d'estudis de la química del sòl se centren en l'adsorció de ions i molècules en el sòl, els processos de desorció també són extremadament importants, especialment per aquells sòls ja contaminats [229].

Els processos d'adsorció de glifosat en sòls han estat estudiats des de 1975 per diversos autors. L'adsorció de l'herbicida glifosat té lloc principalment en el material argilós i en la matèria orgànica del sòl [230], en els quals el mecanisme d'adsorció és diferent.

En el primer estudi sobre la mobilitat de glifosat en sòls, realitzat per Sprankle et al. [231], tot i observar-se la gran tendència del glifosat a ser adsorbit en tot tipus de sòls, es descriuen diferències significatives pel que fa a l'adsorció d'aquest herbicida segons la composició mineralògica i el contingut en cations inorgànics del sòl. En primer lloc es detecta que el glifosat s'adsorbeix més ràpidament en sòls argilosos que en sòls sorrencs. En segon lloc, s'observa que l'adsorció de glifosat augmenta segons el grau de saturació de cations inorgànics del sòl en l'ordre: $\text{Ca}^{2+} < \text{Mn}^{2+} < \text{Zn}^{2+} < \text{Mg}^{2+} < \text{Fe}^{3+} < \text{Al}^{3+}$. Per altra banda, a causa que el glifosat presenta un grup fosfat en la seva estructura química, es preveu una competència entre aquest compost i els fosfats inorgànics per adsorbir-se en els punts d'adsorció del sòl. Hensley et al. [232] i Shoal et al. [233] també descriuen la gran afinitat del glifosat per formar complexos quelats de gran estabilitat amb el Fe^{3+} i l' Al^{3+} present al sòl. La formació de complexos de glifosat amb nombrosos cations inorgànics (Na^+ , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Fe^{3+} , Al^{3+}) ha estat corroborada posteriorment per diversos autors [49,120,234-238], els quals especifiquen que la complexació de glifosat és afavorida pels ions de càrrega superior.

McConnell i Hossner [234] observen que, en general, l'adsorció de glifosat disminueix a mesura que el pH del sistema augmenta, tot i descriure algunes excepcions. Aquest fet es deu a les propietats àcid-base del glifosat i dels sòls argilosos (montmorillonita, nontronita, caolinita, hematita, goetita), que segons el pH del medi poden presentar diferent càrrega. A pHs bàsics, tant el glifosat com la superfície dels sòls argilosos es troben carregats negativament, de manera que les atraccions electrostàtiques entre ambdós es veuen desfavorides.

En un estudi posterior, de Miles i Moye [46], s'observa que l'adsorció de glifosat està relacionada principalment amb la concentració d'ions hidroxil. Els resultats obtinguts concorden amb els de McConnell, ja que a pHs àcids té lloc una major adsorció de glifosat. Aquest fet es relaciona tant amb la concentració d'hidroxils com amb el fet que a pHs àcids els cations Fe^{3+} i Al^{3+} es troben en forma no soluble. En aquest estudi s'observa que la relació entre la capacitat d'intercanvi catiònic del sòl i la seva àrea superficial es relaciona inversament amb el grau d'adsorció, tendència contrària a l'habitual en compostos no específics. Per aquest motiu s'arriba a la conclusió que el mecanisme d'adsorció ha de ser específic per glifosat, i d'acord amb altres autors [120,234], es proposa un mecanisme mitjançant enllaços de pont d'hidrogen i per bescanvi iònic dels cations presents a la superfície del sòl. En aquest treball també s'estudia la cinètica dels

processos d'adsorció i desorció de glifosat en diversos sòls. Els resultats mostren que l'adsorció de l'herbicida en general és ràpida, tot i que les condicions d'equilibri no s'assoleixen fins al cap d'aproximadament sis hores. Pel que fa a la desorció, el comportament és pràcticament el mateix, requerint un temps màxim de 6 hores per arribar a l'estat d'equilibri.

Tot i que una gran part dels treballs estudien l'adsorció en funció dels cations presents en el sòl, són varis els autors que reconeixen que les substàncies húmiques adsorbeixen la majoria de plaguicides en sòls, i que aquestes substàncies poden actuar de transportadors de contaminants orgànics en sòls [239]. En aquest sentit, Piccolo et al. han publicat diversos treballs on s'estudia la influència de les substàncies húmiques en el procés d'adsorció de glifosat en el sòl. En un primer estudi [240], es demostra que el glifosat s'enllaça a substàncies húmiques mitjançant un mecanisme per ponts d'hidrogen, de manera que permet la seva adsorció. En un altre estudi es demostra la interacció del glifosat amb un complex format entre àcids húmics i ferro [241]. En aquest tipus d'adsorció intervé un mecanisme de intercanvi de lligands, on un o més hidroxils de l'esfera d'hydratació del ferro es poden intercanviar pel grup fosfonat del glifosat. En un últim estudi [242], es demostra que l'adsorció de glifosat en substàncies húmiques es veurà afavorida en cas de substàncies de gran mida molecular i gran flexibilitat estereoquímica. En diversos estudis també s'observa la interacció de glifosat amb la matèria orgànica dissolta del sòl [230,232],. Així doncs, el glifosat una vegada alliberat al sòl, pot interaccionar temporalment amb substàncies húmiques i ser alliberat de nou al cap de cert temps. Igualment, la mobilitat de l'herbicida cap a horitzons més profunds del sòl pot estar controlat per la formació de complexos relativament estables entre el glifosat i les substàncies húmiques solubles.

Tot i això, sembla que a causa de la naturalesa àcida del glifosat, aquest herbicida és més propens a patir interaccions iòniques amb el sòl i no hidròfobes, sent adsorbit principalment pels minerals argilosos via el seu grup fosfonat.

L'estudi dels processos d'adsorció/desorció entre anàlits i sòls es pot dur a terme en el laboratori mitjançant dos tipus d'estudis: estudis en equilibri o en *batch* o estudis en condicions dinàmiques o en columna. El primer tipus d'estudi permeten l'avaluació de l'adsorció del sòl en un gradient de concentracions dels anàlits, mentre que els estudis en columna permeten l'estudi del transport dels anàlits en condicions de flux.

- **ESTUDIS EN EQUILIBRI O EN BATCH: ISOTERMES D'ADSORCIÓ**

Una isoterma d'adsorció descriu la relació entre la concentració d'una espècie química en dissolució (adsorbat) i la quantitat adsorbida de la mateixa espècie per una fase sòlida (adsorbent) en condicions d'equilibri a pressió i temperatura constants [243].

És habitual avaluar els processos d'adsorció en sòls en condicions d'equilibri entre la dissolució i la fase adsorbent, que són les condicions en les quals la velocitat de la reacció directa

és igual a la de la reacció inversa. Les tècniques més emprades per a l'estudi dels equilibris d'adsorció o per descriure l'adsorció en sòls impliquen l'ús de les isoterms d'adsorció.

En aquest tipus d'estudi es posen en contacte separatament quantitats fixes de sòl amb un volum fix de dissolucions, que contenen diferent concentració de l'anàlit a estudiar. Aquesta barreja s'agita fins que s'assoleix l'estat d'equilibri, el qual s'ha de determinar prèviament, i es comprova la concentració de solut restant en dissolució. Tot seguit es pot representar gràficament la concentració d'anàlit que queda en dissolució respecte la quantitat d'anàlit adsorbit a la fase sòlida, que descriuran la isoterma d'adsorció per aquell anàlit.

Segons la forma que descriuen, les isoterms d'adsorció es poden classificar en quatre tipus (veure **Figura I.11** [243]):

- **Tipus L.** Es caracteritza per un pendent decreixent a mesura que la concentració augmenta, a causa de la saturació de l'adsorbent. Descriu una elevada afinitat entre l'adsorbat i l'adsorbent a concentracions baixes, la qual disminueix a concentracions majors. Generalment indica quimisorció, per exemple, interaccions sòl-fosfat.

- **Tipus S.** Inicialment el pendent augmenta amb la concentració d'adsorbat, però al final decreix fins a zero en el moment que els punts d'adsorció de l'adsorbent estan tots ocupats. Descriu interaccions entre molècules d'adsorbat en l'adsorbent, formant lligands, de manera que a baixes concentracions la superfície té poca afinitat per l'adsorbat, però augmenta a concentracions més grans, quan s'assoleix la saturació dels lligands formats.

- **Tipus C.** Indiquen un mecanisme de partició on els ions o molècules d'adsorbat es distribueixen entre la interfície i dissolució sense cap tipus d'interacció específica entre l'adsorbent i l'adsorbat. Sol produir-se entre adsorbats hidròfobs i adsorbents hidròfils, per exemple, plaguicides apolars i matèria orgànica.

- **Tipus H.** Descriu interaccions fortes entre l'adsorbat i l'adsorbent amb un mecanisme de quimisorció, es considera un cas extrem de les isoterms de tipus L. Seria l'exemple d'interaccions entre fosfat i òxids de ferro.

Els equilibris d'adsorció entre una fase sòlida i una fase líquida es poden descriure mitjançant diverses expressions matemàtiques, de diferent grau de complexitat.

L'aproximació més senzilla és la que suposa que la relació entre la concentració de solut en dissolució ($C_{dsó}$) i la quantitat de solut adsorbida en l'adsorbent (C_{ads}), ambdós a l'equilibri, és lineal, que s'anomena **isoterma lineal**:

$$C_{ads} = K_d \cdot C_{dsó} \quad ,$$

on la K_d es defineix com el coeficient d'adsorció o de distribució del plaguicida. En la representació gràfica de C_{ads} versus $C_{dsó}$, s'obté una recta amb pendent igual a K_d i ordenada a

l'origen igual a zero (isoterma de tipus C). Segons el tipus d'estudi, el valor de K_d es relaciona amb el valor de K_{oc} mitjançant el percentatge de carboni orgànic present a la mostra de sòl.

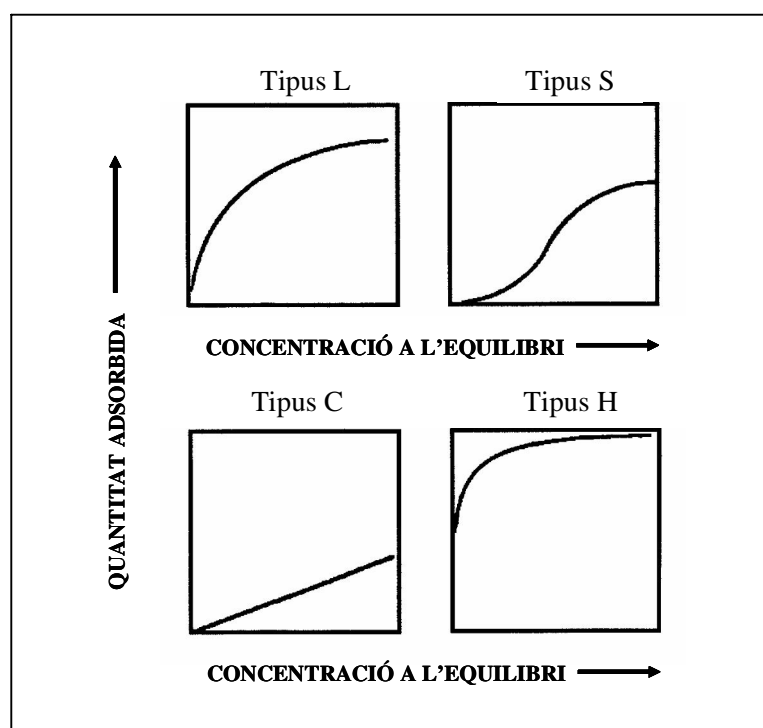


Figura I.11. Els quatre tipus d'isotermes d'adsorció.

A concentracions baixes de compostos poc polars, la isoterma lineal és la representació més precisa de les isotermes d'adsorció [244]. Aquest model de partició lineal s'explica per la distribució lineal de compostos hidròfobs entre la matèria orgànica adsorbida en partícules minerals inorgàniques i la dissolució. La linealitat s'obté a causa que no té lloc una interacció específica entre l'adsorbent (matèria orgànica) i l'adsorbat (contaminant), i per això no s'assoleix la saturació de l'adsorbent [243].

No obstant, per la majoria de compostos orgànics polars, no es pot assumir la linealitat de les isotermes d'adsorció. En aquests casos les aproximacions més utilitzades són les del model de Freundlich i les del model de Langmuir, a causa de la seva gran versatilitat pel que fa a sistemes adsorbent-adsorbat i per la facilitat per obtenir els paràmetres que caracteritzen l'adsorció en aquests models.

El **model de Langmuir** fou desenvolupat al 1918 per Langmuir per descriure l'adsorció de vapor en una superfície homogènia. Per a la seva aplicació com a model d'adsorció d'espècies químiques en sistemes sòl-dissolució requereix tres assumpcions importants [245]: l'energia d'adsorció és la mateixa per totes les posicions d'enllaç i és independent del grau de saturació de la superfície, l'adsorció de molècules té lloc en posicions fixes sense interacció entre elles i

l'adsorció té lloc en una sola capa (monocapa). L'expressió matemàtica que descriu aquest model és:

$$C_{\text{ads}} = \frac{K_L Q_{\text{màx}} C_{\text{dsó}}}{1 + K_L C_{\text{dsó}}},$$

on C_{ads} és la quantitat de solut adsorbida en l'adsorbent en condicions d'equilibri, $C_{\text{dsó}}$ és la concentració de solut que resta en dissolució a l'equilibri, $Q_{\text{màx}}$ representa la màxima capacitat d'adsorció de l'adsorbent i K_L representa una constant d'afinitat entre l'adsorbent i l'adsorbat. A partir d'aquesta expressió matemàtica es poden calcular els paràmetres de $Q_{\text{màx}}$ i K_L .

En el cas de $C_{\text{dsó}}$ molt inferiors a 1, l'expressió queda reduïda a: $C_{\text{ads}} = K_L Q_{\text{màx}} C_{\text{dsó}}$, de manera que la representació gràfica correspondrà a una recta amb pendent $K_L Q_{\text{màx}}$ i ordenada a l'origen 0. Mentre que $C_{\text{dsó}}$ molt elevades, en condicions de saturació del sòl, la C_{ads} tendirà a $Q_{\text{màx}}$. La representació gràfica de les isoterms de Langmuir presenten un comportament de tipus L, tal com es mostra a la **Figura I.12**.

Aquest tipus d'isoterms, que tendeixen a $Q_{\text{màx}}$ a elevades $C_{\text{dsó}}$, són típiques de compostos iònics i molt polars, on l'adsorció implica mecanismes específics de quimisorció [246]. A mesura que la concentració de solut augmenta, la capacitat limitada de la superfície d'adsorbent dona lloc a una disminució de la capacitat d'adsorció.

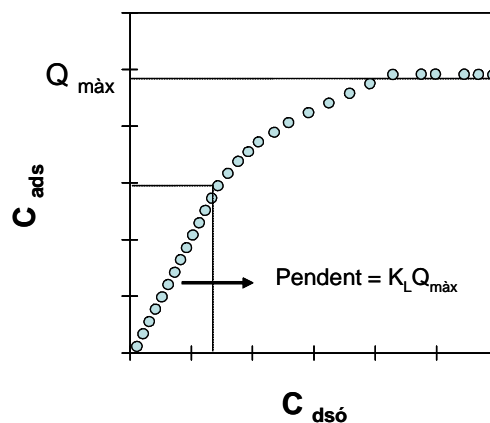


Figura I.12. Exemple de isoterma de Langmuir

El **model de Freundlich** és l'aproximació més utilitzada per representar casos de no linealitat. En aquest cas l'expressió matemàtica que descriu aquest tipus d'isoterms és:

$$C_{\text{ads}} = K_F \cdot C_{\text{dsó}}^{1/n},$$

on C_{ads} és la quantitat de solut adsorbida en l'adsorbent en condicions d'equilibri, $C_{dsó}$ és la concentració de solut que resta en dissolució a l'equilibri, K_F representa el coeficient d'adsorció de Freundlich i n és una constant empírica de linealització.

La representació gràfica de C_{ads} versus $C_{dsó}$ dóna una gràfica curvilínia, la qual es pot linealitzar traient logaritmes:

$$\log C_{ads} = \log K_F + 1/n \log C_{dsó}$$

En aquest cas, el pendent de la recta correspon a $1/n$ i l'ordenada a l'origen dóna la K_F . Els valors de $1/n$ generalment varien entre 0,7 i 1,0. En el cas que $1/n = 1$, l'expressió de Freundlich dóna lloc a una isoterma lineal (de tipus C), on K_F és igual a K_d , que correspon a la pendent de la recta. Per valors de $1/n$ inferiors a 1 indiquen que és difícil per l'adsorbent adsorbir més molècules quan es troba concentracions elevades d'adsorbat. Això pot tenir lloc ja que les posicions d'enllaç més específiques ja estan ocupades o quan aquestes no són atractives per les molècules d'adsorbat. Només es troben valors de $1/n$ superiors a 1 per compostos de superfície activa, com alquilbenzè sulfonats, en els quals les molècules adsorbides en primer lloc modifiquen de la superfície del sòlid, afavorint una posterior adsorció [247].

L'expressió del model de Freundlich no té cap interpretació mecànica molecular, simplement representa una aproximació empírica per predir la distribució de l'adsorbat entre la fase aquosa i la fase adsorbent. Aquest model es pot utilitzar, per exemple, per predir la filtració dels herbicides en el sòl. Generalment per sòls amb $1/n$ similars, com més gran és la K_F , l'herbicida presenta menys potencial per filtrar-se.

Existeixen altres models més complicats que consideren l'adsorció en doble o triple capa, els quals ajusten més paràmetres que els models vistos fins ara, però que requereixen la resolució d'algoritmes d'elevada complexitat, que en limita sovint la seva aplicació. Aquests models no es tractaran en aquest treball.

De la mateixa manera que es poden determinar les isoterms d'adsorció, les isoterms de desorció ens donen informació de la quantitat de plaguicida desorbit en un determinat procés. Els processos de desorció generalment són més complicats que els d'adsorció. Sovint no tot l'adsorbat és desorbit, o el que és el mateix, l'adsorció i la desorció són reaccions irreversibles. Aquesta aparent irreversibilitat s'anomena **histèresis** [229]. En aquests casos, les isoterms d'adsorció i desorció corresponents a la reacció directa i inversa no coincideixen. Aquesta histèresis és bastant comuna en les interaccions sòl-plaguicida. Les raons d'aquest comportament poden ser diverses, per exemple, alguns aspectes relacionats amb les condicions experimentals, com la no consecució de l'equilibri d'adsorció i/o transformacions químiques i microbiològiques que tenen lloc durant l'experiment [248].

- **ESTUDIS EN CONDICIONS DINÀMIQUES: EXPERIMENTS EN COLUMNES**

Els estudis en discontinu proporcionen informació útil pel que fa a l'adsorció de contaminants en sòls, però presenten diverses limitacions. Els estudis en continu permeten millorar aquests aspectes, a més de reproduir de forma més real el transport de soluts en les condicions de camp.

Els estudis en continu se solen realitzar utilitzant columnes de sòls, les quals es consideren sistemes oberts basats en principis cromatogràfics. En aquesta tècnica el solut es posa en contacte amb el sòl en continu o en un pols de temps concret i es fa circular contínuament una dissolució a través seu, de manera que es poden superar algunes de les limitacions dels estudis en equilibri com:

- les elevades relacions sòl:dissolució dels experiments en discontinu, poc representatives;
- l'acumulació de productes i espècies dessorbides en un sistema tancat que pot donar lloc a reaccions secundàries;
- la metodologia d'agitació pot produir un augment de l'àrea superficial de l'adsorbent, o evitar la formació de suspensions no uniformes o no suficientment per evitar transferència de soluts per processos de difusió;
- la presa de mostra i la separació de fases depenen freqüentment de l'analista.

En els experiments en columna, prèviament a l'aplicació de l'herbicida, s'introdueix un traçador per verificar que les condicions de la columna de sòl són les adequades per realitzar un assaig d'aquest tipus. Els traçadors són compostos no reactius que permeten comprovar l'homogeneització del sòl empaquetat i la no existència de camins preferencials en la columna. A partir de paràmetres físico-químics del sòl, el traçador també permet calcular quin és el volum de porus del sòl empaquetat.

Les tècniques en continu [249], basades en els principis de transferència de matèria en medis porosos, permeten dur a terme estudis controlats que proporcionen informació sobre els mecanismes de transport i reactivitat. Els assaigs de laboratori es poden orientar a la reproducció d'un procés real en condicions més controlades, comprovant simultàniament l'efecte global dels diferents factors que tenen incidència directa. Això inclou l'ús de columnes de sòl inalterat, amb macroporus, en règim no estacionari i subsaturat, i de diferents mides. No obstant, a causa de la multitud de processos que intervenen tant en el transport com en la reactivitat d'aquestes substàncies (propietats físiques, químiques i biològiques del sòl, variabilitat espacial i temporal, etc.), resulta de vital importància el coneixement dels diferents aspectes del procés global en el camp. L'objectiu final dels estudis de laboratori és la recopilació de la informació necessària per a

la predicció del comportament de cada substància en un escenari real determinat. Per tant, no s'intenta reproduir una situació real en condicions més controlades, sinó variar un conjunt de factors per avaluar la influència de cadascun d'ells en el moviment i persistència dels compostos en el sòl.

Aquest tipus d'estudi haurien d'anar acompanyats sempre que fos possible de models matemàtics que defineixin el comportament i permetin predir la seva evolució amb el temps. La investigació destinada a trobar estratègies per augmentar la producció agrària i disminuir la degradació del medi utilitzant models matemàtics són molt més ràpids i menys costosos que la investigació experimental per sí sola. L'ús de models, més que una alternativa, és una eina per ajudar a prendre decisions en la investigació i explotació agrària. Els models de comportament parteixen d'un plantejament general que engloba els diferents mecanismes de transport, incloent també, els processos d'adsorció i reactivitat específics per cada tipus de contaminant i sòl.

Així doncs, a l'hora de caracteritzar els mecanismes de transport és necessari, per una part, un dispositiu experimental adequat pel seguiment dels compostos d'interès i que permeti un control suficient de les condicions de treball, i per altra banda, un model de transport d'anàlits la resolució del qual estigui acoblada a un mètode d'ajust dels seus paràmetres, que permeti la investigació dels mecanismes de transport i la interpretació de resultats experimentals.

• ESTUDIS DE CAMP

Una vegada realitzats estudis en equilibri i estudis en condicions dinàmiques al laboratori, només queda estudiar el comportament dels plaguicides en sòls *in-situ*, o sigui, en el camp.

En aquests estudis seran molt importants els aspectes relacionats amb la preparació de la mostra, des que és presa al camp fins a la determinació química. Només a partir de resultats fiables es podran fer especulacions sobre el comportament de l'herbicida en el medi estudiat.

A banda dels aspectes analítics, abans de realitzar un estudi de camp cal conèixer quins són els principals factors que determinen el transport i distribució de l'anàlit en el medi:

- característiques del sòl: textura i estructura, densitat i porositat, contingut en aigua, pH, potencial redox, contingut argilós, contingut en matèria orgànica, capacitat de bescanvi catiònic i contingut d'òxids;

- factors climàtics a la zona: temperatura, pluja, vent;

- topografia i geomorfologia de la zona;

- vegetació de la zona;

- característiques de l'anàlit objecte d'estudi: solubilitat, coeficients d'adsorció, temps de vida mitja, degradació, volatilitat,...

Aquest tipus d'estudi permet veure l'evolució d'un plaguicida després de la seva aplicació controlada en un sòl de característiques conegudes, tant en el temps com en profunditat. A partir de representacions gràfiques de la concentració de plaguicida versus temps, profunditat del sòl o característiques d'aquest, es poden extreure múltiples conclusions sobre el comportament de l'anàlit i el risc que suposa el seu alliberament al medi.

Pel cas de l'herbicida glifosat es troben nombrosos estudis de camp realitzats en sòls de diversa naturalesa i sota diverses condicions [63,64,250-254]. La major part de les observacions dels estudis al laboratori concorden amb els resultats de camp. Per exemple, s'observa que el glifosat és fortament adsorbit en sòls, sobretot en els horitzons més superficials, que corresponen als horitzons de major contingut en matèria orgànica i CEC.

Un dels estudis més complets és el realitzat per Huang et al., el qual consta d'una primera fase al laboratori, on es realitzen estudis en discontinu [55], i d'una segona fase que es du a terme al camp emprant les dades obtingudes en l'estudi previ [63]. En l'estudi de camp, centrat en sòls de carretera, es posa especial èmfasi en les condicions climàtiques (èpoques plujoses) durant el temps de mostreig. En aquest treball es destaca la poca mobilitat del glifosat en el sòl, tot i que es detecta una elevada concentració d'AMPA a profunditats majors. En aquest estudi també es descriu un model de primer ordre que permet explicar el comportament del glifosat tant en els diversos horitzons del sòl com en les aigües superficials per escorrentia, així com la seva degradació a AMPA.

Guarracimo et al. [253] realitzen una aplicació controlada de glifosat, els resultats de la qual són emprats per deduir un model numèric que modelitza el transport en la zona no saturada del sòl. En aquest model se suposa que els processos d'adsorció són lineals i que la degradació de glifosat a AMPA és de primer ordre. De l'aplicació del model als assajos de camp es conclou que el glifosat és fortament adsorbit ens els primers centímetres del sòl i que la seva degradació té lloc principalment en aquesta zona, de manera que la contaminació dels aqüífers es preveu poc probable.

En l'estudi dut a terme per Veiga et al. [254], els resultats difereixen de la resta de treballs. En aquest cas s'observa una gran mobilitat del glifosat i l'AMPA a través dels horitzons del sòl, trobant concentracions elevades d'ambdós compostos en horitzons profunds, on la degradació té lloc més lentament. L'explicació que donen és l'elevada porositat i la moderada permeabilitat del sòl tractat, així com la gran quantitat de pluja caiguda durant el període estudiat.

OBJECTIUS DEL TREBALL

Com ja s'ha comentat anteriorment, l'ampli ús dels herbicides que contenen glifosat com a principi actiu fa necessari un millor coneixement del comportament d'aquest compost en el medi ambient, així com del seu principal metabòlit, l'AMPA i la resta de substàncies addicionades en les formulacions comercials. Aquest coneixement ha d'incloure la presència i la distribució de cadascun dels compostos en les diverses matrius ambientals per tal de poder-hi predir les seves conseqüències a mig i llarg termini.

En aquest context, els estudis que constitueixen la present tesi doctoral s'han adreçat als objectius següents:

1. Disseny d'un sistema d'extracció en fase sòlida mitjançant adsorbents de bescanvi iònic per a l'extracció i preconcentració de glifosat i AMPA en mostres d'aigües naturals.
2. Aplicació del sistema de preconcentració desenvolupat emprant diferents tècniques per a la determinació dels anàlits: cromatografia líquida amb detecció fluorescent i UV-vis i electroforesi capil·lar amb detecció indirecta UV-vis.
3. Desenvolupament d'un mètode de caracterització i quantificació d'alquilamina etoxilats (ANEOs) derivats del *tallow*, presents habitualment en les formulacions comercials de glifosat. Aplicació a la caracterització de diverses formulacions comercials.
4. Estudi de les característiques d'adsorció i desorció de glifosat en sòls al laboratori: assaigs en condicions d'equilibri i en condicions dinàmiques emprant columnes de sòl. Estudi de l'efecte dels adjuvants en les propietats d'adsorció del component actiu en les formulacions comercials.
5. Desenvolupament d'un procediment analític per a la determinació de glifosat i AMPA en sòls. Aplicació a l'estudi de camp de la mobilitat (adsorció i degradació) del glifosat en una aplicació controlada de l'herbicida Atila en un camp de pollanques de Begur (Girona, Espanya).

BIBLIOGRAFIA

- [1] C.Orozco, A.Pérez, N.González, F.Rodríguez, J.M.Alfayate. *Contaminación ambiental. Una visión desde la química.*, Ed. Thomson Spain, 2003. ISBN: 84-9732-178-2
- [2] I.Morell, L.Candela. PLAGUICIDAS. *Aspectos ambientales, analíticos y toxicológicos.* Col·lecció Summa. Universitat Jaume I, 1998. ISBN: 84-8021-240-3
- [3] *Pollution. Causes, Effects and Control.* 3rd Edition. The Royal Society of Chemistry, 1996. ISBN: 0-85404-534-1
- [4] T.P. Knepper, D.Barceló, P.de Voogt. *Analysis and fate of surfactants in the aquatic environment.* Wilson & Wilson, Comprehensive Analytical Chemistry, Volum XL, Amsterdam, Elsevier, 2003. ISBN: 0-444-50935-6
- [5] C.Alistar, M.Kogan. *El uso de los surfactantes como medio para aumentar la eficacia de los herbicidas,* Agronomía y Forestal UC-9, 2003.
- [6] D.Barceló, M.C.Hennion. *Techniques and instrumentation in analytical chemistry,* Elsevier 19 (1997) 8
- [7] P.J.Mulqueen. *Surfactants for agrochemical formulations,* Industrial Applications of Surfactants, vol. II. The Royal Society of Chemistry, 1990
- [8] G.F.White, *Pesticide Science,* 37 (1993) 159-166
- [9] *Agricultural book ii, Herbicides.* Chemicals, Thomson Publications, California (1997).
- [10] *Pesticides Industry Sales and Usage, 2000 and 2001 Market ESTimates.* Office of Prevention, Pesticides, and Toxic Substances, U.S. Environmental Protection Agency, May 2004
- [11] D.Barceló, *J. Chromatogr. A,* 643 (1993) 117
- [12] K.A.Krogh, B.Halling-Sorensen, B.B.Mogensen, K.V.Vejrup, *Chemosphere,* 50 (2003) 871
- [13] C.Alistar, M.Kogan. *El uso de los surfactantes como medio para aumentar la eficacia de los herbicidas,* Agronomía y Forestal UC-9, 2003.
- [14] R.C.Kirkwood, R.Hetherrington, T.L.Reynolds, G.Marshall, *Pest. Manag. Sci.,* 56 (2000) 359
- [15] C.Leeper, P.J.Hollowas, *Pest. Management Sci.,* 56 (2000) 313
- [16] Z.Liu, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces,* 35 (2004) 149
- [17] P.E.Laerke, J.C.Streibig, *Pest. Sci.,* 44 (1995)107
- [18] I. Marqués, V.Salvadó, M.Hidalgo. Pòster presentat al *XII Italian-Spanish Congress on thermodynamics of metal complexes* en l'ISMEC 2001 (Parma)
- [19] Glyphosate, Fact Sheet. Pesticides News, issue n°33, September 1996, p-28-29.
- [20] A.G.Hornsby, R.D. Wauchope, A.E.Herner. *Pesticide Properties In The Environment,* Springer-Verlag New York, Inc. 1996. ISBN: 0-387-394353-6
- [21] M.A.Kamrin. *Pesticide Profiles: Toxicity, Environmental Impact, and Fate,* Lewis Publishers, USA, 1997. ISBN: 0-56670-190-2
- [22] R.H.Schreuder, A.Martijn, H.Poppe, J.C.Kraak, *J. Chromatogr.,* 368 (1986) 339
- [23] *Surfactants in Analytical Chemistry. Applications of organized amphiphilic media.* Edited by S.G.Weber, Wilson & Wilson, Comprehensive Analytical Chemistry, Volum XXXI, Amsterdam, Elsevier, 1996. ISBN: 0-444-89033-5
- [24] Product Datasheet for Berol 907
- [25] K.A.Krogh, C.Schilder, K.V.Vejrup, Determination of the CMC and pKa values of three ANEOs, unpublished work, 2001

- [26] R.E.D. Facts. *Glyphosate. Prevention, Pesticides and Toxic Substances*, EPA-738-F-93-011 (Septembre 1993)
- [27] WHO/FAO Data Sheets on Pesticides, N°91, Glyphosate. Juliol 1996
- [28] G.M.Williams, R.Kroes, I.C.Munro, *Reg. Toxicol. Pharm.*, 31 (2000) 117
- [29] *Annual Review Of Plant Physiology And Plant Molecular Biology* 1999, Vol. 50, pp 473-503
- [30] Directiva 98/83/CE del Consejo de 3 de noviembre de 1998, *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*, L 330/32 ES, 5.12.98
- [31] *Estableciendo estándares para agua potable segura*, EPA 815-F-00-008, Maig 2004
- [32] WHO Environmental Health Criteria 159: *Glypohsate* (1994)
- [33] C.G.Van Ginkel, C.A.Stroo, A.G.Kroon, *Sci. Total Environ.*, 1 (1993a) 689
- [34] M.D.Hoey, J.F.Gadberry. Polyoxyethylene alkylamines. N.M. Van Os, Ed. *Nonionic Surfactants: Organic Chemistry*. Marcel Dekker, New York, 1998, 163
- [35] M.A.Lewis, R.L.Lewis, *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Proceedings of the Fourth Annual Symposium on Aquatic Toxicology*. American Society for Testing and Materials, (1981) 402
- [36] Martin T.K.Tsui, L.M.Chu, *Chemosphere*, 52 (2003) 1189
- [37] Martin T.K.Tsui, L.M.Chu, *Archives Environmental Contamination and Toxicology* (Arch.Environ.Contam.Toxicol.), 46 (2004) 316
- [38] K.A.Krogh, K.V.Vejrup, B.B.Mogensen, B.Halling-Sorensen. *J. Chromatogr A*, 957 (2002) 45
- [39] M.Castillo, E.Martínez, A.Ginebreda, L.Tirapu, D.Barceló, *Analyst*, 200 (2000) 1733
- [40] M.Petrovic, D.Barceló, *Anal. Chem.*, 72 (2000) 4560
- [41] Regulation (EC) No 648/2004 of the European Parliament and of the Council of 31 March 2004 on detergents
- [42] C.Cámara, P.Fernández, A.Martin-Esteban, C.Pérez-Conde, M.Vidal. *Toma y tratamiento de muestras*, Ed. Síntesis, Biblioteca de Químicas, Madrid, 2002. ISBN: 84-7738-962-4
- [43] P.Alferness, Y.Iwata, *J. Agric. Food Chem.*, 41 (1992) 2751
- [44] E.Mallat, D.Barceló, *J. Chromatogr. A*, 823 (1998) 129
- [45] C.D.Stalikas, C.N.Konidari, *J. Chromatogr. A*, 907 (2001) 1
- [46] C.J.Miles, H.A.Moye, *J. Agric. Food Chem.*, 36 (3) (1988) 486
- [47] J.V.Sancho, C.Hidalgo, F.Hernández, F.J.López, E.A.Hogendoorn, E.Dijkman, *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, 62 (1996) 53
- [48] L.N.Lundgren, *J. Agric. Food Chem.*, 34 (1986) 535
- [49] D-M.Zhou, Y-J.Wang, L.Cang, X-Z.Hao, X-S.Luo, *Chemosphere*, 57 (2004) 1237
- [50] R.G.Gerritse, J.Beltran, F.Hernández, *Aust. J. Soil Res.*, 34 (1996) 599
- [51] A.J.Aubin, A.E.Smith, *J. Agric. Food Chem.*, 40 (1992) 1163
- [52] L.N.Lundgren, *J. Agric. Food Chem.*, 34 (1986) 535
- [53] R.Strange-Hansen, P.E.Holm, O.S.Jacobsen, C.S.Jacobsen, *Pest. Manag. Sci.*, 60 (2004) 570
- [54] M.Kogan, A.Metz, R.Ortega, *Pesq. Agropec. Bras.*, 38 (4) (2003) 513
- [55] X.Huang, T.Pedersen, M.Fisher, R.White, T.M.Young, *Environ. Sci. Technol.*, 38 (2004) 3272
- [56] R.G.Gerritse, J.Beltran, F.Hernández, *Aust. J. Soil Res.*, 34 (1996) 599
- [57] A.J.Aubin, A.E.Smith, *J. Agric. Food Chem.*, 40 (1992) 1163
- [58] D.Barceló, M.D.Hennion, *Anal. Chim. Acta*, 338 (1997) 3

- [59] C.J.Miles, L.R.Wallace, H.A.Moye, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 69 (1986) 458
- [60] M.Tomita, T.Okuyama, S.Watanabe, B.Uno, S.Kawai, *J. Chromatogr.*, 566 (1991) 239
- [61] E.A.Lee, L.R.Zimmerman, B.S.Bhullar, E.M.Thurman, *Anal. Chem.*, 74 (2002) 4937
- [62] C.Hidalgo, C.Rios, M.Hidalgo, V.Salvadó, J.V.Sancho, F.Hernández, *J. Chromatogr. A*, 1035 (2004) 153
- [63] X.Huang, T.Pedersen, M.Fisher, R.White, T.M.Young, *Environ. Sci. Technol.*, 38 (2004) 3263
- [64] J.J.Miller, B.D.Hill, C.Chang, C.W.Lindwall, *Can. J. Soil Sci.*, 75 (1995) 349
- [65] M.Valcárcel, A.Gómez. *Técnicas analíticas de separación*, Editorial Reverté, S.A., 1994
- [66] J.L.Tadeo, C.Sánchez-Brunete, R.A.Pérez, M.D.Fernández, *J. Chromatogr. A*, 882 (2000) 175
- [67] E.Matthijs, E.C.Hennes, *Tenside Surf. Det.*, 28 (1991) 22
- [68] S.L.Boyer, K.F.Guin, R.M.Kelley, L.M.Mausner, H.F.Robinson, T.M.Schmitt, C.R.Stahi, E.A.Setkorn, *Environ. Sci. Technol.*, 10 (1976) 1167
- [69] A.T.Kiewiet, J.M.D.Van der Oteen, J.R.Parsons, *Anal. Chem.*, 67 (1995) 4409
- [70] B.E.Andrew, *Analyst*, 118 (1993) 153
- [71] R.A.Menges, T.S.Menges, G.L.Bertrand, D.W.Armstrong, L.A.Spino, *J. Liq. Chromatogr.*, 15 (1992) 2909
- [72] H.F.Schröder, *J. Chromatogr. A*, 647 (1993) 219
- [73] J.Morberg, E.Thordarson, L.Mathiasson, J.A.Jönsson, *J. Chromatogr. A*, 869 (2000) 523
- [74] Y.Shen, J.A.Jönsson, L.Mathiasson, *Anal. Chem.*, 70 (1998) 946
- [75] R.D.Noble, J.D.Way, *Liquid Membranes. Theory and Applications*, ACS Symposium Series 347, Washington, DC (1987)
- [76] P.Dzygiel, P.Wieczorek, *J. Chromatogr. A*, 889 (2000) 93
- [77] C.Rios, V.Salvadó, M.Hidalgo, *J. Membrane Sci.*, 203 (2002) 201
- [78] J.Chen, J.Pawliszyn, *Anal. Chem.*, 67 (1995) 2530
- [79] A.A.Boyd-Boland, J.B.Pawliszyn, *Anal. Chem.*, 68 (1996) 1521
- [80] R.Aranda, R.C.Burk, *J. Chromatogr.*, 829 (1998) 401
- [81] K.K.Chee, M.K.Wong, H.K.Lee, *J. Microcol. Sep.*, 8 (1996) 131
- [82] E.M.Thurman, M.S.Mills. *Solid-phase extraction. Principles and practice*, Wiley-Interscience, 1998
- [83] J.S.Fritz. *Analytical solid-phase extraction*, Ed. Willey-VCH, 1999
- [84] K.Dorfner. *Ion exchangers*. Walter de Gruyter Berlin. New York 1991
- [85] A.Royer, S.Beguín, J.C.Tabet, S.Hulot, M.A.Reding, P.Y.Communal, *Anal. Chem.*, 72 (2000) 3826
- [86] Y.Y.Wigfield, M.Lanouette, *J. AOAC Int.*, 74 (5) (1991) 842
- [87] M.J.Lovdahl, D.J.Pietrzyk, *J. Chromatogr. A*, 602 (1992) 197
- [88] S.K.Konar, D.N.Roy, *Anal. Chim. Acta*, 229 (1990) 277
- [89] P.L.Alferness, Y.Iwata, *J. Agric. Food Chem.*, 42 (1994) 2759
- [90] J.V.Sancho, F.Hernández, F.J.López, E.A.Hogendoorn, E.Dijkman, P. van Zoonen, *J. Chromatogr. A*, 737 (1996) 75
- [91] J.V.Sancho, C.Hidalgo, F.Hernández, F.J.López, E.A.Hogendoorn, E.Dijkman, *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 62 (1996) 53

- [92] E.A.Hogendorn, E.M.Ossendrijver, E.Dijkman, R.A.Beumann, *J.Chromatogr. A*, 833 (1999) 67
- [93] F.Hernández, C.Hidalgo, J.V.Sancho, *J. AOAC Int.*, 83 (3) (2000) 728
- [94] C.Hidalgo, C.Rios, M.Hidalgo, V.Salvadó, J.V.Sancho, F.Hernández, *J.Chromatogr. A*, 1035 (2004) 153
- [95] Thomas M. Schmitt, Marcel Dekker. *Analysis of surfactants*, 2nd Ed, New York, 2001, ISBN: 0824704495
- [96] N.J.Fendinger, W.M.Begley, D.C.McAvoy, W.S.Echoff, *Environ. Sci. Technol.*, 29 (1995) 856
- [97] M.Petrovic, S.Lacorte, P.Viana, D.Barceló, *J. Chromatogr. A*, 959 (2002) 15
- [98] M.Petrovic, D.Barceló, *Anal. Chem.*, 72 (2000) 4560
- [99] A.Marcomini, W.Giger, *Anal. Chem.*, 59 (1987) 1709
- [100] A.Marcomini, A.D.Corcia, R.Samperi, S.Capri, *J. Chromatogr.*, 644 (1993) 59
- [101] N.Jonkers, R.W.P.M.Laane, P. De Voogt, *Environ. Sci. Technol.*, 37 (2003) 321
- [102] N.Jonkers, T.P.Knepper, P.De Voogt, *Environ. Sci. Technol.*, 35 (2001) 335
- [103] P.De Voogt, K.De Beer, F.Van der Wielen, *Tr. Anal. Chem.*, 16 (1997) 584
- [104] K.A.Evans, S.T.Dubey, L.Kravetz, J.Gumulka, R.Mueller, J.R.Stork, *Anal. Chem.*, 66 (1994) 699
- [105] E.M.Thurman, T.Willoughby, L.B.Barber, K.A.Thron, *Anal. Chem.*, 59 (1987) 1798
- [106] F.Ventura, D.Fraisse, J.Caixach, J.Rivera, *Anal. Chem.*, 63 (1991) 2095
- [107] K.Maruyama, M.Yuan, A.Otsuki, *Environ. Sci. Technol.*, 34 (2000) 343
- [108] M.Castillo, E.Martínez, A.Ginebreda, L.Tirapu, D.Barceló, *Analyst*, 125 (2000) 1733
- [109] M.Castillo, M.C.Alonso, J.Riu, M.Reinke, G.Klöter, H.Dizer, B.Fischer, P.D.Hansen, D.Barceló, *Anal. Chim. Acta*, 426 (2001) 265
- [110] M.Farré, M.J.García, L.Tirapu, A.Ginebreda, D.Barceló, *Anal. Chim. Acta*, 427 (2001) 181
- [111] A.DiCorcia, R.Samperi, A.Marcomini, *Environ. Sci. Technol.*, 28 (1994) 850
- [112] C.Crescenzi, A.Di Corcia, R.Samperi, A.Marcomini, *Anal. Chem.*, 67 (1995) 1797
- [113] H.Fr.Schroeder. *Techniques and instrumentation in analytical chemistry; sample handling and trace analysis of pollutants- Techniques, applications and quality assurance*, In: D.Barceló (Ed.), Elsevier, Amsterdam, Volume XXI, 2000, p. 828. ISBN: 0-444828311
- [114] C.Crescenzi, A.Di Corcia, G.Passariello, M.Samperi, M.I.T.Carou, *J. Chromatogr. A*, 733 (1996) 41
- [115] S.Valsecchi, S.Polesello, S.Cavalli, *J. Chromatogr. A*, 925 (2001) 297
- [116] A.T.Kiewet, J.M.D.van der Oteen, J.R.Parsons, *Anal. Chem.*, 67 (1995) 4409
- [117] D.Y.Shang, M.G.Ikonomou, R.W.Macdonald, *J Chromatogr A*, 849 (1999) 467
- [118] K.P.Spann, P.A.Hargreaves, *Pest. Sci.*, 40 (1994) 41
- [119] D.G.Thompson, J.E.Cowell, R.J.Daniels, B.Staznik, L.M.McDonald, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 72 (1989) 355
- [120] R.L.Glass, *J. Agric. Food Chem.*, 31 (1983) 280
- [121] A.J.Subin, A.E.Smith, *J. Agric. Food Chem.*, 40 (1992) 1163
- [122] M.C.Sampedro, N.Unceta, Z.Gómez de Balugera, M.A.Goicolea, R.J.Barrio, *póster "ExTech 2001 Symposium"* (Barcelona)
- [123] S.Heise, N.Litz, *Tenside Surfact. Det.*, 36 (1999) 185
- [124] V.Camel, *Analyst*, 126 (2001) 1182

- [125] Y.Zhu, K.Yanagihara, F.Guo, Q.X.Li, *J. Agric. Food Chem.*, 48 (2000) 4097
- [126] K.Krogh, B.B.Mogensen, B.Halling-Sorensen, A.Cortés, K.V.Vejrup, D.Barceló, *Anal. Bioanal. Chem.*, 376 (2003) 1089
- [127] P.L.Alferness, L.A.Wiebe, *J.AOAC Int.*, 84 (3) (2001) 823
- [128] H.Kataoka, S.Ryu, N.Sakiyama, M.Makita, *J. Chromatogr. A*, 726 (1996) 253
- [129] A.Rayer, S.Beguín, J.C.Tabet, S.S.Hulot, M.A.Reding, P.Y.Communal, *Anal. Chem.*, 72 (2000) 3826
- [130] C.D.Stalikas, G.A.Pilidis, M.I. Karayannis, *Chromatographia*, 51 (2000) 741
- [131] C.D.Stalikas, G.A.Pilidis, *J. Chromatogr. A*, 872 (2000) 215
- [132] E.Boerjesson, L.Torstensson, *J. Chromatogr. A*, 886 (2000) 207
- [133] S.H.Tseng, Y.W.Lo, P.C.Chang, S.S.Chou, H.M.Chang, *J. Agric. Food Chem.*, 52 (13) (2004) 4057
- [134] EPA, Method 547. EPA-500 Series, Supplement 1, July 1990
- [135] J.V.Sancho, F.J.López, F.Hernández, E.A.Hogendoorn, P.Van Zoonen, *J. Chromatogr. A*, 678 (1994) 59
- [136] D.A. Skoog, J.J.Leary, ANÁLISIS INSTRUMENTAL. 4a Edición, *McGrawHill* (1994) 202
- [137] B.B.M.Sadi, A.P.Vonderheide, J.A.Caruso, *J. Chromatogr. A*, 1050 (2004) 95
- [138] S.Kawai, B.Uno, M.Tomita, *J. Chromatogr.*, 540 (1991) 411
- [139] G.Forlania, A.Mangiagallia, E.Nielsen, C.M.Suardib, *Soil Biol. Biochem.*, 31 (1999) 991
- [140] L.Grey, B.Nguyen, P.Yang, *J. AOAC Int.*, 84 (6) (2001) 1770
- [141] R.J.Vreeken, P.Speksnijder, I.Bobeldijk-Pastorova, Th.H.M.Noij, *J. Chromatogr. A*, 794 (1998) 187
- [142] M.Ibáñez, O.J.Pozo, J.V.Sancho, F.J.López, F.Hernández, *J. Chromatogr. A*, 1081 (2005) 145
- [143] M.Ibáñez, O.J.Pozo, J.V.Sancho, F.J.López, F.Hernández, *J. Chromatogr. A*, 1134 (2006) 51
- [144] M.P.Abdullah, J.Daud, K.S.Hong, C.H.Yew, *J. Chromatogr. A*, 697 (1995) 363
- [145] M.Valcárcel, A.Gómez. *Técnicas analíticas de separación*, Editorial Reverté, S.A., 1994
- [146] Y.Zhu, F.Zhang, C.Tong, W.Liu, *J. Chromatogr. A*, 850 (1999) 297
- [147] K.H.Bauer, T.P.Knepper, A.Maes, V.Schatz, M.Voisel, *J. Chromatogr. A*, 850 (1999) 117
- [148] K.Sato, J.Y.Jin, T.Takeuchi, T.Miwa, K.Suenami, Y.Takekoshi, S.Kanno, *J. Chromatogr. A*, 919 (2) (2001) 313
- [149] K.Granby, S.Johannesen, M.Vahl, *Food Additives and Contaminants*, 20 (8) (2003) 692
- [150] S.A.Shamsi, N.D. Danielson, *Anal. Chem.*, 67 (1995) 1845
- [151] M.G.Cikalo, D.M.Goodall, W.Matthews, *J. Chromatogr. A*, 745 (1996) 189
- [152] M.Corbera, M.Hidalgo, V.Salvadó, P.P.Wieczorek, *Anal. Chim. Acta*, 540 (1) (2005) 3
- [153] S.Y.Chang, CH. Liao, *J. Chromatogr. A*, 959 (2002) 309
- [154] L.Goodwin, M.Hanna, J.R.Startin, et al., *Analyst*, 127 (2) (2002) 204
- [155] J.You, M.Kaljurand, J.A.Koropchak, *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 83 (9) (2003) 797
- [156] L.Goodwin, J.R.Startin, B.J.Keely, et al., *J. Chromatogr. A*, 1004 (1-2) (2003) 107
- [157] H.Safarpour, R.Asiaie, *Electrophoresis*, 26 (2005) 1562
- [158] M.Molina, M.Silva, *Electrophoresis*, 23 (7-8) (2002) 1096

- [159] R.G.Wuilloud, M.Shah, S-S-Kannamkumarath, J.C.Altamirano, *Electrophoresis*, 26 (2005) 1598
- [160] Hammock,B.D., *Immunochemical Methods for Environmental Analysis*, Van Emon,J.M. Mumma,R.O., Eds. ACS Symposium Ser 442; American Chemical Society; (1990) 112
- [161] B.S.Clegg, G.R.Stephenson, J.C.Hall, *J. Agric. Food Chem.*, 47 (1999) 5031
- [162] F.Rubio, L.J.Veldhuis, B.S.Clegg, J.R.Fleeker, J.C.Hall, *J. Agric. Food Chem.*, 51 (2003) 691
- [163] M.A.González-Martínez, E.M.Brun, R.Puchades, A.Maquieira, K.Ramsey, F.Rubio, *Anal. Chem.*, 77 (2005) 4219
- [164] T.P.Knepper, D.Barceló, P.de Voogt. *Comprehensive analytical chemistry; analysis and fate of surfactants in the aquatic environment*, D.Barceló (Ed.), Wilson & Wilson's, Elsevier, Amsterdam, Volume XL (2003) ISBN: 0-444509356
- [165] A.T.Kiewet, P.de Vooght, *J. Chromatogr. A*, 733 (1996) 185
- [166] A.Marcomini, M.Zanette, *J. Chromatogr. A*, 733 (1996) 193
- [167] T.Cserhádi, E.Forgács, *J. Chromatogr. A*, 774 (1997) 265
- [168] J.H.Benedict, *Anal. Chem.*, 33 (1961) 1884
- [169] M.F.Puthoff, H.G.Nadeau, *Anal. Chem.*, 36 (1964) 1914
- [170] H.G.Nadeau, D.M.Oaks Jr., W.A.Nichols, L.P.Carr, *Anal. Chem.*, 36 (1964) 1914
- [171] W.Giger, E.Stephanou, C.Schaffner, *Chemosphere*, 10 (1981) 1253
- [172] W.H.Ding, S.H.Tzing, *J. Chromatogr. A*, 824 (1998) 79
- [173] F.W.Jones, *J. Chromatogr. Sci.*, 36 (1998) 223
- [174] A. Mathias and N. Mellor, *Anal. Chem.*, 38 (1966) 472
- [175] K.Komarek, J.Minar, S.Skvarenina, *J. Chromatogr. A*, 727 (8) (1996) 131 (buscar!!)
- [176] R.A.Rudel, S.J.Melly, P.W.Geno, G.Sun, J.G.Brody, *Environ. Sci. Technol.*, 32 (1998) 861
- [177] F.W.Jones, D.J.Westmoreland, *Environ. Sci. Technol.*, 32 (1998) 2623
- [178] J.Ejlertsson, M.L.Nilsson, H.Kylin, A.Bergman, L.Karlson, M.öquist, B.H.Svensson, *Environ. Sci. Technol.*, 33 (1999) 301
- [179] C.Wahlberg, L.Renberg, U.Wideqvist, *Chemosphere*, 20 (1990) 179
- [180] N.Chaloux, J.M.Bayona, J.Albaigés, *J. Chromatogr. A*, 686 (1994) 275
- [181] H. Briischweiler, H. Felber and F. Schwager, *Tenside Surf.Det.*, 28 (1991) 348
- [182] E.Stephanou, M.Reinhard, H.A.Ball, *Biomed. Environ. Mass Spectrom.*, 15 (1988) 275
- [183] H.B.Lee, T.E.Peart, *Anal. Chem.*, 67 (1995) 1976
- [184] K.A.Consani, R.D.Smith, *J. Supercrit. Fluids*, 3 (1990) 51
- [185] P.R.Geissler, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 66 (1989) 685
- [186] A.E.Johnson Jr., P.R.Geissler, L.D.Tally, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 67 (1990) 123
- [187] P.Sandra, F.David, *J. High Resolut. Chromatogr.*, 13 (1990) 414
- [188] A.H.Silver, H.T.Kalinoski, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 69 (1992) 599
- [189] M.Kane, J.R.Dean, S.M.Hitchen, C.J.Dowle, R.L.Tranter, *Anal. Proc.*, 30 (1993) 399
- [190] Z.Wang, M.Fingas, *J. Chromatogr. Sci.*, 31 (1993) 509
- [191] C.Brede, E.Lundanes, *J. Chromatogr. A*, 712 (1995) 95
- [192] A.Jablonska, M.Hansen, D.Ekberg, E.Lundanes, *J.Chromatogr.*, 647 (1993) 341
- [193] M.Takeuchi, T.Saito, *J. High Resolut. Chromatogr.*, 14 (1991) 347

- [194] L.N.Tyrefors, R.X.Moulder, K.E.Markides, *Anal. Chem.*, 65 (1993) 2835
- [195] H.T.Kalinoski, O.L. Hargiss, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 3 (1992) 150
- [196] K.Heining, C.Vogt, G.Werner, *Anal. Chem.*, 70 (1998) 185
- [197] R.A.Wallingford, *Anal. Chem.*, 68 (1996) 2541
- [198] J.Bullock, *J. Chromatogr. A*, 645 (1993) 169
- [199] K.Heinig, C.Vogt, G.Werner, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 357 (1997) 695
- [200] N.Márquez, R.E.Antón, A.Usabillaga, J.L.Salager, *J. Liq. Chromatogr.*, 17 (1994) 1147
- [201] Z.Liang, A.G.Marshall, D.G.Westmoreland, *Anal. Chem.*, 63 (1991) 815
- [202] I.Zeman, J.Silha, M.Bares, *Tenside Detergents*, 23 (1986) 181
- [203] S.D.Scullion, M.R.Clench, M.Cooke, A.E.Ashcroft, *J. Chromatogr. A*, 733 (1996) 207
- [204] A.Marcomini, S.Capri, W.Giger, *J. Chromatogr.*, 403 (1987) 243
- [205] T.Cserháti, *Anal. Lett.*, 27 (1994) 2615
- [206] E.Forgács, *Anal. Chim. Acta*, 296 (1994) 235
- [207] E.Forgács, T.Cserjádi, *J. Chromatogr. A*, 722 (1996) 281
- [208] K.Lemr, M.Zanette, A.Marcomini, *J. Chromatogr. A*, 686 (1994) 219
- [209] M.Kudoh, *J. Chromatogr.*, 291 (1984) 327
- [210] K.A.Evans, S.T.Dubey, L.Kravetz, S.W.Evetts, I.Dzidic, C.C.Dooyema, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 74 (1997) 765
- [211] C.Zhou, A.Bahr, G.Schwedt, *Anal. Chim. Acta*, 236 (1990) 273
- [212] M.Ahel, W.Gifer, *Anal. Chem.*, 57 (1985) 2584
- [213] Ch-Y.Cheng, W-H.Ding, *J. Chromatogr. A*, 968 (2002) 143
- [214] D.T.Bennie, C.A.Sullivan, J.B.Lee, T.E.Peart, R.J.Maguire, *J. Sci. Total Environ.*, 193 (1997) 263
- [215] A.M.Rothman, *J. Chromatogr.*, 253 (1982) 283
- [216] A.Nozaava, T.Ohnuma, *J. Chromatogr.*, 187 (1980) 261
- [217] P.L.Desbene, B.Desmazeires, J.J.Basselier, A.Desbene Monvernay, *J. Chromatogr.*, 461 (1989) 305
- [218] M.Zanette, A.Marcomini, E.Marchiori, R.Samperi, *J. Chromatogr. A*, 756 (1996) 159
- [219] F.I.Portet, C.Treiner, P.L.Desebène, *J. Chromatogr. A*, 878 (2000) 99
- [220] T.C.G.Kibbey, T.P.Yavaraski, K.F.Hayes, *J. Chromatogr. A*, 752 (1996) 155
- [221] H.Fr.Schröder, F.Ventura. *Techniques and instrumentation in analytical chemistry, sample handling and trace analysis of pollutants- Techniques, applications and quality Assurance*, D. Barceló Ed., Vol. 21, Elsevier, Amsterdam (2000) ISBN: 0-444-828311
- [222] A.DiCorcia, *J. Chromatogr. A*, 794 (1998) 165
- [223] R.M.Hill. *Silicone surfactants*, Surfactant Science Series, R.M. Hill Ed., Vol 86, Marcel Dekker Inc, New York, 1999. ISBN: 0-8247-0010-4
- [224] J.Johnson, R.Yost, *Anal. Chem.*, 57 (1985) 758 A
- [225] R.F.Lang, D.Parra-Díaz, D.Jacobs, *J. Surf. Det.*, 2 (4) (1999) 503
- [226] J.P.Giesy, S.Dobson, K.R.Solomon, *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, 167 (2000) 35
- [227] N.Brady, R.R.Weil. *The nature and properties of soils*, 13th Edition, Prentice Hall, New Jersey, EUA ISBN: 0-13-016763-0

- [228] C.Orozco, A.Pérez, N.González, F.J.Rodríguez, J.M.Alfayate. *Contaminación ambiental, Una visión desde la Química*, Thomson, Madrid, 2003. ISBN: 84-9732-178-2
- [229] R.N. Young, A M O Mohamed and B P Warkentin. *Principles of contaminant transport in soils*, Elsevier, Amsterdam (1996) ISBN: 0-444-89819
- [230] T.Crisanto, M.J.Sánchez-Martin, M.Sánchez-Camazano, M.Arienzo, *Toxicol. Environ. Chem.*, 45 (1994) 97
- [231] P.Sprankle, W.F.Meggit, D.Penner, *Weed Sci.*, 23 (1975) 229
- [232] D.L.Hensley, D.S.N.Beuerman, P.L.Carpenter, *Weed Res.*, 18 (1978) 287
- [233] S.Shoval, S.Yariv, *Clays Clay Mineral*, 27 (1979) 19
- [234] J.S.McConnell, L.R.Hossner, *J. Agric. Food Chem.*, 33 (1985) 1075
- [235] E.Morillo, T.Undabeytia, C.Maqueda, *Environ. Sci. Technol.*, 31 (1997) 3588
- [236] B.C.Barja, M.I.Tejedor-Tejedor, M.A.Anderson, *Langmuir*, 15 (1999) 2316
- [237] B.Nowack, A.T.Stone, *Environ. Sci. Technol.*, 33 (1999) 3627
- [238] J.Sheals, S.Sjöberg, P.Persson, *Environ. Sci. Technol.*, 36 (2002) 3090
- [239] C.T.Chiou, D.E.Kile, T.I.Binton, R.L.Malcom, J.A.A.Leenheer, *Environ. Sci. Technol.*, 20 (1986) 502
- [240] A.Piccolo, G.Celano, M.Arienzo, A.Mirabella, *J. Environ. Sci. Health*, 29 (1994) 1105
- [241] A.Piccolo, L.Gatta, L.Campanella, *Ann. Chim.*, 85 (1995) 31
- [242] A.Piccolo, G.Celano, P.Conte, *J. Agric. Food Chem.*, 44 (1996) 2442
- [243] V.P.Evangelou. *Environmental soil and water chemistry, Principles and applications*, John Willey & Sons, New York, USA, (1998) ISBN: 0-471-16515-6
- [244] S.W.Karickhoff. *Contaminants and sediments- Analysis, chemistry and biology*, Ed. R.A. Barker, Ann. Arbor Science, Ann Arbor, Volume 2, USA (1980) ISBN: 0-250-40307-2
- [245] M.T.Condesso de Melo. *Laboratory studies of glyphosate equilibrium and kinetic adsorption processes in soils of the maresme region (Barcelona, Spain)*, tesina, Universitat Politècnica de Catalunya (UPC), Barcelona (1996)
- [246] R.I.Masel. *Principles of adsorption and reaction on solid surfaces*, John Willey & Sons, Inc. (1996) ISBN: 0-471-30392-3
- [247] R.P.Schwarzenbach, P.M.Gschwend, D.M.Imboden. *Environmental organic chemistry*, John Willey and Sons, Inc., New York, USA (1993) ISBN: 0-471-35053-2
- [248] D.L.Sparks. *Soil physical chemistry*, CRC Press, USA (1986) ISBN: 0-873-71883-6
- [249] J.Alvarez, A.Herguedas, J.Atiensa, S.Bolado. *Modelización numérica y estimación de parámetros para la descripción del transporte de solutos en columnas de suelo en laboratorio*, Colección: Monografías Inia, nº 91, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid, (1995)
- [250] M.Newton, L.M.Horner, J.E.Cowell, D.E.White, E.C.Cole, *J. Agric. Food Chem.*, 42 (1994) 1795
- [251] D.N.Roy, S.K.Konar, S.Banerjee, D.A.Charles, D.G.Thompson, R.Prasad, *J. Agric. Food Chem.*, 37 (1989) 437
- [252] W.W.Major III, C.E.Grue, S.C.Gardner, J.M.Grassley, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 71 (2003) 912
- [253] L.Guarracino, L.Candela Lledó, J.E.Santos. *Estudios de la zona no saturada del suelo*, Eds. R.Muñoz-Carpena, A.Ritter, C.Tascón. ICIA, Tenerife, 1999. ISBN: 84-699-1258-5
- [254] F.Veiga, J.M.Zapata, M.L.Fernández Marcos, E.Álvarez, *Sci. Total Environ.*, 271 (2001) 135

CHAPTER 1

OUTLINE AND OBJECTIVES

CHAPTER 1	
OUTLINE AND OBJECTIVES.....	85
1.1 PESTICIDES IN THE ENVIRONMENT	87
1.1.1 <i>COMMERCIAL FORMULATIONS OF GLYPHOSATE</i>	88
1.2 ANALYTICAL DETERMINATION.....	92
1.3 TRANSPORT AND FATE OF GLYPHOSATE IN THE ENVIRONMENT	97
1.4 OBJECTIVES.....	101
1.5 REFERENCES.....	103

1.1 PESTICIDES IN THE ENVIRONMENT

The presence of a substance in the environment that because of its chemical composition or quantity prevents the functioning of natural processes and produces undesirable environmental and health effects is called pollution. Pesticides constitute a broad group of environmental pollutants which require a special control and regulation.

According to U.S. Environmental Protection Agency (EPA), pesticide is any substance or mixture of substances intended for preventing, destroying, repelling, or mitigating any pest. Pests can be insects, mice and other animals, unwanted plants (weeds), fungi, or microorganisms like bacteria and viruses. A pesticide is also any substance or mixture of substances intended for use as a plant regulator, defoliant, or desiccant.

By their nature, most pesticides create some risk of harm to humans, animals, or the environment because they are designed to kill or otherwise adversely affect living organisms. At the same time, pesticides are useful to society because of their ability to kill potential disease-causing organisms and control insects, weeds, and other pests.

The widespread use and disposal of pesticides by farmers, institutions, and the general public provide many possible sources of pesticides in the environment. The release of pesticides into the environment may be followed by a very complex series of events that can transport the pesticide through the air or water, into the ground, or even into living organisms. The most important route of distribution and the extent of distribution will be different for each formulation of the pesticide, depending on how and when it is released.

Commercial pesticide products are usually not formulated in a pure form, but a mixture of one or more pesticidal active ingredients diluted in inert ingredients, which are defined by EPA as:

Active ingredient: the chemical or substance component of a pesticide product that can kill, repel, attract, mitigate or control a pest or that acts as a plant growth regulator or desiccant.

Inert ingredients: substances that are not “active”, such water, petroleum distillates, talc, or adjuvants. They do not attack a particular pest, but some are chemically or biologically active, causing health and environmental problems.

The function of adjuvants in commercial formulations of pesticides is usually to act as a wetting or spreading agent, sticker, penetrant, or emulsifier to enhance the effectiveness of the final product. In agrochemical formulations is usual the addition of non-ionic surfactants as adjuvant.

1.1.1 COMMERCIAL FORMULATIONS OF GLYPHOSATE

Glyphosate is a broad-spectrum, nonselective, post-emergence systemic herbicide used for control annual and perennial plants, including grasses, sedges, broad-leaved weeds, and woody plants. It can be used on non-croplands as well as on a great variety of crops.

Numerous commercial formulations containing glyphosate as the active ingredient are becoming increasingly popular all over the world since 1974, when glyphosate was first registered for use by Monsanto manufacturer. Some of the trade names for glyphosate herbicide are:

Roundup	Accord	Sting	Tumbleweed
Rodeo	Glycel	Spasor	Atila
Glialka	Compo	Muster	Glifonox

Common formulations are available as water based solution of glyphosate salt (isopropylamine salt). This salt is used to control broadleaf weeds and grasses in many food and non-food crops and a variety of other sites including ornamentals, turf, forestry and rights-of-way. Roundup® is the most common formulation and contains 480 g of isopropylammonium salt per litre (equivalent to 360 g glyphosate per litre).

Glyphosate [N-(phosphonomethyl)glycine] is an organophosphonate herbicide readily degraded by soil microbes to aminomethylphosphonic acid (AMPA), which is also degraded to carbon dioxide. Chemical structures of both compounds are shown in **Figure 1.1** and **1.2**.

Pure glyphosate is a colourless, odourless, crystalline solid slightly soluble in water ($12 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ at 25°C) and practically insoluble in most organic solvents. Glyphosate and its metabolite, AMPA, present acidic properties and they are highly polar compounds.

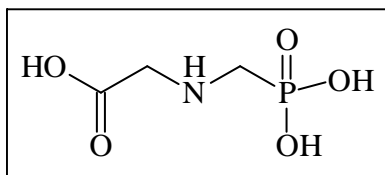


Figure 1.1. Chemical structure of glyphosate

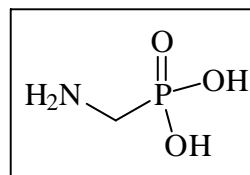


Figure 1.2. Chemical structure of AMPA

In plants, glyphosate is absorbed by leaves and translocated to the roots, shoot regions and fruit, where it inhibits the shikimic acid pathway, causing a deficit in essential aromatic amino acids. The absence of this pathway in animals may account for its low acute toxicity to these organisms [1].

Glyphosate is moderately persistent in soil, with an estimated average half-life of 47 days. Reported field half-lives range from 1 to 174 days. It is strongly adsorbed to most soils, even those with lower organic and clay content. Thus, even though it is highly soluble in water, field and laboratory studies show that it does not leach appreciably, and has low potential for runoff (except as adsorbed to colloidal matter). Microbes are primarily responsible for the breakdown of the product, and volatilization or photodegradation losses will be negligible [2].

The wide use of glyphosate formulations makes necessary to control its concentration in the environment, especially in water. The European Legislation does not distinguish among pesticides and it establishes a maximum concentration of any single pesticide of $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, but the total amount of pesticides must be lower than $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ in drinking water. Otherwise, EPA set the Maximum Contaminant Level Goal (MCLG) for glyphosate at 0.7 parts per million ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) and the same value for the Maximum Contaminant Level (MCL), the enforced standard. The World Health Organisation (WHO) set the same maximum levels of glyphosate in tap water than EPA, 0.7 parts per million.

Besides the active ingredient, pesticide formulations usually contain mixtures of specific substances called adjuvants which are added in order to enhance the effectiveness of the product. Among adjuvants, surfactants (surface active agents) are the most used in herbicide formulations as emulsifiable concentrates, microemulsions or wetting and dispersing agents for wettable powders, water dispersible granules and suspension concentrates. They can also be used as spray-tank additives to enhance their adhesion and wetting of foliage and plant uptake [3].

Generally, surfactants are classified into four groups; anionic, cationic, non-ionic and amphoteric. Non-ionic surfactants have shown to be the most used in agrochemical formulations. These compounds allow an efficient delivery of the active ingredient to the target sites required for the herbicide activity, especially for foliage-applied systemic compounds such as glyphosate [4]. In fact, commercial glyphosate formulations usually contain ethoxylated alkylamines (ANEOs) as surfactants (see **Figure 1.3**).

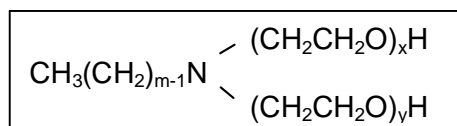


Figure 1.3. Chemical structure of ethoxylated alkylamines.

ANEOs are industrially produced by reaction of alkylamines, derived from natural fats or oils (coconut, lauryl, tallow, oley, etc.) with ethylene oxide (EO) at increased pressure and temperature [3,5]. The original natural product is actually a mixture of various fatty acids, which distribution determines the length of the alkyl chains of the final ANEOs. The resulting ANEOs are technical mixtures of alkylamines with the general structure C_mNEO_n ; $n=x+y$. In case of glyphosate formulations, surfactants derived from tallow (extracted from cattle and sheep suet) are the most common. The composition of tallow is shown in **Table 1.1**, so C18 and C16 alkylic homologues are the most important.

The role of adjuvants on foliar uptake of glyphosate formulations has been widely studied [4,6-8]. In the presence of surfactants, the herbicide uptake depends on at least three factors: concentration and physicochemical properties of active ingredients, chemical structure and concentration of surfactants and leaf surface character of the plant species [5]. It is generally recognised that not every surfactant can increase the uptake of any herbicide. Therefore, information about the content and the complete composition of these formulations is necessary, involving both the active ingredient and the added adjuvants.

FATTY ACID	N° Carbon atoms : N° Insaturations	Weight Percentage
Oleic acid	18 : 1	40,8
Palmitic acid	16 : 0	25,3
Stearic acid	18 : 0	19,4
Palmitoleic acid	16 : 1	4,0
Myristic acid	14 : 0	3,5

Table 1.1. Typical composition of tallow oil with the fatty acid distribution.

On the other hand, the characterisation of these alkylamine mixtures is also required due to their different toxicity. In this way, it has been reported that the toxicity for some species depends on the length of both alkyl and ethoxylated chains [9]. It does not exist a specific legislation for surfactants in pesticide formulations, but it is indirectly included in the general regulations for active ingredients and commercial formulations of pesticides.

The most relevant characteristics of glyphosate and non-ionic surfactants related to the studies involved in this thesis are summarized in **Table 1.2**.

	GLYPHOSATE	NON-IONIC SURFACTANTS
TOXICITY	Low-moderated	Low, related to: Etoxi groups number Lengh of alkylic chain
DEGRADATION	Fungi or microbial degradation	Degradation depending on pH of medium
HALF-LIFE	47 days	20-40 days
MOBILITY	High adsorption to soils $K_{oc}=24\ 000\ mL\cdot g^{-1}$	Low
LEGISLATION (water)	$0.1\ \mu g\cdot L^{-1}$ (98/83/CE) $0.7\ \mu g\cdot L^{-1}$ (WHO and EPA)	Non especific Included in 91/414/EEC for pesticides commercial formulations in general

Table 1.2. Summary of remarkable aspects of glyphosate and non-ionic surfactants.

Until recently, research on pesticides has focused mainly on the environmental problems of the active ingredients, but environmental toxicity and risk of adjuvants are becoming important subjects to take into account [9,10]. For this purpose, complete analytical information about these formulations could lead to a more appropriated field application and in this way to avoid unnecessary amounts of these compounds in the environment.

1.2 ANALYTICAL DETERMINATION

Due to the strict European legislation, which establishes the limits of concentration at sub-ppb levels, pesticides must be monitored mainly in water and soils, but also in other matrices such as fruits, vegetables and even products of animal origin, because of their presence in the food chain.

A great variety of analytical methods for glyphosate determination have been recently reviewed [11], but only a few works referring to ANEO's analysis have been reported [5,12-14].

Several analytical procedures have been successfully applied for determination of glyphosate and AMPA in a variety of environmental matrices, in which these compounds can be found. The most common techniques are: gas chromatography (GC) with flame photometric, thermoionic, electron capture, MS and MS/MS detection (see **Table 1.3**); liquid chromatography (LC) with UV-Vis, fluorescence and MS detection (see **Table 1.4**); capillary electrophoresis (CE) with UV-Vis [15], fluorescence [16,17] and MS [18] detectors; and ion chromatography [19,20]. Promising results of the application of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) have also been reported [21,22]. Depending on the method used, the detection system usually requires a previous conversion of analytes to volatile or chromophore derivatives.

DETECTION	ENVIRONMENTAL MATRIX	DERIVATISING AGENT	DETECTION LIMITS AMPA Glyphosate	REF.
MS(EI), MS(CI)	soil, plants, tissues animal, water	TFAA-HFB	0.01 mg·kg ⁻¹ 0.01 mg·kg ⁻¹	[23,24]
FID	Water, soil, vegetals	Isopropylchloroformate -diazomethane	0.8 mg·L ⁻¹ 1.2 mg·L ⁻¹	[25]
MS-MS (ion trap)	Water	TFAA-HFB	0.05 µg·L ⁻¹ 0.05 µg·L ⁻¹	[26]
ECD, MS(EI)	Water	TFAA-TFE	0.09 µg·L ⁻¹ 0.36 µg·L ⁻¹	[27]
MS(EI)	Water	Àcid acètic-TMOA	0.29 µg·L ⁻¹ 0.65 µg·L ⁻¹	[28]
MS(EI)	Water, soil	TFAA-TFE	0.05 µg·L ⁻¹ 0.003 mg·kg ⁻¹	[29]
PFPD	Cereals	TMOA	0.02 mg·kg ⁻¹ 0.03 mg·kg ⁻¹	[30]

EI = electronic impact; CI = chemical ionisation; PFPD = Pulsed Flame Photometric Detector; TFAA-HFB = trifluoroacetic anhydride-heptafluorobutanol; TMOA = trimethyl ortoacetate

Table 1.3. Summary of GC methods for glyphosate and AMPA in environmental matrices.

DETECTION	ENVIRONMENTAL MATRIX	DERIVATISING AGENT	DETECTION LIMITS AMPA Glyphosate	REF.
UV-Vis (240nm o 280nm)	water, soil	p-toluensulphonil chloride	8 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	[31,32]
UV-Vis (240nm o 280nm)	Serum	p-toluensulphonil chloride	0.3 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 0.2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	[33]
UV-Vis (405 nm)	Soil	1-fluoro-2,4-dinitrobenzene	0.1 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 0.05 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	[34]
FL (254nm, 313nm)	water, soil	FMOC-Cl	10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	[35]
FL (270nm, 315nm)	water	FMOC-Cl	5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	[36]
FL (263nm, 317nm)	water, soil, vegetals	FMOC-Cl	1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 10 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 0.05 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	[37,38]
ESI / MS	water, plants	FMOC-Cl	0.3 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 0.06 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	[39]
ESI / MS	residual water	FMOC-Cl	0.03 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 0.03 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	[40]
ESI / MS	surface water, subterranean water	FMOC-Cl	0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	[41]
ESI / MS-MS	surface water, subterranean water, soil	FMOC-Cl	5 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ 5 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	[42]
FL (340nm, 455nm)	water	OPA-ME	2 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	[43]
FL (330nm, 465nm)	water	OPA-ME	2 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 4 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	[44]

UV-vis= ultraviolet-visible; FL=fluorescence; ESI=electrospray interfase; MS= mass spectrometry; FMOC-CL=fluorenylmethyl chloroformate chloride; OPA-ME=o-phthalaldehyde-mercaptoethanol

Table 1.4. Summary of LC methods for glyphosate and AMPA in environmental matrices.

The methods involved in ANEO's analysis require a previous chromatographic separation followed by fluorescence [5], mass evaporative [12] or MS [13,14] detection of the analytes. However, only mass spectrometry allows the simultaneous determination of both alkyl and ethoxymer homologues. Other methods involve two determinations, a first one for the alkyl homologues by reversed-phase LC and a second one for the individual oligomers by normal-phase LC [5,12].

Other non-ionic surfactants such as alkyphenol ethoxylates [45,46] or alcohol ethoxylates [47] with similar characteristics to ANEO compounds have been widely characterized by HPLC-MS. Considering the effectiveness of HPLC-MS to determine alkyphenol ethoxylates and the methods previously reported on the determination of ANEOs, this methodology seems to be the most

suitable technique [48,49] given the capability of mass spectrometry for the easy identification of the different alkylamine homologues.

However, some of these techniques are still not sensitive and selective enough to determine glyphosate and ANEOs in complex matrices at the required levels. In these cases, extraction and preconcentration procedures before the analytical determination are indispensable.

The chemical properties that contribute to the effectiveness of glyphosate as an herbicide (polar nature and high water solubility), complicate the extraction of this compound from aqueous and solid matrices, making the recovery of glyphosate and its metabolite from field samples the main difficulty in their analysis.

Although liquid-liquid extraction (LLE) is rarely applied for the extraction of glyphosate and AMPA, the purification of glyphosate extracts coming from food using LLE has been reported recently [50].

Anionic and cationic resins have shown great effectiveness in the enrichment and clean-up of samples when a solid-phase extraction method (SPE) is applied [51-55]. Mallat and Barceló [47] reported detection limits of 2 and 4 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ for glyphosate and AMPA, respectively using a Lichrolut EN cartridge coupled to an anionic ion-exchanger resin, Amberlite IRA 410-OH⁻ form, for the preconcentration and purification of 50 mL of water. A two-step clean-up based on ion-exchange chromatography [48], consisting of successive sample application to a column with an iron-loaded Chelex-100 resin followed by a second column containing AG1X8 anion-exchange resin was developed for the determination of glyphosate and AMPA in water samples by gas chromatography coupled to tandem MS (GC-MS-MS). Patsias et al. [49] assayed different anion-exchanger cartridges, PRP-X100 and silica based trimethylaminopropyl and diethylaminopropyl, which were coupled on-line with LC using a PROSPEKT system.

An ion-exchange mechanism was also used to transport glyphosate and AMPA through a supported liquid membrane containing a quaternary ammonium salt, Aliquat 336, which acts as an anion-exchanger carrier [56,57]. Enrichment factors of 19 for glyphosate and of 2.6 for AMPA were obtained with a hollow fiber module [52]. More recently immobilised metal ion affinity chromatography (IMAC) has also been applied to the extraction of both analytes [58].

In case of adjuvants, liquid-liquid extraction, solid-phase microextraction and solid-phase extraction techniques are reported for surfactants, but only a study describes an extraction method for ethoxylated alkylamines [59]. The combination of three polymeric cartridges and two C18 phases only allows recoveries up to 60%, due to the important effect of sample pH and the insufficient elution of homologues of longer alkylic chains.

The extraction of glyphosate and AMPA from soil samples is mainly carried out by mechanical shaking at basic pHs [60-66], whereas pressurised fluid extraction (PFE) is the unique

reported technique for ethoxylated alkylamines, which achieves recoveries from 63 to 88% for the different homologues of the surfactant [67].

The evaluation and comparison of two strong polymeric anion-exchange resins (Styrene-divinylbenzene matrix), which differ in their porous size, Amberlite®IRA-416 (gel-type) and Amberlite®IRA-900 (macroreticular) is presented in **Chapter 2**. The extraction efficiency of glyphosate and AMPA is related to the sorbent matrix, so both resins are compared with Isolute-NH₂, a silica-based sorbent. The effect of sample volume, pH, flow-rate and capacity and the efficiency of these sorbents in the analysis of real samples is also discussed in this chapter.

The selectivity of sample pretreatment techniques becomes a crucial parameter for the extraction efficiency of the analytes, especially from complex matrices. However, the recovery of glyphosate and AMPA from water samples characterised by high conductivity (ie. high contents of inorganic ions and organic compounds as well) could decrease because the matrix components interfere and cause appearance of misleading results [49,50]. In **Chapter 3** the effect of conductivity and concentration of the sample on extraction efficiency of glyphosate and AMPA in pure and natural waters using the preconcentration technique developed in the previous chapter is studied. A linear relationship between extraction efficiency for AMPA and sample conductivity is established.

Some modifications of three analytical methods involving liquid chromatography (UV and fluorescence detection) and capillary electrophoresis (UV indirect detection) are reported, so as to improve its applicability in the laboratory and the detection limits for glyphosate and AMPA in natural water samples (**Chapter 2** and **3**). The results obtained by using capillary electrophoresis with UV indirect detection are compared with those previously obtained by HPLC with UV detection applying a pre-column derivatisation with p-toluensulphonyl chloride in **Chapter 3**.

In **Chapter 4** an analytical method for non-ionic surfactants (ANEOS) is presented. The HPLC-MS method provides rapid structural and quantitative information of the surfactants (ANEOS) presents in commercial glyphosate formulations, including distribution of alkyl chains, ethoxylated chains and also information about the distribution of unsaturated alkyl chains. In addition, the possibility of improving the sensitivity of the method by an on-line preconcentration step is also proposed.

The development and suitability of a quantitative methodology for the determination of glyphosate and AMPA in soil samples is reported in **Chapter 5**. The main drawback of the proposed methodology is the requirement of a purification step using a XAD-7 resin, which increases considerably the analysis time. Methodology for extraction of ANEOs from soil samples has not been developed in this thesis. In order to investigate the ANEOs influence on glyphosate adsorption in soils only the concentration of this compound in the liquid and solid phase has been determined, and the concentration of ANEOs in each phase was not considered. The concentration

of each homologue, which is what could be determined, is much lower than the active ingredient, so its determination has been discarded.

1.3 TRANSPORT AND FATE OF GLYPHOSATE IN THE ENVIRONMENT

Once pesticides reach the soil move in one or more directions [68]: they may vaporize into the atmosphere without chemical change, they may be absorbed by soils, they may move downward through the soil in liquid or solution form and be lost from the soil by leaching, they may undergo chemical reactions within or on the surface of the soil, they may be broken down by soil microorganisms, they may wash into streams and rivers in surface runoff and they may be taken up by plants or soil animals and move up to the food chain. The specific fate of each pesticide will be determined at least in part by their physic-chemical properties:

- Biochemical degradation by soil and water organisms to AMPA
- High adsorption to most part of soils ($K_{oc}=24\ 000\ \text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$)
- High solubility in water ($12\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
- Very low volatility (negligible P_v)
- Moderated persistence in soils ($t_{1/2} = 47$ days)

Recently, the most relevant studies about mobility and leaching of glyphosate in agriculturally used soils have been reviewed by Vereecken [69].

The earliest findings on the adsorption of glyphosate on soils were reported by Sprankle et al. [70]. They found a stronger sorption of glyphosate on a clay loam soil than onto a sandy loam, suggesting that clay minerals were responsible for sorption. Glyphosate is an acidic compound which possesses three donor groups (amine, carboxylate and phosphonate groups) that can be responsible for strong coordination bonds to metal ions and mineral surfaces. However, contradictory results are observed in various studies on glyphosate adsorption. Whereas several authors correlate glyphosate binding to soils with the content of soil organic matter and polyvalent cations adsorbed on clay, especially iron and aluminium oxides [70-73], other works relate glyphosate adsorption to the pH system [74,75] and the cation exchange capacity (CEC) of the soils [76], indicating that soil organic matter has little effect on glyphosate adsorption [77-79].

On the other hand, interactions of glyphosate with soil constituents at molecular level have also been investigated. Adsorption of glyphosate onto iron and aluminium oxides is generally explained by the formation of inner-sphere surface complexes [80]. Bonding to clay minerals takes place either through interlayer exchange cations [76,81,82] or by hydrogen bonding to the clay external surface [75]. Adsorption to organic matter occurs through hydrogen bonding [73,83] and is considered by several authors [72,84] to be comparable or even stronger than adsorption to clay minerals, depending on the macromolecular structure and dimension of humic material.

Summarizing, adsorption of glyphosate seems to be mainly by the mineral phase of the soil matrix with a strong preference for iron and aluminium hydroxides. Soil organic matter seems to play only an indirect role. The soil pH determines the electrical charge of glyphosate and therefore its adsorption on the mineral phase.

Other authors have focused on more quantitative aspects of glyphosate adsorption. These studies are aimed at both laboratory experiments (continuous [19] and batch [20,21]) and field-scale studies [22-24].

The results of leaching and mobility studies of glyphosate in soils conducted at laboratory and field scales indicate that in spite of being a strongly sorptive substance (with high K_{oc}), it may be transported rapidly to the sub-surface. Laboratory studies include continuous and batch experiments. An important drawback in these studies is that the materials used vary considerably in their composition, ranging from pure clay to soils with high organic matter content. In addition, concentration ranges differ greatly between the various experiments, with a tendency for rather high concentration levels.

In case of batch experiments, glyphosate adsorption on soils, humic substances and clay minerals is usually described by the Freundlich sorption isotherm [85-87]. However, the lack of uniform conditions cited before make it difficult to compare the adsorption coefficients obtained by fitting the Freundlich equation to adsorption isotherms.

Lysimeter studies and soil column studies (continuous experiments) provide evidence that transport of glyphosate may be colloid-facilitated, since glyphosate may interact with clay particles and iron oxides of the colloidal fraction, although it does not seem to be a major transport route [88,89]. These studies indicate that glyphosate leaching is dominated by preferential flow mechanisms [90].

Leaching studies field-scale in the unsaturated zone are often used to determine the risk of groundwater and surface water pollution, as well as contaminant fate and exposure studies [91,92]. In case of glyphosate, leaching studies on drained field sites indicate that glyphosate may be transported to deeper soil layers through a combination of high rainfall intensity after application on a wet macroporous soil, despite the fact that the compound is strongly sorptive and rapidly degrading [86,93-96].

Data from glyphosate monitoring in the USA and Europe indicate a low occurrence in groundwater [97,98]. This is in line with two experimental lysimeter studies on glyphosate [99,100] which indicate that glyphosate does not occur in the leachate water at concentrations of environmental concern ($< 0.1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). However, glyphosate monitoring in groundwater is still limited.

Chapter 5 highlights the behaviour of glyphosate herbicide in Catalanian soils from laboratory to field-scale. Preliminary batch sorption studies of glyphosate in selected soils are described and used to design the next miscible displacement experiments in the laboratory to better simulate the field conditions. In both experiments, different commercial herbicides containing glyphosate were tested in order to compare the effects of adjuvants. The glyphosate transport through the soil column in a controlled application of the herbicide in a creek forest (*Populus nigra*) is finally reported, relating its dynamics to the soil properties.

1.4 OBJECTIVES

This thesis reports on the research performed to the improvement of analytical existing methodologies and the development of novel procedures that can be applied to assess environmental effects of pesticide release to the environment. The combination of the implementation of analytical tools to predict potential mobility of glyphosate released from a controlled application with the development of different analytical methodology to study the transport and fate of this herbicide in Mediterranean soils could be summarised as the main goal of this study.

In order to achieve the main goal, the studies collected in Chapters 2-5 have been addressed to the next points:

- Design of a solid-liquid extraction system using ion exchange adsorbents for the extraction and preconcentration of glyphosate and AMPA in natural aqueous samples.
- Comparison of obtained results applying the previous preconcentration system using different determination methods for the analytes: liquid chromatography with fluorescent and UV-vis detection and capillary electrophoresis with indirect UV-vis detection.
- Development of a characterization and quantification method for ethoxylated alkylamines (ANEOs) derived from tallow fat, usually presents in commercial formulations of glyphosate. Application to the characterization of various commercial formulations widely used over the world.
- Development of an analytical procedure for glyphosate and AMPA determination in soil samples.
- Laboratory studies of glyphosate mobility (adsorption and degradation) in soils of the Mediterranean area. Continuous (soil columns) and discontinuous (adsorption isotherms) studies. Comparison of commercial formulations and pure glyphosate.
- Field study of glyphosate mobility (adsorption and degradation) in a controlled application of the Atila herbicide in a creek field of Begur (Girona, Spain).

1.5 REFERENCES

- [1] Glyphosate in the Environment, Water, Soil and Air Pollution. S.M. Carlisle and J.T.Trevors, 39 (1988) 409-420
- [2] Pesticide Profiles: Toxicity, Environmental Impact and Fate. M.A.Kamrin, Lewis publishers, USA (1997) ISBN: 0-56670-190-2
- [3] Trace determination of pesticides and their degradation products in water. Techniques and instrumentation in analytical chemistry. D. Barceló, M.C.Hennion, Elsevier Science & Technology, 19 (1997) 8. ISBN: 0444818421
- [4] R.C.Kirkwood, R.Hetherrington, T.L.Reynolds, G.Marshall, *Pest. Manag. Sci.* 56 (2000) 359
- [5] R.H.Schreuder, A.Martijn, H.Poppe, J.C.Kraak, *J. Chromatogr.*, 368 (1986) 339
- [6] C.Leaper, P.J.Holloway, *Pest. Manag. Sci.*, 56 (2000) 313
- [7] Z.Liu, *Colloids Surfaces B: Biointerfaces*, 35 (2004) 149
- [8] P.E.Laerke, J.C.Streibig, *Pest. Sci.*, 44 (1995) 107
- [9] K.A.Krogh, B.Halling-Sorensen, B.B.Mogensen, K.V.Vejrup, *Chemosphere*, 50 (2003) 871
- [10] M.T.K.Tsui, L.M.Chu, *Chemosphere*, 52 (2003) 1189
- [11] C.D.Stalikas, C.N. Konidari, *J. Chromatogr. A*, 907 (2001) 1
- [12] R.F.Lang, D.Parra-Diaz, D.Jacobs, *J. Surfactants Deterg.*, 2 n°4 (1999) 503
- [13] K.A.Krogh, K.V.Vejrup, B.B.Mogensen, B.Halling-Sorensen, *J. Chromatogr. A*, 957 (2002) 45
- [14] K.A.Krogh, B.B.Mogensen, B.Halling-Sorensen, A.Cortés, K.V.Vejrup, D.Barceló, *Anal. Bioanal. Chem.*, 376 (2003) 1089
- [15] M. G. Cikaló, D. M. Goodall, W. Matthews, *J. Chromatogr. A*, 745 (1996) 189
- [16] M. Molina, M. Silva, *Electrophoresis*, 23 (2002) 1096
- [17] M. Molina, M. Silva, *Electrophoresis*, 23 (2002) 2333
- [18] L.Goodwin, J.R.Startin, B.J.Keely, D.M.Goodall, *J. Chromatogr. A*, 1004 (2003) 107
- [19] K. H. Bauer, T. P. Knepper, A. Maes, V. Schatz, M. Voihsel, *J. Chromatogr. A*, 837 (1999) 117
- [20] J.You, J.A.Koropchak, *J. Chromatogr. A*, 989 (2003) 231
- [21] E. A. Lee, L. R. Zimmerman, B. S. Bhullar, E. M. Thurman, *Anal. Chem.*, 74 (2002) 4937
- [22] F. Rubio, L. J. Veldhuis, B. S. Clegg, J. R. Fleeker, J. C. Hall, *J. Agric. Food Chem.*, 51 (2003) 691
- [23] P.L.Alferness, Y.Iwata, *J. Agric. Food Chem.*, 42 (1994) 2759
- [24] P.L.Alferness, L.A.Wiebe, *J.AOAC Int.*, 84 (3) (2001) 823
- [25] H.Kataoka, S.Ryu, N.Sakiyama, M.Makita, *J. Chromatogr. A*, 726 (1996) 253
- [26] A.Rayer, S.Beguín, J.C.Tabet, S.S.Hulot, M.A.Reding, P.Y.Communal, *Anal. Chem.*, 72 (2000) 3826
- [27] C.D.Stalikas, G.A.Pilidis, M.I. Karayannis, *Chromatographia*, 51 (2000) 741
- [28] C.D.Stalikas, G.A.Pilidis, *J. Chromatogr. A*, 872 (2000) 215
- [29] E.Boerjesson, L.Torstensson, *J. Chromatogr. A*, 886 (2000) 207
- [30] S.H.Tseng, Y.W.Lo, P.C.Chang, S.S.Chou, H.M.Chang, *J. Agric. Food Chem.*, 52 (13) (2004) 4057
- [31] S.Kawai, B.Uno, M.Tomita, *J. Chromatogr.*, 540 (1991) 411

- [32] G.Forlania, A.Mangiagallia, E.Nielsen, C.M.Suardib, *Soil Biol. Biochem.*, 31 (1999) 991
- [33] M.Tomita, T.Okuyama, S.Watanabe, B.Uno, S.Kawai, *J. Chromatogr. A*, 566 (1991) 239
- [34] L.N.Lundgren, *J. Agric. Food Chem.*, 34 (1986) 535
- [35] R.L.Glass, *J. Agric. Food Chem.*, 31 (1983) 280
- [36] C.J.Miles, L.R.Wallace, H.A.Moye, *J.Assoc.Off.Anal.Chem.*, 69 n°3 (1986) 458
- [37] J.V.Sancho, F.Hernández, F.J.López, E.A.Hogendoorn, E.Dijkman, P. van Zoonen, *J. Chromatogr. A*, 737 (1996) 75
- [38] F.Hernández, C.Hidalgo, J.V.Sancho, *J. AOAC Int.*, 83 (3) (2000) 728
- [39] L.Grey, B.Nguyen, P.Yang, *J. AOAC Int.*, 84 (6) (2001) 1770
- [40] R.J.Vreeken, P.Speksnijder, I.Bobeldijk-Pastorova, Th.H.M.Noij, *J. Chromatogr. A*, 794 (1998)187
- [41] E.A.Lee, L.R.Zimmerman, B.S.Bhullar, E.M.Thurman, *Anal. Chem.*, 74 (2002) 4937
- [42] M.Ibáñez, O.J.Pozo, J.V.Sancho, F.J.López, F.Hernández, *J. Chromatogr. A*, 1081 (2005) 145
- [43] M.P.Abdullah, J.Daud, K.S.Hong, C.H.Yew, *J. Chromatogr. A*, 697 (1995) 363
- [44] E.Mallat, D.Barceló, *J. Chromatogr. A*, 823 (1998) 129
- [45] A.Jahnke, J. Gandrass, W. Ruck, *J. Chromatogr. A*, 1035 (2004) 115
- [46] A.A.Boyd-Boland, J.B.Pawliszyn, *Anal.Chem.*, 68 (1996) 1521
- [47] M.Petrovic, D. Barceló, *Anal.Chem.*, 72 (2000) 4560
- [48] Cserhádi T., Forgács E., *J. Chromatogr. A*, 774 (1997) 265
- [49] D.Barceló, *Anal. Chim. Acta*, 263 (1992) 1
- [50] J.L.Tadeo, C.Sánchez-Brunete, R.A.Pérez, M.D.Fernández, *J. Chromatogr. A*, 882 (2000) 175
- [51] M.P. Abdullah, J. Daud, K.S. Hong, C.H. Yew, *J.Chromatogr. A*, 697 (1995) 363
- [52] E. Mallat, D. Barceló, *J.Chromatogr. A*, 823 (1998) 129
- [53] A. Royer, S. Beguin, J.C. Tabet, S. Hulot, M.A. Reding, P.Y. Communal, *Anal. Chem.*, 72 (2000) 3826
- [54] J.Patsias, A. Papadopoulou, E. Papadopoulou-Mourkidou, *J. Chromatogr. A*, 932 (2001) 83
- [55] E. Böerjesson, L. Torstensson, *J. Chromatogr. A*, 886 (2000) 207
- [56] P. Dzygiel, P. Wieczorek, *J. Chromatogr. A*, 889 (2000) 93
- [57] C. Ríos, V. Salvadó, M. Hidalgo, *J. Membr.Sci.*, 203 (2002) 201
- [58] C. Rios, V. Salvadó, M. Hidalgo, *J. Sep. Sci.*, 27 (7-8) (2004) 602
- [59] K.A.Krogh, K.V.Vejrup, B.B.Mogensen, B.Halling-Sorensen, *J. Chromatogr. A*, 957 (2002) 45
- [60] P.Alferness, Y.Iwata, *J. Agric. Food Chem.*, 41 (1992) 2751
- [61] C.J.Miles, H.A.Moye, *J. Agric. Food Chem.*, 36 (3) (1988) 486
- [62] J.V.Sancho, C.Hidalgo, F.Hernández, F.J.López, E.A.Hogendoorn, E.Dijkman, *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, 62 (1996) 53
- [63] L.N.Lundgren, *J. Agric. Food Chem.*, 34 (1986) 535
- [64] X.Huang, T.Pedersen, M.Fisher, R.White, T.M.Young, *Environ. Sci. Technol.*, 38 (2004) 3263
- [65] D.G.Thompson, J.E.Cowell, R.J.Daniels, B.Staznik, L.M.McDonald, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 72 (1989) 355
- [66] R.L.Glass, *J. Agric. Food Chem.*, 31 (1983) 280

- [67] K.Krogh, B.B.Mogensen, B.Halling-Sorensen, A.Cortés, K.V.Vejrup, D.Barceló, *Anal. Bioanal. Chem.*, 376 (2003) 1089
- [68] N.C.Brady, R.R.Well. *The Nature and Properties of Soils*, 13th Edition, Prentice Hall, USA (2001) ISBN: 0-130-16763-0
- [69] H.Vereecken, *Pest. Manag. Sci.*, 61 (2005) 1139-1151: 0130167630
- [70] P. Sprankle, W. F. Meggit, D. Penner, *Weed Sci.*, 23 (1975) 229
- [71] E.Morillo, T.Undabeytia, C.Maqueda, A. Ramos, *Chemosphere*, 40 (2000) 103
- [72] S. M. Carlisle, J. T. Trevors, *Water, Air Soil Pollut.*, 39 (1988) 409
- [73] A. Piccolo, G. Celano, P. Conte, *J. Agric. Food Chem.*, 44 (1996) 2442
- [74] J. S. McConnell, L. R. Hossner, *J. Agric. Food Chem.*, 33 (1985) 1075
- [75] E.Morillo, T.Undabeytia, C.Maqueda, *Environ. Sci. Technol.*, 31 (1997) 3588
- [76] R. L Glass, *J. Agric. Food Chem.*, 35 (1987) 497
- [77] R.G.Gerritse, J.Beltran, F.Hernández, *Australian J. Soil Res.*, 34 (1996) 599
- [78] H.De Jonge, L.W.De Jonge, O.H.Jacobsen, T.Yamaguchi, P.Moldrup, *Soil Sci.*, 166 (2001) 230
- [79] L.Mamy, E.Barriuso, *Chemosphere*, 61 (2005) 844
- [80] J.Sheals, S. Sjöberg, P.Persson, *Environ. Sci. Technol.*, 36 (2002) 3090
- [81] J. S. McConnell, L. R. Hossner, *J. Agric. Food Chem.*, 33 (1985) 1075
- [82] A. Piccolo, G. Celano, *Environ. Toxicol. Chem.*, 13 (1994) 1737
- [83] A.Piccolo, G.Celano, M.Arienzo, A.Mirabella, *J. Environ. Sci. Health B*, 29 (1994) 1105
- [84] C.Maqueda, E.Morillo, T.Undabeytia, F.Martín, *Chemosphere*, 37 (1998) 1063
- [85] A. Piccolo, G. Celano, G.Pietramellara, *Sci. Total Environ.*, 123-124 (1992) 77
- [86] X. Huang, T. Pedersen, M. Fischer, R. White, T.M. Young, *Environ. Sci. Technol.*, 38 (2004) 3272
- [87] Y.Yu, Q-X. Zhou, *Chemosphere*, 58 (2005) 811
- [88] J.Beltran, R.G.Gerritse, F.Hernández, *Eur. J. Soil Sci.*, 49 (1998) 149
- [89] H. de Jonge, O.H.Jacobsen, L.W. de Jonge, P.Moldrup, *J. Environ. Qual.*, 27 (1998) 1495
- [90] H. de Jonge, L.W. de Jonge, O.H.Jacobsen, *Pest. Manag. Sci.*, 56 (2000) 909
- [91] M.Waldman, Y.Shevah, *Pure Appl. Chem.*, 65 (1993) 1595
- [92] D.C.Goody, J.P.Bloomfield, P.J.Chilton, A.C.Johnson, R.J.Williams, *Ground Water*, 39 (2001) 262
- [93] M. Newton, L.M.Horner, J.E. Cowell, D.E. White, E.C. Cole, *J. Agric. Food Chem.*, 42 (1992) 1795
- [94] F.Veiga, J.M.Zapata, M.L.Fernández Marcos, E.Álvarez, *Sci. Total Environ.*, 271 (2001) 135
- [95] K.G.Villholth, N.J.Jarvis, O.H.Jacobson, H.Jonge, *J. Environ. Qual.*, 29 (2000) 1298
- [96] J.Kjaer, M.Ullum, P.Olsen, A.Helweg, B.B.Mogensen, F.Plauborg, R.Grant, I.S.Fomsgaarg, W.Brüsch. *The Danish Pesticide Leaching Assessment Programme: Monitoring Results*. 3rd report. Denmark (2003)
- [97] EPA, *Occurrence Estimation Methodology and Occurrence Findings Report for the Six Year Review of Existing National Primary Drinking Water Regulations*. EPA-815-R-03-006. Environmental Protection Agency, USA (2003)
- [98] Institut Français de l'Environnement, *Les pesticides dans les eaux, sixième bilan annuel*. Etudes et Travaux, 42 (2004)

[99] I.S.Fomsgaard, N.H.Spliid, G.Fielding, *J. Environ. Sci. Health B*, 38 (2003) 19

[100] R.W.Malone, M.J.Shipitalo, R.D.Wauchope, H.Sumner, *J. Environ. Qual.*, 33 (2004) 2141

CHAPTER 2

**EXTRACTION AND PRECONCENTRATION
OF THE HERBICIDE GLYPHOSATE AND
ITS METABOLITE AMPA USING ANION-
EXCHANGE SOLID PHASES**

CHAPTER 2

EXTRACTION AND PRECONCENTRATION OF THE HERBICIDE GLYPHOSATE AND ITS METABOLITE AMPA USING ANION-EXCHANGE SOLID PHASES 107

2.1	ABSTRACT	109
2.2	INTRODUCTION.....	110
2.3	EXPERIMENTAL.....	112
	2.3.1 CHEMICALS	112
	2.3.2 INSTRUMENTATION.....	112
	2.3.3 PREPARATION OF SOLID-PHASE COLUMNS.....	112
	2.3.4 PRECONCENTRATION PROCEDURE.	113
	2.3.5 HPLC ANALYSIS	113
2.4	RESULTS AND DISCUSSION	114
	2.4.1 PARAMETERS AFFECTING ADSORPTION AND ELUTION PROCEDURES.....	114
	2.4.2 EXTRACTION AND PRECONCENTRATION PROCESS.....	116
	2.4.3 SPIKED NATURAL WATER SAMPLES.....	117
2.5	CONCLUSIONS.....	119
2.6	REFERENCES.....	120

2.1 ABSTRACT

An extraction and preconcentration method has been developed for the determination of glyphosate and its degradation product, aminomethylphosphonic acid (AMPA), over a broad range of concentrations (0,1-500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) in various aqueous matrices which differ in their ionic content. Two anion-exchange resins (the microporous Amberlite[®]IRA-416 and the macroporous Amberlite[®]IRA-900) and a commercial silica modified cartridge, ISOLUTE-NH₂[®], were evaluated and compared. The effect of flow-rate, composition and volume of the elution solution, analyte concentration, sample volume and porosity of the sorbents were investigated and the best experimental conditions were then used in the recovery of the analytes from spiked natural waters. Determination of the analytes was performed by HPLC with fluorescence detection, using FMOC-Cl as a pre-column derivatisation agent. Enrichment factors of up to 125 were achieved with the protonated ISOLUTE-NH₂[®] cartridge allowing the determination of glyphosate at a level of 0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Recovery rates of 99% for glyphosate and 77% for AMPA and relative standard deviations for repeatability of <10% for both analytes were determined with the Amberlite[®]IRA-900 macroporous resin.

2.2 INTRODUCTION

Analytical methods for the determination of phosphonic and amino acid-group-containing pesticides, including glyphosate [N-(phosphonomethyl)glycine], a widely-used broad-spectrum non-selective post-emergence herbicide, have recently been summarized [1]. Despite high levels of sensitivity being obtained by gas (GC) [2-5] and liquid chromatographic (LC) [6-11] methods, a preconcentration step is required for the determination of glyphosate and its primary metabolite aminomethyl phosphonic acid (AMPA) in environmental matrices, especially in the case of drinking-water samples (sub-ppm).

The amphoteric character of glyphosate and AMPA and the fact that both analytes are highly soluble in water [12,13] make it impossible to use conventional organic solvent extraction. Anionic and cationic resins have shown great effectiveness in the enrichment and clean-up of samples when a solid-phase extraction method (SPE) is applied [10,13-16]. Mallat and Barceló [13] obtained detection limits of 2 and 4 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ for glyphosate and AMPA, respectively using a Lichrolut EN cartridge coupled to an anionic ion-exchanger resin, Amberlite IRA 410-OH⁻ form, for the preconcentration and purification of 50 mL of water. A two-step clean-up based on ion-exchange chromatography [14], consisting of sample application to a column with an iron-loaded Chelex-100 resin followed by passing the solution through a column containing AG1X8 anion-exchange resin was developed for the determination of glyphosate and AMPA in water samples by gas chromatography coupled to tandem MS (GC-MS-MS). Patsias et al. [15] assayed different anion-exchanger cartridges, PRP-X100 and silica based trimethylaminopropyl and diethylaminopropyl, which were coupled on-line with LC using a PROSPEKT system.

An ion-exchanger mechanism was also used to transport glyphosate and AMPA through a supported liquid membrane containing a quaternary ammonium salt, Aliquat 336, which acts as an anion-exchanger carrier [17,18]. Enrichment factors of 19 for glyphosate and of 2.6 for AMPA were obtained with a hollow fiber module [18].

Both gas and liquid chromatography require derivatisation steps, which are necessary to produce volatile derivatives in GC and either chromophores or fluorophores for LC detection. The polar nature of the two analytes, combined with the compatibility of performing derivatisation in aqueous samples, make LC the most widely used technique. The derivatisation reagents for fluorescence detection are typically 9-fluorenylmethylchloroformate chloride (FMOC-Cl) reagent [6-8], which is used in a precolumn mode, and o-phthalaldehyde (OPA) [9-11,13], used in a post-column mode. The use of fluorogenic agents in precolumn mode together with pretreatment of the sample by liquid-liquid extraction allows the determination of glyphosate and AMPA in natural waters at 0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ levels [19, 20]. Other pre-derivatisation agents, such as 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene and p-toluensulphonyl chloride, have been used for UV-Vis detection, although with lower sensitivity [21, 22]. More sensitive and selective methods involving GC-MS/MS [14], HPLC-MS/MS [23] and ELISA [24,25] have recently been reported. Alternative techniques such as ion

chromatography [26] and capillary electrophoresis [27] have also been applied, although higher detection limits are obtained.

This study aims to develop a preconcentration and clean-up method using anion-exchange sorbents for the determination of glyphosate and AMPA. We evaluate and compare two strong polymeric anion-exchange resins (Styrene-divinylbenzene matrix), which differ in their porous size: Amberlite® IRA-416 is gel-type whereas Amberlite® IRA-900 is macroporous. In order to study the effect of the sorbent matrix, we have compared these two resins with ISOLUTE-NH₂, which has a silica base. The protonation of the amino group of ISOLUTE-NH₂ makes it act as a weak anion-exchange sorbent. The three sorbents are compared in terms of sample volume, pH, flow-rate and capacity and their efficiency is tested in the analysis of different types of natural waters.

2.3 EXPERIMENTAL

2.3.1 CHEMICALS

The chemicals employed were Glyphosate of 97.5% purity (Dr. Ehrenstorfer GmbH, Germany) and AMPA of 99% purity (Lancaster Synthesis, UK); Amberlite®IRA-416 (OH⁻), strong anion-exchanger resin with polystyrenedivinylbenzene (PS-DVB) (Carlo Erba Reagenti, Italy); Amberlite®IRA-900 (Cl⁻) (20-50 mesh), a strong anion-exchanger resin with a PS-DVB matrix (Fluka, Switzerland); and Isolute-NH₂®, a weak anion exchanger silica solid-phase cartridge (100 mg, 50 µm) (Symta, Spain). 9-fluorenylmethyl chloroformate (Fluka, Switzerland), was used as the derivatisation reagent. Acetonitrile, acetone and ethyl acetate, were all of HPLC grade (Carlo Erba, Italy and Romil Pure Chemistry, UK). All aqueous solutions were prepared with purified water (Milli-Qplus System, Millipore, Spain).

Glyphosate and AMPA stock calibration solutions of 250 µg·mL⁻¹ were separately prepared by dissolving a weighted amount of each analyte in ultrapure water. Working calibration solutions from 1 µg·L⁻¹ to 200 µg·L⁻¹ were produced by combining aliquots of each stock solution. An 0.025 mol·L⁻¹ borate buffer solution (pH 9) in HPLC-grade water and a solution of 0.01 mol·L⁻¹ Fmoc-Cl in acetone were used for the derivatisation of the analytes prior to their LC analysis.

2.3.2 INSTRUMENTATION

Analyses were carried out with a Spectra System liquid chromatograph (ThermoQuest, USA) equipped with an HPLC pump P2000, a model SCM1000 vacuum membrane degasser and a Rheodyne 7725 injection valve with a 100 µl loop (Cotati, California). A model FL3000 fluorescence detector (ThermoQuest, USA) set at 262 nm (excitation) and 316 nm (emission) was used.

Analyte separation was achieved with a 25 x 0.46 cm i.d. 5 µm Kromasil 100 NH₂ column (Tracer, Teknokroma) and a NH₂ precolumn (Tracer, Teknokroma).

A Minipuls 3 peristaltic pump (Gilson, France) and a fraction collector autosampler (Gilson, France) were used to monitor the adsorption/elution processes.

2.3.3 PREPARATION OF SOLID-PHASE COLUMNS.

In the case of resins, 1 g of dried sorbent was packed into a narrow glass column (ϕ 4.8 mm, 30 cm long). Amberlite®IRA-416, originally in OH⁻ form, was converted to the chloride form by preconditioning with 25 mL of 1 mol·L⁻¹ NaCl solution at a flow rate of 2 mL·min⁻¹, whereas Amberlite®IRA-900 was already supplied in Cl⁻ form.

Both resins were rinsed with 5 mL of ultrapure water at 2 mL·min⁻¹ before the sample application.

The ISOLUTE-NH₂ cartridge was previously converted into its protonate form with 25 mL of 1 mmol.L⁻¹ HCl (pH 3) at a flow rate of 2 mL·min⁻¹. The sorbent was washed with 5 mL of ultrapure water at the same flow rate before the introduction of the sample.

2.3.4 PRECONCENTRATION PROCEDURE.

Different volumes of spiked water with glyphosate and/or AMPA were applied to the resin at a constant flow rate of 5 mL·min⁻¹. After the loading step, the sorbent was washed with 10 mL of ultrapure water at 1 mL·min⁻¹ to remove interfering matrix components. Different elution solutions were then evaluated. Extraction and preconcentration procedures were monitored by determining the analyte content of the outlet solution collected using an autosampler.

2.3.5 HPLC ANALYSIS

0.2 mL of the aliquot sample was derivatised in a glass tube by adding 1.8 mL of 0.025 M borate buffer (pH 9), 1.8 mL of acetone and 0.2 mL of 9-fluorenylmethyl chloroformate solution (0.01 mol.L⁻¹ in acetone). The mixture was shaken and left for 25 min at room temperature. Excess Fmoc was then removed by double liquid-liquid extraction with 2 mL of ethyl acetate. A 100 µL aliquot of the aqueous solution was injected into the HPLC system.

Analyses were carried out under isocratic conditions at room temperature with a mobile phase consisting of a acetonitrile-0.05 mol.L⁻¹ phosphate buffer (pH 5.50) (35:65, v/v) at a flow rate of 1 mL·min⁻¹.

The quantification of both analytes was performed by external calibration with the working calibration solutions prepared after derivatisation.

2.4 RESULTS AND DISCUSSION

Both glyphosate and AMPA have amino, phosphonic and carboxylic functional groups in their structure (**Figure 2.1**) which can be either positively or negatively charged depending on the pH of the aqueous solution. They display a zwitterionic character with a predominance of negative charges in a broad pH range [12].

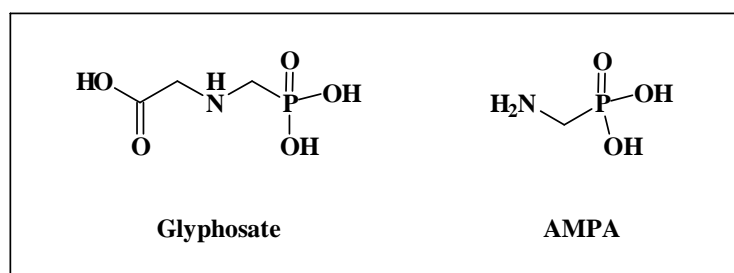


Figure 2.1. Structural formulae of glyphosate and AMPA.

In this study, which uses two polymeric resins and a silica commercial cartridge (**Table 2.1**), it is assumed that glyphosate and AMPA anions can be adsorbed through an ion-exchange mechanism. This mechanism involves an electrostatic interaction between the polar analytes and the ionogenic group of the sorbent, which can be exchanged.

	AMBERLITE IRA-416 (OH⁻)	AMBERLITE IRA-900 (Cl⁻)	ISOLUTE-NH₂
Appearance	Orange pearls	Beige pearls	White powder
Porosity	Microporous or gel type	Macroporous or macroreticular	60 A
Exchange mode	Strong anion exchange	Strong anion exchange	Weak anion exchange
Functional group	Type II (PS-DVB)-N ⁺ (CH ₂ CH ₂ OH)(CH ₃) ₂	Type I (PS-DVB)-N ⁺ (CH ₃) ₃	Silica-(CH ₂) ₃ NH ₂
Total exchange capacity	1.30 meq/ mL wet resin 2.12 meq/ g dry resin	1.16 meq/ mL wet resin 2.96 meq/ g dry resin	0.6 meq/ g dry sorbent
Density (wet)	740 g / L	700 g / L	-
Max. working temperature	35°C (OH ⁻) / 70°C (Cl ⁻)	60°C (Cl ⁻)	-
pH working range	1 - 14	1 - 14	2 - 8
Mesh size	14 - 52	20 - 50	50

Table 2.1. Main characteristics of the three sorbents tested.

2.4.1 PARAMETERS AFFECTING ADSORPTION AND ELUTION PROCEDURES

The efficiency of the extraction of glyphosate and AMPA using different sorbents was evaluated and compared, and the influence of flow-rate, sample pH, eluent, sample volume and analyte concentration on the extraction procedure was also investigated.

Firstly, the capacity of the resins to retain glyphosate at high levels (1 mg·L⁻¹) in milliQ water (pH=5) was tested at different flow-rates. A flow-rate of 5 mL·min⁻¹ was selected as, owing to the relatively fast kinetics of the ion-exchange mechanism, a quantitative adsorption of glyphosate was obtained working at flow-rates of up to this level. When the pH of the sample was fixed at 8, which is similar to that of natural waters, no decrease in analyte retention was

observed. Polymeric sorbents can be used for a wide variety of samples as they have greater pH stability (from 1-13) than silica sorbents (from 2-8).

In the case of the silica modified SPE cartridge, the amino group was previously protonated, and so the sample pH was a critical factor in adsorption efficiency. Quantitative retentions were obtained working with sample pH values between 2 and 5, and flow rates of up to $5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

Quantitative adsorption of glyphosate in 500, 100 and $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ solutions were obtained with the three sorbents evaluated. Breakthrough volume was only surpassed when 250 mL of a solution containing $500 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ of glyphosate and AMPA was applied to 1g of Amberlite®IRA-900 resin.

After attaining quantitative retention, the next step was to find an appropriate eluent. Solutions of different composition (**Figure 2.2**) were tested for their ability to quantitatively elute glyphosate from the sorbents.

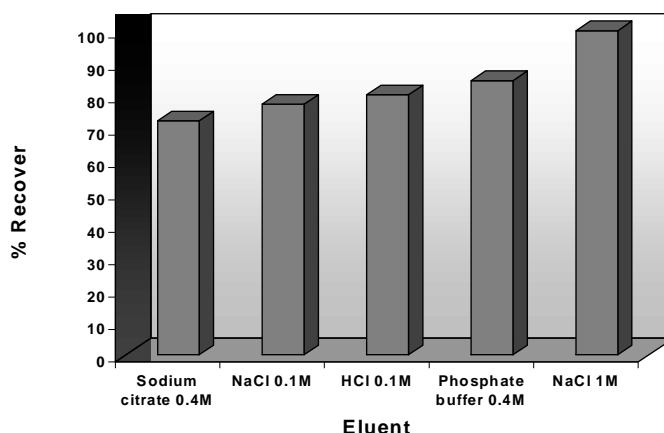


Figure 2.2. The efficiency of various solutions in eluting glyphosate from Amberlite®IRA-416. A 50 mL (pH=5) sample containing $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of glyphosate was applied to 1 g of resin. 15 mL of elution solutions was pumped at a flow rate of $5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

Complete recovery was obtained from the two polymeric resins with 15 mL of $1.0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl solution and from the silica sorbent using 2 mL of the same solution. Similar recovery rates were obtained with $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl and $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HCl indicating that elution processes occur as a consequence of the exchange of the Cl^- present in the solution for the glyphosate sorbed in the solid phase. Protonation of the functional groups of glyphosate, achieved at low pHs, was found to have little effect on its recovery. Although citrate has been reported to be an effective eluting agent with anion-exchange resins [13,28], we were unable to attain quantitative elutions of glyphosate from the sorbents studied. The effect of flow rate on elution was also tested and a flow rate of $5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ was finally selected, as in the adsorption step.

2.4.2 EXTRACTION AND PRECONCENTRATION PROCESS

The optimised method was tested to process samples containing mixtures of glyphosate and its main metabolite, AMPA, at a broad range of concentrations (**Table 2.2**). In the range of 0.3 to 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, glyphosate was quantitatively retained in all the sorbents. However, quantitative adsorption of AMPA was only achieved with AMBERLITE[®] IRA-900. From 45% to 55% of AMPA was adsorbed by the gel-type resin and 20-50% of this analyte was retained by the silica cartridge. In the elution step, the compounds extracted by the sorbents were totally recovered.

Spiking level ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	AMBERLITE [®] IRA-900				ISOLUTE-NH ₂			
	Glyphosate		AMPA		Glyphosate		AMPA	
	avg. recovery (%)	RDS (%)	avg. recovery (%)	RDS (%)	avg. recovery (%)	RDS (%)	avg. recovery (%)	RDS (%)
0.1	ND	ND	ND	ND	107	4	46	7
0.3	108	12	97	8	ND	ND	ND	ND
1	99	5	77	8	105	8	39	5
10	96	5	92	7	97	4	21	12

n=4; ND= non determined

Table 2.2. Recoveries obtained for the two sorbents tested. A 100 mL spiked sample was applied to the sorbents, 15 and 2 mL NaCl 1M for Amberlite[®] IRA-900 and Isolute-NH₂, respectively. Extraction was performed as in the experimental section.

The extraction efficiency of each sorbent was investigated when higher sample volumes were applied (**Figure 2.3**). The recoveries obtained for all the sorbents were acceptable, achieving enrichment factors of up to 115 when processing 250 mL of the sample with the commercial cartridge and up to 15 in the case of the polymeric resins. Using the most appropriate sorbent, detection limits (calculated as the lowest fortification level where analytes were detected with a signal-to-noise ratio > 3) better than 0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ for glyphosate and 0.3 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ for AMPA were achieved with 100 mL of ultrapure water. Recoveries of glyphosate and AMPA from milliQ water at a concentration level of 1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ using the macroporous resin, AMBERLITE[®] IRA-900, were 99 and 77 % respectively. The repeatability was also acceptable, even at the lowest fortification levels considered, with relative standard deviations (RDS) of analyte recoveries of <15% (n=4). This sorbent was used to develop an improved coupled-column LC method for the determination of glyphosate and AMPA residues in water [29].

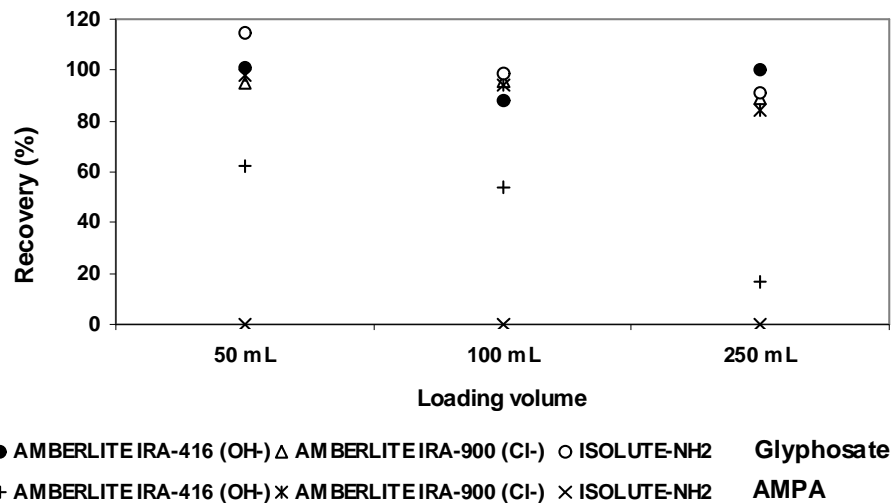


Figure 2.3. Comparison of recoveries obtained for the sorbents studied by applying different sample volumes ($0.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Experimental conditions are described in 3.1 section.

The results show that Amberlite[®]IRA-900 adsorbs AMPA more efficiently than Amberlite[®]IRA-416, which highlights the importance of porous size in the ion-exchange process. The larger pore size of the macroporous resin gives greater accessibility of AMPA to the ionogenic groups, improving the contact between the analyte and the anion-exchanger positions. It is also important to note that Amberlite[®]IRA-900 contains a trimethylammonium group (Type I), which results in a stronger basicity than Amberlite[®]IRA-416, a Type II resin with a dimethyl- β -hydroxyethyl ammonium group. In the case of the silica cartridge, AMPA is poorly extracted, which makes it useful only in the extraction of glyphosate. However, an increase in AMPA adsorption is observed when spiked samples at lower levels are treated. The limited affinity of such a hydrophylic compound for the silica matrix makes quantitative extraction more difficult.

2.4.3 SPIKED NATURAL WATER SAMPLES

The three sorbents were evaluated for their ability to extract and/or preconcentrate glyphosate and AMPA from spiked natural waters of different characteristics using the previously optimised method. Two types of water were studied: water from the River Ter (Girona) ($\text{pH}=8.17$, $90.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ sulphate, $46.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ chloride, $85.9 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Ca, $40.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Na, conductivity $674 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$) and water taken from the mouth of the same river ($\text{pH}=8.00$, $109.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ sulphate, $125.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ chloride, $96.8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Ca, $81.9 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Na, conductivity $1310 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$). After filtration through a $0.45 \mu\text{m}$ membrane, the samples were spiked with both analytes at concentration levels of 1 and $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

When Amberlite® IRA-416 was used, quantitative extraction of glyphosate from low salinity samples, and 50% in more complex ones was achieved. The extraction of AMPA was about 60% for both kinds of waters. The macroreticular resin, Amberlite® IRA-900, gave satisfactory results for glyphosate in all cases working at a low flow-rate of $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, but not for AMPA. Using river water fortified at $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, glyphosate and AMPA recoveries were 103 % and 57 %, respectively, with RDS between 9 % and 13 % ($n=4$). The use of this resin allows the elimination of the interferences and the determination of the analytes in river waters (**Figure 2.4**).

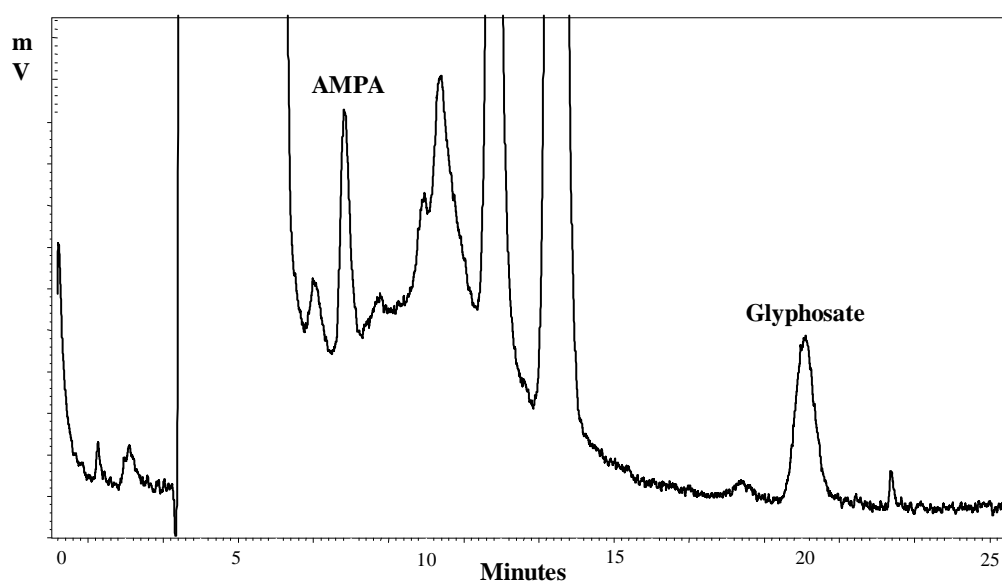


Figure 2.4. An example of a chromatogram of AMPA and Glyphosate ($1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) in 100 mL sample of surface water (River Ter, Spain) after Amberlite® IRA-900 extraction.

The results obtained with the silica cartridge were not as good. Although samples were previously acidified, neither glyphosate nor AMPA were adsorbed by the sorbent. In this case, the presence of organic and inorganic interferences prevented the adsorption of the analytes.

2.5 CONCLUSIONS

In this study glyphosate was quantitatively extracted by all the sorbents tested in a broad range of concentrations ($0.1\text{-}500\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), whilst only Amberlite®IRA-900 retained AMPA quantitatively. The complete elution of both analytes was obtained using 15 mL of $1\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl for both resins and 2 mL of this elution solution for the cartridge. Higher preconcentration factors were obtained when working with the silica cartridge ($\cong 125$) than with either of the two resins ($\cong 17$). The results allowed samples containing lower levels of herbicides to be concentrated and analysed. Using Amberlite®IRA-900, detection limits (calculated as the lowest fortification level where analytes were detected with a signal-to-noise ratio > 3) better than $0.1\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ for glyphosate and $0.3\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ for AMPA were achieved in the analysis of 100 mL of water.

The extraction and preconcentration methods developed in this study were applied to the analysis of natural waters of high ionic content fortified at $1\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ with glyphosate and AMPA. In case of both resins, recoveries of 90-100% were obtained for glyphosate and 50-60% for AMPA.

2.6 REFERENCES

- [1] C.D. Stalikas, C.N. Konidari, *J.Chromatogr. A*, 907 (2001) 1
- [2] H. Kataoka, S. Ryu, N. Sakiyama, M. Makita, *J. Chromatogr. A*, 726 (1996) 253
- [3] S.K. Konar, D.N. Roy, *Anal. Chim. Acta*, 229 (1990) 277
- [4] P.L. Eberbach, L.A. Douglas, *J.Agric. Food Chem.*, 39 (1991) 1776
- [5] C.D. Stalikas, G.A. Pilidis, *J. Chromatogr. A*, 872 (2000) 215
- [6] J.V. Sancho, F. Hernández, F.J. López, E.A. Hogendoorn, E. Dijkman, P. Van Zoonen, *J. Chromatogr. A*, 737 (1996) 75
- [7] F. Hernández, C. Hidalgo, J.V. Sancho, *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.*, 83 (3) (2000) 728
- [8] E.A. Hogendoorn, F.M. Ossendrijver, E. Dijkman, R.A. Baumann, *J.Chromatogr. A*, 833 (1999) 67
- [9] M.E. Oppenhuizen, J.E. Cowell, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 74 (2) (1991) 317
- [10] M.P. Abdullah, J. Daud, K.S. Hong, C.H. Yew, *J. Chromatogr. A*, 697 (1995) 363
- [11] K.M.S. Sundaram, J. Curry, *J. Liq. Chrom Rel. Technol.*, 20 (4) (1997) 511
- [12] D. Wauchope, *J. Agric. Food Chem.*, 24 (1976) 717
- [13] E. Mallat, D. Barceló, *J. Chromatogr. A*, 823 (1998) 129
- [14] A. Royer, S. Beguin, J.C. Tabet, S. Hulot, M.A. Reding, P.Y. Communal, *Anal. Chem.*, 72 (2000) 3826
- [15] J.Patsias, A. Papadopoulou, E. Papadopoulou-Mourkidou, *J. Chromatogr. A*, 932 (2001) 83
- [16] E. Böerjesson, L. Torstensson, *J. Chromatogr. A*, 886 (2000) 207
- [17] P. Dzygiel, P. Wieczorek, *J. Chromatogr. A*, 889 (2000) 93
- [18] C. Ríos, V. Salvadó, M. Hidalgo, *J. Membr. Sci.*, 203 (2002) 201
- [19] E. Le Fur, R. Colin, C. Charrêteur, C. Dufau, J.J. Péron, *Analisis*, 28 (2000) 813
- [20] R. Colin, E. Le Fur, C. Charrêteur, C. Dufau, J.J. Péron, *Analisis*, 28 (2000) 819
- [21] S. Kawai, B. Uno, M. Tomita, *J. Chromatogr.*, 540 (1991) 411
- [22] S.Y. Chang, C.H. Liao, *J.Chromatogr. A*, 959 (2002) 309
- [23] R.J. Vreeken, P. Speksnijder, I. Bobeldijk-Pastorova,Th.H.M. Noij, *J. Chromatogr. A*, 794 (1998) 187
- [24] E.A. Lee, L.R. Zimmerman, B.S. Bhullar, E.M. Thurman, *Anal. Chem.*, 74 (2002) 4937
- [25] F. Rubio, L.J. Veldhuis, B.S. Clegg, J.R. Fleeker, J.C. Hall, *J. Agric. Food Chem.*, 51 (2003) 691
- [26] Zhu Y, Zhang F, Tong C, Liu W, *J.Chromatogr. A*, 850 (1999) 297
- [27] M.G. Cikalo, D.M. Goodall, W. Matthews, *J.Chromatogr. A*, 745 (1996) 189
- [28] Y.Y. Wigfield, M. Lanouette M, *Anal. Chim. Acta*, 233 (1990) 311
- [29] C. Hidalgo, C. Ríos, M. Hidalgo, V. Salvadó, J.V. Sancho, F. Hernández, *J.Chromatogr. A*, 1035 (2004) 153

CHAPTER 3

**DETERMINATION OF GLYPHOSATE AND
AMINOMETHYLPHOSPHONIC ACID IN
NATURAL WATER USING THE
CAPILLARY ELECTROPHORESIS
COMBINED WITH ENRICHMENT STEP**

CHAPTER 3

DETERMINATION OF GLYPHOSATE AND AMINOMETHYLPHOSPHONIC ACID IN NATURAL WATER USING THE CAPILLARY ELECTROPHORESIS COMBINED WITH ENRICHMENT STEP 121

3.1	ABSTRACT	123
3.2	INTRODUCTION	124
3.3	EXPERIMENTAL	126
	3.3.1 CHEMICALS AND REAGENTS	126
	3.3.2 CE ANALYSIS	126
	3.3.3 HPLC ANALYSIS	126
	3.3.4 ENRICHMENT SYSTEM	127
3.4	RESULTS AND DISCUSSION	128
	3.4.1 ENRICHMENT SYSTEM	128
	3.4.2 COMPARISON OF CE VERSUS HPLC	131
3.5	REFERENCES	133

3.1 ABSTRACT

A previously elaborated capillary electrophoresis (CE) method used for the determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) was slightly modified in order to improve the sensitivity. However, detection limits attained ($5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for glyphosate and $4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for AMPA) were still not satisfactory for analytical purposes, thus the addition of a preconcentration step before the CE analysis was proposed. AMBERLITE®IRA-900, a strong anion-exchange resin, was used to preconcentrate both analytes in environmental aqueous samples. The experimental conditions optimised in a previous work were readapted, by decreasing the eluent concentration due to CE limitations. Satisfactory results were attained when spiked ultrapure water was applied, with recoveries from 84 to 87 % for glyphosate (RSD<6%) and from 85 to 98 % for AMPA (RSD<5%). Enrichment factors up to 65 were achieved with this system, allowing the determination of $85 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ of glyphosate and $60 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ of AMPA. The extraction efficiency varied when four different natural water samples of varying conductivity were applied. Especially the strong dependence on ion concentration in samples on AMPA recovery was found. For glyphosate, good recoveries (86 to 99%) were obtained for samples of low and medium conductivity ($0\text{-}800\mu\text{S}$). The effect of sample salt content on extraction efficiency was studied and a linear relationship could be established for AMPA ($r^2=0.996$). An important improvement on recoveries was observed when lower volumes of sample were treated.

A HPLC method with UV-VIS detection and pre-column derivatisation with p-toluensulphonyl chloride was compared to the CE method. No significant differences in results were found when t- and F- statistical tests were applied.

3.2 INTRODUCTION

Glyphosate, [N-(phosphonomethyl)glycine], is a non-selective, post-emergence herbicide extensively used in various applications for weed and vegetation control. Numerous commercial formulations containing glyphosate as the active ingredient are becoming increasingly popular all over the world not only due to its high herbicidal activity but also because of its low mammalian toxicity. Aminomethylphosphonic acid (AMPA) is the principal degradation product of glyphosate. Due to the strict European legislation, which establishes the limits of concentration at sub-ppb levels, pesticides must be monitored mainly in water and soils, but also in other matrices such as fruits, vegetables and products of animal origin, because of their presence in the food chain.

Several analytical procedures have been successfully applied for determination of glyphosate and AMPA in variety of environmental matrices, in which these compounds can be found. The most common techniques are: gas chromatography (GC) with flame photometric [1], thermoionic [2], electron capture [3,4], MS [5] and MS/MS detection [6]; liquid chromatography (LC) with UV-Vis [7], fluorescence [8-13] and MS detection [14]; capillary electrophoresis (CE) with UV-Vis [15], fluorescence [16,17] and MS [18] detectors; and ion chromatography [19,20]. Promising results of the application of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) have also been reported [21,22]. Depending on the method used, the detection system usually requires a previous conversion of analytes to volatile or chromophore derivatives. A comprehensive review of the analytical methods, as well as sample pretreatment is given in recent review [23]. However, some of these techniques are still not sensitive and selective enough to determine glyphosate and AMPA in complex matrices at the required levels (0.1 ppb for a single pesticide in drinking water). In these cases, extraction and preconcentration procedures before the analytical determination are indispensable. The chemical properties that contribute to the effectiveness of glyphosate as a herbicide (polar nature and high water solubility), complicate extraction of these compounds from aqueous matrices, making the recovery of glyphosate and its metabolite from field samples the main difficulty in their analysis.

A great variety of sample pretreatment techniques have also been developed for extraction and preconcentration of herbicides from natural waters. These include liquid-liquid extraction (LLE), solid-phase extraction (SPE), solid supported-liquid membranes (SLM) [24,25], ion-exchange chromatography [26, 27] and, more recently, immobilised metal ion affinity chromatography (IMAC) [28]. The selectivity of these techniques becomes a crucial parameter for the extraction efficiency of the analytes, especially from complex matrices. However, the recovery of both phosphonic acids from water samples characterised by high conductivity (ie. high contents of inorganic ions and organic compounds as well) interfere with the retention of mechanism of ion exchanger and cause appearance of misleading results [26, 27].

The main goal of this work was to examine the effect of conductivity and concentration of the sample on extraction efficiency of glyphosate and AMPA in pure and natural waters using a

preconcentration step. Previously developed extraction method of glyphosate and AMPA by means of ion-exchange chromatography is applied in order to achieve the following objectives:

- to improve the detection limits reported for glyphosate and AMPA in natural water using CE with UV indirect detection;
- to evaluate a usefulness of polymeric resin, AMBERLITE® IRA-900, for the preconcentration of glyphosate and AMPA from natural water samples with a wide range of salt content and to study a possible relationship between extraction efficiency and sample conductivity;
- to compare the results obtained by CE with those previously obtained by HPLC with UV detection applying a pre-column derivatisation with *p*-toluenesulphonyl chloride.

3.3 EXPERIMENTAL

3.3.1 CHEMICALS AND REAGENTS

The chemicals used in this study were obtained from the following sources: Amberlite® IRA-900 (Cl⁻) (20-50 mesh), strong anion-exchanger resin with PS-DVB matrix, from Fluka (Switzerland); potassium phthalate and tetradecyltrimethylammonium bromide (TTAB), from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA); other inorganic salts, from Sigma (Poland) and Panreac (Spain); the derivatisation reagent, *p*-toluenesulphonyl chloride, from Aldrich (Germany); acetonitrile of HPLC grade, from Carlo Erba (Italy). Glyphosate was supplied by Dr. Ehrenstorfer GmbH (Germany) and AMPA by Lancaster Synthesis (UK). All the aqueous solutions were prepared by using water purified with a Milli-Q plus system (Millipore, Bedford, MA, USA).

3.3.2 CE ANALYSIS

The CE analysis was performed on a P/ACE 5000 CE system (Beckman, Palo Alto, CA, USA) according to the method previously described by Cikalo et al. [16]. Capillary zone electrophoresis (CZE) was performed in a fused-silica capillary [57 cm (effective length 50 cm) X 75 µm I.D. X 375 µm O.D.] obtained from Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, USA). The capillary was conditioned before use for approximately 1h: 5 min in H₂O, 25 min in 0.1 M NaOH, 15 min in H₂O, 15 min in BGE, and then electrophoresed for 20 min. Analytes were loaded in a 10 s injection (80 p.s.i., pressurised nitrogen) and their electrophoretic separation was performed under reverse polarity conditions at 27 kV. The background electrolyte (BGE) was 50 mM potassium phthalate with 0.5 mM TTAB, used as an electroosmotic flow (EOF) reverser, adjusted to pH 7.5 with NaOH solution. The external capillary temperature was fixed at 25°C. The capillary was rinsed before each injection with 0.1 M NaOH (0.5 min) and BGE (1min). A UV detector on the capillary window set a 254 nm was used for the detection of the analytes.

The quantification of both analytes was performed by external calibration with the working calibration solutions prepared.

3.3.3 HPLC ANALYSIS

A model LC-9A high-performance liquid chromatograph (Shimadzu, Kyoto, Japan) equipped with a UV-Vis detector set at 240 nm was used for the separation and determination of glyphosate and AMPA as described in [8]. Samples were injected using a Rheodyne valve 7725 equipped with a 20 µm loop (Cotati, California). The HPLC separation was performed on a 20 x 0.46 cm I.D. Hypersil ODS-5 column (Tracer, Teknokroma) using a mobile phase consisting of 0.06 M phosphate buffer (pH 2.30 adjusted with NaOH) and acetonitrile (85:15, v/v) at a flow rate of 1 mL·min⁻¹. Analyses were carried out under isocratic conditions at room temperature.

1 mL aliquots of samples were derivatised in glass tubes by adding 0.5 mL of 0.4 M phosphate buffer (pH 11) and 0.2 mL of p-toluenesulphonyl chloride solution (10 mg/mL in acetonitrile). This mixture was heated in a water bath for 5 min at 50°C. A 20 µL aliquot of the reaction mixture was injected into the HPLC system.

The quantification of both analytes was performed by external calibration with the standard calibration solutions prepared after derivatisation.

3.3.4 ENRICHMENT SYSTEM

A wet resin (4 ml) was packed into a narrow glass column (5.0 mm diameter, 25 cm long). The sorbent was initially rinsed with 5 mL of ultrapure water at a flow rate of 2 mL·min⁻¹. Next, various volumes of water samples spiked with glyphosate and AMPA were passed through the resin at 5 mL·min⁻¹ using a Minipuls 3 peristaltic pump (Gilson, France). Interfering matrix components were then removed from the sorbent by washing with 10 mL of ultrapure water at 1 mL·min⁻¹. Finally, the analytes were eluted with, 15 mL of 0.1 M / 1 M NaCl. This solution was analysed using the previously described methods.

Conductivity measurements were performed with a digital conductivity meter 524 (Crison, Spain).

3.4 RESULTS AND DISCUSSION

A capillary electrophoresis (CE) method originally developed by Cikalo et al. [16] for the determination of glyphosate and AMPA was slightly modified in our laboratory in order to improve the detection limits (LOD). The modifications included changes in the capillary size (75 μm , $L_T = 57$ cm, $L_{\text{eff}} = 50$ cm), the hydrodynamic injection time (10 s), the separation voltage (27 kV) and the detection wavelength (254 nm). With these conditions, calibration curves from 0.03 mM to 5 mM for both analytes were prepared (5-850 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for glyphosate and 4-550 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for AMPA) and linear response was obtained over the entire concentrations range (two orders of magnitude) receiving 95% confidence limits:

$$\text{Glyphosate: } (153.7 \pm 2.6)x + (-130.6 \pm 958.9) ; r=0.9993 ; N=7$$

$$\text{AMPA: } (203.1 \pm 3.6)x + (-734.4 \pm 853.4) ; r=0.9992 ; N=7$$

The reproducibility of the method was confirmed by a triplicate-time injection of each standard, with relative standard deviations (RSDs) lower than 5% in all cases.

When the method is applied to the analysis of real environmental samples, limits of detection for both analytes unfortunately increased, because the high concentration of salts affected the peak shape. The decreasing of the LOD has been so far achieved by other kinds of sample injection, such as electrokinetic, stacking or field-amplification. However, these possibilities should be rejected because of problems reported for the analysis of real samples, especially for those with high conductivity [15]. Thus, the determination of glyphosate and AMPA in real water samples characterised by lower concentrations of these compounds by CE is still questionable. Therefore, we propose to use a polymeric resin for extraction and/or preconcentration step prior to the CE analysis.

3.4.1 ENRICHMENT SYSTEM

In a previous study a preconcentration method for glyphosate and AMPA from natural waters prior to HPLC determination was developed [29]. The analytes, which are in anionic form in a broad range of pH [23], were retained on an anion-exchange resin, AMBERLITE®IRA-900. The influence of weight of adsorbent, loading and elution flow-rate, sample pH and eluent were investigated. A complete adsorption of glyphosate and AMPA was attained in the concentration range 0.3-500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. The best recoveries for both analytes from the adsorbent were obtained when chloride ions were present during the elution step (80-100%), indicating that the process took place by the exchange of chloride ions for the analytes adsorbed on the resin.

In this study we have evaluated the usefulness of the same system for the extraction and enrichment of glyphosate and AMPA at ppb levels in natural water samples prior to determination by capillary electrophoresis.

In the original study 1 M NaCl was chosen as the best eluent, but it was not possible to analyse standards with this matrix by CE. The high salt content of the samples led to the appearance of peaks in the electropherogram, which did not allow the interpretation of the results. Therefore, a more diluted solution (0.1 M NaCl) was used as the eluent, since similar recoveries of our analytes from the resin were obtained (90%) and the electropherograms could be easily interpreted (see **Figure 3.1**). Other experimental conditions were taken from the cited work [15].

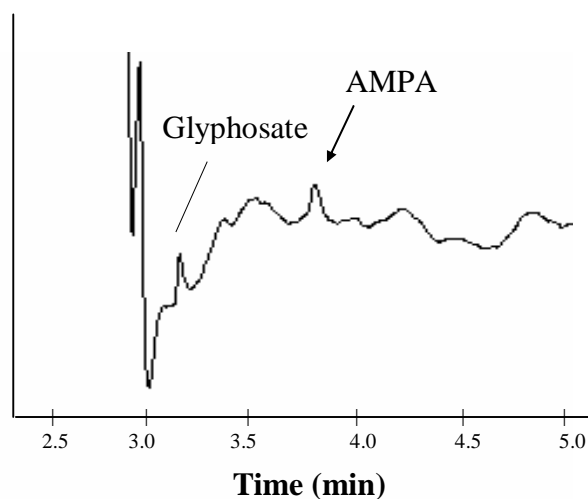


Figure 3.1. Electropherogram obtained for a $15 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ standard of glyphosate and AMPA in 0.1 M NaCl.

- **INFLUENCE OF SAMPLE CONCENTRATION ON EXTRACTION EFFICIENCY**

The effect of glyphosate and AMPA concentration on the enrichment process was studied. The obtained results for MilliQ pure water are listed in **Table 3.1**. It could be concluded that for concentrations below $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, the recoveries are acceptable and not significantly different for both analytes, whereas at upper range of concentrations the resin was saturated, and a drastic decrease of the extraction efficiency was observed, especially for AMPA. However, an improvement in the recoveries of both analytes can be noticed when the initial concentration of the sample is smaller (200 ppb in comparison to 1000 ppb), which probably resulted from the limited capacity of the adsorbent.

At the same time, enrichment factors up to 65 were achieved with the system when processing samples of 1 L volume, so concentrations of $85 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ of glyphosate and $60 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ of AMPA might be easily determined in pure water samples. These results have shown that important improvement of LODs both for glyphosate or AMPA is achieved by applying the developed preconcentration method prior to CE analysis.

Replicates	V sample mL	Conc sample ppb	GLYPHOSATE % Recovery (RSD)	AMPA % Recovery (RSD)
N=3	1000	200	87.4 (5.9)	97.6 (3.4)
N=3	300	500	86.2 (2.3)	93.4 (1.3)
N=3	300	1000	84.5 (8.0)	85.2 (4.9)
N=3	300	5000	67.8 (4.9)	24.8 (4.7)

Each experiment performed in triplicate

Table 3.1. Effect of glyphosate and AMPA concentration on extraction efficiency. Sample: pure water spiked with both analytes, loading flow-rate: 5 mL·min⁻¹, rinsing: 10 mL water, 1 mL·min⁻¹, elution: 15 mL 0.1 M NaCl, 1 mL·min⁻¹.

• INFLUENCE OF SAMPLE CONDUCTIVITY ON EXTRACTION EFFICIENCY

The concentration of inorganic salts in the analysed samples appeared to be of vital importance for the obtained recoveries. Thus, the effect of the salt content (given as sample conductivity) in the sample on the extraction efficiency has also been studied. Four natural water samples from different sources (their pH and conductivity values are given in **Table 3.2**) were used applying the enrichment system developed. **Figure 3.2** shows the dependence of the extraction efficiency of AMBERLITE®IRA-900 for both analytes when samples of different salt content were used. For glyphosate, good extraction efficiencies (86 to 99% (*RSD* < 10%)), were obtained when samples of low or medium conductivity values were preconcentrated (from 0 to 800 μ S), followed by a linear decrease of recoveries at conductivities above 800 μ S ($r^2 = 0.94$). In contrast, AMPA is only quantitatively extracted when pure water was passed through the adsorbent. In environmental samples, a linear relationship between conductivities and AMPA extraction efficiency was observed, namely in samples of conductivities from 500 to 2000 μ S ($r^2 = 0.996$), although the maximum recovery is only around 50%.

ORIGIN	pH	Conductivity (μ S)
Tap water	7.93	553
Izbicka Steam	8.52	739
Odra River 1	7.30	1116
Odra River 2	8.37	1906

Table 3.2. Characteristics of natural waters used to study the effect of their conductivity on the recoveries of the analytes.

On the other hand, an improvement on recoveries of both analytes can be achieved. For example, loading the resin with 150 mL of spiked water from Odra River instead of 300 mL, approximately doubled the recoveries: from 30 % to 48 % in case of glyphosate and from 22 % to 48 % for AMPA ($n = 3$) was obtained.

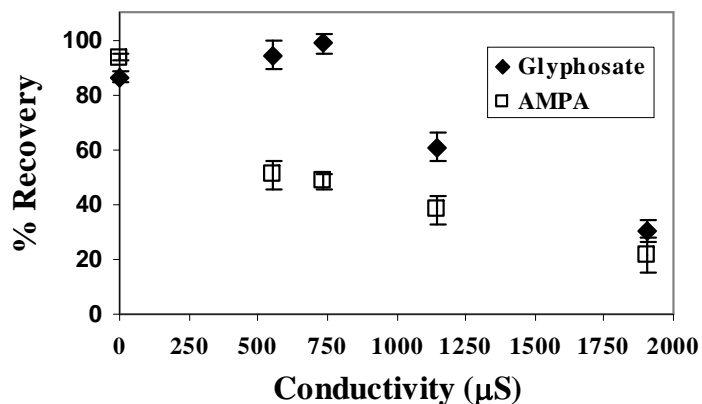


Figure 3.2. Relationship between the recovery of glyphosate and AMPA and sample conductivity. N = 3, Sample volume = 300mL, Sample concentration = 500 µg·L⁻¹. Each experiment was performed in triplicate.

In conclusion, the strict dependence of the extraction efficiency on the conductivity of the sample was demonstrated when applying AMBERLITE®IRA-900 resin. The lack of selectivity of this adsorbent produces a strong competition between the analytes and other anions present in natural waters (directly related to the sample conductivity). The application of procedure proposed in this work, enables to handle the samples of high ionic strength and to receive reasonable results when analysing samples of low glyphosate and AMPA concentrations.

3.4.2 COMPARISON OF CE VERSUS HPLC

Usually, most of analytical methods developed for the determination of glyphosate and AMPA require derivatization step before or after the separation in order to convert both phosphonic acids in chromophore derivatives. Indirect detection is a good alternative because it reduces the time of analysis for analytes with little or no absorbance. However, reaching similar LODs is only possible with a right choice of the probe (absorbing species added to the background electrolyte) [30]. In this part of the study the results obtained with both HPLC and CE methods using the enrichment of samples by means of AMBERLITE®IRA-900 resin are compared.

The results obtained for pure and natural waters by both analytical methods are presented in **Fig. 3.3**. As it can be seen, the results for spiked MilliQ water (500 µg·L⁻¹) are very similar for both analytes when using either CE or HPLC method. Comparison of average recoveries for glyphosate and AMPA, determined by both methods, by statistical analysis (t- and F- tests) revealed no significant differences (P = 0.05). However, when using natural water samples different results were obtained for glyphosate and AMPA. When analysing glyphosate similar results were achieved by both analytical methods, which is illustrated by no differences in statistical significance (P = 0.05). In contrast, recoveries of AMPA were quite different and are probably due

to the effects of sample type on detection system used, although the conductivity of the samples was the same. The obtained results of recoveries and limits of detection are lower than those received for glyphosate and AMPA determination in water samples using HPLC analysis after anion-exchange resin for preconcentration reported earlier. However, according to the authors of previous procedure the application of their method for real samples is problematic, especially if taking into consideration natural waters with high salt content [31].

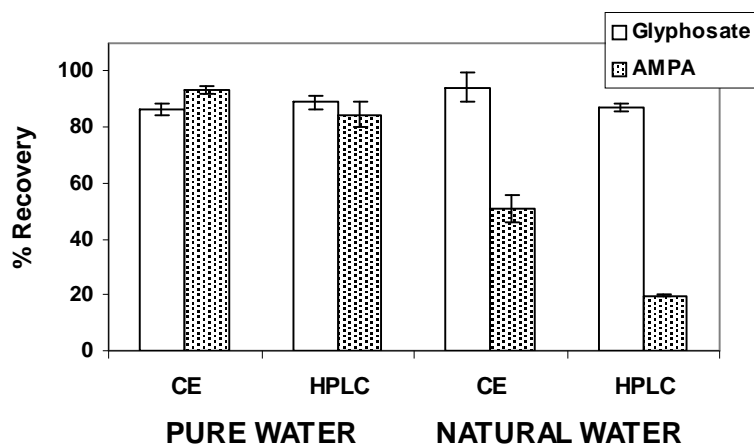


Figure 3.3. Comparison of the results obtained by CE with indirect detection and HPLC with pre-column derivatization with *p*-TsCl for different water samples (pure water versus natural water, 560 μ S).

Sample volumes: 300mL, Sample concentrations: 500 μ g·L⁻¹. N = 3. Each experiment was performed in triplicate.

To summarize, the preconcentration system developed for HPLC analysis could also be successfully applied to CE method, although requires modification of the eluent composition. Glyphosate concentration might be effectively determined in samples of low to medium conductivity with both methods, but sample volume must be adjusted to the required sensitivity. It should be pointed out, however, that CE seems to be a method of choice since it is much cheaper and less time consuming if comparing HPLC.

The analysis of AMPA, the main metabolite of glyphosate, seems to be more problematic and results from the fact that is poorly extracted by the resin from samples of high concentration of salts.

3.5 REFERENCES

- [1] H. Kataoka, S. Ryu, N. Sakiyama, M. Makita, *J. Chromatogr. A*, 726 (1996) 253
- [2] S. K. Konar, D. N. Roy, *Anal. Chim. Acta*, 229 (1990) 277
- [3] P. L. Eberbach, L. A. Douglas, *J. Agric. Food Chem.*, 39 (1991) 1776
- [4] C. D. Stalikas, G. A. Pilidis, M. I. Karayannis, *Chromatographia*, 51 (2000) 741
- [5] A. Royer, S. Beguin, J. C. Tabet, S. Hulot, M. A. Reding, P. Y. Communal, *Anal. Chem.*, 72 (2000) 3826
- [6] Z. H. Kudzin, D. K. Gralak, J. Drabowicz, J. Luczak, *J. Chromatogr. A*, 947 (2002) 129
- [7] S. Kawai, B. Uno, M. Tomita, *J. Chromatogr. A*, 540 (1991) 411
- [8] J. V. Sancho, F. Hernández, F. J. López, E. A. Hogendoorn, E. Dijkman, P. Van Zoonen, *J. Chromatogr. A*, 737 (1996) 75
- [9] F. Hernández, C. Hidalgo, J. V. Sancho, *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.*, 83 (3) (2000) 728
- [10] E. A. Hogendoorn, F. M. Ossendrijver, E. Dijkman, R. A. Baumann, *J. Chromatogr. A*, 833 (1999) 67
- [11] T.V. Nedelkoska, G.K.-C. Low, *Anal. Chim. Acta*, 511 (2004) 145
- [12] M. P. Abdullah, J. Daud, K. S. Hong, C. H. Yew, *J. Chromatogr. A*, 697 (1995) 363
- [13] K. M. S. Sundaram, J. Curry, *J. Liq. Chrom Rel. Technol.*, 20 (4) (1997) 511
- [14] R. J. Vreeken, P. Speksnijder, L. Bobeldijk-Pastorova, Th. H. M. Noij, *J. Chromatogr. A*, 794 (1998) 187
- [15] M. G. Cikalo, D. M. Goodall, W. Matthews, *J. Chromatogr. A*, 745 (1996) 189
- [16] M. Molina, M. Silva, *Electrophoresis*, 23 (2002) 1096
- [17] M. Molina, M. Silva, *Electrophoresis*, 23 (2002) 2333
- [18] L. Goodwin, J.R. Startin, B.J. Keely, D.M. Goodall, *J. Chromatogr. A*, 1004 (2003) 107
- [19] K. H. Bauer, T. P. Knepper, A. Maes, V. Schatz, M. Voihsel, *J. Chromatogr. A*, 837 (1999) 117
- [20] J. You, J.A. Koropchak, *J. Chromatogr. A*, 989 (2003) 231
- [21] E. A. Lee, L. R. Zimmerman, B. S. Bhullar, E. M. Thurman, *Anal. Chem.*, 74 (2002) 4937
- [22] F. Rubio, L. J. Veldhuis, B. S. Clegg, J. R. Fleeker, J. C. Hall, *J. Agric. Food Chem.*, 51 (2003) 691
- [23] C. D. Stalikas, C. N. Konidari, *J. Chromatogr. A*, 907 (2001) 1
- [24] P. Dzygiel, P. Wieczorek, *J. Chromatogr. A*, 889 (2000) 93
- [25] C. Rios, V. Salvadó, M. Hidalgo, *J. Membr. Sci.*, 203 (2002) 201
- [26] E. Mallat, D. Barceló, *J. Chromatogr. A*, 823 (1998) 129
- [27] J. Patsias, A. Papadopoulou, E. Papadopoulou-Mourkidou, *J. Chromatogr. A*, 932 (2001) 83
- [28] C. Rios, V. Salvadó, M. Hidalgo, *J. Sep. Sci.*, 27 (7-8) (2004) 602
- [29] M. Corbera, V. Salvadó, M. Hidalgo, *Micropchim. Acta*, 153 (2006) 203
- [30] P. Doble, M. Macka, P. R. Haddad, *Trends Anal. Chem.*, 19 (1) (2000) 10
- [31] C. Hidalgo, C. Rios, M. Hidalgo, V. Salvado, J. V. Sancho, F. Hernández, *J. Chromatogr. A*, 1035 (2004) 153

CHAPTER 4

**CHARACTERIZATION OF
ETHOXYLATED ALKYLAMINES (ANEOs)
IN COMMERCIAL HERBICIDE
FORMULATIONS USING LIQUID
CHROMATOGRAPHY-ELECTROSPRAY
MASS SPECTROMETRY**

CHAPTER 4
CHARACTERIZATION OF ETHOXYLATED ALKYLAMINES (ANEOs) IN COMMERCIAL HERBICIDE FORMULATIONS USING LIQUID CHROMATOGRAPHY-ELECTROSPRAY MASS SPECTROMETRY 135

4.1 ABSTRACT 137

4.2 INTRODUCTION 138

4.3 EXPERIMENTAL 140

 4.3.1 MATERIALS 140

 4.3.2 INSTRUMENTAL ANALYSIS 140

4.4 RESULTS AND DISCUSSION 142

 4.4.1 CHROMATOGRAPHY 142

 4.4.2 MASS SPECTROMETRY 145

 4.4.3 ANALYTICAL FEATURES 145

 4.4.4 ANALYTICAL APPLICATIONS 148

4.5 REFERENCES 151

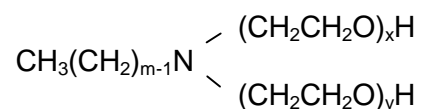
4.1 ABSTRACT

A quantitative method is described for the characterization of ethoxylated alkylamines (ANEOs) surfactants in commercial herbicide formulations using reversed-phase high-performance liquid chromatography with electrospray mass spectrometry detection. The proposed protocol allows the simultaneous analysis of a full range of oligomers which were monitored as $[M-H]^+$ ions in positive ion mode. Instrumental detection limits (LOD) were 0.5 μg . The developed method was successfully applied to the analysis of ANEOs in a number of glyphosate formulations. The total concentration of these surfactants and also the oligomer distribution was found to be different in the commercial herbicides analyzed. The precision of the determination of the oligomers in samples ranged from 0.5 to 15 %.

4.2 INTRODUCTION

Pesticides are generally sold and applied in agriculture as formulations. These commercial formulations usually contain mixtures of specific substances called adjuvants which are added in order to enhance the effectiveness of the active ingredient or pesticide. Among adjuvants, surfactants (*surface active agents*) are the most used in herbicide formulations as emulsifiable concentrates, microemulsions or wetting and dispersing agents for wettable powders, water dispersible granules and suspension concentrates. They can also be used as spray-tank additives to enhance their adhesion and wetting of foliage and plant uptake [1].

Generally, surfactants are classified into four groups; anionic, cationic, non-ionic and amphoteric. Non-ionic surfactants have shown to be the most used in agrochemical formulations. These compounds allow an efficient delivery of the active ingredient to the target sites required for the herbicide activity, especially for foliage-applied systemic compounds such as glyphosate [2]. In fact, commercial glyphosate formulations usually contain ethoxylated alkylamines (ANEOs) as surfactants. ANEOs are industrially prepared by reaction of alkylamines, derived from natural fats or oils (coconut, lauryl, tallow, oley, etc.) with ethylene oxide (EO) at increased pressure and temperature [3]. The original natural product is actually a mixture of various fatty acids, which distribution determines the length of the alkyl chains of the final ANEOs. The resulting ANEOs are technical mixtures of alkylamines with the general structure C_mNEO_n ; $n=x+y$:



The role of adjuvants on foliar uptake of glyphosate formulations has been widely studied [2,4,5,6]. In the presence of surfactants, the herbicide uptake depends on at least three factors: concentration and physicochemical properties of active ingredients, chemical structure and concentration of surfactants and leaf surface character of the plant species [3]. It is generally recognised that not every surfactant can increase the uptake of any herbicide. Therefore, information about the content and the complete composition of these formulations is necessary, involving both the active ingredient and the added adjuvants.

On the other hand, the characterisation of these alkylamine mixtures is also required due to their different toxicity. In this way, it has been reported that the toxicity for some species depends on the length of both alkyl and ethoxylated chains [7]. Until recently, research on pesticides has focused mainly on the environmental problems of the active ingredients, but environmental toxicity and risk of adjuvants are becoming important subjects to take into account [7,8]. For this purpose, more analytical information about these formulations could lead to a more

appropriated field application and in this way to avoid unnecessary amounts of these compounds in the environment.

A great variety of analytical methods for glyphosate determination have been recently reviewed [9], but only a few works referring to ANEO's analysis have been reported [3,10-12]. These methods involve a previous chromatographic separation followed by fluorescence [3], mass evaporative [10] or MS [11,12] detection of the analytes. However, only mass spectrometry allows the simultaneous determination of both alkyl and ethoxymer homologues. Other methods involve two determinations, a first one for the alkyl homologues by reversed-phase LC and a second one for the individual oligomers by normal-phase LC [3,10].

Other non-ionic surfactants such as alkyphenol ethoxylates [13,14] or alcohol ethoxylates [15] with similar characteristics to ANEO compounds have been widely characterized by HPLC-MS. Considering the effectiveness of HPLC-MS to determine alkyphenol ethoxylates and the methods previously reported on the determination of ANEOs, this methodology seems to be the most suitable technique [16,17] given the capability of mass spectrometry for the easy identification of the different alkylamine homologues. The aim of this work is to develop an analytical method based on HPLC-MS that provide rapid structural and quantitative information of the surfactants (ANEOs) presents in commercial glyphosate formulations, including distribution of alkyl chains, ethoxylated chains and also information about the distribution of unsaturated alkyl chains. To our knowledge unsaturated ANEOs have been only barely considered and their systematic determination in commercial formulations has not been previously described.

4.3 EXPERIMENTAL

4.3.1 MATERIALS

Acetonitrile and methanol for HPLC RS-PLUS were obtained from Carlo Erba (Italy). Acetic acid (99.7%) and triethylamine (99%) were purchased from Aldrich (Germany) and hydrochloric acid and ammonia, from Panreac (Spain). Solutions were all prepared in purified water from a Millipore milli-Q apparatus (Spain).

Alkylamine ethoxylates were obtained as a technical mixture, Berol 907 (B907, tallowalkylamine ethoxylate 70%, ethyleneglycol 1-5%), which was kindly supplied by Akzo Nobel (Sweden). Stock solutions and standards of this mixture were prepared once a month and once a week, respectively. Roundup (Monsanto Europe S.A., Belgium), Roundup Energy (Monsanto Europe S.A., Belgium), Atila (Afrasa S.A., Spain) and Compo (Compo Agricultura, Spain) were the commercial formulations tested in this study. These samples were diluted at convenience with 0.1 M HCl. All standards and samples were dissolved in 0.1M HCl and kept at 5°C.

4.3.2 INSTRUMENTAL ANALYSIS

- **CHROMATOGRAPHY**

ANEO compounds were separated chromatographically prior to ESI-MS detection. Efficient separation was provided by HPLC, using a BDS Hypersil C18 column (Thermo Electron Corporation, France). This column had dimensions of 250 × 2.1 mm and a particle size of 5µm. The HPLC system (Thermo Quest, UK) included a binary gradient pump and a controller. Solvent "A" was an aqueous solution containing 20mM acetic acid and 60mM ammonia, and solvent "B" was acetonitrile:methanol (1:1), also containing 20mM acetic acid and 60mM ammonia. The operating conditions of the HPLC, including the mobile phase gradients recommended, are shown in **Table 4.1**.

The run time for the total analysis was 60 min, including a water-wash step and a column equilibration step between samples (this time is achieved when working with gradient II). The entire column eluent was directed to the ESI-MS system for analysis.

- **ELECTROSPRAY MASS SPECTROMETRY.**

The mass spectrometer used in the present study was a Finnigan AQA single quadrupole instrument manufactured by Thermo Quest (Manchester, UK). This instrument was fitted with a spray ion source, which allows high robust operation of the mass spectrometer at relatively high

flow-rates (0.2 ml/min) by sampling the electrospray plume in an orthogonal configuration. The oligomeric distribution of each sample was estimated in the full-scan mode and the quantitative analysis for each ANEO compound was performed by extracting its corresponding $[M-H]^+$ ion. The full scan range used was 750 to 1025 amu. Electrospray MS operating parameters as well as characteristic m/z value of $[M-H]^+$ ions are shown in **Table 4.1**. Nitrogen was used as nebulizer and drying gas.

HPLC parameters

Flow rate	0.2 ml/min
Column temperature	25°C
Injection volume	100 μ l

Gradient timetable

Gradient I			Gradient II		
Time (min)	%A	%B	Time (min)	%A	%B
0	80	20	0	80	20
5	80	20	5	80	20
15	15	85	15	2	98
45	15	85	45	2	98
55	2	98	48	80	20
80	2	98	60	80	20
83	15	85			
93	15	85			

Electrospray MS parameters

Desolvation gas flow	~550 l/h
Source temperature	150°C
Capillary (positive ion)	4.5 kV
Cone voltage	30 V
SIM dwell (positive ion)	0.08 s

Masses (m/z) of C_mNEO_n ; $[M-H]^+$

m	10	12	14	16-uns ^x	16-s ^{xx}	18-uns ^x	18-s ^{xx}
n							
13	730	758	786	812	814	840	842
14	774	802	830	856	858	884	886
15	818	846	874	900	902	928	930
16	862	890	918	944	946	972	974
17	906	934	962	988	990	1016	1018

^x unsaturated compounds

^{xx} saturated compounds

Table 4.1. Operating parameters.

4.4 RESULTS AND DISCUSSION

Reversed-phase liquid chromatography provides a reliable separation of saturated ANEO compounds according to their alkyl chain. However, it is not possible to separate simultaneously saturated and unsaturated ANEO compounds. For example, the unsaturated ANEO compound containing 18 carbon atoms in its alkyl chain coelute with the 16 carbon atoms alkyl chain saturated ANEO. Other additional complexity is the presence of ethoxymers homologues, which can not separate under reversed-phase HPLC conditions. The use of reverse-phase LC together with a mass spectrometer provides an efficient approach for the complete analysis of all the ANEO compounds present in the sample. In this work, we assessed the potential of LC-MS for the analysis of the ANEO compounds including the distribution of the saturated and unsaturated alkyl chain and the distribution of the ethoxylated homologues.

4.4.1 CHROMATOGRAPHY

Ethoxylated alkylamine compounds were separated on the basis of alkyl chain length by gradient elution on a C18 reversed phase column (**Figure 4.1**). Distinct peaks are evident in the Total Ion Chromatogram (**Figure 4.1a**) for ethoxylated alkylamines with 10, 12, 14, 16 and 18 carbons in the alkyl chain. As it can be seen, ethoxylated alkylamines compounds elute in the order of increasing the alkyl chain length, but the retention time is also function of the presence of unsaturations (double bound) in the alkyl chain. When the short chromatographic gradient is used (see **Table 4.1**, gradient II) the unsaturated ethoxylated alkylamines coeluted with short alkyl chain saturated ANEO compounds (viz, unsaturated-C16NEO_x coeluted with C14NEO_x and unsaturated-C18NEO_x coeluted with C16NEO_x). **Figure 4.2** shows the chromatogram obtained when a long chromatographic gradient was used (see **Table 4.1**, gradient I). As it can be seen, the separation of the saturated-unsaturated compounds can be achieved. It should be pointed out that the analysis was carried out by extracting the characteristic mass of each ANEO compounds. Results obtained when working with both gradients were statistically comparable. It is important to point out that when the characteristic mass corresponding to the unsaturated-C₁₈NEO_x and unsaturated-C₁₆NEO_x compounds are extracted the chromatogram presents two peaks partially overlapped (see **Figures 4.1e** and **4.2**). Note that a better separation between these peaks is achieved when using the long chromatographic gradient. The identification of target compounds was done assuming that the mass corresponds to the unsaturated compound and, as we will discuss later, considering both peaks as the analyte. In this way, it has been found that the relative proportion of the ANEO compounds corresponds to the proportion of the alkyl chain originally present in the natural fat from which the ANEO mixture originates. Probably during the industrial process of synthesis of the ANEOs some cis- / trans-isomerizations of the double bound occur. As a result, two unsaturated compounds are likely present in the sample.

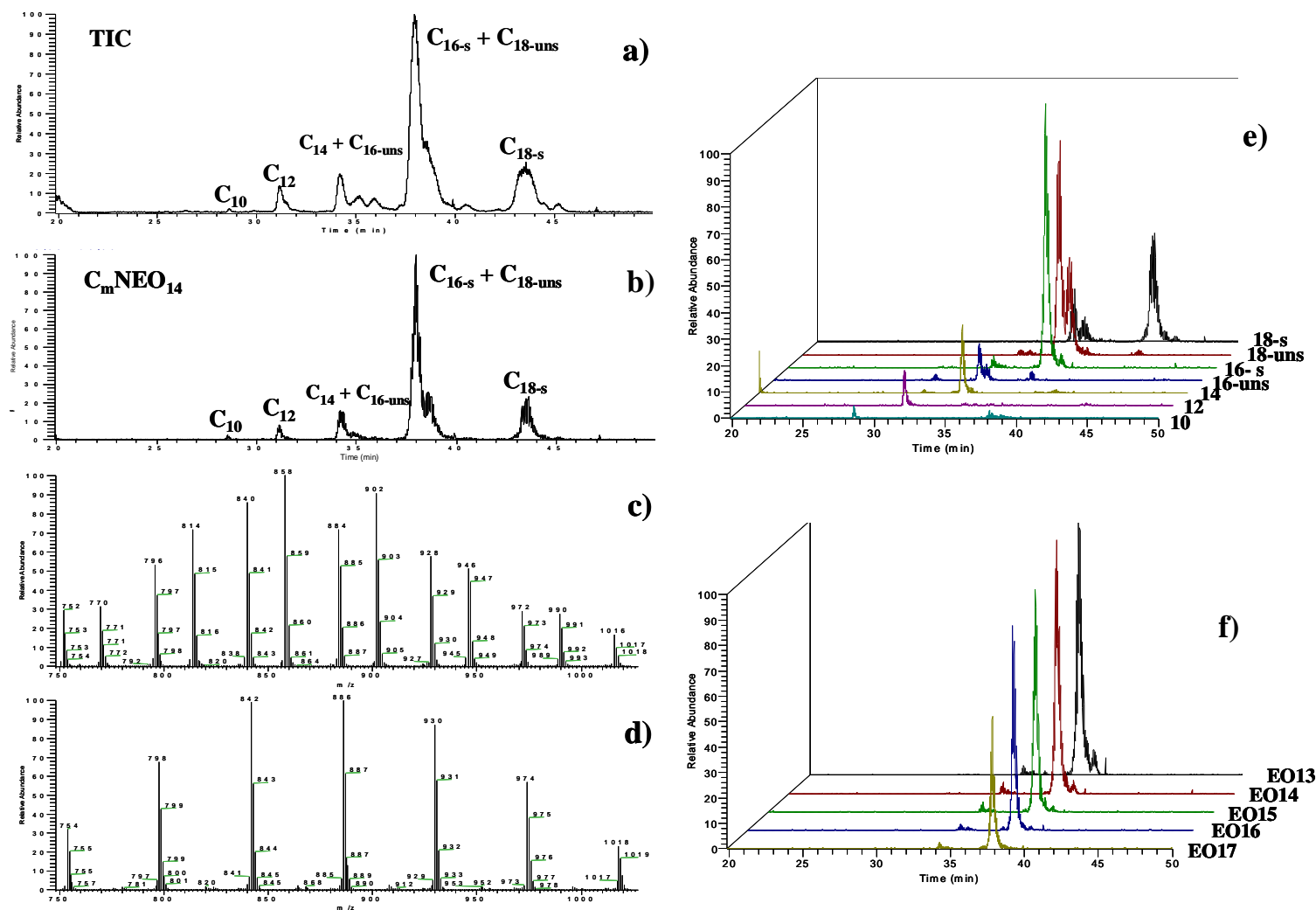


Figure 4.1. Reversed-phase HPLC chromatogram of a standard solution a) TIC and b) chromatogram obtained extracting the mass of the ANEO compounds with only 14 ethoxy units. Positive ion electrospray spectrum of c) peak C16-s+C18-uns and d) peak C18s. e) Extracted chromatograms corresponding to figure b and f) extracted chromatograms corresponding to the ANEO compounds with the alkyl chain with 16 carbon atoms.

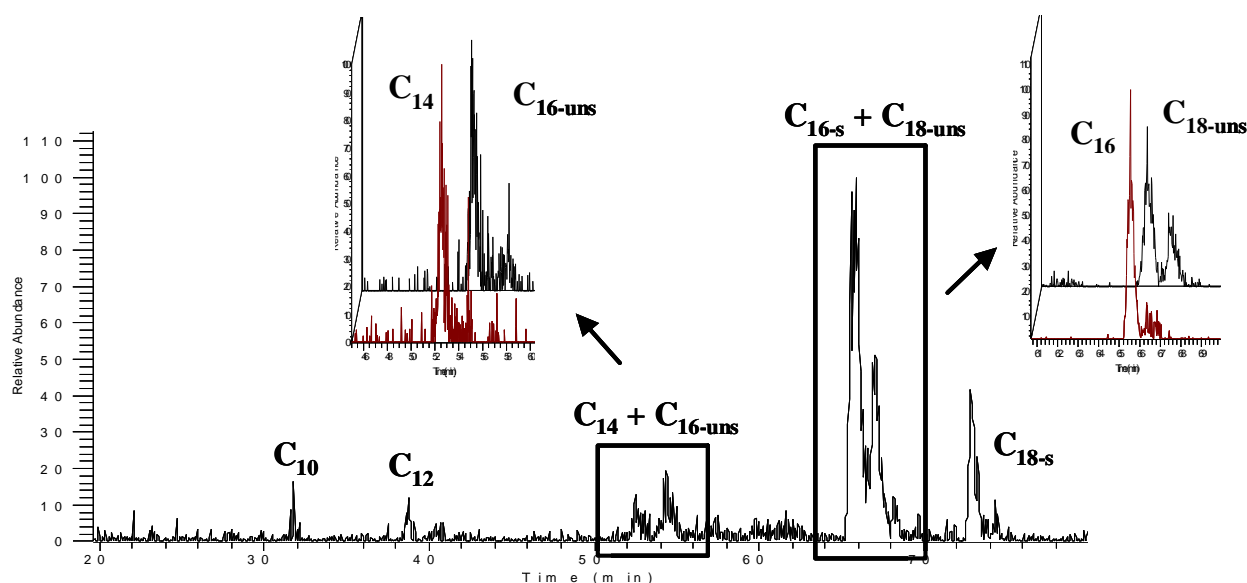


Figure 4.2. TIC obtained working under the proposed experimental conditions and using the long chromatographic gradient, including the extracted chromatograms corresponding to the collapsed peaks (see text for details).

Regarding the ethoxymers, it is important to note that ethoxymers of a given alkyl chain coeluted, as it can be seen in **Figure 4.1f**. However, as it is shown in the same figure, the coeluting ANEOs were resolved in the present work by the mass spectrometer in reversed-phase LC-ESI-MS due to its characteristic mass shift of 44 Da (mass of a ethoxylated moiety). **Figures 4.1c** and **4.1d** show the mass spectra corresponding to the two last peaks of the chromatogram respectively. In the **Figure 4.1c**, corresponding to the peak C16-s + C18-uns in the TIC (**Fig 4.1a**), the characteristic mass of the different ethoxylated oligomers of the $C_{16}NO_x$ and the unsaturated- $C_{18}NEO_x$ can be observed. **Figure 4.1d** corresponds to the characteristic mass spectrum of saturated- $C_{18}NEO_x$, where the typical Gaussian distribution of the ethoxymers is evidenced.

The separation of saturated-ANEO compounds using reversed-phase LC has been previously described by Krogh and co-workers [11]. Nevertheless, their separation was based on the use of TEA as additive in the mobile-phase. Working with this mobile phase and electrospray interface we found some problems with obstruction of the silica fused capillary in the interface of the mass spectrometer. Besides, it is well known that the use of triethylamine is not recommended when the mass spectrometer detector is used because of its tendency to be absorbed on metallic surfaces. On the other hand, it is known that in absence of amines in the mobile-phase the chromatographic time was longer. Therefore, in order to avoid the use of triethylamine, ammonia and trimethoxyaminomethane (TRIS) were tested. The best results in terms of precision and repeatability were obtained working with ammonia, therefore its addition in the mobile-phase was recommended.

4.4.2 MASS SPECTROMETRY

Under positive ion conditions, ANEOs produce mainly $[M-H]^+$ ions, that are formed by the addition of a proton from the solvent to the amine group. In general, polyethoxylated molecules show a remarkable affinity for alkali metal ions [14] which normally is reflected in the positive electrospray spectra of these analytes. In the absence of added electrolyte, polyethoxylated molecules such as alkylphenol ethoxylate compounds are frequently detected as Na^+ adducts, presumably due to the ubiquity of this metal. These adducts, depending on the ethoxy chain length and indirectly of the affinity for alkali metal ions, present different capacity to be ionized [18]. In the case of ANEO compounds, the presence of acetic acid in the mobile-phase prevented the formation of Na^+ adducts, as is evidenced in the mass spectra presented in **Figures 4.1c** and **4.1d**. Probably the acid media provided by the acetic acid when the ammonia is evaporated in the interface facilitates the formation of the $[M-H]^+$ ion, which is not affected by the length of the ethoxy chain. Therefore, it can be assumed that all the ethoxymers are ionized in the same proportion. Moreover, the possible formation of NH_4^+ adducts due to the presence of ammonia in the mobile phase was also considered. However, such adducts were not observed from the mass spectra.

The influence of the different electrospray-MS parameters on the ionization of the ANEO compounds depending on the length of the ethoxy chain has been evaluated. It should be pointed out that individual ANEO compound are not commercially available and, as it was indicated before, the coelution of the ethoxymers is one of the limitations of the reversed-phase chromatography as competitive ionization suppression from highly ethoxylated ANEO may occur.

The recommended values of the electrospray-MS parameters are collected in **Table 4.1**. One of the most important operating parameters is the cone voltage. When the analytes have different ionization capacity, for example alkylphenol ethoxylates as Na^+ adducts, high cone voltage produces different dissociation of the adduct species due to the collision-induced by the voltage. This effect is more remarkable for adducts with less affinity to the metal. The results obtained in case of ANEO compounds for $[M-H]^+$ ions showed a similar response of all the ethoxymers with the cone voltage, therefore support the idea that these analytes are ionized in the same extension. In order to give more data about this fact, several analysis changing slightly the pH and composition of the mobile-phase were also performed. The results showed the same response for all the ethoxymers.

4.4.3 ANALYTICAL FEATURES

The developed method was evaluated for trueness, precision and method detection limits. The first step was to establish the concentration of the different ANEO compound in our standard. The standard used was the technical mixture Berol 907 supplied by Akzo Nobel, with a total

concentration of the ANEO compounds of $73.85 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. The relative proportion of the peak areas with different alkyl chain were the same than the relative proportion of alkyl chains from the tallow oil originally used in the industrial synthesis of ANEO surfactants (see **Table 4.2**), therefore it was assumed that this system provided a useful way to quantify these compounds. For this reason, the individual concentration of each ANEO compound was established on the basis that all the ethoxymers are ionized in the same proportion.

FATTY ACID	# Carbon atoms : # unsaturations	Weight percentage
Oleic	18 : 1	40.8
Palmitic	16 : 0	25.3
Stearic	18 : 0	19.4
Palmitoleic	16 : 1	4.0
Myristic	14 : 0	3.5

Table 4.2. Typical composition of tallow oil with the fatty acid distribution.

Table 4.3 shows the analytical figures of merit of the proposed method for the analysis of ANEO compounds containing 12, 14, 16 and 18 carbon atoms in the alkyl chain (including the unsaturated compounds) and an ethoxylated chain with a number of ethoxyl groups ranging from 13 to 17. Calibrations graphs were established working with standards solutions of the ANEO compounds prepared in 0.1 M HCl. As it can be seen, the relative standard deviation for solutions containing $54 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ANEO concentrations varied from 1.3 to 16.5 %. Limits of detection, calculated as $3 \text{ Sy}/x$ / sensitivity, ranged from 4.1 to $22.9 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Linearity was studied in the range from 10 to $1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ according to ISO recommendations. Finally, a linear working range from 10 to $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ was observed.

As it can be seen from **Table 4.3**, a good sensitivity, precision and repeatability were obtained for all the ANEO compounds.

The sensitivity of the method could be further improved by an on-line preconcentration of the analytes, by using a $10 \times 2.1 \text{ mm}$ precolumn containing the same adsorbent that the separation column (BDS Hypersil C18). When 5-mL sample ($\text{pH} \leq 1$) was quantitatively preconcentrated in this system, the detection limits for all ANEO compounds were 50 times lower than with direct injection. Obviously, the sensitivity can be further improved if high volumes of sample are treated. However, this step is not necessary for the characterisation of ANEO compounds in commercial formulations. On the contrary, for this particular application, samples should be diluted prior to analysis.

The good precision for the retention times (typically chromatographic times were reproducible to RSD < 5 %) evidences the effectiveness of the proposed mobile-phase and the selected chromatographic conditions.

	a	b	Sy/x	LOD	LOQ	RSD
C12						
EO13	5873	-99882	24133	12.3	41.1	
EO14	5165	-47718	18635	10.8	36.1	14.1
EO15	4374	-33929	14611	10.0	33.4	7.5
EO16	3376	-28290	11784	10.5	34.9	15.2
EO17	2290	-28938	6030	7.9	26.3	16.5
C14						
EO13	11329	-15997	35599	9.4	31.4	6.0
EO14	10844	-17975	34359	9.5	31.7	7.7
EO15	9085	-850	28706	9.5	31.6	6.1
EO16	6687	2808	23648	10.6	35.4	4.4
EO17	4316	-5695	12119	8.4	28.1	7.6
C16 unsat						
EO13	10604	-43339	33499	9.5	31.6	7.0
EO14	9102	-24660	19743	6.5	21.7	6.9
EO15	7799	-34744	24948	9.6	32.0	7.6
EO16	5649	-17585	9210	4.9	16.3	7.1
EO17	3846	-21049	11679	9.1	30.4	7.6
C16sat						
EO13	63730	-1121338	352294	16.6	55.3	4.0
EO14	47821	-116477	155714	9.8	32.6	1.3
EO15	39388	-54068	99247	7.6	25.2	3.7
EO16	29384	22502	128554	13.1	43.8	5.5
EO17	16080	-251591	53435	10.0	33.2	6.6
C18unsat						
EO13	85970	-978738	120022	4.2	14.0	3.5
EO14	76531	-1176742	178130	7.0	23.3	3.9
EO15	62041	-565366	52481	2.5	8.5	4.3
EO16	41766	102940	108167	7.8	25.9	6.8
EO17	26909	69514	36577	4.1	13.6	7.1
C18sat						
EO13	48263	35562	346178	21.5	71.7	7.8
EO14	59499	-442093	366504	18.5	61.6	8.1
EO15	53157	-451404	275676	15.6	51.9	8.8
EO16	40814	-307811	228371	16.8	56.0	10.0
EO17	19470	53432	148325	22.9	76.2	14.9

Table 4.3. Analytical figures of merit of the proposed method for determination of ANEOs. a: slope of the calibration graph; b: intercept of the calibrations graph; Sy/x: standard deviation of residuals; LOD and LOQ expressed in $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; RSD (%) corresponding to three measurements.

4.4.4 ANALYTICAL APPLICATIONS

The applicability of the proposed method was tested in the determination ANEOs in various glyphosate commercial available formulations. The accuracy of the method was established by analysing spiked samples. The overall accuracy was assessed by plotting the concentration found in samples versus the concentration found using the standard addition method (total ANEO concentration found in spiked sample minus the ANEO concentration added) of each alkylamine. The results revealed a linear relationship between both values, with a unity slope and a zero intercept at a 95% confidence level. These results confirm the accuracy of the proposed method. **Table 4.4** summarises the values obtained in the recovery test and, as it can be seen, quantitative recoveries were obtained.

	C12	C14	C16_{unsat}	C16_{sat}	C18_{unsat}	C18_{sat}
COMPO						
EO₁₃	-	-	90.5 (15.5)	99.8 (2.1)	99.6 (3.6)	107.5 (7.9)
EO₁₄	82.1 (10.6)	99.6 (15.3)	96.2 (13.5)	100.2 (1.1)	98.0 (3.0)	106.8 (13.3)
EO₁₅	99.7 (10.4)	97.8 (11.5)	90.3 (15.3)	106.7 (2.9)	100.9 (2.5)	102.3 (10.9)
EO₁₆	90.0 (2.6)	94.3 (8.3)	96.6 (8.9)	97.5 (4.0)	101.8 (2.3)	96.5 (12.2)
EO₁₇	99.9 (9.8)	99.8 (3.1)	98.6 (9.3)	97.5 (4.5)	-	-
ATILA						
EO₁₃	67.7 (14.8)	100.7 (6.1)	90.0 (8.3)	90.6 (5.5)	93.2 (3.4)	106.4 (7.7)
EO₁₄	66.9 (8.2)	91.3 (4.6)	95.4 (8.0)	104.8 (4.8)	95.0 (4.5)	107.4 (7.8)
EO₁₅	68.6 (7.2)	90.0 (5.9)	89.3 (10.3)	106.6 (2.7)	94.4 (5.3)	105.8 (5.3)
EO₁₆	66.6 (9.1)	90.6 (7.2)	85.6 (1.0)	104.8 (0.4)	100.2 (5.7)	104.6 (4.5)
EO₁₇	65.5 (12.9)	89.9 (8.3)	95.8 (6.2)	107.8 (2.9)	101.1 (9.9)	102.8 (7.3)
ROUNDUP						
EO₁₃	101.5 (4.0)	98.3 (6.5)	97.5 (9.4)	96.4 (4.8)	118.8 (9.6)	94.9 (4.6)
EO₁₄	102.1 (1.3)	98.0 (5.0)	95.0 (8.4)	96.4 (5.0)	95.2 (5.3)	93.3 (5.8)
EO₁₅	101.0 (6.4)	98.3 (7.1)	100.0 (13.6)	103.3 (5.1)	92.3 (12.3)	93.3 (4.6)
EO₁₆	102.7 (8.3)	95.8 (2.4)	92.5 (9.9)	98.8 (12.1)	116.4 (8.8)	96.8 (8.4)
EO₁₇	101.0 (5.7)	96.2 (7.4)	103.3 (10.9)	108.7 (9.7)	113.2 (7.7)	102.0 (8.2)
ROUNDUP ENERGY						
EO₁₃	-	83.9 (3.3)	93.3 (6.9)	102.5 (1.5)	99.4 (10.3)	111.5 (0.5)
EO₁₄	72.7 (8.9)	84.9 (2.2)	86.0 (8.5)	105.5 (0.9)	96.2 (8.3)	109.4 (0.5)
EO₁₅	64.8 (1.3)	83.4 (2.6)	87.0 (10.3)	96.4 (10.9)	104.5 (3.4)	106.1 (3.4)
EO₁₆	62.4 (2.6)	81.8 (0.7)	85.9 (9.6)	101.2 (10.9)	93.0 (8.2)	107.2 (1.7)
EO₁₇	61.7 (14.6)	85.9 (1.6)	89.1 (7.1)	105.6 (4.0)	89.9 (9.8)	112.8 (3.9)

Table 4.4. Recoveries (%) obtained for the analysis of ANEO compounds in spiked samples using the proposed method. Values are expressed as average (RSD). Three measurements.

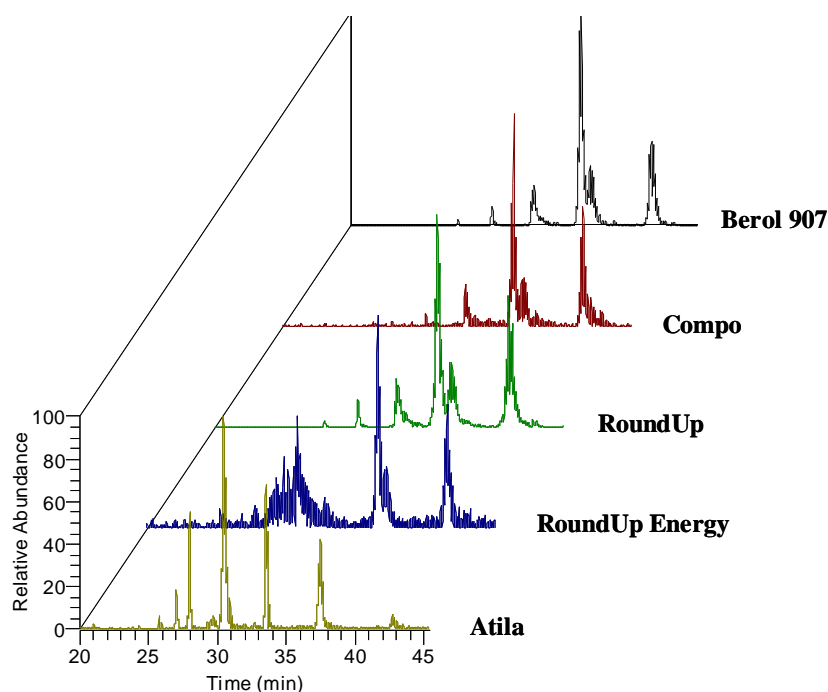


Figure 4.3. TIC for commercial glyphosate formulations using the developed method. Chromatograms of each formulation are normalised to the corresponding highest peak.

Figure 4.3 shows the Total Ion Chromatograms obtained for the standard used and the four commercial glyphosate formulations studied. As it can be observed, the appearance of the chromatograms in case of Compo and RoundUp is similar to that of the Berol 907 standard, but it is clearly different for Atila and RoundUp Energy herbicides. In these cases, besides the ANEO compounds other non identified surfactants are predominantly present. The results obtained of the analysis of four commercial formulations are presented in **Figure 4.4**. **Figures 4.4a** and **4.4b** show the distribution of the alkyl and ethoxylated chain respectively. As it could be deduced from the chromatograms, the distribution of the oligomers was different for the formulations studied. In the case of Compo and RoundUp pesticides, the distribution of alkyl and ethoxy chains are very similar than the standard, Berol 907, but not in case of Atila and RoundUp Energy formulations. As this standard came from tallow oil, the results showed that Compo and RoundUp pesticides includes in their formulation a non-ionic surfactant derived from tallow oil. This fact is confirmed by the manufacturer of RoundUp, Monsanto, which states the presence of tallowamine ethoxylated in its formulation. The total content of ANEOs in both formulations was also determined. $99.4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ of tallowamine ethoxylated ($RSD 4.6$; $n=2$) was obtained for Compo formulation, however no certified data of concentration for comparison was available. For RoundUp, Monsanto informs of an approximated value of $127 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ for ANEOs in its formulations. The concentration determined in this case was $98.1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ of ANEOs ($RSD 5.4\%$; $n=3$), which represents about 80% of recovery. Therefore, considering that these surfactants are frequently used and that they can be classified as

emerging contaminants, analytical methodologies for their determination and control in commercial herbicide formulations are required in order to assess the possible environmental impact of the herbicide formulation. Obviously, the study of the analytical response of these compounds in the LC-ESI-MS constitutes the first step to undertake the study of the occurrence of these compounds and their metabolites in the environment.

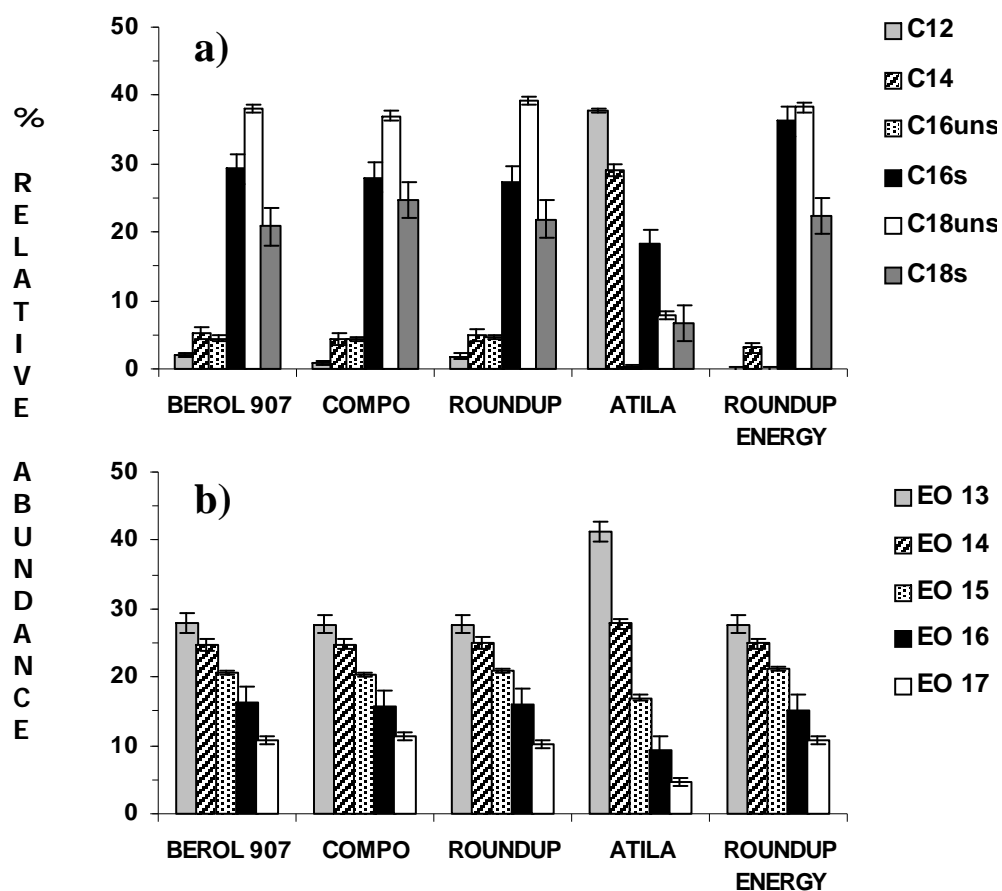


Figure 4.4. a) Relative distribution of alkyl chain and, b) relative distribution of the ethoxylated chain. Results are shown as arithmetic means and SDs (n=3).

4.5 REFERENCES

- [1] D.Barceló, M.C.Hennion. *Trace determination of pesticides and their degradation products in water. Techniques and instrumentation in analytical chemistry*, Elsevier Science & Technology, 19 (1997) 8. ISBN: 0-444-81842-1
- [2] R.C.Kirkwood, R.Hetherrington, T.L.Reynolds, G.Marshall, *Pest. Manag. Sci.*, 56 (2000) 359
- [3] R.H.Schreuder, A.Martijn, H.Poppe, J.C.Kraak, *J. Chromatogr.*, 368 (1986) 339
- [4] C.Leaper, P.J.Hollowas, *Pest. Manag. Sci.*, 56 (2000) 313
- [5] Z.Liu, *Colloids Surfaces B: Biointerfaces*, 35 (2004) 149
- [6] P.E.Laerke, J.C.Streibig, *Pest. Sci.*, 44 (1995)107
- [7] K.A.Krogh, B.Halling-Sorensen, B.B.Mogensen, K.V.Vejrup, *Chemosphere*, 50 (2003) 871
- [8] M.T.K.Tsui, L.M.Chu, *Chemosphere*, 52 (2003) 1189
- [9] C.D.Stalikas, C.N. Konidari, *J. Chromatogr. A*, 907 (2001) 1
- [10] R.F.Lang, D.Parra-Diaz, D.Jacobs, *J. Surfactants Deterg.*, 2 n°4 (1999) 503
- [11] K.A.Krogh, K.V.Vejrup, B.B.Mogensen, B.Halling-Sorensen, *J. Chromatogr. A*, 957 (2002) 45
- [12] K.A.Krogh, B.B.Mogensen, B.Halling-Sorensen, A.Cortés, K.V.Vejrup, D.Barceló, *Anal. Bioanal. Chem.*, 376 (2003) 1089
- [13] A.Jahnke, J. Gandrass, W. Ruck, *J. Chromatogr. A*, 1035 (2004) 115
- [14] A.A.Boyd-Boland, J.B.Pawliszyn, *Anal.Chem.*, 68 (1996) 1521
- [15] M.Petrovic, D. Barceló, *Anal.Chem.*, 72 (2000) 4560
- [16] Cserháti T., Forgács E., *J. Chromatogr. A*, 774 (1997) 265
- [17] D.Barceló, *Anal. Chim. Acta*, 263 (1992) 1
- [18] T. Okada, *Macromolecules*, 23 (1990) 4216

CHAPTER 5

**GLYPHOSATE SORPTION IN
SOILS OF BEGUR (GIRONA, SPAIN).
LABORATORY AND FIELD STUDIES.**

CHAPTER 5 GLYPHOSATE SORPTION IN SOILS OF BEGUR (GIRONA, SPAIN). LABORATORY AND FIELD STUDIES. 153

5.1	ABSTRACT.....	155
5.2	INTRODUCTION.....	156
5.3	EXPERIMENTAL.....	158
5.3.1	<i>CHEMICALS</i>	158
5.3.2	<i>INSTRUMENTATION</i>	158
5.3.3	<i>SOIL SAMPLING</i>	158
5.3.4	<i>SOIL CHARACTERIZATION</i>	159
5.3.5	<i>GLYPHOSATE AND AMPA DETERMINATION</i>	160
5.3.6	<i>HPLC ANALYSIS</i>	160
5.3.7	<i>BATCH SORPTION EXPERIMENTS</i>	160
5.3.8	<i>MISCIBLE DISPLACEMENT EXPERIMENTS (COLUMN EXPERIMENTS)</i>	161
5.3.9	<i>FIELD STUDY</i>	162
5.4	RESULTS AND DISCUSSION.....	163
5.4.1	<i>SOIL PROFILE CHARACTERISATION</i>	163
5.4.2	<i>SORPTION ISOTHERMS</i>	164
5.4.3	<i>MISCIBLE DISPLACEMENT EXPERIMENTS</i>	169
5.4.4	<i>FIELD STUDY</i>	173
5.5	CONCLUSIONS.....	176
5.6	REFERENCES.....	177

5.1 ABSTRACT

In this work, the sorption behaviour of glyphosate in sandy soils of a creek forest in the Empordà area, NE Spain, has been studied from a laboratory to field scale.

Preliminary batch sorption results were the basis to design miscible displacement experiments in the laboratory. In both type of experiments the pure compound and commercial formulations of glyphosate were evaluated in order to investigate the effect of adjuvants. Similar adsorption and desorption behaviour was observed for the pure and commercial forms. K_d values around 4 were determined, assuming linear adsorption isotherms in the concentration range studied (50-50 μL^{-1}). Although this similar behaviour was confirmed in column experiments when working at a flow rate of 0.03 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, when the flow rate was 0.01 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, a higher adsorption was observed for the pure compound than for Roundup.

Finally, the mobility and degradation of glyphosate through the soil column in a controlled application of the herbicide under field conditions was studied. The results showed a strong adsorption of glyphosate on the surface layer that could be related to the organic matter content. Furthermore, relatively high concentrations of the main metabolite aminomethylphosphonic acid, AMPA, were found in the upper soil the day after application.

5.2 INTRODUCTION

Glyphosate [N-(phosphonomethylglycine)] is a non-selective, broad-spectrum, post-emergence herbicide extensively used in multiple applications related to weed and vegetation control. Numerous commercial formulations containing glyphosate are used all over the world. Glyphosate is readily degraded microbiologically in soils to aminomethylphosphonic acid (AMPA). Besides the active ingredients, these formulations usually contain mixtures of specific substances called adjuvants which are added in order to enhance the effectiveness of the active ingredient. Until recently, research on pesticides has been focused mainly on the environmental behaviour of the active ingredients, but environmental toxicity and risk of adjuvants are becoming important issues to take into consideration [2,3].

Since 1975, when Sprankle et al. [4] reported that glyphosate was adsorbed more readily onto a clay loam soil than onto a sandy loam, numerous studies about the interaction of glyphosate and soil components have been conducted. Glyphosate is an acidic compound which possesses three donor groups (amine, carboxylate and phosphonate groups) that can be responsible for strong coordination bonds to metal ions and mineral surfaces. However, contradictory results are observed in various studies on glyphosate adsorption. Whereas several authors correlate glyphosate binding to soils with the content of soil organic matter and polyvalent cations adsorbed on clay, especially iron and aluminium oxides [4-7] other works relate glyphosate adsorption to the pH system [8,9] and the cation exchange capacity of the soils [10], indicating that soil organic matter has little effect on glyphosate adsorption [11,12,13].

Diferent authors have also investigated the interactions of glyphosate and soil constituents at molecular level. Adsorption of glyphosate onto iron and aluminium oxides is generally explained by the formation of inner-sphere surface complexes [14]. Bonding to clay minerals takes place either through interlayer exchange cations [10,15,16] or by hydrogen bonding to the clay external surface [9]. Adsorption to organic matter occurs through hydrogen bonding [7,17] and is considered by several authors [6,18] to be comparable or even stronger than adsorption to clay minerals, depending on the macromolecular structure and dimension of humic material.

Other authors have focused on more quantitative aspects of glyphosate adsorption [10]. These studies are aimed to both laboratory experiments (continuous [19] and batch [20,21]) and field studies [22-24]. Leaching studies in the unsaturated zone are often used to determine the risk of groundwater and surface water pollution, as well as contaminant fate and exposure studies [25,26]. Recently, the most relevant studies about mobility and leaching of glyphosate have been reviewed by Vereecken [27].

Our objective in this work is to study the behaviour of glyphosate herbicide in Catalonian soils from laboratory-scale to field-scale. To achieve this goal, preliminary batch sorption studies of glyphosate in selected soils were used to design the next miscible displacement experiments in the

laboratory to better simulate the field conditions. In both experiments, different commercial herbicides containing glyphosate were tested in order to compare the effects of auxiliary substances usually added to the final formulation to improve their performance. Finally, the study of glyphosate transport through the soil column in a controlled application of the herbicide in a creek forest (*Populus nigra*), was carried out, relating its dynamics to the soil properties.

5.3 EXPERIMENTAL

5.3.1 CHEMICALS

Glyphosate of 97.5% purity was from Dr. Ehrenstorfer GmbH (Germany) and AMPA of 99% purity from Lancaster Synthesis (UK). The commercial herbicide formulation Atila was obtained from Afrasa S.A., Spain, and RoundUp from Monsanto Europe S.A., Belgium. Pentafluorobenzoic acid, used as tracer, and 9-fluorenylmethyl chloroformate, used as the derivatisation reagent for the chromatographic analysis of glyphosate, were supplied by Fluka (Switzerland). Acetonitrile, acetone and ethyl acetate, all of HPLC grade, were purchased from Carlo Erba (Italy) and Romil Pure Chemistry (UK). The inorganic salts and acids were from Panreac (Spain). All aqueous solutions were prepared with water purified by a Milli-Qplus System (Millipore, Barcelona, Spain). XAD-7 resin was supplied by Fluka (Switzerland). Cellulose acetate filters of 0.2 μm were from Teknocroma (Spain).

5.3.2 INSTRUMENTATION

For the determination of the adsorption isotherms a rotary shaker (Dinko, Spain) and a centrifuge (Mixtasel, Selecta, Spain) were used.

A Minipuls 3 peristaltic pump (Gilson, France) and a fraction collector autosampler (Gilson, France) were used to monitor the adsorption processes during column experiments.

Analyses were carried out with a Spectra System liquid chromatograph (ThermoQuest, USA) equipped with an HPLC pump P2000, a model SCM1000 vacuum membrane degasser and a Rheodyne 7725 injection valve with a 20 μl loop (Cotati, California). A model FL3000 fluorescence detector (ThermoQuest, USA) set at 262 nm (excitation) and 316 nm (emission) was used. Analyte separation was achieved with a 25 x 0.46 cm i.d. 5 μm Kromasil 100 NH_2 column and a NH_2 precolumn (Tracer, Teknokroma, Spain).

5.3.3 SOIL SAMPLING

The soils used in this study were collected from a creak (*Populus nigra*) forest of Begur (Girona, north-east Spain). Samples were collected at 1.5, 12.5, 35, 85, 140 and 172.5 cm depths. To obtain the natural density and gravimetric and volumetric water content of the soil, undisturbed samples were collected using a sampler ring kit model C (standard set to a depth of 2 m for soil sampling rings of 84 mm diameter). On the other hand, soil samples for the determination of glyphosate were collected using a helicoidal gimlet Ejelkamp, wrapped with aluminium foil and kept refrigerated. Once in the laboratory, the soils were air-dried, passed through a 2-mm sieve and stored at -20°C until its analysis.

Groundwater from a piezometer built in the study field was also collected with a 500-mL bailer sampler (5cm id). Water samples were transported refrigerated in glass bottles to the laboratory, where they were stored at -20°C until analysis. Temperature, conductivity and pH were measured in-situ.

5.3.4 SOIL CHARACTERIZATION

Grain size distribution of samples was obtained according to ASTM. The X-ray diffraction technique was used to characterise the minerals present in the soil. X-ray diffraction tests were conducted in a Siemens D-5000 diffractometer with a Bragg-Brentano $\theta:2\theta$ configuration, using a Cu target tube and a graphite monochromator, operating at 40kV-20mA. Samples were analyzed within the range 4-60°, taking data every 0.05° and step-time of 3s. X-ray diffraction plots were studied using the Siemens automatic software for peak recognition, mineral identification and peak intensity calculations. The physical and hydrological properties of samples were determined applying standard methods, using the mathematical expressions shown in **Table 5.1**.

Soil property	Mathematical Formulae	Parameters
Natural density (γ)	$\gamma = \frac{W}{V}$	W : weight of sample (g) V : volume of sample (cm ³)
Dry density (γ_d)	$\gamma_d = \frac{W_s}{V}$	W_s : weight of solid (g)
Solid particles density (γ_s)	$\gamma_s = \frac{W_s}{V_s}$	V_s : volume of solid (cm ³)
Porosity (η)	$\eta = \frac{V_v}{V}$	V_v : volume of pore (cm ³)
Void ratio (e)	$e = \frac{V_v}{V_s}$	
Gravimetric water content (w)	$w = \frac{W_w}{W_s}$	W_w : weight of water (g)
Volumetric water content (θ)	$\theta = \frac{V_w}{V}$	V_w : volume of water (cm ³)
Degree of saturation	$S_r = \frac{w\gamma_s}{e\gamma_w}$	γ_s : density of water (g cm ⁻³)
Saturated hydraulic conductivity (K_s)	$K_s = \frac{Q}{AI}$, $I = \frac{h_m}{h_{cw}}$	Q : outflow rate (m ³ s ⁻¹) A : cross-sectional area of the column (m ²) I : hydraulic gradient (nondimensional) h_{cw} : height of water column (m) h_{cw} : height of sample (m)

Table 5.1. Mathematical relations used for the determination of physical and hydrological properties of the soil.

5.3.5 GLYPHOSATE AND AMPA DETERMINATION

Aqueous samples were filtered and submitted to HPLC analysis as explained below.

Glyphosate and AMPA were extracted from soil samples with 0.1M potassium hydroxide solution, according to Miles and Moye [28]. 5-gram soil samples were extracted by shaking for 30 min in 10 mL 0.1 mol·L⁻¹ KOH with an orbital shaker, centrifuged 10 min at 5000 rpm, and filtered through a 0.2 µm cellulose acetate filter. The extraction method was previously validated with fortified soil samples at different levels. The recoveries obtained in all cases were above 95%, with RDS values lower than 5%. Soil extracts were purified using a XAD-7 resin. A glass column of 30 cm length and 4.8 mm diameter, containing glass wool at the lower tip, was packed with 0.2 g of XAD-7 resin. 5 mL of sample was applied to the column and the organic material was retained on the solid adsorbent. Glyphosate was finally recovered in 10 mL water. Losses of glyphosate during the purification step were determined to be less than 5 % by working with known concentration of analyte.

5.3.6 HPLC ANALYSIS

0.2 mL aliquot of the sample was derivatised in a glass tube by adding 1.8 mL of 0.025 mol·L⁻¹ borate buffer (pH 9), 1.8 mL of acetone and 0.2 mL of 9-fluorenylmethyl chloroformate solution (0.01 mol·L⁻¹ in acetone). The mixture was shaken and left for 25 min at room temperature. Excess FMOOC was then removed by double liquid-liquid extraction with 2 mL of ethyl acetate. A 20 µL aliquot of the aqueous solution was injected into the HPLC system. The mobile phase consisted of a 35:65 binary mixture of acetonitrile and 50 mM phosphate buffer, pH 5.5 at a flow rate of 1 mL·min⁻¹. The quantification of both analytes was performed by external calibration.

5.3.7 BATCH SORPTION EXPERIMENTS

Experiments were conducted by mixing 2 g of soil with 10 mL of 1·10⁻⁴ M calcium chloride solution containing different concentration of glyphosate (0-5000 µg/L) in a plastic tub, to prevent glyphosate adsorption on glass materials. A control sample with only glyphosate in 1·10⁻⁴ mol·L⁻¹ CaCl₂ solution (no soil) and a blank run per soil with the same amount of soil and the total volume of CaCl₂ solution (without glyphosate) were added in all experiments in order to check the stability of the analyte in CaCl₂ solution and its possible adsorption on the surfaces of test tubes, and to detect interfering compounds or cross-contamination. The concentration of glyphosate was determined by HPLC after centrifugation, decantation and filtration of the aqueous phase. The amount of sorbed glyphosate in soil was determined by difference between initial and final amount of glyphosate in solution.

Soil samples were pre-equilibrated with 1·10⁻⁴ mol·L⁻¹CaCl₂ solution during 24 hours.

A combined herbicide adsorption and desorption study was performed to investigate the reversibility of the sorption process. Firstly, adsorption experiments were carried out as described above. After separation of the supernatant, 10 mL of $1 \cdot 10^{-4}$ mol·L⁻¹ calcium chloride solution were added to each tub containing the soil. Mixtures were shaken for 24 hours. Then, they were centrifuged and the aqueous phases were separated and filtrated. Desorption step was immediately repeated, using the same conditions. The concentration of glyphosate in the supernatant was determined by HPLC after centrifugation and filtration.

5.3.8 MISCIBLE DISPLACEMENT EXPERIMENTS (COLUMN EXPERIMENTS)

The experimental set-up was based on the method described by Brusseau et al. [29] (Figure 5.1). A stainless column (10 cm long, 1.6 cm i.d.) with polytetrafluoroethylene (PTFE) end pieces and polyethylene frits was used to conduct the flow experiments. The soil column was saturated with $1 \cdot 10^{-4}$ mol·L⁻¹ CaCl₂ solution from the top of the column. After allowing the column to drain for 48 h, 100 µL of sodium pentafluorobenzoate was applied to the column. The tracer allowed verifying the absence of preferential pathways and to determine the column pore volume. A peristaltic pump was used to continuously circulate a $1 \cdot 10^{-4}$ mol·L⁻¹ CaCl₂ solution through the soil column. The effluent was analysed on-line by UV detection at 262 nm. Next, a 100 µL pulse of approximately 170 mg·mL⁻¹ of pesticide (pure glyphosate, Atila or Roundup formulations) was injected. Samples at the end of the soil column were collected using an autosampler and analysed by HPLC. Different flow-rates of CaCl₂ solution were tested in order to assess their effect on the adsorption/desorption process.

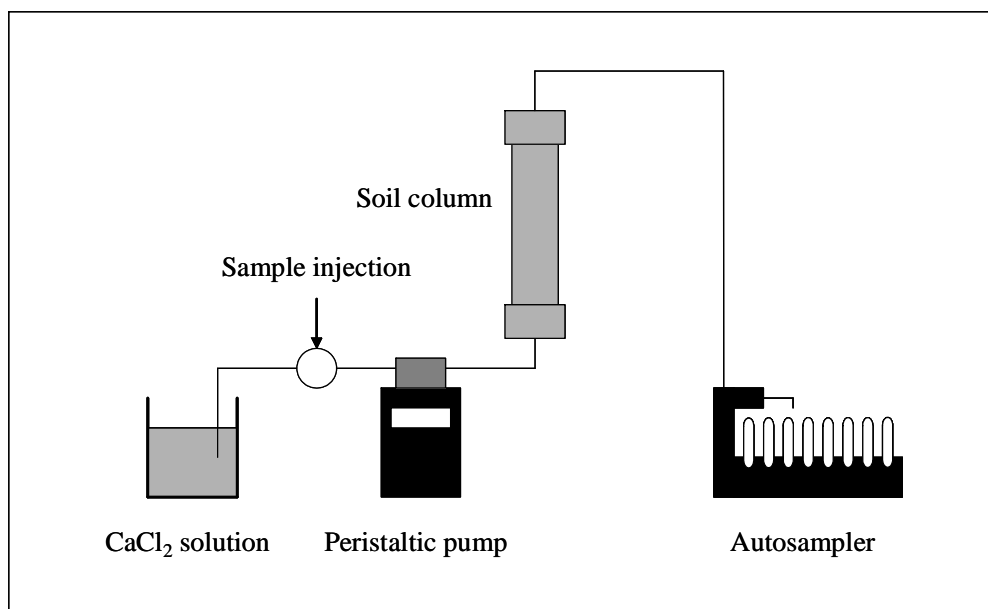


Figure 5.1. Experimental setup used for the column experiments.

5.3.9 FIELD STUDY

The study area was located in a creak (*Populus nigra*) forest of Begur (Girona, north-east Spain) daily irrigated with the effluent of a wastewater-treatment plant. The selected plot sized 10 x 10 m² and it was divided into 10 subplots of 2 x 5 m². A piezometer in the center of the plot allowed the sampling of groundwater from the field. The absence of glyphosate and AMPA residues before the herbicide application was ensured by the analysis of soil samples from different depths and points within the field. The herbicide was applied on May 21, 2002 using a 5 L manual drum sprayer. A commercial herbicide, Atila (316 g·L⁻¹) was applied at 9 kg glyphosate · ha⁻¹, according to the manufacturer's recommendations. Bromide ion was applied simultaneously as tracer.

After the herbicide application, soil and groundwater samples were collected periodically over a 3-month period. The sampling schedule was 0, 1, 3, 6, 9, 16, 23, 28, 36, 44, 56 and 89 days after the treatment. Samples were collected at 1.5 (surface), 12.5, 35, 85, 140 and 172.5 cm depths from the ground to study the mobility of glyphosate.

5.4 RESULTS AND DISCUSSION

5.4.1 SOIL PROFILE CHARACTERISATION

The knowledge of physical, chemical and hydrological properties of soils is a fundamental aspect for the characterization of sorption processes. In order to characterize the soil horizons of the experimental field, 5 profiles were sampled and analysed. **Figure 5.2** shows the main characteristics of the soil profile versus depth.

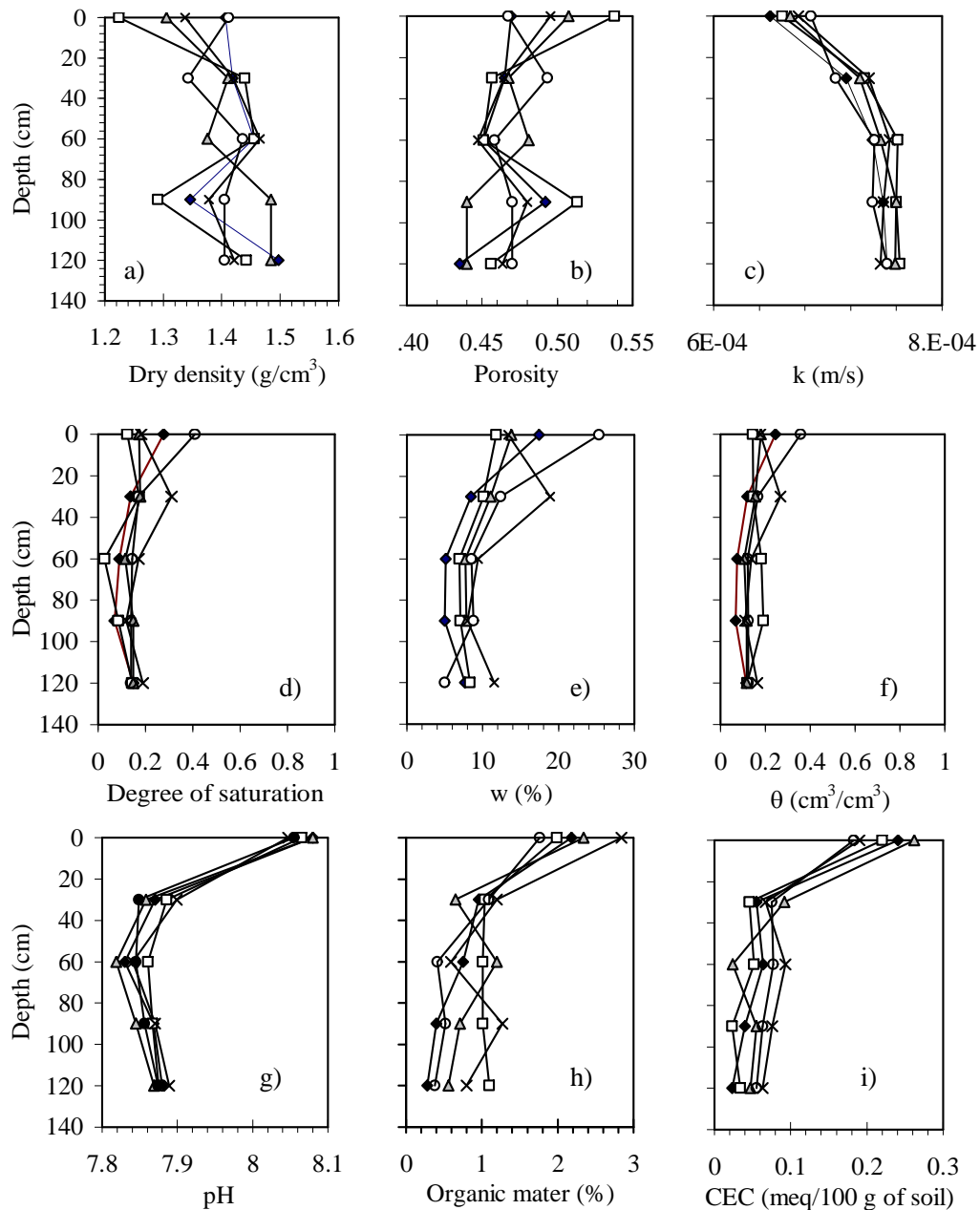


Figure 5.2. Characteristics of soil profile versus depth: a) dry density, b) porosity, c) hydraulic conductivity, d) degree of saturation, e) gravimetric water content, f) volumetric water content, g) pH, h) Organic matter and i) CEC.

According to the physico-chemical properties, the upper part of the soil profile (up to 10-15 cm) is characterised by higher CEC, pH and OM values and lower density and permeability values than the soil sampled at higher depths. The grain size distribution and mineralogical composition for the two horizons are also shown in **Table 5.2**.

Parameters	Depth		% Gravel	% Sand	% Silt	% Clay
Diameter of particles (mm)	(cm)	N	4.0- 2.0	2.0-0.06	0.6-0.02	0.02-0.0
Horizon 1	0-10	6	8.92	83.36	0.83	6.89
Horizon 2	10-120	21	2.49	92.30	0.56	4.65
Main mineralogical composition	Quartz	Illite	Anorthite	Chlorite	Sanidine	Calcite
Horizon 1	33.2%	21.3%	17.2%	5.2%	3.1%	2,1%
Horizon 2	38.1%	17.3%	12.5%	7.2%	4.2%	3,4%

Table 5.2. Grain size distribution of soil. Main mineralogical composition.
N: number of samples.

5.4.2 SORPTION ISOTHERMS

Preliminary adsorption and desorption studies of glyphosate were carried out in closed systems. For the soils studied in this work at the usual analyte concentrations, the most appropriated soil:solution ratio was determined to be 1:5 according to the OECD guidelines [30], obtaining a glyphosate adsorption in non-superficial soils of 49.1% ($\pm 3.05\%$, $n=3$). This ratio has been used in subsequent experiments.

Adsorption behaviour of glyphosate was studied for soils corresponding to the two horizons (0-15 cm and 15-175 cm). The resulting adsorption isotherms are shown in **Figure 5.3**. It can be observed that the superficial soil presents a relatively higher adsorption capacity than the deeper horizon. Considering that the deeper soil represents the most unfavourable conditions regarding contaminant immobilisation and that it accounts for more than 80% of the total soil profile, the following kinetic and sorption experiments were performed using this soil horizon.

Herbicides are generally sold and applied in agriculture as formulations that usually contain mixtures of specific substances, the so called adjuvants, which are added in order to enhance the effectiveness of the active ingredient, glyphosate in this case. Among adjuvants, non-ionic surfactants (*surface active agents*) are the most used in agrochemical formulations as emulsifiable concentrates, microemulsions or wetting and dispersing agents for wettable powders, water dispersible granules and suspension concentrates. These compounds allow an efficient delivery of the active ingredient to the target sites required for the herbicide activity, especially for foliage-applied systemic compounds such as glyphosate [31]. In fact, commercial glyphosate formulations usually contain ethoxylated alkylamines (ANEOs) as surfactants, which are technical mixtures of

alkylamines with different length of both alkyl and ethoxilated chains [32]. Krogh et al. [2] reported that the length of these chains could determine the toxicity of the mixture. In spite of the effort from analytical chemistry to improve the knowledge about the content and the complete composition of these formulations [33,34], there is a great ignorance about environmental toxicity and risk of surfactants due to their sorption behaviour in soils [35]. In this study the adsorption behaviour of pure glyphosate and two widely used commercial herbicides (Roundup and Atila) has been studied separately and then compared in order to determine the effect of the adjuvants.

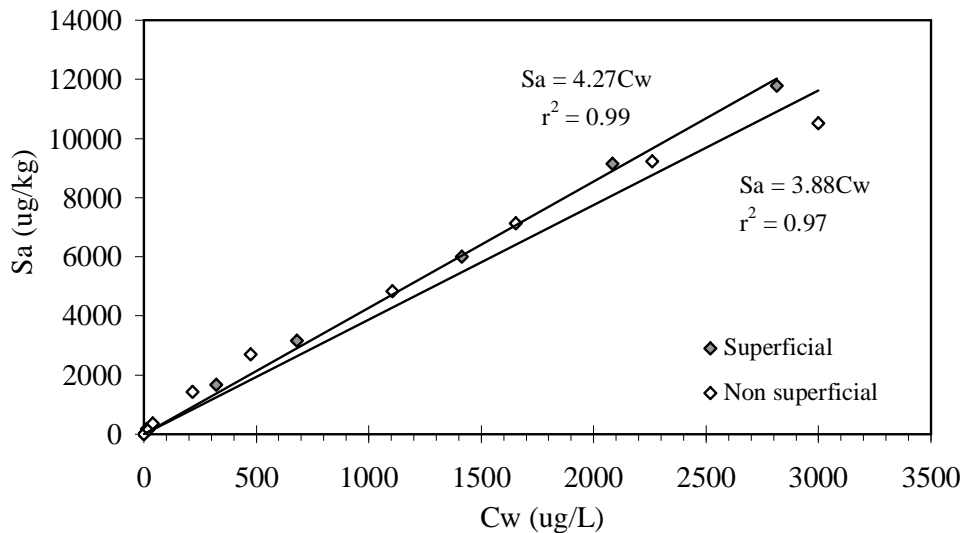


Figure 5.3. Comparison of glyphosate adsorption behaviour in different soil horizons. Experimental conditions: superficial (0-15 cm) and non-superficial (15-55 cm) soils, 1:5 soil:solution ratio, equilibrium solution: $1 \cdot 10^{-4}$ M CaCl_2 . Concentration range: 0-5000 ppb of glyphosate.

First, the kinetic adsorption of glyphosate in soils was studied both as pure compound and as commercial product with soils from the deeper horizon.

As it is shown in **Figure 5.4**, in all the tested products, approximately 75% of the total glyphosate adsorbed at the equilibrium is absorbed during the first hour. This fact could be explained by a physical adsorption of the herbicide to the soil, where the charge of the soil particles plays a crucial role. From an environmental point of view, a rapid adsorption of herbicides is very interesting, since it reduces the contaminant movement through the porous medium, decreasing the contamination risk of the aquifers. After the first hour and until the achievement of equilibrium, it could be predicted an adsorption by chemisorption, because of the low clay content of the soil. The time required to attain an apparent equilibrium is 8-10 hours, as it can be seen in **Figure 5.4**. Therefore, the time for the next batch studies was fixed at 15 hours. It should be noted that during the kinetic experiments no AMPA (the main metabolite of glyphosate) was detected in any case.

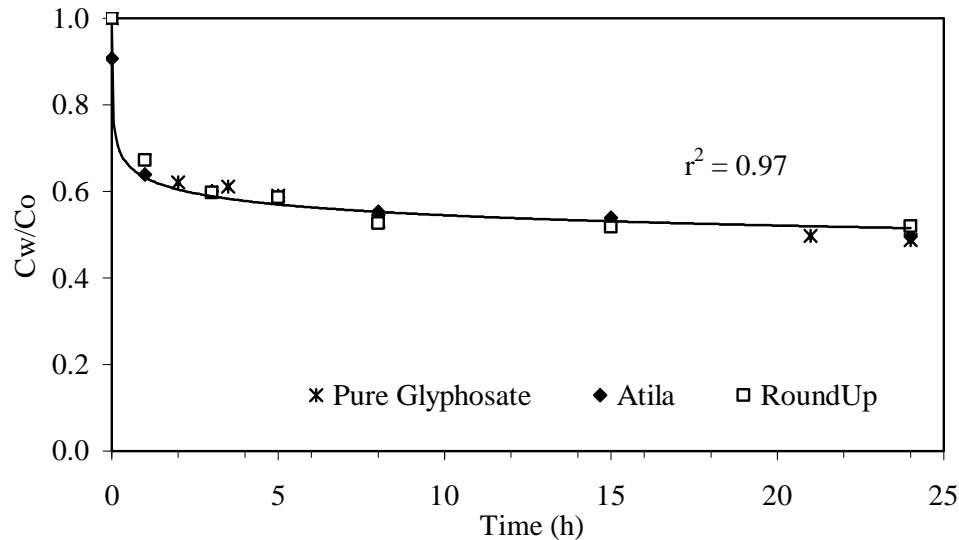


Figure 5.4. Kinetics of the adsorption process obtained for pure glyphosate and two commercial formulations of this herbicide: Atila and Roundup. The results are shown all together. Experimental conditions: non-superficial soil (15-55 cm), 1:5 soil:solution ratio, equilibrium solution: $1 \cdot 10^{-4}$ M CaCl_2 , $1 \text{ mg Glyphosate} \cdot \text{L}^{-1}$.

Adsorption isotherms for the different products containing glyphosate were determined. The results show a similar behaviour for the three products studied (see **Figure 5.5**). In all cases, an increase of the adsorption can be observed at higher analyte concentrations, with a very similar distribution coefficient (k_d). The relationship between the adsorbed concentration and the solution concentration is assumed to be linear according to **Equation 1**,

$$S_a = k_d C_w \quad (1)$$

where S_a and C_w are the concentrations of glyphosate in the soil and in the solution, respectively. k_d is the distribution coefficient between the concentrations in both phases. According to Giles et al.[36], a linear adsorption isotherm is classified as Type C.

It is important to note that the initial range of concentrations is at ppb level (50 to 5000 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), since it was considered sufficient to correlate the sorption behaviour of glyphosate in laboratory and the field experiment. However, adsorption isotherms determined with glyphosate concentrations at ppm level [10,19,21] and higher soil:solution ratios [24] are usual in the literature, which could explain the no linearity reported by several authors [10,20,21]. This could also explain the lower k_d values obtained our case in comparison to other works (3-4 versus 5-400, depending on the sorbent characteristics).

A representation of all the data of adsorption experiments shows a similar adjustment to a linear adsorption isotherm for all the studied products, with similar k_d values (see **Figure 5.5**).

In addition to adsorption isotherms It is also interesting to consider the analyte desorption behaviour. In this case, the adsorption isotherms (24h) have been compared with desorption

isotherms after 48 and 72 hours, for both the pure herbicide and the commercial product Roundup (Figure 5.6). In all cases desorption isotherms are assumed to be linear, with correlation coefficients close to 1.

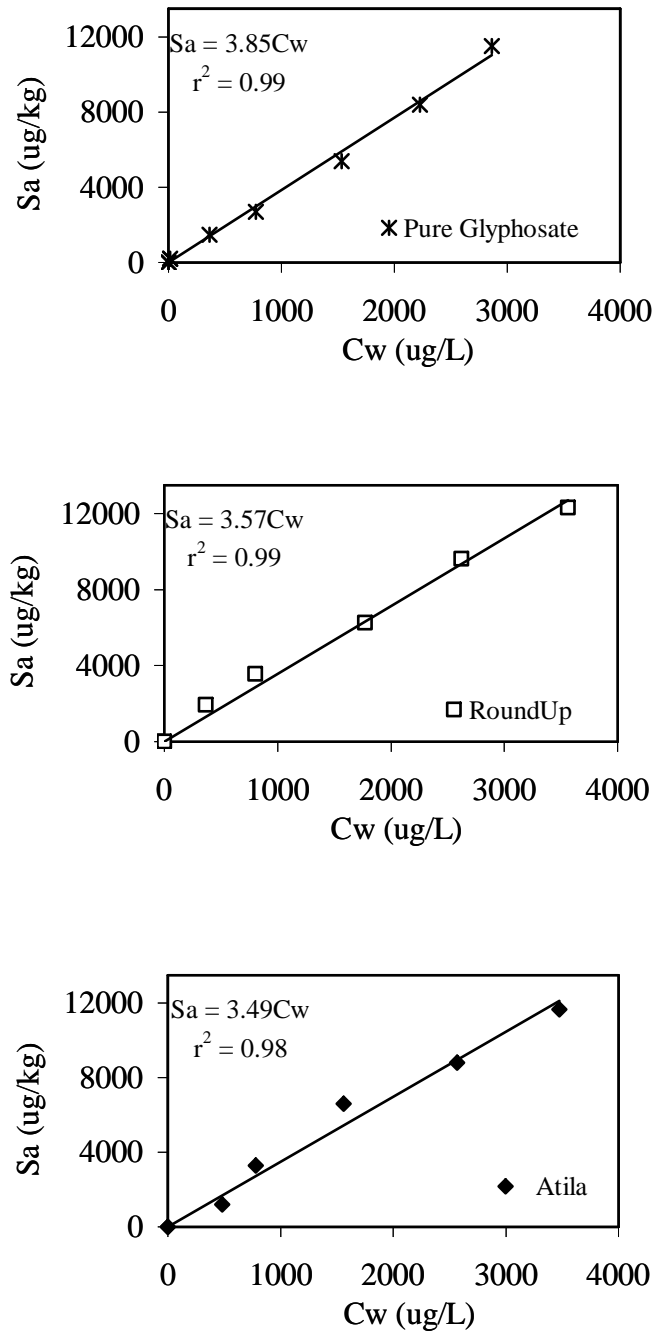


Figure 5.5. Adsorption isotherms of pure glyphosate (a) and two commercial formulations of this herbicide: Roundup (b) and Atila (b).

Experimental conditions: non-superficial soil (15-55 cm), 1:5 soil:solution ratio, equilibrium time: 15 h, equilibrium solution: $1 \cdot 10^{-4}$ M CaCl_2 . Concentration range: 0-5000 ppb of glyphosate.

It should be pointed out the great hysteresis observed during the sorption process, very frequent in soil-pesticide interactions [37]. The hysteresis phenomenon indicates the non reversibility of the adsorption and desorption processes in this kind of soil and for this herbicide, therefore, not all the adsorbed herbicide is then desorbed during the studied time intervals. It can be appreciated that the desorbed herbicide mass is function of the original point of the adsorption isotherm in all cases as indicated in **Figure 5.6**.

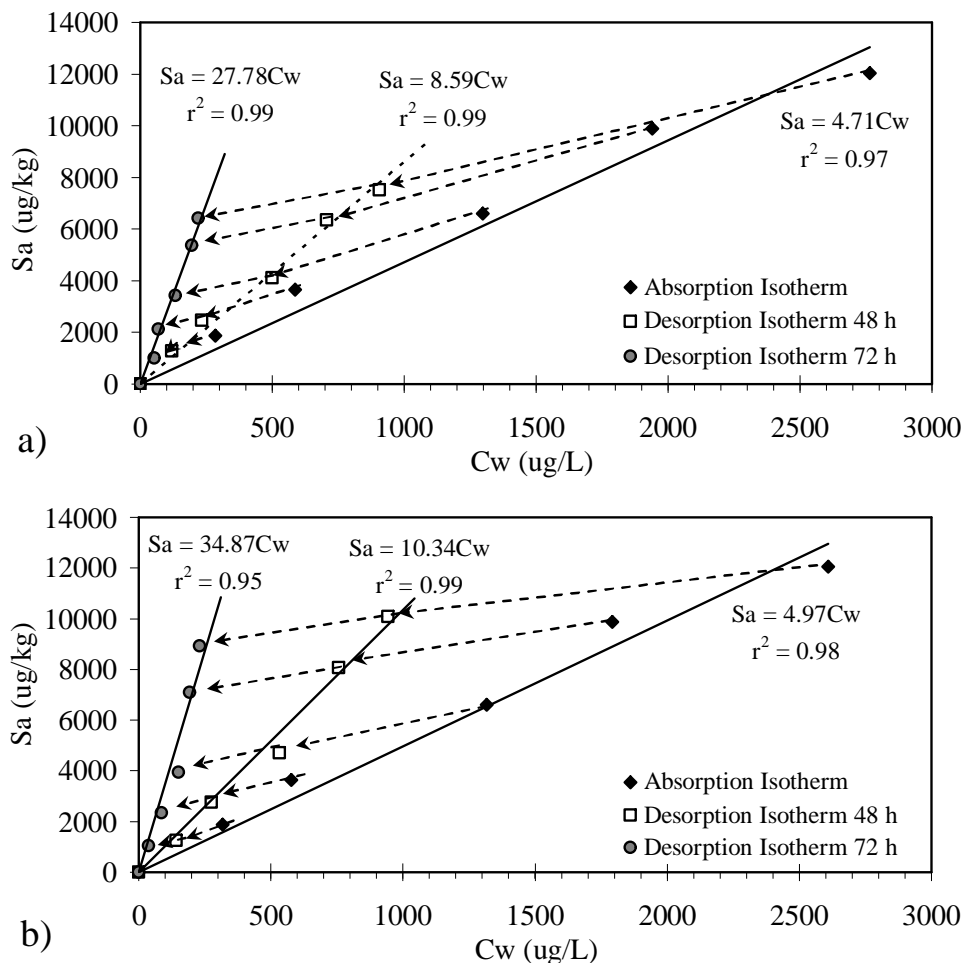


Figure 5.6. Adsorption and desorption isotherms: a) Pure Glifosate and b) RoundUp. Arrows indicate the direction of desorption process from each soil simple of the adsorption isotherm. Experimental conditions: non-superficial soil (15-55 cm), 1:5 soil:solution ratio, equilibrium time: 15 h, equilibrium solution: $1 \cdot 10^{-4}$ M CaCl_2 . Concentration range: $0\text{-}5000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ of glyphosate.

In case of pure glyphosate, the first soil cleaning step with electrolyte solution was performed after 48 hours, and 35.03% ($\pm 0.49\%$) of adsorbed glyphosate is desorbed. In the second cleaning step, there is a release of 10.58% ($\pm 0.38\%$) of the initial mass retained. So, after 72 hours, the desorbed mass is three times lower than the first cleaning. The sum of desorbed mass in both cleaning steps is 45.61% ($\pm 1.6\%$). These results indicate a no fixation of the contaminant to the soil, as Sørensen et al. [38] indicates. Although some authors assume that the

desorption-resistant fraction is unavailable to the microbial degraders [38-39], in our work 1.25% ($\pm 0.32\%$) of AMPA is detected in the solution after 48 hours, while the amount of AMPA detected after 72 hours represents 1.73% ($\pm 0.80\%$) of the glyphosate initially adsorbed onto the soil.

Concerning to the commercial formulation, Roundup, the results are very similar. In the first and the second cleaning steps a 33.9% ($\pm 1.84\%$) and 9.3% ($\pm 1.04\%$) of the initial glyphosate mass adsorbed respectively, is desorbed. Related to the degradation of the herbicide, in this case a higher tendency of glyphosate to metabolize to AMPA is observed, since the total mass of AMPA released amounts 3.6% of the glyphosate mass initially adsorbed, 1.13% ($\pm 0.34\%$) came from the first cleaning step and 2.28% ($\pm 0.69\%$) came from the second one.

The similarity of glyphosate behaviour in its pure and commercial form is confirmed again, as it was observed in the kinetic and adsorption isotherms studies.

5.4.3 MISCIBLE DISPLACEMENT EXPERIMENTS

Column studies have been performed with the deeper soil at two flow-rates: the minimum applicable flow-rate to guarantee stability ($0.03 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$) and a higher flow-rate ($0.11 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$) to evaluate its effect. The behaviour of the glyphosate in the pure or commercial (Roundup and Atila) form was also compared.

The main characteristics of the stain column and the packed soil are shown in **Table 5.3**.

Column characteristics			
Length (L) cm	10.00	Particle density (ρ_s) g/cm^3	2.66
Diameter (Φ) cm	1.60	Pore volume (V_p) cm^3	10.0
Total volume (V)	20.11	Porosity (η) cm^3/cm^3	0.36
Weight of soil (M) g	53.3	Volumetric water content (θ) cm^3/cm^3	0.36
Bulk density (ρ_h) g/cm^3	2.65	Water flow (Q) cm^3/min	0.11
			0.03
Dry density (ρ_d) g/cm^3	1.45	Volume depth (V_m) cm^3	0.12

Table 5.3. Principal soil column characteristics used in miscible displacement experiments.

Knowing the soil density, water volumetric content (θ), soil dry density (ρ) and the distribution coefficient (k_d) from the adsorption isotherm, the retardation factor (R) of glyphosate in the porous medium can be estimated. The retardation factor indicates the delay of the herbicide transport rate in comparison with the water rate, which allows predicting the required time for the mass center of the analyte injected to pass exit the column. This factor is calculated from

Equation 2:

$$R = 1 + \rho k_d / \theta \quad (2)$$

In case of tracers, k_d is zero, so R is 1; but for adsorbable compounds R is much higher than 1. This indicates that k_d measured under equilibrium conditions only reveals the potential sorption capacity of a material.

- **TRACER**

The use of tracers is an indispensable tool for the study of water and contaminant transport as it allows verifying the absence of preferential pathways and to obtain the column pore volume. In our study pentafluorobenzoate ion was selected as tracer. The presence of a single peak in the curves assures soil homogenization and good package inside the steel column. The pore volume (or water) of the soil packed into the column is 10.0 mL and the maximum of the peak curve corresponds to a pore volume of 1. In each test the mass recovered (M_r) were calculated according to **Equation 3**. In all column experiments with tracer, more than 70% of the mass of injected tracer was recovered for two pore volumes; besides, in any case the concentration of tracer at the end of the experiment was zero. In spite of the small tail on the right hand, the obtained curve is practically symmetric (see **Figure 5.7**). The tailing was more evident in case of lower flow-rate because of the dispersion effect.

$$M_r = Q \cdot \Delta t \cdot (C_{i+1} - C_i) / 2 \quad (3)$$

where Δt is time interval (s), C_i is the concentration in water (mg/l) and Q is the outflow rate ($\text{m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$).

- **GLYPHOSATE**

The curves obtained for glyphosate were not symmetric in any case, as did not resume the zero concentration at the end of the experiment. This fact agrees with the hysteresis phenomenon described before, involving an incomplete desorption of the herbicide previously adsorbed.

Although in batch experiments the adsorption of glyphosate was similar when it was applied in pure or commercial form, in miscible displacement experiments performed at low flow rate, a higher adsorption is observed when glyphosate is applied in its pure form, as it can be seen in **Figure 5.7a**. At the peak maximum, there is a difference of adsorbed mass of 0.091 μg of glyphosate, which represents about 0.54% of the applied herbicide. However, at higher flow-rates, both curves, for pure and commercial glyphosate, practically overlap (see **Figure 5.7b**). The differences observed in the curves for the flow-rates evaluated can be explained by the longer residence time of the herbicide inside the column at low flow-rates, allowing longer contact time between analyte and soil, favouring its adsorption and degradation. As other authors reported [19,40], the results indicate that k_d is lower when measured in flow conditions than when

measured in batch studies, and that k_d measured at low flow-rates approaches that obtained in batch studies.

The calculated retardation factors and the real ones for each form of glyphosate tested are shown in **Table 5.4**. It can be observed that the real retardation factors are very close to the calculated factors in case of high flow-rates. However, at lower flow-rates, $0.03 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, the real retardation factors are higher due to a longer contact time between analyte and soil and a higher dispersion effect of analyte (axial and radial).

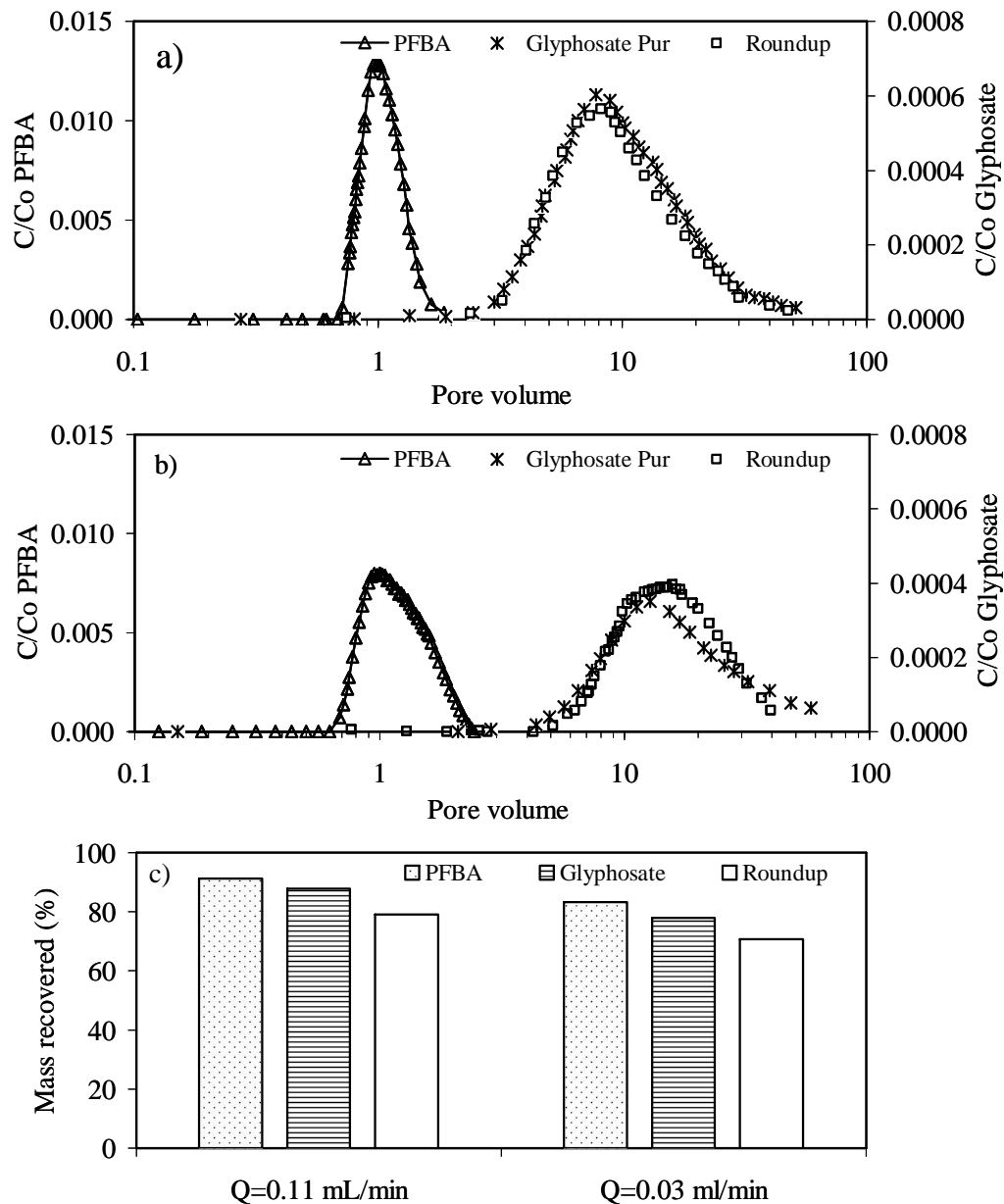


Figure 5.7. Comparison of breakthrough curves obtained for the tracer, pentafluorobenzoate ion, and the herbicide, applied in its pure and in its commercial form, at different flow-rates: a) $0.11 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ and b) $0.03 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. c) Comparison of mass recoveries at different flow-rates.

Although in batch experiments the adsorption of glyphosate was similar when it was applied in pure or commercial form, in miscible displacement experiments performed at low flow rate, a higher adsorption is observed when glyphosate is applied in its pure form, as it can be seen in **Figure 5.7a**. At the peak maximum, there is a difference of adsorbed mass of 0.091 μg of glyphosate, which represents about 0.54% of the applied herbicide. However, at higher flow-rates, both curves, for pure and commercial glyphosate, practically overlap (see **Figure 5.7b**). The differences observed in the curves for the flow-rates evaluated can be explained by the longer residence time of the herbicide inside the column at low flow-rates, allowing longer contact time between analyte and soil, favouring its adsorption and degradation. As other authors reported [19,40], the results indicate that k_d is lower when measured in flow conditions than when measured in batch studies, and that k_d measured at low flow-rates approaches that obtained in batch studies.

The calculated retardation factors and the real ones for each form of glyphosate tested are shown in **Table 5.4**. It can be observed that the real retardation factors are very close to the calculated factors in case of high flow-rates. However, at lower flow-rates, 0.03 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, the real retardation factors are higher due to a longer contact time between analyte and soil and a higher dispersion effect of analyte (axial and radial).

	(ρ) g/cm^3	θ	K_d	r^2	R_c	R_r	
						Flow-rate ($\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$)	
						0.11	0.03
PFBA	1.45	0.36	0	0.99	1	1.02	1.12
Pure Glyphosate	1.45	0.36	3.85	0.99	13.49	12.29	18.45
Roundup	1.45	0.36	3.57	0.99	12.58	12.21	18.97

Table 5.4. Values of distribution coefficient (k_d), correlation coefficient (r^2), calculated retardation factor (R_c) and real retardation factor (R_r).
R values are calculated from equation 2.

Few controlled transport experiments in undisturbed soils with glyphosate have been carried out to date. The comparison of the results is always difficult because of the different nature of the soils studied and the different objectives of the studies. In the work by De Jonge et al. [41] two soil of different structure were compared, a sandy loam soil (macroporous soil) and a sandy soil. The amount of glyphosate leached from the macroporous sandy loam soil were 50-150 times larger than from the sandy soil, which would be more similar to our soil. Strange-Hansen et al. [19] correlate high values of k_d with slow mineralization of glyphosate in batch studies

comparing gravel and sandy soils, whereas in column experiments they conclude that precipitation events may cause up to one-fifth of applied glyphosate to leach from gravel.

5.4.4 FIELD STUDY

As it is described in the experimental section, the field study was carried out in Begur (Girona, Spain) during three months. It is important to note that the experimental plot was daily irrigated with reclaimed water, but not at a constant rate, as it can be seen in **Figure 5.8a**. This irrigation involved a recharge in the soil which resulted in variations of the piezometer level or water table and the degree of saturation with time (see **Figure 5.8b** and **5.8c**).

- **TRACER**

Bromide ion was used as the tracer in the field study. Although the next day of the tracer application it was mainly located in the most superficial soil, it could be also detected at 45 cm depth (see **Figure 5.8d**). The following days, the tracer concentration decreased drastically in the superficial soil (**Figure 5.8g**), while increasing in deeper horizons. However, after 16 days of the application, bromide was not detected in sample.

- **GLYPHOSATE AND AMPA**

The presence of the glyphosate, is notable until 1 month after its application (see **Figure 8e**). However, some traces of glyphosate were detected until two months after application. Concerning its presence in the soil profile, it is important to note the high amount of herbicide in the first horizon during the first 9 days after application (8.4, 3.5 i 1.8 μg glyphosate per gram of soil in the first, sixth and ninth days, respectively, see **Figure 8i**). These results agrees with those obtained by Roy et al. [42], who reports that glyphosate residues in the upper organic layer was always more than 95% of the total present in the soil core at any time. However, the next day of the application, glyphosate was already detected at 55 cm of depth at low levels ($0.0042 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). The deeper horizon where glyphosate was detected was nearly 70 cm, with $0.0003 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ soil after 28 days. The same day, $0.17 \mu\text{g}$ of glyphosate per g of soil were determined in the superficial soil. At the intermediate depths, the presence of glyphosate was detected for the 28 days after the application, but always at concentrations much lower than in the superficial soil. This fact indicates that glyphosate is mainly adsorbed in the superficial soil because of its high organic matter content, as well as its high ion exchange capacity. This way, as many authors point out [4,7,43,44], a positive correlation between adsorption and both parameters, OMC and CEC, is observed in this work.

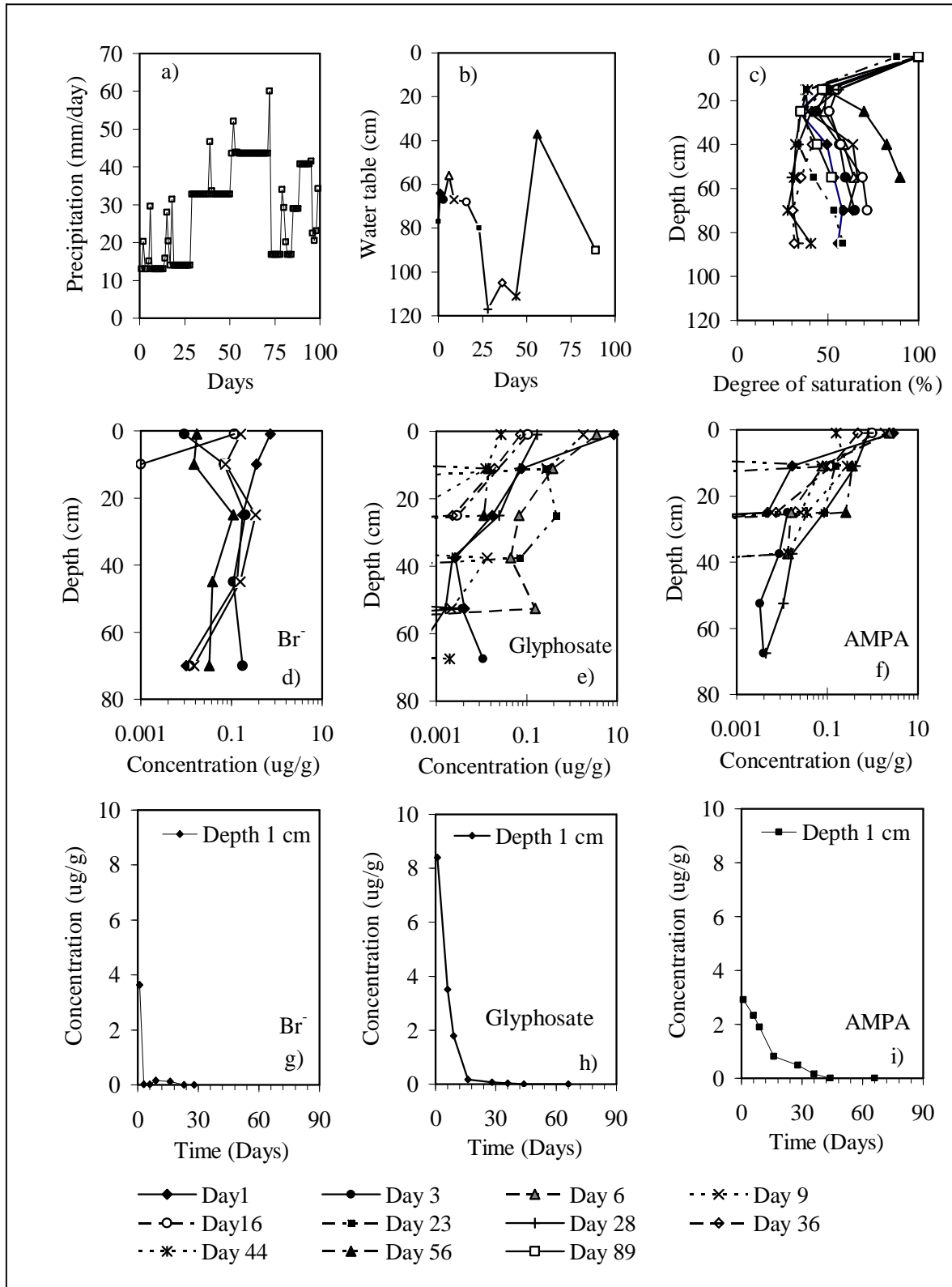


Figure 5.8. Results obtained in field study: a) precipitation versus days, b) piezometric level or water table versus days, c) degree of saturation versus depth, d) concentration of tracer versus depth, e) concentration of tracer in surface for different time, f) concentration of Glyphosate versus depth, g) concentration of Glyphosate in surface for different time and h) concentration of AMPA versus depth and i) concentration of AMPA in surface for different time.

In the study of glyphosate mobility in soil, the degradation of this compound to aminomethylphosphonic acid (AMPA) should be taking into account. The presence of AMPA in soil was mainly detected in the most superficial soil, as it occurred with glyphosate (see **Figure 8.5f**). It is worth to note that the next day of the herbicide application, 2.91 μg of AMPA per gram of soil were detected in the upper soil layer, indicating a very fast degradation of glyphosate to AMPA. As it is shown in **Figure 5.8i**, the presence of the metabolite in the superficial soil was observed up to 44 days after the application ($0.16 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), although the detected concentrations decreased considerably from the first until the ninth day ($1.89 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). This fact indicates that AMPA, in spite of being also degraded by the microorganisms, is more persistent than glyphosate, which is in line with literature results [45,46]. Moreover, the determined concentrations of AMPA at the intermediate depths were higher than the measured for glyphosate, as observed Huang et al. [44], especially considering the lower initial concentration of AMPA compared to the glyphosate's (three times lower). These results suggest a higher mobility of this compound respect to its precursor. On the other hand, it must be noted the little presence of AMPA in the deepest soils, only detected one month after the application of the herbicide ($0.0044\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), indicating the degradation of the metabolite.

5.5 CONCLUSIONS

In the first part of this work the main sorption parameters of glyphosate in the selected soils have been determined. Higher values of K_d obtained for soils with higher OMC and CEC values (4.3 versus 3.6) confirmed the important role of these parameters in the adsorption behaviour of glyphosate, as reported by several authors [4-7]. Adsorption and desorption isotherms have been classified as Type C, according to the Giles classification. An important hysteresis effect was observed during the sorption process, commonly found in soil-pesticide interactions.

Although a lower adsorption of glyphosate in the commercial herbicide formulation was observed in case of miscible displacement experiments at low flow-rates, the presence of adjuvants has shown to have little effect on the adsorption behaviour of the active ingredient.

In the last part of this work, the migration of glyphosate herbicide in the unsaturated zone of an experimental patch over the Begur water-treatment plant (Girona, Spain). The results showed a limited risk of contamination in the aquifer of the area due to a very low mobility of the herbicide in the soil profile, because of the strong adsorption of glyphosate and AMPA in the most superficial soil, as well as the rapid degradation of glyphosate to AMPA. This fact was corroborated with the analysis of the groundwater during the sampling period, which gave negative results in all cases. These results are in agreement with various published works [47,48], although some other authors had found traces of the herbicide in groundwater [23,49].

5.6 REFERENCES

- [1] T.Crisanto, M.J.Sanchez-Martin, M.Sanchez-Camazano, M.Arienzo, *Toxicol. Environ. Chem.*, 45 (1994) 97
- [2] K.A.Krogh, B.Halling-Sorensen, B.B.Mogensen, K.V.Vejrup, *Chemosphere*, 50 (2003) 871
- [3] M.T.K.Tsui, L.M.Chu, *Chemosphere*, 52 (2003) 1189
- [4] P. Sprankle, W. F. Meggit, D. Penner, *Weed Sci.*, 23 (1975) 229
- [5] E.Morillo, T.Undabeytia, C.Maqueda, A. Ramos, *Chemosphere*, 40 (2000) 103
- [6] S. M. Carlisle, J. T. Trevors, *Water, Air Soil Pollut.*, 39 (1988) 409
- [7] A. Piccolo, G. Celano, P. Conte, *J. Agric. Food Chem.*, 44 (1996) 2442
- [8] J. S. McConnell, L. R. Hossner, *J. Agric. Food Chem.*, 33 (1985) 1075
- [9] E.Morillo, T.Undabeytia, C.Maqueda, *Environ. Sci. Technol.*, 31 (1997) 3588
- [10] R. L Glass, *J. Agric. Food Chem.*, 35 (1987) 497
- [11] R.G.Gerritse, J.Beltran, F.Hernández, *Australian J. Soil Res.*, 34 (1996) 599
- [12] H.De Jonge, L.W.De Jonge, O.H.Jacobsen, T.Yamaguchi, P.Moldrup, *Soil Sci.*, 166 (2001) 230
- [13] L.Mamy, E.Barriuso, *Chemosphere*, 61 (2005) 844
- [14] J.Sheals, S. Sjöberg, P.Persson, *Environ. Sci. Technol.*, 36 (2002) 3090
- [15] J. S. McConnell, L. R. Hossner, *J. Agric. Food Chem.*, 33 (1985) 1075
- [16] A. Piccolo, G. Celano, *Environ. Toxicol. Chem.*, 13 (1994) 1737
- [17] A.Piccolo, G.Celano, M.Arienzo, A.Mirabella, *J. Environ. Sci. Health B*, 29 (1994) 1105
- [18] C.Maqueda, E.Morillo, T.Undabeytia, F.Martín, *Chemosphere*, 37 (1998) 1063
- [19] R.Strange-Hansen, P.E.Holm, O.S.Jacobsen, C.S.Jacobsen, *Pest. Manag. Sci.*, 60 (2004) 570
- [20] X. Huang, T. Pedersen, M. Fischer, R. White, T.M. Young, *Environ. Sci. Technol.*, 38 (2004) 3272
- [21] Y. Yu, Q-X. Zhou, *Chemosphere*, 58 (2005) 811
- [22] M. Newton, L.M.Horner, J.E. Cowell, D.E. White, E.C. Cole, *J. Agric. Food Chem.*, 42 (1992) 1795
- [23] F.Veiga, J.M.Zapata, M.L.Fernández Marcos, E.Álvarez, *Sci. Total Environ.*, 271 (2001) 135
- [24] X. Huang, T. Pedersen, M. Fischer, R. White, T.M. Young, *Environ. Sci. Technol.*, 38 (2004) 3263
- [25] M.Waldman, Y.Shevah, *Pure Appl. Chem.*, 65 (1993) 1595
- [26] D.C.Goody, J.P.Bloomfield, P.J.Chilton, A.C.Johnson, R.J.Williams, *Ground Water*, 39 (2001) 262
- [27] H.Vereecken, *Pest. Manag. Sci.*, 61 (2005) 1139
- [28] C.J.Miles and H.A.Moye, *J. Agric. Food Chem.*, 36 (1988) 486
- [29] M.L.Brusseau, R.E.Jessup, P.S.C.Rao, *Environ. Sci. Technol.*, 24 (5) (1990) 727
- [30] *OECD guideline for the testing of chemicals. Adsorption-Desorption using a batch equilibrium method.* OECD/OCDE 106, 21st January 2000
- [31] R.C.Kirkwood, R.Hetherringtoth, T.L.Reynolds, G.Marshall, *Pest. Manag. Sci.*, 56 (2000) 359
- [32] R.H.Schreuder, A.Martijn, H.Poppe, J.C.Kraak, *J. Chromatogr.* 368 (1986) 339
- [33] K.A.Krogh, K.V.Vejrup, B.B.Mogensen, B.Halling-Sorensen, *J. Chromatogr. A*, 957 (2002) 45

- [34] M. Corbera, B.M.Simonet, V.Salvadó, M.Hidalgo, *J. Chromatogr. A*, in revision
- [35] N.Wang, J.M.Besser, D.R.Buckler, J.L.Honegger, C.G.Ingersoll, B.T.Johnson, M.L.Kurtzweil, J.MacGregor, M.J.McKee, *Chemosphere*, 59 (2005) 545
- [36] C.Giles, T.H. MacEwan, S.N. Nakhwa, D.Smith, *J. Chem. Soc.*, 111 (1960) 3973
- [37] D.L.Sparks. *Soil physical chemistry*, CRC Press, USA (1986) ISBN: 0-873-71883-6
- [38] S.R.Sorensen, A.Schultz, O.S.Jacobsen, J.Aamand, *Environ. Pollution*, 141 (2006) 184
- [39] M.F.Zaranyika, M.G.Nyandoro, *J. Agric. Food Chem.*, 41 (1993) 838
- [40] J.Beltran, R.G.Gerritse, F.Hernández, *Eur. J. Soil Sci.*, 49 (1998) 149
- [41] H.De Jonge, L.W.De Jonge, O.H.Jacobsen, *Pest. Manag. Sci.*, 56 (2000) 909
- [42] D.N.Roy, S.K.Konar, S.Banerjee, D.A.Charles, D.G.Thompson, R.Prasad, *J. Agric. Food Chem.*, 37 (1989) 437
- [43] C.T.Chiou, D.E.Kile, T.I.Binton, R.L.Malcom, J.A.A.Leenheer, *Environ. Sci. Technol.*, 20 (1986) 502
- [44] X.Huang, T.Pedersen, M.Fischer, R.White, T.M.Young, *Environ. Sci. Technol.*, 38 (2004) 3263
- [45] J.P.Geisy, S.Dobson, K.R.Solomon, *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, 138 (1994) 73
- [46] P.Laitinen, K.Siimes, L.Eronen, S.Rämö, L.Welling, S.Oinonen, L.Mattsoff, M.Ruohonen-Lehto, *Pest. Manag. Sci.*, 62 (2006) 473
- [47] *R.E.D. Facts. Glyphosate. Prevention, Pesticides and Toxic Substances*, EPA-738-F-93-011 (September 1993)
- [48] L.Guarracino, L.Candela Lledó, J.E.Santos. *Estudios de la zona no saturada del suelo*, Eds. R.Muñoz-Carpena, A.Ritter, C.Tascón. ICIA, Tenerife, 1999. ISBN: 84-699-1258-5
- [49] W. M. Edwards, Jr G. B. Triplett, R. M. Kramer, *J. Environ. Qual.*, 9 (4) (1980) 661

CHAPTER 6

DISCUSSIÓ GLOBAL DELS RESULTATS

CHAPTER 6	
DISCUSSIÓ GLOBAL DELS RESULTATS.....	179
6.1	DESENVOLUPAMENT DE METODOLOGIA PER A LA DETERMINACIÓ DE GLIFOSAT I AMPA 182
6.1.1	<i>CROMATOGRAFIA LÍQUIDA</i> 182
6.1.2	<i>ELECTROFORESI CAPIL·LAR</i> 183
6.2	EXTRACCIÓ I PRECONCENTRACIÓ DE GLIFOSAT I AMPA EMPRANT FASES BESCANVIADORES DE IONS 185
6.2.1	<i>RESINES POLIMÈRIQUES</i> 186
6.2.2	<i>ADSORBENT DE SÍLICA MODIFICADA</i> 188
6.3	COMPARACIÓ RESULTATS: HPLC VERSUS CE 189
6.4	CARACTERITZACIÓ D'ALQUILAMINES ETOXILADES EN FORMULACIONS COMERCIALS D'HERBICIDES MITJANÇANT CROMATOGRAFIA LÍQUIDA - ELECTROSPRAI - ESPECTROMETRIA DE MASSES 190
6.4.1	<i>MÈTODE D'ANÀLISI</i> 190
6.4.2	<i>APLICACIONS</i> 192
6.5	ESTUDI DEL TRANSPORT I MOBILITAT DE GLIFOSAT EN SÒLS DE BEGUR..... 194
6.5.1	<i>EXTRACCIÓ I PURIFICACIÓ</i> 194
6.5.2	<i>CARACTERITZACIÓ DEL SÒL</i> 195
6.5.3	<i>ESTUDIS DE SORCIÓ DE GLIFOSAT EN SÒLS EN CONDICIONS D'EQUILIBRI</i> 195
6.5.4	<i>EXPERIMENTS EN COLUMNA</i> 197
6.5.5	<i>ESTUDI DE CAMP</i> 198
6.6	BIBLIOGRAFIA..... 201

La problemàtica de l'ús de productes químics amb finalitats agrícoles és un motiu de creixent preocupació en la societat. Tot i els nombrosos beneficis, aquests productes poden ocasionar problemes a llarg termini. Per aquest motiu és important caracteritzar la seva dinàmica en el medi ambient, des de poder determinar-ne la mínima quantitat en qualsevol matriu ambiental fins a predir el seu comportament en el medi. Els estudis realitzats en aquesta tesi van dirigits a aquests aspectes. En primer lloc s'ha dissenyat un sistema per a l'extracció i preconcentració de glifosat i el seu principal metabòlit, AMPA, en matrius aquoses, que a posteriori s'ha aplicat a la determinació dels anàlits en aigües emprant tècniques diferents. A continuació s'ha desenvolupat un mètode de caracterització i quantificació d'alquilamina etoxilats, tensioactius que s'addicionen habitualment a les formulacions comercials de glifosat. En una altra vessant, s'ha estudiat la mobilitat del glifosat en sòls, així com l'efecte dels tensioactius en les propietats d'adsorció del component actiu en les formulacions comercials. Finalment, s'ha desenvolupat un procediment analític per a la determinació de glifosat i AMPA en sòls, que s'ha aplicat a l'estudi de camp sobre la mobilitat de l'herbicida en una aplicació controlada.

Els resultats obtinguts en els estudis realitzats es recullen en els capítols 2-5 d'aquesta tesi. A continuació, s'exposen els resultats més destacats de cadascun dels apartats, discutint en cada cas aquells aspectes més interessants.

6.1 DESENVOLUPAMENT DE METODOLOGIA PER A LA DETERMINACIÓ DE GLIFOSAT I AMPA

En la introducció d'aquesta tesi s'ha fet una revisió dels mètodes aplicables a la determinació analítica de glifosat i el seu metabòlit, AMPA. Per les característiques químiques d'ambdós anàlits, els mètodes descrits impliquen majoritàriament l'ús de tècniques cromatogràfiques, especialment cromatografia líquida, amb detectors diversos. En aquesta tesi s'han utilitzat les tècniques de cromatografia líquida i electroforesi capil·lar. En el cas de la cromatografia líquida s'ha treballat amb dos sistemes de detecció, UV-vis i fluorescència, mentre que en electroforesi capil·lar només s'ha utilitzat la detecció UV-vis, bàsicament per raons de disponibilitat dels diversos instruments.

6.1.1 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA

En aquest treball s'han utilitzat dos mètodes d'anàlisi per cromatografia líquida (LC) diferents: un mètode amb detecció per UV-vis i un altre mètode amb detecció per fluorescència.

En el mètode per cromatografia líquida amb detecció UV-vis s'ha partit del mètode proposat per Kawai et al. [1], que es basa en un mecanisme de fase invertida.

La derivatització del glifosat i l'AMPA, necessària ja que aquests compostos no absorbeixen la radiació UV-vis, es du a terme amb clorur de tossil en condicions alcalines (pH 11) a 50°C. Una alíquota de la mescla s'injecta en el sistema cromatogràfic, per on circula una fase mòbil de tampó fosfat 0.06 M (pH 2,30) - acetonitril (85:15, v/v).

El límit de detecció d'aquest mètode és de 0,1 mg·L⁻¹, mentre que el rang de linealitat es troba entre 0,1 – 10 mg·L⁻¹.

El mètode amb detecció per fluorescència, que és molt més sensible que l'anterior, implica cromatografia de bescanvi aniònic. En aquest cas també cal una etapa de derivatització prèvia a la injecció al cromatògraf a causa que ni el glifosat ni l'AMPA tenen propietats fluorescentes.

En aquest cas, tot i basar-nos en el mètode proposat per Miles et al. [2], ha calgut una optimització de les condicions d'anàlisi prèvia a la seva aplicació.

Els paràmetres que s'han estudiat han estat la longitud d'ona, les condicions per la reacció de derivatització, la composició de la fase mòbil (pH del tampó i relació tampó fosfat:acetonitril) i el volum d'injecció de la mostra. Les condicions analítiques que han permès obtenir la màxima repetibilitat i reproduïbilitat del mètode (RSD < 5) han estat:

- DERIVATITZACIÓ: 0,2 mL mostra + 1,8 mL tampó borat 0,025M pH=9 + 1,8 mL acetona + 0,2 mL FMOC-Cl 0,01M en acetona → 2 extraccions amb 1 mL d'acetat d'etil
- COLUMNA: Kromasil 100 NH₂
- FASE MÒBIL: tampó fosfat 0,05M pH=5.5 / acetonitril (65:35, v/v)
- LONGITUD D'ONA D'EXCITACIÓ I EMISSIÓ: 262 nm i 316 nm
- VOLUM D'INJECCIÓ: 100 µL

En aquestes condicions s'obtenen uns límits de detecció i quantificació per glifosat de 0,5 µg·L⁻¹ i 3 µg·L⁻¹, i per AMPA, 0,2 µg·L⁻¹ i 0,5 µg·L⁻¹, respectivament. El rang de linealitat va de 3 a 500 µg·L⁻¹ per glifosat i de 0,5 a 200 µg·L⁻¹ per AMPA. Es pot observar com els límits de detecció són 3 ordres de magnitud més baixos que amb el sistema de detecció UV-vis, tot i que els rangs de linealitat són més estrets.

En la **Figura 6.1.** es pot veure un cromatograma obtingut en les condicions de treball utilitzades.

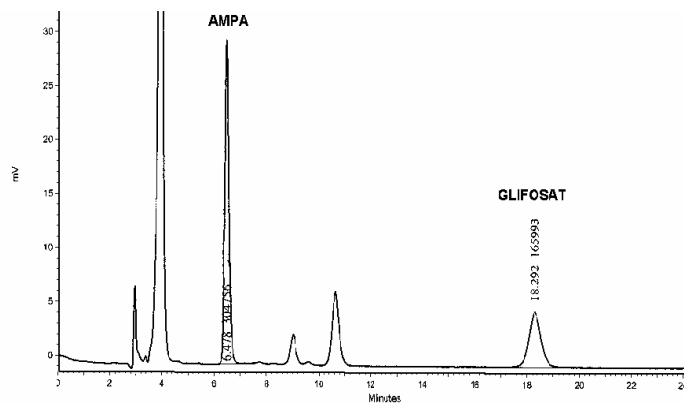


Figura 6.1. Cromatograma corresponent a un patró de 100 ppb de glifosat i AMPA.

6.1.2 ELECTROFORESI CAPIL·LAR

La tècnica d'electroforesi capil·lar amb detecció indirecta presenta el gran avantatge que no cal derivatitzar les mostres prèvia a la seva determinació analítica, de manera que el temps d'anàlisi es redueix de forma important.

Tot i que el mètode emprat es basa en el mètode desenvolupat per Cikalo et al. [3], ha estat modificat lleugerament per intentar millorar els límits de detecció. Les modificacions principals han estat les mides del capil·lar (75 µm, L_T=57 cm, L_{eff}=50 cm), el temps d'injecció (10 s), el voltatge de separació (27kV) i la longitud d'ona de detecció (254 nm). En aquestes condicions s'ha comprovat la reproduïbilitat del mètode (RSD<5%), així com els rangs de linealitat per ambdós anàlits: 5-850 µg·L⁻¹ per glifosat i 4-550 µg·L⁻¹ per AMPA.

El tipus d'electroferograma que s'obté en aquestes condicions es pot veure en la Figura 1 del capítol 3.

L'opció d'utilitzar altres tipus d'injecció de la mostra (electrocinètica, stacking,...) ha estat descartada per la seva problemàtica en cas demostres reals, ja descrita per altres autors [3].

6.2 EXTRACCIÓ I PRECONCENTRACIÓ DE GLIFOSAT I AMPA EMPRANT FASES BSCANVIADORES DE IONS

Les baixes concentracions dels anàlits quan es troben en el medi impliquen etapes d'extracció i preconcentració abans de la seva determinació analítica, ja que els límits de detecció d'aquests mètodes no són suficientment baixos. Donades les propietats àcid-base que presenta l'herbicida glifosat i el seu metabòlit, AMPA, ambdós anàlits poden estar en forma iònica a l'ajustar adequadament el pH del medi on es troben. Per aquest motiu, s'ha considerat que la tècnica d'extracció en fase sòlida emprant el mecanisme de bescanvi iònic és la millor alternativa per a la seva extracció i preconcentració de matrius ambientals. Tot i que ambdós anàlits poden presentar càrrega negativa o positiva, la forma aniònica predomina en un ampli rang de pH. En el cas de les mostres d'interès, especialment aigües naturals, aquesta és la forma majoritària als valors habituals de pH. Així doncs, les fases sòlides més indicades pels nostres anàlits són les de bescanvi aniònic.

En aquesta part del treball (Capítols 2 i 3), en primer lloc s'han optimitzat les condicions químiques per a l'extracció de glifosat emprant un adsorbent polimèric, AMBERLITRE®IRA-416, per a continuació, avaluar altres tipus d'adsorbents (Capítol 2) i aplicar-ho a mostres de diversa procedència (Capítol 3). La preconcentració dels anàlits s'aconsegueix eluint els anàlits amb volums inferiors al volum de mostra inicial.

En l'optimització del sistema s'ha estudiat l'influència de diversos paràmetres sobre l'eficiència d'extracció i elució de glifosat de l'adsorbent de bescanvi aniònic, AMBERLITRE®IRA-416, que presenta un grup funcional de tipus $-N^+(CH_2CH_2OH)(CH_3)_2$.

En l'etapa d'extracció s'han avaluat el flux de càrrega, el pes d'adsorbent i el pH de la mostra. Cap d'aquests paràmetres ha donat lloc a diferències importants en els percentatges de retenció de glifosat en l'adsorbent. Tot i que l'extracció es manté a diferents fluxos de càrrega, es treballa a fluxos intermitjos, ja que els mecanismes de bescanvi iònic són relativament lents [4]. Inicialment es decideix treballar amb un gram de resina, ja que pels volums i tipus de mostra que s'apliquen en aquesta etapa és suficient. El pH de la mostra no és un factor crític en el cas d'emprar adsorbents polimèrics, els quals són estables en un ampli rang de pH [5]. Per qüestions de semblança amb les mostres naturals, el pH s'ajusta a 8.

Pel que fa a l'elució, s'han avaluat diverses dissolucions. Segons la teoria clàssica del bescanvi iònic, els ions més voluminosos i carregats són els que tenen més tendència a ser bescanviats [4,6] tot i que no es pot oblidar que el procés és un equilibri, on les concentracions de les espècies juguen un paper determinant. Per aquest motiu, s'avalua en primer lloc l'ió citrat ($C_6H_5O_7^{3-}$), que diversos autors utilitzen satisfactòriament [7-9]. No obstant, per al nostre adsorbent no s'obtenen recuperacions quantitatives (només de 77%). La recuperació quantitativa

de glifosat de la resina polimèrica s'aconsegueix amb una dissolució de clorur de sodi a concentracions elevades. El fet que quan s'utilitza àcid clorhídric 0,1M s'obtinguin recuperacions similars confirma que el procés d'elució té lloc per l'intercanvi de clorur de l'eluent pel glifosat adsorbit en la fase sòlida. S'ha comprovat que la protonació de l'anàlit, a valors de pH baixos, no afecta significativament les recuperacions obtingudes. Així doncs, es decideix realitzar l'elució amb NaCl 1M sempre que sigui possible. En el cas que la determinació final es dugui a terme emprant cromatografia líquida, s'ha comprovat que les elevades concentracions de clorur no afecten a la forma dels pics cromatogràfics. Per contra, quan s'utilitza electroforesi capil·lar, l'elevat contingut salí de les mostres dona lloc a nombrosos pics en l'electroferograma, impeding la resolució dels pics dels anàlits. En aquest cas s'opta per fer l'elució amb NaCl 0,1M, que permet obtenir recuperacions del 90% i els electroferogrames es poden interpretar fàcilment. El volum d'eluent emprat en tots els casos ha estat de 15 mL.

Una vegada el sistema ha estat optimitzat per a l'extracció de glifosat en la resina AMBERLITE® IRA-416, s'avaluen diferents sorbents per a l'extracció conjunta de l'herbicida amb el seu principal metabòlit, l'AMPA. Inicialment s'estudien dues resines de bescanvi aniónic, les quals difereixen en el seu tamany de porus i tipus de matriu (veure **Taula I.11**): AMBERLITE® IRA-416, és microporosa i de tipus II (presenta grups dimetilhidroxietil amoni), mentre que AMBERLITE® IRA-900, és macroporosa i de tipus I (presenta grups trimetil amoni). Per avaluar l'efecte de la matriu, s'empra un cartutx ISOLUTE-NH₂ (veure **Taula I.12**), el qual pot actuar de bescanviador de ions, una vegada protonat el grup amino.

6.2.1 RESINES POLIMÈRIQUES

Quan s'avaluen ambdós adsorbents polimèrics per a l'extracció conjunta de glifosat i AMPA en aigües ultrapures, s'observen diferències significatives pel que fa al comportament de cadascun dels adsorbents. Mentre que la resina microporosa només és capaç d'extreure quantitativament el glifosat, la resina macroporosa extreu amb èxit ambdós anàlits d'aigües ultrapures. Aquests resultats s'expliquen a partir de les característiques de les resines:

La porositat. L'estructura de les resines macroporoses presenta uns canals molt més amples que les de tipus gel, els quals permeten una major accessibilitat als grups funcionals de la resina. D'aquesta manera s'afavoreix un contacte més íntim entre la mostra i els grups bescanviadors de la resina.

El grup funcional. La presència d'un grup hidroxietil en l'estructura de la resina microporosa provoca una debilitació de la càrrega positiva de l'amoni quaternari, tal com es mostra

en la **Figura 6.2**. Per contra, en la resina que només conté grups metil, la càrrega positiva de l'amoni quaternari és més forta, augmentant la basicitat, i per tant, la força d'adsorció.

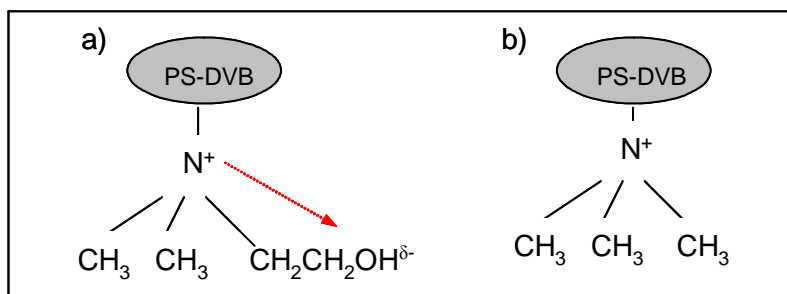


Figura 6.2. Efecte del desplaçament de la càrrega de l'amoni quaternari en presència d'un grup hidroxil. a) Matriu tipus II (AMBERLITE® IRA-416), b) Matriu tipus I (AMBERLITE® IRA-900).

Pel que fa a la diferent adsorció de glifosat (95-100%) i AMPA (de 45 a 55%) en la resina de tipus gel, es pot explicar pel diferent tamany dels anàlits. Tot i que el glifosat i l'AMPA són compostos estructuralment semblants, l'AMPA és menys voluminós que el primer, i tal com s'ha dit anteriorment, la teoria del bescanvi iònic prediu que els ions voluminosos es bescanvien amb més facilitat que els més petits.

Els resultats més destacables obtinguts en l'aplicació d'aquests adsorbents a mostres d'aigües naturals es comenten a continuació. En general s'observa una disminució de l'eficiència de l'extracció en mostres de matriu complexa, a causa de l'escassa selectivitat inherent al mecanisme de bescanvi iònic. En el cas de la resina microporosa, l'adsorció de glifosat es redueix a un 50% en les aigües més salines, mentre que en la resina macroporosa aquesta no es veu afectada, però si l'adsorció d'AMPA, que es redueix a un 57%. En les aigües naturals glifosat i AMPA competeixen amb altres ions pels grups ionogènics de la resina. La naturalesa d'aquests ions pot ser diversa (clorurs, sulfats, nitrats,...). Per una banda poden ser ions inorgànics, generalment menys voluminosos que el glifosat, però que es poden trobar a concentracions elevades. Per altra banda, cal considerar la presència de substàncies húmiques, principalment àcids húmics i àcids fúlvics, que també poden quedar retinguts en la resina i que es poden trobar a concentracions elevades. S'ha de tenir present que el procés de bescanvi és d'equilibri i que, per tant, el valor de les concentracions de les espècies que intervenen són de vital importància.

En el cas de la resina macroporosa, que és la que permet obtenir millors resultats per ambdós anàlits (103% pel glifosat, 57% per l'AMPA, n=4), s'ha fet un estudi de l'eficiència d'extracció en relació a la conductivitat de la mostra (Capítol 3, punt 3.1.2). S'ha observat que fins a conductivitats de 800 μS s'obtenen bones recuperacions pel glifosat, entre el 86 i el 99%, mentre que a conductivitats majors, l'eficiència d'extracció disminueix considerablement, fins a un 30% en les aigües més salines. En el cas de l'AMPA només s'obtenen recuperacions quantitatives en aigües ultrapures. El fet d'obtenir una relació lineal entre les recuperacions obtingudes i la conductivitat de

la mostra ($r^2=0,996$) i un augment en les recuperacions d'ambdós anàlits quan es treballa amb volums de mostra més petits, confirma el paper determinant de la conductivitat de la mostra en el rendiment de l'extracció.

En el cas de les interferències de compostos orgànics, cal recórrer a una etapa prèvia de purificació de la mostra emprant un adsorbent polimèric comercial sense funcionalitzar [9] o una fase C18 [10], basada en un mecanisme de fase invertida. Altres possibilitats, com l'ús d'un adsorbent polar, tipus florisil, mitjançant un mecanisme d'adsorció en fase normal o adsorbents amb ió metàl·lic immobilitzat (tècnica IMAC) [11,12], estan esdevenint cada vegada més habituals. En aquest treball l'aplicació d'una etapa prèvia de purificació s'ha dut a terme en l'anàlisi de glifosat i AMPA en sòls, però no en aigües naturals.

6.2.2 ADSORBENT DE SÍLICA MODIFICADA

Aquest cartutx de sílica modificada, ISOLUTE-NH₂, només és adequat per a l'extracció de glifosat de mostres molt netes. En aquests casos, la seva aplicació és molt útil ja que permet assolir factors de preconcentració molt superiors als de les resines polimèriques. En aquest cas, l'elució és efectiva amb només 2 mL d'eluent (factor de concentració de 125, emprant 250 mL de mostra). Amb aquest adsorbent no s'aconsegueix l'extracció del metabòlit AMPA. En mostres d'aigües naturals, tot i ser prèviament acidificades, aquest cartutx es mostra totalment ineficaç per ambdós anàlits (0% d'adsorció). La presència de nombrosos ions, orgànics (àcids húmics i fúlvics) i inorgànics (clorur, sulfat,...) que competeixen amb els anàlits pel grup amino protonat impedeixen una extracció efectiva. En aquest cas també cal una etapa prèvia de purificació de les mostres.

6.3 COMPARACIÓ RESULTATS: HPLC VERSUS CE

El mètode d'extracció i preconcentració més adequat implica, doncs, l'ús de la resina macroporosa, AMBERLITE®IRA-900. Els límits de detecció obtinguts amb aquest mètode de preconcentració combinat amb la determinació per cromatografia líquida (LC) amb detecció fluorescent (FL) són de $0,1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ per glifosat i $0,3 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ per AMPA (100mL de mostra). Si es comparen els resultats obtinguts amb els dos mètodes d'anàlisi amb detecció UV-vis, en el cas de la cromatografia líquida s'assoleixen límits de detecció d'una ordre de magnitud menor que amb electroforesi capil·lar (CE), sempre considerant que es preconcentren volums iguals de mostra. En el cas de preconcentrar un litre de mostra, els límits de detecció per LC-UV són de $2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ per ambdós anàlits, mentre que en CE els límits de detecció són $85 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ per glifosat i $60 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ per AMPA. Un o altre procediment analític pot ser aplicat amb èxit a l'extracció i determinació de glifosat i AMPA en mostres aquoses de diversa naturalesa, tot i que les condicions experimentals s'hauran d'ajustar per a cadascun dels mètodes. Les avantatges de la cromatografia líquida respecte l'electroforesi capil·lar són els baixos límits de detecció que s'assoleixen, inferiors per ambdós anàlits, i la robustesa del mètode pel que fa al contingut salí de les mostres. Respecte l'electroforesi capil·lar, cal destacar la no necessitat de derivatitzar els anàlits, així com la senzillesa de l'instrumentació implicada. Així doncs, segons les possibilitats i/o preferències dels laboratoris d'anàlisi (temps d'anàlisi, cost econòmic, necessitat de baixos límits de detecció), es durà a terme l'elecció del mètode d'anàlisi més indicat.

L'adsorbent AMBERLITE®IRA-900 ja estat aplicat posteriorment amb èxit a la preconcentració de mostres aquoses mitjançant altres mètodes d'anàlisi, com LC-LC-FL [13]. En aquest cas els autors observen un empitjorament de l'extracció pel cas de concentracions molt baixes d'AMPA, que en el nostre cas no s'han detectat. El mètode descrit per Hidalgo et al. [13] permet la determinació de glifosat en mostres reals a uns nivells de $0,02 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Tot i la importància de la determinació de glifosat en les diverses matrius ambientals a causa del seu ampli ús com a herbicida, cal tenir en compte que aquest compost s'aplica en forma de formulacions comercials que generalment contenen barreges complexes de tensioactius no iònics de tipus alquilamina etoxilades (ANEOS). Per aquest motiu, la caracterització d'aquests tensioactius, així com la seva determinació analítica, és també necessària per conèixer l'impacte ambiental d'aquest herbicida quan s'aplica al medi.

6.4 CARACTERITZACIÓ D'ALQUILAMINES ETOXILADES EN FORMULACIONS COMERCIALS D'HERBICIDES MITJANÇANT CROMATOGRÀFIA LÍQUIDA - ELECTROSPRAI - ESPECTROMETRIA DE MASSES

La complexitat de les barreges d'alquilamines etoxilades (ANEOS) en les formulacions comercials requereix un mètode d'anàlisi que permeti la separació dels diferents homòlegs presents, així com la identificació inequívoca de cadascun d'ells. Per aquests motius, el mètode d'anàlisi més adequat per a la seva determinació és la cromatografia líquida acoblada a espectrometria de masses. El mètode LC-MS desenvolupat permet la caracterització de la barreja d'ANEOS incloent la distribució d'homòlegs de cadena alquíllica saturada i insaturada i la distribució dels homòlegs etoxilats. Una vegada desenvolupat el mètode d'anàlisi, té lloc la caracterització d'ANEOS en diverses formulacions comercials d'herbicides que contenen glifosat com a principi actiu. Els resultats d'aquesta part del treball es recullen en el Capítol 4.

6.4.1 MÈTODE D'ANÀLISI

La separació dels ANEOs es duu a terme en una columna C18 de base desactivada, indicada per anàlits bàsics, amb una elució en gradient. El mecanisme de fase invertida permet la separació dels diversos homòlegs saturats segons la llargada de la cadena alquíllica, però no permet la separació simultània dels homòlegs saturats i insaturats. Aquesta fase estacionària tampoc permet la separació dels diferents homòlegs etoxilats, tot i que la seva determinació es pot resoldre amb espectrometria de masses. Mitjançant aquesta tècnica es poden extreure les masses característiques dels ANEOs que interessin en cada cas.

En el desenvolupament del mètode d'anàlisi s'ha partit de les condicions proposades per Krogh et al. [14], tot i que s'han fet diverses modificacions.

En primer lloc, la dilució de les mostres s'ha realitzat en tots els casos en àcid clorhídric diluït, 0,1M, per evitar l'ús de dissolvents orgànics. Prèviament s'ha comprovat que aquest àcid no afecta a la separació cromatogràfica i augmenta la solubilitat dels anàlits mitjançant la seva protonació.

Quant a la separació cromatogràfica, s'han avaluat dos gradients de diferent durada, ambdós partint d'un elevat percentatge de fase aquosa (80%) i augmentant el percentatge de fase orgànica fins a un 98%, per finalment recuperar les condicions inicials per a la següent mostra. En ambdós gradients, s'observa com els pics corresponents als homòlegs alquíllics insaturats se solapen amb els homòlegs saturats d'una unitat de carboni menys, per exemple, l'homòleg C16 insaturat presenta un pic solapat amb l'homòleg C14 saturat. Val la pena esmentar el fet que els pics corresponents als homòlegs insaturats apareixen desdoblats en el cromatograma,

probablement per la presència d'isòmers cis-/trans- provinents del procés industrial de síntesi a partir del *tallow* original (veure **Figura 4.2**). Pel que fa als homòlegs etoxilats, s'observa com tots els homòlegs corresponents a una mateixa cadena alquilica coelueixen en un únic pic (**Figura 4.1f**), contribuint al seu eixamplament en el cromatograma obtingut en mode TIC (**Figura 4.1a**). Aquest fet es comprova en l'espectre de masses de cadascun d'aquests pics, on s'observen fragments de masses separades per 44 Da (massa d'una unitat etoxilada) que segueixen una distribució de Poisson (**Figura 4.1d**), tal com Johnson et al. [15] descriuen com a mètode d'identificació de compostos etoxilats.

Quant a la composició de la fase mòbil, s'ha addicionat amoníac, en lloc de trietilamina, per evitar problemes d'obtenció del capil·lar de sílica fosa de l'interfase, tot i que altres autors utilitzen aquesta base sense comentar problemes d'aquest tipus [14]. L'addició d'àcid acètic permet la formació de ions $[M+H^+]$ en l'interfase per protonació del grup amino dels ANEOs, indicant que la ionització en mode positiu és la més adequada. En aquest mode de ionització, un excés d'acetat d'amoni pot millorar la sensibilitat del mètode per supressió d'adductes de sodi o potassi [16], habituals en molècules polietoxilades [17]. Aquest és el motiu pel qual en el nostre cas no s'ha observat la formació d'aquest tipus d'adductes. La llargada de la cadena etoxilada no afecta a la formació dels ions $[M+H^+]$, cosa que succeeix en la formació d'adductes de sodi [18], de manera que podem suposar que tots els etoxímers s'ionitzen en la mateixa proporció.

Pel que fa als paràmetres de l'espectròmetre de masses han estat optimitzats per a una màxima sensibilitat de l'instrument.

La distribució oligomèrica de cada mostra s'ha dut a terme en mode *Full Scan*, mentre que l'anàlisi quantitatiu dels diversos homòlegs d'ANEOS s'ha realitzat extraient la massa corresponent als ions $[M+H^+]$.

Els límits de detecció (entre 2 i 23 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), precisió ($S_{y/x}$) i repetitivitat ($\text{RSD} < 15\%$) per cada un dels homòlegs estudiats es recullen en la **Taula 4.3**. Un aspecte a destacar és el mètode per a quantificar els diferents homòlegs en el patró disponible, Berol 907, en el qual la concentració total d'ANEOS és de 73,85 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Es comprova que la distribució de les àrees de pic del cromatograma coincideixen amb la distribució de les cadenes alquílques del *tallow* original emprat per a la síntesi dels ANEOs, de manera que es pot reassignar una concentració per cada homòleg alquílic.

L'objecte d'aquest estudi és la caracterització dels tensioactius presents en les formulacions comercials de glifosat, en les quals els anàlits es troben a concentracions molt elevades. Per aquest motiu, la sensibilitat del mètode no és l'aspecte més important. No obstant, el mètode desenvolupat es podria aplicar a l'anàlisi de mostres on les concentracions dels ANEOs siguin molt inferiors, amb algunes adaptacions. En primer lloc caldrà treballar amb l'espectròmetre de masses en mode SIM (*Single Ion Monitoring*), on la sensibilitat de l'instrument augmenta considerablement respecte l'adquisició de dades en mode *Full Scan* amb extracció de masses, tal com es pot veure en

la **Figura 6.3**. En segon lloc, es pot aplicar una tècnica de preconcentració prèvia a l'anàlisi per LC-MS. Amb aquesta finalitat, s'ha avaluat una tècnica de preconcentració on-line dels anàlits amb una precolumna empaquetada amb el mateix adsorbent que la columna de separació. Aquesta etapa prèvia ha permès disminuir fins a 50 vegades els límits de detecció per tots els homòlegs ($0,05\text{-}0,5\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) aplicant un volum màxim de mostra de 5 mL ($\text{pH}\leq 1$).

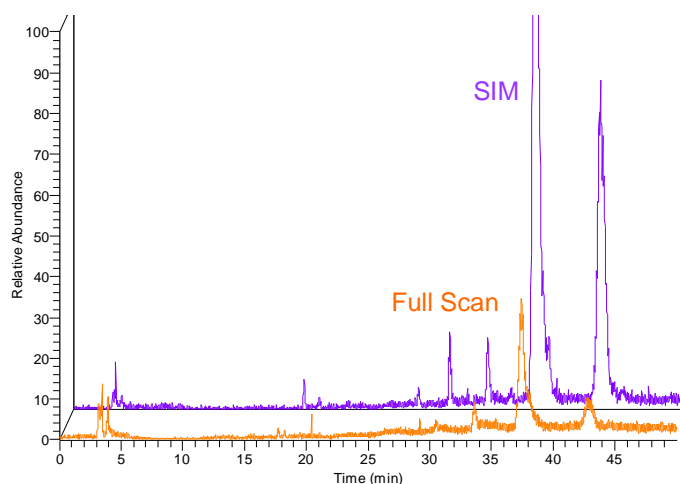


Figura 6.3. Comparació dels espectres obtinguts per un mateix patró de 1.9 ppm de Berol 907 adquirint les dades en mode SIM o en mode Full Scan.

6.4.2 APLICACIONS

El mètode proposat per a la determinació d'ANEOS s'ha aplicat a la caracterització de diverses formulacions comercials de l'herbicida glifosat.

El mode més adequat per a la identificació en qualsevol mètode analític implica l'addició d'un estàndard intern, de característiques cromatogràfiques semblants a les dels anàlits. No obstant, pel cas de tensioactius aquests estàndards de referència són escassos. Un mètode alternatiu són els assaigs de recuperació [18], basats en l'addició de patró a mostres reals. En aquests testos s'analiza la mostra original i la segona mostra on s'ha addicionat una quantitat coneguda de patró, preferiblement a un nivell de concentració similar, i per comparació dels resultats obtinguts per ambdues mostres s'obté informació de les recuperacions i de possibles supressions de ions en la interfase degudes a altres constituents de la matriu de la mostra. En la Taula 4 del capítol 4 es pot veure que les recuperacions obtingudes pels homòlegs majoritaris en cada mostra són molt pròximes al 100 % en tots els casos, indicant que no existeixen problemes de supressió de ions en l'interfase.

A partir dels cromatogrames obtinguts pels diferents productes analitzats, es poden extreure diverses conclusions (*veure Figura 4.3*). En primer lloc s'observa com la forma dels pics cromatogràfics que apareixen en el cas de les formulacions Compo i RoundUp són molt semblants

a les del patró, mentre que les d'Atila i RoundUp Energy són molt diferents. Des d'un punt de vista quantitatiu es comprova que la distribució de cadenes alquílques i etoxilades pel cas de les formulacions comercials d'Atila i RoundUp Energy és molt diferent que la del patró, Berol 907, de manera que es pot assegurar que no contenen ANEOs en la seva formulació (veure **Figura 2.11**). Per contra, la distribució pels herbicides Compo i RoundUp és molt similar a la del patró, de manera que es confirma la presència de tensioactius derivats del *tallow* en la seva formulació. Aquest resultat és coherent amb la informació sobre el producte proporcionada pel fabricant de l'herbicida RoundUp, Monsanto, que indica la presència d'aquest tipus de tensioactiu. Finalment, s'ha determinat el contingut total d'ANEOs en les dues formulacions en les que s'ha confirmat la seva presència. Mentre que en el cas del Roundup s'ha comprovat que els resultats obtinguts es correlacionen bé amb els resultats reportats pel fabricant, en el cas de l'herbicida Compo no s'ha pogut comprovar, ja que en la fitxa tècnica no es detalla el tipus de tensioactiu addicionat.

6.5 ESTUDI DEL TRANSPORT I MOBILITAT DE GLIFOSAT EN SÒLS DE BEGUR

S'ha estudiat la mobilitat de glifosat en sòls d'un camp de pollanques de Begur (Girona, Espanya), regat habitualment amb aigües residuals tractades provinents d'una estació depuradora molt propera. En aquesta zona, l'ús d'herbicides que contenen glifosat és molt freqüent.

S'han fet estudis a diferents nivells. En primer lloc s'han dut a terme experiments en discontinu al laboratori que han permès caracteritzar l'adsorció de glifosat en els sòls estudiats. La informació obtinguda ha servit de base per dissenyar uns experiments en condicions dinàmiques (en columna) que són més similars a les condicions del camp. En ambdós tipus d'experiments s'ha avaluat la influència que poden tenir les substàncies auxiliars addicionades en les formulacions comercials d'herbicides. Finalment, els resultats obtinguts al laboratori s'apliquen a l'estudi del transport de glifosat en el sòl en una aplicació controlada en el camp de pollanques de Begur.

En qualsevol estudi d'adsorció de compostos orgànics en sòls s'han de considerar tres factors determinants:

- les propietats físico-químiques de l'anàlit;
- les propietats del sòl;
- les condicions ambientals, les quals caldrà simular en el major grau possible.

A continuació es discuteixen els principals resultats obtinguts en aquesta part del treball, que es poden veure amb més detall en el Capítol 5.

6.5.1 EXTRACCIÓ I PURIFICACIÓ

En primer lloc s'ha avaluat el mètode d'extracció de glifosat del sòl proposat per Sancho et al. [19] pel sòl emprat en aquest estudi. S'ha comprovat que el glifosat adsorbit en 5 g de sòl es pot extreure amb 10 mL de hidròxid de potassi 0,6M mitjançant agitació orbital durant 30 minuts, obtenint sempre recuperacions de glifosat superiors al 95%.

D'altra banda cal destacar que per aquells sòls amb un contingut de matèria orgànica més elevat s'ha dut a terme una etapa de purificació prèvia a la seva determinació. D'aquesta manera s'eliminen una gran part de les substàncies húmiques que interfereixen en la posterior anàlisi cromatogràfica. Aquesta purificació s'ha realitzat mitjançant la resina XAD-7, que permet l'eliminació dels àcids fúlvics presents al sòl, els quals donen un senyal molt important en els sistemes de detecció per fluorescència, interferint, i fins i tot impossibilitant, la quantificació dels

nostres anàlisis. La IHSS (International Humic Substances Society) recomana l'ús de resines de tipus XAD per a l'extracció de substàncies húmiques [20].

6.5.2 CARACTERITZACIÓ DEL SÒL

Les propietats físico-químiques obtingudes en la caracterització del sòl (veure **Figura 5.2**) permeten distingir clarament dues tipologies: una corresponent als primers 15 cm (0-15 cm) i una segona tipologia corresponent al sòl més profund (15-120 cm). El sòl superficial presenta uns valors de capacitat de bescanvi iònic ($0,15-0,28 \text{ meq} \cdot 100\text{g}^{-1}$) i de matèria orgànica (1,6-2,9%) clarament superiors als del sòl més profund ($0,02-0,1 \text{ meq} \cdot 100\text{g}^{-1}$ i 0,2-1,2%, respectivament), així com uns valors de densitat i permeabilitat lleugerament inferiors.

6.5.3 ESTUDIS DE SORCIÓ DE GLIFOSAT EN SÒLS EN CONDICIONS D'EQUILIBRI

Els estudis en discontinu s'han iniciat realitzant uns experiments per determinar la relació de sòl-solució d'extracció més adequada segons les característiques del sòl emprat. Per tal d'obtenir adsorcions superiors al 20% i pròximes al 50%, tal com recomana la guia OECD [21], s'ha trobat que la relació sòl:solució més adequada és de 1 a 5, donant lloc a una adsorció de glifosat en un sòl no superficial del 49,1%.

La presència de dues tipologies d'horitzons de sòl tan clarament diferenciats ha portat a estudiar l'adsorció de glifosat en cadascun d'ells. Es pot observar en la **Figura 5.3** que el sòl més superficial presenta una major capacitat d'adsorció que l'horitzó més profund. Per aquest motiu, s'ha considerat que aquest sòl més profund és més desfavorable pel que fa a adsorció del contaminant, i per tant, és el més adequat per dur a terme els següents experiments de cinètica i d'adsorció/desorció.

Tal com s'ha dit en apartats anteriors, l'aplicació de l'herbicida en condicions reals es fa emprant formulacions comercials, però no se'n coneix el comportament i els efectes de les substàncies auxiliars en sòls. En l'estudi de la cinètica d'adsorció en el sòl no superficial, s'ha comparat el comportament del glifosat pur amb el comportament d'aquest compost quan es troba en dues formulacions comercials: Atila, comercialitzada a l'estat espanyol, i RoundUp, àmpliament utilitzada a molts altres països.

S'ha comprovat que l'adsorció de glifosat, tant quan és aplicat en forma pura com en les formulacions comercials, és molt ràpida. En tots els productes emprats, el 75% de glifosat adsorbit en l'equilibri queda retingut durant la primera hora de contacte. Aquest fet sembla indicar que l'adsorció de l'herbicida al sòl té lloc per fisorció, on la càrrega de les partícules del sòl juguen un paper determinant. Una adsorció ràpida és molt interessant ja que permet una reducció del

moviment del contaminant en el medi. Després de la primera hora i fins a l'assoliment de l'equilibri s'observa una disminució de la velocitat d'adsorció. L'equilibri, tal com es pot veure en la **Figura 5.4**, s'assoleix en unes 8-10 hores, tot i que per evitar problemes de reproduïbilitat, el temps d'equilibri en l'estudi de isoterms d'adsorció s'ha fixat en 15h. S'ha de destacar que durant les 24 hores que han durat els experiments de cinètica, en cap cas s'ha detectat la presència del principal metabòlit del glifosat, l'AMPA.

A continuació s'han determinat les isoterms d'adsorció de glifosat en sòls no superficials, tant en la seva forma pura com formant part de les dues formulacions comercials. Es pot observar en la **Figura 5.5** que les isoterms d'adsorció per tots els productes estudiats tenen una forma molt similar. En els tres casos s'aprecia un augment de l'adsorció a mesura que augmenta la concentració de solut en dissolució. La relació entre la concentració de glifosat adsorbida al sòl i la concentració de glifosat que resta en dissolució és de tipus lineal, de manera que es poden classificar les isoterms com de Tipus C, segons la classificació de Giles et al. [22]. El rang de concentracions de glifosat utilitzat ($50 - 5000 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) es considera suficient per correlacionar els experiments del laboratori amb el posterior experiment de camp. De fet, les concentracions de glifosat emprades tant en l'estudi de les cinètiques d'adsorció ($10 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sòl) com en les isoterms d'adsorció/desorció ($0-25 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sòl) són del mateix ordre que les concentracions de glifosat trobades en sòls en l'estudi de camp, tot i ser menors que la dosi recomenada en aplicacions domèstiques d'aquest herbicida, 1 g de glifosat per kg de sòl [23]. Una adsorció lineal com la observada indica que s'estableix un equilibri entre la massa de glifosat adsorbida i la massa de glifosat en dissolució. Aquest comportament és indicatiu de la generació constant de nous punts d'adsorció [24].

Si es representen simultàniament tots els valors dels assatjos d'adsorció es pot comprovar que el resultat de l'ajust a una isoterma lineal no difereix dels resultats obtinguts per cadascun dels productes independentment (**Figura 5.5**). De fet, els coeficients de l'equació que ajusta la isoterma d'adsorció són pràcticament els mateixos.

Finalment, per completar els estudis de sorció s'ha considerat la desorció de l'anàlit del sòl al llarg del temps. En aquest cas s'han comparat les isoterms d'adsorció (24h) amb les isoterms de desorció al cap de 48 i 72 hores, tant per l'herbicida pur (**Figura 5.6a**) com per l'herbicida comercial, RoundUp (**Figura 5.6b**). En tots els casos les isoterms de desorció són lineals (Tipus C), amb coeficient de correlació molt propers a 1.

Un primer aspecte destacable és que la sorció d'aquest herbicida en el sòl presenta una histèresis molt marcada, com sol ser habitual en el cas de les interaccions sòl-plaguicida [24]. El fenomen de histèresi indica que els processos d'adsorció i desorció no són processos reversibles en aquest tipus de sòl i per aquest herbicida, o sigui, no tot l'herbicida adsorbit és posteriorment desorbit. Els resultats indiquen que la massa d'herbicida desorbit és funció del punt inicial de l'isoterma d'adsorció (**Figura 5.6**).

En el cas del glifosat pur, al cap de 48 hores, s'ha dessorbit un 35,0% del glifosat adsorbit en 24 hores (un 52% de l'inicial), mentre que al cap de 72 hores, se n'ha dessorbit un 10,6 % més. Aquests valors indiquen que el contaminant no està fixat fortament al sòl, sinó que cada vegada que hi ha un rentat aquest sòl allibera una part important de glifosat al medi aquós (6-7 µg/g sòl). Cal destacar que tot i que durant el procés d'adsorció no s'observa la formació d'AMPA, al cap de 48 hores s'observa un 1,8% d'AMPA en dissolució, i al cap de 72 hores se n'observa un 8,4%.

Pel que fa a l'herbicida comercial, RoundUp, els resultats són molts similars. Mentre que en 48 hores s'ha dessorbit un 33,9% del glifosat adsorbit inicialment (55,4%), al cap de 72 hores se n'ha dessorbit un total de un 43,2%. Pel que fa a la formació d'AMPA, en aquest cas sembla que la tendència del glifosat a degradar-se és una mica major, ja que al cap de 48 hores se n'ha format un 1,93% en dissolució, però al cap de 72 hores, se'n troba un 12,2%, gairebé un 4% més que en el cas del glifosat pur. S'observa, doncs, altra vegada, un comportament del glifosat pur molt similar al del compost comercial.

Són destacables també els valors creixents de les K_d en cada fase de rentat (4,71, 8,59 i 27,78 pel glifosat pur i 4,97, 10,34 i 34,87 pel Roundup), el que implica una major adsorció de l'anàlit en el sòl.

6.5.4 EXPERIMENTS EN COLUMNA

Per estudiar la mobilitat de l'herbicida glifosat simulant de forma més real el transport de soluts en les condicions de camp s'han realitzat experiments en continu emprant columnes de sòl. L'aplicació de dissolució de forma continuada a la columna de sòl s'ha efectuat a dos fluxos diferents: el mínim flux aplicable per garantir la seva estabilitat ($0,03 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$) i un cabal més elevat ($0,11 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$) per comparar el seu efecte amb el primer. També s'ha estudiat el comportament del glifosat en funció de la seva aplicació en forma pura o en la forma comercial, utilitzant l'herbicida RoundUp.

En primer lloc s'ha aplicat un traçador, l'ió pentafluorobenzanoat, que ens ha permès assegurar l'homogeneització del sòl i un bon empaquetament d'aquest dins la columna.

En les corbes obtingudes per glifosat, es pot veure com en cap dels experiments s'obtenen pics simètrics, tots presenten dispersió, i les corbes no recuperen mai el zero de concentració a la sortida de la columna (**Figura 5.7**). Aquest fet concorda amb el fenomen d'histerèsis que s'ha comentat anteriorment, provocant que no tot l'herbicida adsorbit sigui a continuació dessorbit completament.

En el cas de treballar a cabals de solució baixos, s'ha observat una diferència de massa de glifosat adsorbida dependent de si es treballa amb glifosat pur o amb la formulació comercial. Tot i

que en discontinu s'observava una adsorció molt similar pel glifosat pur o pel glifosat en RoundUp, en els estudis en continu es pot observar una major adsorció de glifosat quan s'aplica de forma pura, tal com ens mostra el pic inferior en la corba de saturació (veure **Figura 5.7b**). La diferència de massa adsorbida en el màxim del pic és de 0,091 µg de glifosat, que representa aproximadament un 0,54% del glifosat aplicat. No obstant, quan es treballa a fluxos de solució superiors, la corba obtinguda pel glifosat és pràcticament idèntica tant si és en forma pura com en la forma comercial (veure **Figura 5.7a**). Si es comparen les corbes obtingudes per l'herbicida emprant els diferents fluxos, es pot veure com les corbes obtingudes a flux elevat són més altes que quan es treballa a fluxos més baixos. Aquest fet és lògic si pensem que un flux més lent permet un temps de residència de l'herbicida en la columna més elevat, de manera que s'augmenta el temps de contacte entre l'anàlit i el sòl i, per tant, s'afavoreix tant la seva adsorció com la seva degradació. Tal com citen altres autors [23,25], aquests resultats indiquen que els valors de K_d mesurats en experiments en columna són inferiors als mesurats en discontinu, tot i que els valors s'aproximen en cas de treballar a fluxos més baixos. Pels mateixos motius, els factors de retard mesurats (veure **Taula 5.3**) s'acosten molt als valors calculats segons l'**equació 2** en cas de treballar a fluxos elevats, però a fluxos més baixos, els factors de retard són majors, a causa de l'augment de temps de contacte entre l'anàlit i el sòl i també per un major efecte de dispersió, tant horitzontal com vertical, de l'anàlit.

Els resultats obtinguts en aquest estudi no s'han pogut comparar amb altres dades publicades a causa dels pocs estudis semblants realitzats fins avui, els resultats dels quals són difícils de comparar a causa de la diferent naturalesa dels sòls, així com dels objectius dels treballs. En un estudi de De Jonge et al. [26] es compara un sòl argilós (amb estructura macroporosa) i un sòl sorrenc. Els resultats mostren que la quantitat de glifosat alliberada del sòl macroporós és de 50 a 150 vegades major que del sòl sorrenc, el qual s'assembla més al nostre sòl. Strange-Hansen et al. [23] relacionen uns valors de K_d elevats amb una mineralització lenta de glifosat en estudis en discontinu, comparant una grava amb sòl sorrenc. En aquest mateix treball es realitzen estudis en columna que conclouen que episodis importants de precipitació poden provocar que la grava alliberi fins a una cinquena part del glifosat aplicat.

Recentment, De Jonge and Rothenberg [27] han proposat un nou mètode per mostrejar soluts mòbils en sòls. Aquest mètode ha estat avaluat amb glifosat, però els resultats obtinguts estan dirigits a la validació del mètode, de manera que no són comparables als del nostre estudi.

6.5.5 ESTUDI DE CAMP

L'estudi de camp realitzat s'ha dut a terme en un sòl sorrenc d'un camp de pollancre de Begur (Girona, Espanya) durant el maig del 2002. En aquest estudi s'ha utilitzat l'herbicida comercial Atila, molt emprat a la zona, que conté glifosat com a principi actiu (316 g·L⁻¹). Aquest

producte ha estat diluït segons les seves normes d'ús abans de ser aplicat al camp. Simultàniament a l'aplicació de l'herbicida, s'ha aplicat un traçador, l'ió bromur, per avaluar el factor de retard de l'anàlit. És important assenyalar que durant els tres mesos que ha durat l'estudi, la parcel·la experimental utilitzada ha estat regada diàriament, tot i que de forma irregular, tal com mostra la **Figura 5.8a**. Aquest rec irregular va provocar una recàrrega del sòl que va resultar en variacions del nivell piezomètric de l'aigua i del grau de saturació del sòl al llarg del temps que va durar l'experiment (*veure* **Figura 5.8b** i **5.8c**). Tot seguit, es destaquen els resultats més rellevants, tant pel que fa al traçador com a l'herbicida glifosat i el seu principal metabòlit, l'AMPA.

Pel que fa al traçador, l'ió bromur, s'ha observat com l'endemà de la seva aplicació, tot i trobar-se en gran part en l'horitzó més superficial, es detecta fins a 45 cm de profunditat (**Figura 5.8d**). Durant els dies següents, la concentració de traçador disminueix de forma dràstica en el sòl més superficial, tot i que va augmentant en els horitzons més profunds. No obstant, passats setze dies de la seva aplicació, la concentració de traçador en qualsevol horitzó és negligible.

Quant a l'herbicida, glifosat, s'ha comprovat que la seva presència és notable fins a 1 mes després de la seva aplicació (*veure* **Figura 5.8e**). Tot i això, es detecten traces de glifosat fins als dos mesos després de la seva aplicació. Pel que fa a la seva concentració en el perfil de sòl, cal destacar l'elevada concentració de l'herbicida en l'horitzó més superficial durant els primers nou dies després de l'aplicació (8,4, 3,5 i 1,8 µg glifosat/g sòl en el primer, sisè i novè dies, respectivament, *veure* **Figura 5.8i**). Aquest fet concorda amb les observacions fetes per Roy et al. [28], que rebel·len una presència de glifosat en el sòl més superficial sempre superior al 95% del glifosat total present en el perfil de sòl. Tot i això, l'endemà de l'aplicació, el glifosat ja es detecta a 55 cm de profunditat a uns nivells molt baixos. L'horitzó més profund al qual s'ha detectat l'herbicida és a pràcticament 70 cm, després de 28 dies. Aquest mateix dia, en l'horitzó superficial s'han detectat 0,17 µg glifosat/g sòl, molt inferior a les concentracions dels primers dies. En els horitzons intermedis es detecta la presència de glifosat durant els 28 dies després de l'aplicació, però sempre a unes concentracions molt inferiors a les trobades a l'horitzó superficial. Aquest fet indica que el glifosat és adsorbit principalment a la capa superficial del sòl a causa de l'alt contingut de matèria orgànica (OMC) present, així com l'elevada capacitat de bescanvi iònic (CEC) que presenta. Així doncs, pel que fa a la controvèrsia sobre si l'OMC o la CEC del sòl són els responsables de l'elevada adsorció de glifosat en sòls, en aquest estudi s'ha observat una correlació positiva per ambdós paràmetres, tal com ja indicaven diversos autors [29-32]. L'efecte del pH en l'adsorció de glifosat en sòls no s'ha pogut comprovar en aquest estudi a causa de la poca variació en el pH que presenten els diferents horitzons de sòl analitzats.

Un altre aspecte molt important en l'estudi de la mobilitat de glifosat en sòls, és la seva facilitat de degradació a àcid aminometilfosfònic (AMPA). Per aquest motiu, s'ha dut a terme la

determinació simultània de glifosat i AMPA. La presència d'AMPA en el sòl s'ha detectat principalment en l'horitzó més superficial, tal com passava amb el glifosat. Val la pena destacar el fet que l'endemà de l'aplicació de l'herbicida, ja s'hi han detectat 2.91 µg AMPA/g sòl, indicant que el glifosat és degradat amb gran rapidesa pels microorganismes presents en la capa més superficial del sòl. S'ha observat la presència d'aquest metabòlit en el sòl més superficial fins el cap de 44 dies després de l'aplicació (0,16 µg/g), tot i que les concentracions detectades disminueixen considerablement des del primer al novè dia (1.89 µg/g). Aquest fet indica que l'AMPA, tot i també ser degradat pels microorganismes del sòl, ho fa més lentament que el glifosat. També, a diferència del glifosat, les concentracions trobades d'AMPA en horitzons intermedis són més elevades, tal com observen Huang et al. [32], sobretot tenint en compte que la seva concentració inicial és pràcticament un terç de la concentració inicial de glifosat. Aquest fet sembla indicar una major mobilitat d'aquest compost respecte el seu precursor. No obstant, destaca la poca presència d'AMPA en l'horitzó més profund, que només es detecta un mes després de l'aplicació de l'herbicida. L'explicació d'aquest fet pot ser la concentració inicial del metabòlit, inferior comparada amb el glifosat, que no permet la seva detecció amb el mètode d'anàlisi utilitzat, tot i que el percentatge d'AMPA present en aquest sòl respecte l' inicial probablement és major que el de l'herbicida inicial.

La forta adsorció d'ambdós compostos en l'horitzó més superficial, així com la ràpida degradació de glifosat a AMPA, impliquen una mobilitat d'aquest herbicida a través del perfil del sòl molt baixa. Aquest darrer aspecte s'ha corroborat mitjançant l'anàlisi de l'aigua durant els dies de mostreig. En cap cas s'ha detectat la presència de l'herbicida ni del seu metabòlit. Aquest fet està d'acord amb diversos estudis publicats [33,34], tot i que alguns treballs indiquen la presència de traces d'herbicida en les aigües subterrànies, possiblement a causa de fortes pluges caigudes durant l'execució de l'estudi [35,36].

6.6 BIBLIOGRAFIA

- [1] S.Kawai, B.Uno, M.Tomita, *J. Chromatogr.*, 540 (1991) 411
- [2] C.J.Miles, L.R.Wallace, H.A.Moye, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 69 n°3 (1986) 458
- [3] M.G.Cikalo, D.M.Goodall, W.Matthews, *J. Chromatogr. A*, 745 (1996) 189
- [4] M.Valcárcel, A.Gómez. *Técnicas analíticas de separación*, Editorial Reverté S.A., Barcelona (1994) ISBN: 84-291-7984-4
- [5] E.M.Thurman, M.S.Mills. *Solid-phase extraction: principles and practice*, Wiley-Interscience, New York, EUA (1998) ISBN: 0-471-61422-X
- [6] Y. Marcus, A.S.Kertes. *Ion exchange and solvent extraction of metal complexes*, Wiley-Interscience, New York (1969) ISBN: 0-471-56858-9
- [7] Y.Y.Wigfield, M.Lanouette, *Anal. Chim. Acta*, 233 (1990) 311
- [8] M.P.Abdullah, J.Daud, K.S.Hong, C.H.Yew, *J.Chromatogr. A*, 697 (1995) 363
- [9] E.Mallat, D.Barceló, *J.Chromatogr. A*, 823 (1998) 129
- [10] J.V.Sancho, F.Hernández, F.J.López, E.A.Hogendoorn, E.Dijkman, P. van Zoonen, *J. Chromatogr. A*, 737 (1996) 75
- [11] A.Royer, S.Beguín, J.C.Tabet, S.Hulot, M.A.Reding, P.Y.Communal, *Anal. Chem.*, 72 (2000) 3826
- [12] C.Rios, V.Salvadó, M.Hidalgo, en preparació.
- [13] C.Hidalgo, C.Rios, M.Hidalgo, V.Salvadó, J.V.Sancho, F.Hernández, *J. Chromatogr. A*, 1035 (2004) 153
- [14] K.A.Krogh, K.V.Vejrup, B.B.Mogensen, B.Halling-Sorensen, *J. Chromatogr. A*, 957 (2002) 45
- [15] J.Johnson, R.Yost, *Anal. Chem.*, 57 (1985) 758 A
- [16] T.P.Knepper, D.Barceló, P.de Voogt. *Comprehensive analytical chemistry; analysis and fate of surfactants in the aquatic environment*, D.Barceló (Ed.), Wilson & Wilson's, Elsevier, Amsterdam, Volume XL (2003) ISBN: 0-444-50935-6
- [17] A.A.Boyd-Boland, J.B.Pawliszyn, *Anal.Chem.*, 68 (1996) 1521
- [18] T. Okada, *Macromolecules*, 23 (1990) 4216
- [19] J. V. Sancho, C. Hidalgo, F. Hernández, F. J. López, E. A. Hogendoorn, E. Dijkman, *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, 62 (1996) 53-63
- [20] <http://www.ihss.gatech.edu/aquaticafa.html> (04/01/06)
- [21] *OECD guideline for the testing of chemicals. Adsorption-Desorption using a batch equilibrium method*. OECD/OCDE 106, 21st January 2000
- [22] C.Giles, T.H.MacEwan, S.N.Nakhwa, D.Smith, *J. Chem. Soc.*, 111 (1960) 3973-3993
- [23] R.Strange-Hansen, P.E.Holm, O.S.Jacobsen, C.S.Jacobsen, *Pest. Manag. Sci.*, 60 (2004) 570-578
- [24] D.L.Sparks. *Soil physical chemistry*, CRC Press, USA (1986) ISBN: 0-873-71883-6
- [25] J.Beltran, R.G.Gerritse, F.Hernández, *Eur. J. Soil Sci.*, 49 (1998) 149-156
- [26] H.De Jonge, L.W.De Jonge, O.H.Jacobsen, *Pest. Manag. Sci.*, 56 (2000) 909-915
- [27] H. De Jonge, G.Rothenberg, *Environ. Sci. Technol.*, 39 (2005) 274-282
- [28] D.N.Roy, S.K.Konar, S.Banerjee, D.A.Charles, D.G.Thomson, R.Prasad, *J. Agric. Food Chem.*, 37 (1989) 437-440

- [29] C.T.Chiou, D.E.Kile, T.I.Binton, R.L.Malcom, J.A.A.Leenheer, *Environ. Sci. Technol.*, 20 (1986) 502
- [30] A.Piccolo, G.Celano, P.Conte, *J. Agric. Food Chem.*, 44 (1996) 2442
- [31] P.Sprankle, W.F.Meggitt, D.Penner, *Weed Sci.*, 23 (1975) 229
- [32] X.Huang, T.Pedersen, M.Fischer, R.White, T.M.Young, *Environ. Sci. Technol.*, 38 (2004) 3263
- [33] *R.E.D. Facts. Glyphosate. Prevention, Pesticides and Toxic Substances*, EPA-738-F-93-011 (Septembre 1993)
- [34] L.Guarracino, L.Candela Lledó, J.E.Santos. *Estudios de la zona no saturada del suelo*, Eds. R.Muñoz-Carpena, A.Ritter, C.Tascón. ICIA, Tenerife, 1999. ISBN: 84-699-1258-5
- [35] W. M. Edwards, Jr G. B. Triplett, R. M. Kramer, *J. Environ. Qual.*, 9 (4) (1980) 661-665
- [36] F.Veiga, J.M.Zapata, M.L.Fernández Marcos, E.Álvarez, *Sci. Total Environ.*, 271 (2001) 135

CONCLUSIONS

Els resultats obtinguts en els estudis que es recullen en aquesta memòria permeten extreure les següents conclusions:

- Per a l'extracció i preconcentració de glifosat i AMPA de mostres aquoses s'ha avaluat diverses fases sòlides bescanviadores de ions: dues resines polimèriques (AMBERLITE®IRA-416, tipus II) i AMBERLITE®IRA-900, tipus I) i un cartutx de sílica funcionalitzada, ISOLUTE-NH₂®. L'adsorbent més eficaç és la resina AMBERLITE®IRA-900, que amb 1 gram de sòlid, a un flux de càrrega i elució de 5 mL·min⁻¹ i emprant d'eluent una dissolució de NaCl 0,1-1M, permet obtenir recuperacions del 85-110% per glifosat i del 77-98% per AMPA. La resina AMBERLITE®IRA-416 i el cartutx ISOLUTE-NH₂®, tot i permetre una recuperació quantitativa del glifosat, no es mostren gens eficaços en l'extracció del seu metabòlit AMPA. El cartutx de sílica funcionalitzada ISOLUTE-NH₂® permet assolir factors de preconcentració majors que les resines polimèriques (125 i 17, respectivament, quan es tracten 100 mL de mostra).
- Emprant la resina AMBERLITE®IRA-900 s'ha estudiat la influència del contingut salí de les mostres en l'eficiència del procés d'extracció. S'obtenen bones recuperacions de glifosat (86-99%) quan es treballa amb mostres de baixa a moderada conductivitat (0-800 µS), tot i que s'observa una davallada lineal en les recuperacions per mostres de conductivitat més elevada ($r^2=0,94$). Per contra, l'AMPA només es recupera quantitativament de la resina en mostres ultrapures, mentre que en aigües naturals s'observa una relació lineal entre l'extracció de l'anàlit i la conductivitat de les mostres ($r^2=0,996$), tot i que la recuperació màxima assolida és d'un 50%.
- Emprant la tècnica de preconcentració comentada en el primer punt seguida de la determinació per cromatografia líquida amb detecció per fluorescència s'obtenen límits de detecció de 0,1 µg·L⁻¹ i 0,3 µg·L⁻¹ per glifosat i AMPA, respectivament. Amb l'aplicació de sistemes de detecció UV-vis els límits de detecció augmenten considerablement, especialment pel cas de l'electroforesi capil·lar, que tot i la gran avantatge de no requerir derivatització dels anàlits, només permet la detecció de 85 µg·L⁻¹ de glifosat i 60 µg·L⁻¹ de l'AMPA.
- Els resultats obtinguts analitzant el mateix tipus de mostres mitjançant el mètode de cromatografia líquida amb detecció UV-vis i el mètode d'electroforesi capil·lar amb detecció indirecta UV-vis no són estadísticament diferents (test t- i F-), indicant la possibilitat d'emprar indistintivament els dos mètodes quan es treballa en els seus intervals d'aplicació.

- S'ha desenvolupat un mètode d'anàlisi per a la caracterització i determinació de tensioactius no iònics de tipus alquilamina etoxilats per cromatografia líquida en fase invertida acoblada a espectrometria de masses amb interfase d'electrosprai. El mètode ha estat caracteritzat en termes de detecció ($2\text{-}23\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), precisió ($S_{y/x}$) i repetitivitat ($\text{RSD}<15\%$) per cada un dels homòlegs alquilics i etoxilats. S'ha avaluat una tècnica de preconcentració *on-line* que ha permès disminuir fins a 50 vegades els límits de detecció per tots els homòlegs dels tensioactius estudiats aplicant un volum màxim de mostra de 5 mL ($0,05\text{-}0,5\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).
- El mètode desenvolupat s'ha aplicat a l'anàlisi de diverses formulacions comercials de glifosat per caracteritzar la distribució oligomèrica de cada producte, en mode *Full Scan*, i determinar-ne la concentració total de tensioactius, en mode *SIM*. S'ha confirmat la presència de tensioactius derivats de tallow (greix animal) en dues de les quatre formulacions avaluades, amb una concentració de $99,4\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ en el producte Compo i $98,1\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ en el cas de RoundUp.
- Desenvolupament d'un mètode per la determinació de glifosat en sòls. S'ha comprovat que l'extracció de glifosat i AMPA en sòls és superior al 95% emprant 10 mL de KOH per 5 g de sòl emprant agitació orbital durant 30 minuts. En sòls amb un major contingut de matèria orgànica s'ha comprovat que l'eliminació d'àcids húmics i fúlvics prèvia a l'anàlisi cromatogràfica és efectiva emprant la resina XAD-7.
- Caracterització dels processos de sorció de glifosat en sòls. La metodologia analítica desenvolupada s'ha aplicat a la determinació de les isoterms d'adsorció de glifosat en sòls sorrencs d'un camp de pollanques de la zona de l'Empordà (Girona) i als posteriors estudis en condicions de flux. En ambdós casos s'ha observat un comportament semblant pel que fa a adsorció i desadsorció de glifosat pur i les formulacions comercials d'aquest herbicida. S'han obtingut uns valors de K_d pròxims a 4, assumint que l'adsorció és lineal en el rang de concentració estudiat ($50\text{-}5000\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). No obstant, en els experiments en columna s'ha observat una lleugerament més elevada adsorció pel compost pur que pel Roundup en cas de treballar a cabals més baixos, $0,01\ \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$.
- Estudi de camp. S'ha estudiat el transport i la degradació de glifosat a través de la zona no saturada del sòl en una aplicació controlada de l'herbicida Atila en un camp de pollanques de la zona de l'Empordà. Els resultats mostren una adsorció molt forta del glifosat en la capa més superficial, que presenta un elevat contingut de matèria orgànica. S'ha detectat una quantitat important del principal metabòlit del glifosat, l'AMPA, l'endemà mateix de l'aplicació de l'herbicida en l'horitzó més superficial del sòl.

CONCLUDING REMARKS

The results obtained in the studies collected in this memory allow to reach the following conclusions:

- Various ion exchange solid phases have been evaluated for the extraction and preconcentration of glyphosate and AMPA from aqueous matrices: two polymeric resins (AMBERLITE®IRA-416, type II) and AMBERLITE®IRA-900, type I) and a commercial silica modified cartridge, ISOLUTE-NH₂®. AMBERLITE®IRA-900 is the most efficient adsorbent. With 1 g of this solid at a load and elution flow-rate of 5 mL·min⁻¹ and using a solution of NaCl 0,1-1M as eluent recoveries of 85-110% for glifosat and 77-98% for AMPA are achieved. Although AMBERLITE®IRA-416 resin and the cartridge ISOLUTE-NH₂® allow a quantitative recovery of glyphosate, they are not enough efficient with its metabolite extraction, AMPA. The functionalized silica cartridge, ISOLUTE-NH₂®, achieves higher preconcentration factors than the polymeric resins (125 and 17, respectively, applying 100 mL of sample).
- The effect of sample salt content on extraction efficiency has been studied. Good recoveries of glyphosate (86-99%) are obtained with samples of low to moderate conductivities (0-800 µS), but a linear decreasing is observed when samples of higher conductivity values are treated ($r^2=0,94$). In contrast, AMPA is only quantitatively recovered from the resin in ultrapure samples, whereas in natural waters a linear relationship can be established between analyte extraction and sample conductivity ($r^2=0,996$). However, the maximum recovery achieved is 50%.
- Using the preconcentration technique described in the first point followed by liquid chromatography with fluorescence detection, limits of detection of 0,1 µg·L⁻¹ and 0,3 µg·L⁻¹ for glyphosate and AMPA, respectively, are achieved. The application of UV-vis detection systems implies an increasing of detection limits, especially in the case of capillary electrophoresis. Despite the no requirement of analytes derivatization, capillary electrophoresis only allows the determination of 85 µg·L⁻¹ of glyphosate and 60 µg·L⁻¹ of AMPA.
- The obtained results when analysing the same kind of samples using the liquid chromatography with UV-vis detection and the capillary electrophoresis with UV-vis indirect detection are not statistically different (test t- and F-). This fact indicates the possibility of using both methods depending on their application ranges.

- An analytical method for the characterization and determination of etoxylated alkylamines, non-ionic surfactants, has been developed by reversed-phase liquid chromatography-mass spectrometry (electrospray interface). The method has been characterised in terms of sensitivity ($2\text{-}23\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), precision ($S_{y/x}$) and repeatability ($\text{RSD}<15\%$) for each of alkylic and ethoxilated homologues. An on-line preconcentration technique has been avaluated. Detection limits for all the alkylic and ethoxilated homologues 50 times lower than with direct injection have been achieved with a maximum sample volume of 5 mL ($0,05\text{-}0,5\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

- The developed method has been applied to the analysis of various commercial formulations of glyphosate in order to characterize the oligomeric distribution of each product, in Full Scan mode, and to determinate the total concentration of surfactants, in SIM mode. The presence of tallow derived surfactant has been confirmed in two formulation out of four formulations tested, with concentrations of $99,4\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ in the Compo product ang $98,1\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ in the case of RoundUp.

- Determination of glyphosate in soils development method. The extraction of glyphosate and AMPA in soil has been proved to be higher than 95% using 10 mL of KOH per 5 g of soil by orbital shacking for 30 minutes. In soils of higher organic content, an efficient removal of humic and fulvic substances has been achieved using the XAD-7 resin prior to the chromatographic analysis.

- Characterization of glyphosate sorption processes in soils. The analytical methodology developed has been applied to the determination of adsorption isotherms of glyphosate in sandy soils of a creak forest of Empordà area (Girona) and to the posterior studies in flow conditions. In both cases a similar behaviour of adsorption and desorption of pure glyphosate and commercial formulations of this herbicide has been observed. K_d values close to 4 have been obtained, assuming a linear adsorption in the concentration range studied ($50\text{-}5000\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). However, in the column experiments a slightly higher adsorption for the pure compound than for Roundup was observed in case of working at lower flow-rates, $0,01\ \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

- Field study. Transport and degradation of glyphosate has been studied through the non saturated zone of soil in a controlled application of Atila herbice in a creak forest of Empordà area. The results show a strong adsorption of glyphosate in the most superficial layer, which presents a high organic content. An important amount of the main metabolite of glyphosate, AMPA, has been detected in the most superficial soil the next day of the herbicide application.

AGRAÏMENTS / ACKNOWLEDGEMENTS

Massa sovint, durant els últims anys, havia pensat que no arribaria el moment de poder agrair a la gent que m'envolta el que heu fet per tal que aquest treball arribés a la seva fi. Finalment, ho he aconseguit. Els que em coneixeu, sabeu com m'ha costat. Per tot això us vull donar les més sinceres gràcies, per l'ajuda i el suport que m'heu mostrat sempre.

En aquest moment m'és difícil expressar el que sento. Per una banda, la satisfacció de comprovar que l'esforç realitzat durant de tant de temps ha valgut la pena; però per altra banda, la tristesa, ara sí, de deixar enrera l'etapa universitària, tant la dels dies d'estudiant com l'etapa dedicada a la recerca.

En primer lloc voldria donar les gràcies a les meves directores de tesi, Dra. Manuela Hidalgo i Dra. Victòria Salvadó, per haver confiat en mi i deixar-me introduir en el camp de la investigació. Us agraeixo els vostres consells i la vostra dedicació. Gràcies Nela pels ànims que m'has donat aquest últim any, t'ho agraeixo de veritat.

A totes vosaltres, companyes de despatx i laboratori, gràcies per les estones que hem passat juntes, tant en els bons moments com els que no ho han estat tant. M'heu demostrat ser unes bones amigues, per davant de companyes de feina. Gràcies Enriqueta, Clàudia i Mònica, pels vostres consells, tant en química com en mil i altres coses... I gràcies a les doctorants de la "meva època", Carol, Sònia, Gemma, Sara i Eva, per haver-nos-ho passat tan bé. Cadascuna ha seguit pel seu camí, però segur que us anirà molt bé, molta sort a totes! Gràcies també a les resta de gent de Química Analítica i del Departament de Química per les xerrades pels passadissos o pel bar.

També voldria agrair a en Tolo la seva ajuda amb l'espectrometria de masses i els tensioactius en general, a en Roberto, les seves explicacions sobre els sòls, i a en Salvador, la seva ajuda en l'experiment de camp. Tampoc em puc oblidar de l'Anna, la Vero, la Silvia i en Josep i dels seus consells i ajuda logística.

A significant part of the experimental work presented in this thesis has been developed in the "Chemistry Department, University of Opole (Poland)". Therefore, I want to give my deepest gratitude to Prof. Piotr Wieczorek for his generosity in offering me the possibility to work in his group. Thanks to Anna, Pawel, Jacek, Ewa, Iza, Ala and Maxim for their hospitality and the effort to make me feel comfortable so far from home. It meant much more to me than just a professional challenge. Thank you!!!

En el terreny més personal, també sou molts els que m'heu animat a seguir endavant. Us ho agraeixo de tot cor.

Gràcies als companys del Saint George, pel vostre interès per l'evolució de la meva tesi i pels ànims que m'heu anat donant, especialment en Pere, la Lídia, la Dolors i la Cati. Gràcies als meus "nens", que em fan sentir una part important (i molt orgullosa!) dels seus avenços a nivell personal, matemàtic i químic dia rera dia.

Gràcies a les meves companyes de patinatge, tot i que la majoria ja estiguen retirades... Ens ho hem passat molt bé fent de jutges i el que faci falta. Gràcies a tu, Anna, per anar més lluny i ser una amiga de veritat.

Gràcies als meus amics per ser això, amics, molt especialment la Berta i la Sandra, però també l'Anna C, l'Anna Maria, en Marc, l'Albert, la Neus i en Gadius, l'Anna i en Víctor,... I tota la colla de Santa Coloma i de Figueres, que no són pocs!!! Un record molt especial per en Giro, a qui m'hauria agradat poder ensenyar la tesi, segur que me l'hauries criticat... A Santa Coloma se't troba molt a faltar.

Un agraïment molt gran per la família. En primer lloc als meus pares, pel seu esforç per entendre les meves inquietuds i haver-me ajudat sempre a aconseguir allò que em proposo. No m'oblido tampoc del meu germà i la Joana Maria, del meu avi, la Dolors, la Marta i en Bernat, i la resta de família, tots vosaltres heu contribuït d'alguna manera a la realització d'aquest treball.

...I només em queda agrair a la persona més important de la meva vida el seu recolzament infinit. Abel, tu ets el màxim responsable que finalment hagi arribat el dia de presentar aquesta tesi. Gràcies per animar-me. Gràcies per confiar en mi. Gràcies per fer-me riure. Gràcies per ser com ets i per estimar-me com ho fas.

De tot cor, gràcies a tots!

