



Universidad del País Vasco Euskal Herriko Unibertsitatea

(QUÍMICA ANALÍTICA / KIMIKA ANALITIKOA)

MICROENCAPSULACIÓN DE BIOCIDAS

Memoria presentada para optar al grado
de Doctor en Ciencias Químicas

Mariluz Alonso Alonso

(Directoras: Rosa M^a Jiménez Sanz y Rosa M^a Alonso Rojas)

Febrero 2011

Capítulo II: PROCESO DE MICROENCAPSULACIÓN



<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>

Capítulo 2 - Proceso de microencapsulación

2.Proceso de microencapsulación.....	43
2.1.Introducción.....	43
2.2.Objetivo.....	57
2.3.Parte experimental.....	58
2.3.1. Procedimiento de encapsulación.....	58
Efecto del tiempo de agitación y de la temperatura.....	59
2.3.2. Seguimiento/Verificación de la formación del complejo de inclusión biocida-CD en estado sólido.....	60
2.3.3. Seguimiento/Verificación de la formación del complejo de inclusión biocida-CD en disolución.....	60
2.3.4. Verificación de la formación del complejo de inclusión biocida-CD mediante análisis termogavimétrico.....	61
2.3.5. Estequiometría de los complejos de inclusión.....	61
Electroforesis capilar de zona (ECZ).....	62
Espectrofotometría ultravioleta-visible.....	63
Análisis elemental.....	63
2.4.Resultados y Discusión.....	64
2.4.1. Efecto del tiempo de agitación y de la temperatura.....	64
2.4.2. Seguimiento/Verificación de la formación del complejo de inclusión biocida-CD en estado sólido.....	66
2.4.3. Seguimiento/Verificación de la formación del complejo de inclusión biocida-CD en disolución.....	69
2.4.4. Verificación de la formación del complejo de inclusión biocida-CD mediante análisis termogavimétrico.....	75
2.4.5. Estequiometría de los complejos de inclusión.....	77
ECZ/ Espectrofotometría uv-vis.....	77
Análisis elemental.....	78
CONCLUSIONES.....	82

2. PROCESO DE MICROENCAPSULACIÓN

2.1. INTRODUCCIÓN

Una vez seleccionada la ciclodextrina como agente encapsulante de los biocidas en estudio, en esta parte del trabajo se pretende llevar a cabo la optimización del proceso de microencapsulación. Para la elección del proceso se debe tener en cuenta la partícula deseada, las propiedades fisicoquímicas del agente encapsulante y de la sustancia a encapsular, las aplicaciones del material microencapsulado, el mecanismo de liberación deseado y el coste del proceso^{118,119,120}.

El producto resultante de la microencapsulación ha recibido diferentes denominaciones en función de su morfología y estructura interna, teniendo como factor común el tamaño micrométrico. Los métodos de encapsulación se clasifican según el tipo de estructura formada: tipo *capsular* o *matricial*. En la Tabla 2.1 se recogen los métodos de encapsulación más utilizados.

Tabla 2.1. Métodos de encapsulación según el tipo de estructura formada¹²¹.

Métodos	Sistema formado
Secado por aspersión	Matricial
Extrusión	Matricial
Gelificación iónica	Matricial o Capsular
Recubrimiento	Capsular
Coacervación	Capsular
Extracción-Evaporación de disolvente	Usualmente matricial
Atrapamiento por Liposomas	Capsular
Polimerización Interfacial	Capsular
Complejos de Inclusión	Matricial

¹¹⁸Martin del Valle EM. Cyclodextrins and their uses: a review. Process Biochemistry, 2004; 39: 1033–1046.

¹¹⁹Vandegaer JE. Microencapsulation, Processes and application, 1974, Plenum Press, New York, pp. 1-37, 89-94.

¹²⁰Gutcho MH. Capsule technology and microencapsulation, 1972, Noyes Data Corporation, New Jersey, pp. 3-65.

¹²¹Sparks RE., Jacobs IC. Controlled-release delivery systems for pesticides, 1999, HB.Scher, California, pp. 4-11.

- **Secado por aspersión** (Spray drying)

Se fundamenta en la producción de un polvo seco, por medio de la atomización de una emulsión, en una corriente de aire caliente dentro de una cámara de secado a 150-200 °C. Este proceso también se denomina atomización¹²². El disolvente se evapora instantáneamente, permitiendo que el material activo presente en la emulsión, quede atrapado dentro de una película de material encapsulante. Una de las grandes ventajas de este proceso, además de su simplicidad, es que es apropiado para materiales sensibles al calor, ya que el tiempo de exposición a temperaturas elevadas es muy corto (5 a 30 s). Por lo tanto es un método rápido y sencillo, muy útil a nivel industrial, por lo que es uno de los más empleados. El tamaño de partícula que se puede conseguir es de 1-1000 µm. En la Figura 2.1 se muestra la producción de la atomización.



Fig.2.1. Atomización.

Los principales agentes encapsulantes utilizados en este método son carbohidratos (almidón, CD y quitosano), lípidos (ceras, parafinas y grasas) y proteínas (soja, gelatina, suero de leche). Estos encapsulantes deben tener la capacidad de proporcionar una emulsión estable durante el proceso de secado por aspersión y tener buenas propiedades de formador de película para dar lugar a una capa que proteja al ingrediente activo de la oxidación.

El secado por aspersión se ha utilizado en la industria alimentaria para encapsular sabores y aromas¹²³.

- **Aspersión por enfriamiento o congelación** (spray cooling/chilling) Este método es una variante del secado por aspersión. En lugar de atomizar el material formador de cubierta, éste se somete a un proceso de fusión, pulverizándose a continuación a una temperatura. Las coberturas empleadas generalmente son productos de bajo punto de fusión, aceites vegetales en el caso de aspersión por congelación. Este método es

¹²²Masters K. Spray Drying Handbook, 1991, Halsted Press, New York, pp. 125-165.

¹²³Desai KGH, Park HJ. Encapsulation of vitamin C in tripolyphosphate cross-linked chitosan microspheres by spray drying. Journal of Microencapsulation, 2005; 22:179-92.

adecuado para encapsular líquidos sensibles al calor. La reducción de la temperatura produce una solidificación del líquido pared y el atrapamiento de la sustancia activa en el centro de la cápsula¹²⁴.

En concreto, la aspersión por enfriamiento se emplea principalmente para encapsular vitaminas, minerales o acidulantes, mientras que las aplicaciones más comunes de la aspersión por congelación es el secado de sopas y de alimentos con altos contenidos en grasas¹²⁵.

- **Extrusión**

La microencapsulación por extrusión consiste en el paso de una emulsión formada por el material activo y el encapsulante a través de un extrusor (elemento que da forma por presión a una masa fluida) a alta presión. Debido al calor al que se somete al material activo, este proceso no es adecuado para encapsular compuestos termolábiles^{126,127,128}.

- **Gelificación iónica (Alginate beds)**

En esta técnica la formación de la cubierta de las microcápsulas tiene lugar por una reacción de gelificación iónica entre un polisacárido y un ión de carga opuesta.

Generalmente, se recurre a la gelificación de alginato sódico (polianión) con cloruro cálcico (catión). El método consiste en suspender el compuesto que se va a encapsular en una disolución acuosa de alginato sódico, adicionando la mezcla, mediante goteo, sobre una disolución acuosa de CaCl₂, que se encuentra sometida a una velocidad de agitación adecuada. Al entrar la gota de alginato sódico en contacto con Ca²⁺, se produce la gelificación instantánea de la misma, obteniéndose una membrana o cubierta de alginato cálcico que es insoluble en agua, pero permeable. La capsula se deposita sobre citrato sódico para solubilizar el calcio y eliminarlo de la reacción al formar un complejo soluble. La reacción que tiene lugar es:



¹²⁴Issa RJ. Numerical investigation of the chilling of food products by air-mist spray. World Academy of Science, Engineering and Technology, 2008; 47: 364-373.

¹²⁵King C., Tan C., Scharpf Jr., O'chat LG., Schulman DP. Fluidizing spray chilling system for producing encapsulated materials. 5525367. USA Patent, 1996.

¹²⁶Bencézdí D., Bouqueran PE. Process for the preparation of granules for the controlled release of volatile compounds. 01/17372 A1. USA Patent, 2001.

¹²⁷Bencézdí D., Blake A., Encapsulation and the controlled release. Leatherhead Food RA Ind. 1999; 2: 36-48

¹²⁸Gouin S. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends Trends in Food Science & Technology, 2004; 15: 330-347.

Este proceso ha sido muy utilizado por su sencillez para llevarlo a cabo en el laboratorio. Cualquier componente activo puede ser encapsulado tanto si es hidrofílico, hidrofóbico, sensible a la temperatura, líquido viscoso o sólido¹²⁹.

- **Recubrimiento por lecho fluidizado** (Fluid bed coating)

Este proceso tiene su base en el denominado “pan coating”, en el cual partículas de huésped son suspendidas mediante una corriente vertical de aire y pulverizadas sobre el anfitrión, el cual después de evaporarse el disolvente, forma un sólido alrededor del huésped (Figura 2.2).

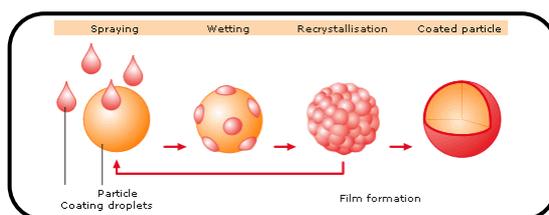


Fig. 2.2. Principio del método de recubrimiento.

El recubrimiento por lecho fluidizado se utiliza para partículas sólidas de tamaño 50-500 μm de diámetro, que son suspendidas en una malla metálica, en aire en corriente ascendente, a alta velocidad dentro de una cámara con temperatura y humedad controlada. El aparato más difundido para llevar a cabo este tipo de proceso es el sistema Wurster¹³⁰, mostrado en la Figura 2.3., donde el material de recubrimiento se atomiza desde la parte inferior en forma de gotas finísimas. La corriente de aire desplaza a las partículas recubiertas hacia la parte superior, donde se produce la solidificación y finalmente caen en la malla metálica. La cantidad de partículas cubiertas depende de la longitud de la cámara y del tiempo de residencia dentro de ésta.

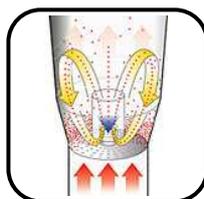


Fig. 2.3. Sistema Wurster.

¹²⁹Mofidi N., Aghai-Moghadam M., Sarbolouki MN. Mass preparation and characterization of alginate microspheres. *Process Biochemistry*, 2000; 35: 885–888.

¹³⁰Wurster DE. Method of applying coatings to edible tablets or the like. 2648609. USA Patent, 1953.

Este procedimiento permite recubrir partículas utilizando cualquier material encapsulante, tanto aquellos que funden fácilmente (aceites vegetales hidrogenados, estearinas, ácidos grasos, emulsificantes, ceras) como coberturas solubles (almidones, gomas y maltodextrinas). Para coberturas fundibles se utiliza aire frío para endurecer el transportador, mientras que para las coberturas solubles se utiliza aire caliente para evaporar el disolvente. Los ingredientes con facilidad de fundir se liberan al incrementar la temperatura o por ruptura física, mientras que las coberturas solubles liberan su contenido al adicionar agua. Los alimentos fortificados y mezclas nutricionales contienen ingredientes encapsulados mediante lecho fluidizado. Algunos ejemplos son: ácido cítrico, ácido láctico, ácido sórbico y bicarbonato de sodio, utilizado en productos de panificación.

- **Coacervación.**

Bajo la denominación de coacervación o separación de fases, se agrupa una serie de técnicas de microencapsulación que se basan en la inducción, por algún procedimiento, de la desolvatación del polímero que, a continuación, se deposita en forma de gotas de coacervado alrededor de la sustancia a encapsular¹³¹. Este método es eficaz, pero caro. El tamaño de partícula que se puede conseguir es de 1-1000 µm.

El proceso consta de las siguientes etapas:

- Dispersión* mediante agitación adecuada del compuesto que se va encapsular en una disolución de polímero formador del recubrimiento.
- Inducción* de la coacervación por modificación de pH, temperatura o fuerza iónica por adición de una segunda sustancia (sal iónica o polímero incompatible).
- Adsorción* de las gotas de coacervado alrededor de los núcleos a encapsular.
- Endurecimiento* de la cubierta de coacervado, sometiéndola a enfriamiento.

Cuando la coacervación se produce en fase acuosa, podemos clasificarla en:

Coacervación simple. Se refiere a un coloide disperso en agua y el agua de solvatación forma un coloide por adición de compuestos químicos, los cuales tienen más afinidad por el agua que por el coloide (sales o alcoholes). Este hecho origina que las cadenas de coloides se cierren entre ellas formando el coacervado.

Coacervación compleja. Implica que las cargas iónicas de las cadenas de coloide son neutralizadas por la mezcla de dos coloides de carga opuesta.

¹³¹Saeki K., Hosono N. Microencapsulation by a complex coacervation process using acid-precursor gelatine. Applied Biochemistry and Biotechnology, 1983; 10(1-3): 251-254.

Cuando la coacervación se produce en fase orgánica, podemos clasificarla en:

- *Coacervación Inducida por un cambio de temperatura.*
- *Coacervación inducida por la adición de un "no solvente",* disolvente que es miscible con el disolvente del polímero y en el cual el polímero es insoluble.
- *Coacervación Inducida por la adición de un polímero incompatible,* que presente una mayor solubilidad en el disolvente que el propio polímero de recubrimiento, no teniendo, en cambio, afinidad por el compuesto que se va a encapsular.

Este proceso se utiliza preferentemente para encapsular diferentes tipos de aceites¹³², nutrientes, vitaminas¹³³ y enzimas¹³⁴.

- **Extracción- evaporación del disolvente** (Solvent evaporation)

Esta denominación ha sido normalmente asignada a un conjunto de procedimientos en los que se da, como circunstancia común, la formación de una emulsión que puede ser del tipo O/W (Oil/water) y O/O (Oil/Oil). En ambos casos, la fase interna de la emulsión es un disolvente orgánico que presenta una solubilidad limitada en la fase externa de la emulsión que puede ser aceite o agua. Además es fundamental la incorporación de un agente tensoactivo en la fase externa de la emulsión. Una vez formada la emulsión, se puede extraer el disolvente para conseguir la precipitación gradual del polímero a medida que se va eliminando el disolvente, dando lugar a las microesferas. Los tamaños de partícula obtenidos varían de 0,1-1000 μm ¹³⁵

- **Atrapamiento por liposomas** (Liposomes)

Los liposomas son micropartículas en las cuales el recubrimiento/membrana exterior consiste en una o más bicapas hidratadas rodeando o encapsulando un material activo, por ejemplo, los fosfolípidos se pueden usar para formar una bicapa esférica alrededor de una sustancia no polar como un esteroide. Las microcápsulas de liposomas poseen unas propiedades más versátiles y son menos frágiles que los encapsulados hechos de grasa. Se han empleado mayoritariamente en el campo farmacéutico y cosmético¹³⁶.

¹³²Korus J., Tomasik P., Lii C.Y. Microcapsules from starch granules. *Journal of Microencapsulation* 2003; 20: 47-56.

¹³³Junyaprasert VB., Mitrevej A., Sinchaipanid N., Boonme P., Wurster DE. Effect of process variables on the microencapsulation of vitamin A palmitate by gelatin-acacia coacervation. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 2001; 27: 561-566.

¹³⁴Dubin PL., Muhoherac BB., Xia, J. Preparation of enzyme-polyelectrolyte coacervate complexes and their properties. 5834271 A. USA patent, 1998.

¹³⁵Wang J., Schwendeman SP. Mechanisms of solvent evaporation encapsulation processes: prediction of solvent evaporation rate. *Journal of Pharmaceutical Science*, 1999; 88(10): 1090-9.

¹³⁶El-Zawahry MM., El-Shami S., Hassan El-Mallah M. *Dyes and Pigments*, 2007; 74(3): 684-691.

- **Polimerización interfacial** (Interfacial polymerization)

La polimerización interfacial involucra la disolución de un monómero hidrofóbico polimerizable en un material activo hidrofóbico¹³⁷. La mezcla se dispersa en una fase polar y un catalizador provoca la polimerización del monómero. El polímero es insoluble en la sustancia activa hidrofóbica y se deposita como pared alrededor de la sustancia activa. El tamaño de partícula que se puede obtener es de 1-1000 µm. Los polímeros que forman coberturas adecuadas son poliamidas, poliaminas, poliureas, poliuretanos, nylon, poliéster o polifeniléster. La polimerización interfacial ocurre entre monómeros disueltos en sus respectivas fases inmiscibles. Los monómeros solubles se dispersan en la fase acuosa por medio de agitación, la membrana de la cápsula se forma por la adición de un monómero orgánico soluble en la fase continua u orgánica. Uno de los procesos más comunes es la formación de poliamida (nylon) como consecuencia de la reacción interfacial 1,6-hexametilendiamina, monómero soluble en agua, y cloruro de sebacilo, soluble en medio orgánico.

- **Encapsulación por Inclusión** (Inclusion encapsulation)

Este proceso hace referencia a una nueva asociación supramolecular de un ligando (ingrediente encapsulado) dentro de un sustrato con una cavidad (material encapsulante). La unidad encapsulada se mantiene dentro de la cavidad por enlaces de hidrógeno y/o fuerzas de van der Waals¹³⁸.

Los materiales encapsulantes más utilizados son las ciclodextrinas. Como ya hemos indicado, el interior de la estructura de las CDs es hidrofóbico mientras que la superficie exterior es hidrofílica. El principal mecanismo de las CDs involucra la formación de complejos tipo huésped-anfitrión, por inclusión de analitos en su cavidad: se genera un equilibrio dinámico en el cual agua u otro compuesto, son reemplazados en la cavidad de la molécula de CD. La estabilidad de estos complejos depende de la estructura, hidrofobicidad de la molécula, pH, disolvente orgánico, temperatura y concentración de la CD.

La preparación de complejos tiene lugar cuando la molécula huésped y la CD, se mezclan con un disolvente menos hidrofóbico que la molécula huésped, produciéndose la complejación de la molécula huésped hacia el centro de la ciclodextrina.

¹³⁷Scher HB., Rodson M., Lee K. Microencapsulation of pesticides by interfacial polymerization utilizing isocyanate or aminoplast chemistry. *Pesticide Science*, 1999; 54(4): 394-400.

¹³⁸Schrooyen PMM., Van der Meer R., De Kruif CG. Microencapsulation: its application in nutrition. *Proceedings of Nutrition Society*, 2001; 60:475-476.

El proceso se lleva a cabo normalmente por etapas y dependiendo del principio activo la velocidad y tiempo varían.

La asociación CD:huésped está regida por un equilibrio termodinámico, mediante la constante de estabilidad del complejo. Los complejos de inclusión obtenidos son sólidos cristalinos, siendo el tamaño de partícula obtenida en este proceso variable, pudiéndose obtener desde tamaños inferiores a 100 μm a superiores a 500 μm . Los complejos de inclusión con ciclodextrinas poseen unas características únicas de liberación del componente activo (huésped) debido a que la unión no es permanente, sino que es un equilibrio termodinámico. Por otra parte, origina importantes modificaciones en las propiedades físico-químicas de la molécula huésped: aumento de la solubilidad en agua, mejora de la estabilidad frente a la degradación producida por la luz, temperatura...¹³⁹

La estructura matricial de las partículas formadas, donde el principio activo se encuentra altamente disperso en pequeñas moléculas en el material de recubrimiento, posibilita encapsular de forma selectiva tanto moléculas polares como apolares y moléculas que en un principio son prácticamente insolubles en agua. Además el coste de todo el proceso no es elevado¹⁴⁰.

Las características mencionadas hacen que se haya seleccionado las **CDs como encapsulantes** y ya que las propiedades de los principios activos son potenciadas por este método, se elige el **método de encapsulación por inclusión** para la obtención de biocidas encapsulados en base agua, por ser más respetuoso con el medioambiente. Para llevar a cabo la obtención de las microcápsulas CD:biocida por el proceso de inclusión, la bibliografía recoge los métodos que se describen en la Tabla 2.2. Una vez formados los compuestos de inclusión por cualquiera de los procedimientos descritos, en algunos casos pueden ser necesarias operaciones como: aportar temperatura, enfriar la disolución a temperatura ambiente, recoger el precipitado mediante decantación, centrifugación o filtración, lavar con una cantidad pequeña de agua u otro disolvente miscible en agua (etanol, metanol o acetona) o/y secar en una estufa, a vacío o mediante liofilización a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ^{141,142,143}.

¹³⁹Astray G., Gonzalez-Barreiro C., Mejuto J.C., Rial-Otero R., Simal-Gándara A. Review on the use of cyclodextrins in foods. *Journal of Food Hydrocolloid*, 2009; 27(7): 1631-1640.

¹⁴⁰Rodis P.S., Karathanos V.T., Mantzavinou A. Partitioning of olive leaf antioxidants between oil and water phases. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 2002; 50: 596-601.

¹⁴¹Yexiang W., Hua X., Yong G., Huaming L. Synthesis of poly(ethylene glycol) functionalized MWNTs and their inclusion complexes with α -cyclodextrin. *Journal of Materials Science*, 2008; 43(16): 5609-5617.

¹⁴²Singh M., Sharma R., Banerjee U.C. Biotechnological applications of cyclodextrins. *Biotechnology Advances*, 2000; 20(5-6): 341-59.

Tabla 2.2. Procesos de microencapsulación con CDs.

Métodos	Procedimiento
Clásico ¹⁴⁴	Tras evaporación del disolvente donde está disuelto el huésped, se añade la disolución acuosa de CD y se agita.
Suspensión ¹⁴²	Para CDs poco hidrosolubles al 10% en agua. Agitación.
Co-precipitación ¹⁴⁵	CD al 20% en agua. Agitación.
Saturación (Slurry) ¹⁴⁶	CD al 50-60% en agua. Agitación
Complejación en disolución ¹⁴⁷	Agitación en agua en cantidad equimolecular.
Amasado (Kneading) ¹⁴⁵	Agitación en agua, en mortero o maquinaria especial.
Disolución con disolventes orgánicos ¹⁴⁸	Biocida disuelto en disolvente orgánico añadido a la CD en agua. Cantidades equimoleculares.
Mezclado en seco (Dry mixing) ¹⁴⁹	Agitación sin disolvente. Para huéspedes líquidos y aceites.
Centrifugación y calentamiento (Damp) ¹⁴⁷	Centrifugación y T=100 °C en vial sellado. Poco disolvente.
Encapsulación mediante vacío ¹⁴⁷	Encapsulante volatilizado a vacío y depositado sobre huésped en rotación y a baja T.
Fusión ¹⁵⁰	Agitación T=10 °C+T _{fusión} del huésped. Poco disolvente. Mayor contacto.

Los procedimientos de encapsulación utilizados en este trabajo han sido: complejación en disolución, disolución con disolventes orgánicos y fusión. Esta elección se ha basado en el empleo de métodos que presenten las mejores ventajas para la producción de encapsulados a escala industrial, desde el punto de vista rendimiento/coste.

La verificación de la formación de los complejos de inclusión y la determinación del rendimiento del proceso, se ha llevado a cabo sobre los productos encapsulados en estado sólido. Se ha utilizado para ello la **calorimetría diferencial de barrido (DSC)** para verificar que no existe biocida libre en el complejo de inclusión y el **análisis termogravimétrico junto con el análisis térmico diferencial (TGA/DTA)** para monitorizar que toda la CD esté formando el microencapsulado. Además esta técnica nos dará información sobre las

¹⁴³Kaneto U., Fumitoshi H., Hidetoshi A. Recent Aspect of cyclodextrin-Based Drug Delivery System. J. Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry, 2006; 56(1-2): 3-8.

¹⁴⁴Gouin S. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. Trends in Food Science & Technology, 2004; 15: 330-347.

¹⁴⁵Loftsson T., Ólafsdóttir B.J., Fridriksdóttir H., Jónsdóttir S. Cyclodextrin complexation of NSAIDs: physicochemical characteristics. European Journal of Pharmaceutical Science, 1993; 1: 95-101.

¹⁴⁶Hidefumi Y., Tze-Loon N., Sun-Hwa B., Takeshi F. Release behavior of flavor encapsulated CD in slurry solution under boiling conditions. Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry, 2006; 56: 113-116.

¹⁴⁷Wacker Chemie AG Company. Germany. Complexation with natural cyclodextrins.

¹⁴⁸Martin Del Valle EM. Cyclodextrins and their uses: a review. Process Biochemistry, 2004; 39: 1033-1046.

¹⁴⁹Hedges AR. Industrial Applications of Cyclodextrins. Chemical Review, 1998; 98: 2035-2044.

¹⁵⁰Orgovánia J., H.-Ottaa K, Pfppla L, Fenyvesib E., Zaraya G. Spectrophotometric and thermoanalytical study of cypermethrin/cyclodextrin complexes. Microchemical Journal, 2005; 79: 77- 82.

moléculas de agua de inclusión, que han sido sustituidas por el biocida en el complejo formado. La determinación del contenido de moléculas de agua de inclusión, nos sirve para poder verificar la estequiometría del microencapsulado mediante la **técnica de análisis elemental (AE)**.

El seguimiento de la estequiometría de la reacción en disolución se ha realizado sobre la disolución resultante de cada procedimiento utilizando los estudios de solubilidad de fase de Higuchi y Connors¹⁵¹ y el método propuesto por Yamamoto y col.¹⁵². En ambos casos se ha empleado la espectrofotometría uv-visible para la determinación de la concentración del biocida.

DSC es una técnica termoanalítica empleada para caracterizar termodinámicamente sistemas macromoleculares. Se basa en mantener la muestra y un material de referencia a la misma temperatura, aplicando la cantidad de energía eléctrica necesaria, mientras ambas son calentadas o enfriadas a velocidad constante. La cantidad de energía que es necesario aplicar para compensar las transiciones o fenómenos sufridos por la muestra se interpreta como una medida del cambio de energía del fenómeno.

Las reacciones producidas pueden ser debidas a fenómenos físicos o químicos. Los procesos físicos endotérmicos incluyen fusión, vaporización, sublimación, absorción y desorción, mientras que un proceso físico exotérmico puede ser la adsorción. Las transiciones cristalinas pueden ser tanto exotérmicas como endotérmicas. Los procesos químicos a menudo producen picos tanto endotérmicos como exotérmicos¹⁵³.

La Termobalanza SHIMADZU DTG-60 utilizada en este trabajo ha sido diseñada de forma que permite realizar análisis térmico diferencial (DTA) y medidas termogravimétricas (TGA) simultáneamente, lo que va a permitir la obtención de las propiedades térmicas de la muestra: temperatura de transición vítrea, punto de fusión, temperatura de reacción, y además también se podrán observar los cambios de masa implicados en los cambios térmicos (o viceversa). De este modo, se podrán atribuir los cambios térmicos a cambios químicos, como la adsorción y la descomposición, o a cambios físicos, como la fusión. Y todo ello empleando una pequeña cantidad de muestra.

¹⁵¹Higuchi T, Connors KA. Phase Solubility Techniques. *Adv Anal Chem Instr.*, 1965; 4:117-212.

¹⁵²Yamamoto I., Unai T., Suzuki Y., Katsuda Y. Preparation, stabilization, and insecticidal activity of cyclodextrin-inclusion compounds of pyrethroids. *Journal of Pesticide Science*, 1976; 1: 41-48.

¹⁵³Hunt BJ., Janes MI. *Polymer characterisation*. Blackie Academic & Professional, 1993, Chapman & Hall, London, pp 1-50.

El análisis elemental es una técnica que proporciona el contenido total de carbono, hidrógeno, nitrógeno y azufre presente en un amplio rango de muestras de naturaleza orgánica e inorgánica tanto sólidas como líquidas. La técnica está basada en la completa e instantánea oxidación de la muestra mediante una combustión con oxígeno puro a una temperatura aproximada de 1000 °C. Los diferentes productos de combustión CO₂, H₂O y N₂, se transportan mediante el gas portador (He) a través de un tubo de reducción y después son selectivamente separados en columnas específicas para ser luego desorbidos térmicamente. Finalmente, los gases pasan de forma separada por un detector de conductividad térmica que proporciona una señal proporcional a la concentración de cada uno de los componentes individuales de la mezcla.

Los estudios de solubilidad de fase (PSA) se realizan según el método propuesto por Higuchi y Connors¹⁵⁴, basado en la interacción entre los componentes de la disolución (biocida y CD) provocando una complejación entre las especies. Para ello se pone en contacto un exceso de sustrato (huésped) que sea débilmente soluble en el medio, con uno que lo sea en mayor medida (CD), éste se añade poco a poco, agitando a temperatura constante. El diagrama de solubilidad de fases se obtiene al representar la concentración del huésped, que se encuentra en disolución, en función de la concentración de CD añadida en el sistema. En la Figura 2.4 se muestran los diferentes diagramas de solubilidad de fases que pueden obtenerse: tipo A y tipo B.

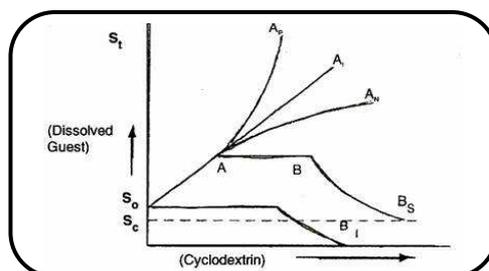


Fig. 2.4. Diagramas de solubilidad de fase Tipo A y B.

Diagrama tipo A, cuando el biocida y la ciclodextrina forman en su mayoría un complejo soluble, donde la cantidad de huésped disuelto va aumentando a medida que aumenta la concentración de CD. Además dentro del tipo A se puede distinguir tres tipos; A_L, cuando la reacción es de orden 1 con respecto a CD, A_P cuando es de orden mayor a 2 con respecto

¹⁵⁴Higuchi T, Connors KA. Phase Solubility Techniques. Adv. Anal. Chem. Instr., 1965; 4:117-212.

a CD y A_N , en la cual se produce una disminución de la complejación, atribuida por Higuchi y Connors a una alteración en el grado de complejación al aumentar la concentración de CD.

Diagrama tipo B, cuando lo que se forma mayoritariamente es un complejo insoluble; pueden ser de dos tipos: B_1 , el complejo insoluble se forma inmediatamente dando lugar a una meseta, o B_2 donde la solubilidad inicialmente aumenta hasta un límite a partir del cual aparece la meseta. En ambos casos, finalmente ocurre un decrecimiento de la curva debido a que la concentración de huésped libre en disolución se transforma en un complejo insoluble con la ciclodextrina. En ocasiones, puede ocurrir la formación de una meseta en los diagramas de tipo A, pero no se produce un decrecimiento posterior.

Asimismo, se puede calcular la constante de solubilidad del complejo (K) a partir del diagrama de fase correspondiente a la formación de un complejo soluble, atribuible también a la primera parte del diagrama B_2 , según la ecuación 2.1¹⁵⁵ :

$$K = \frac{m}{(1-m)s_0} \quad \text{Ec.2.1}$$

Donde m es la pendiente de la recta que se obtiene en el diagrama por aumento de la solubilidad, siempre que ésta sea menor que la unidad¹⁵⁶ y s_0 es la solubilidad intrínseca del biocida.

El cálculo de la razón estequiométrica de los complejos de inclusión formados también se llevó a cabo siguiendo el método propuesto por Yamamoto y col.¹⁵⁷, basado en el cálculo del rendimiento de la reacción de formación de microencapsulados por inclusión, ecuación 2.2, para diferentes relaciones estequiométricas.

$$\text{Rendimiento} = \frac{[\text{biocida}]_{\text{experimental}}}{[\text{biocida}]_{\text{teórico}}} \times 100 \quad \text{Ec.2.2}$$

¹⁵⁵Casella R., Williams D.A., Jambhekar S.S. Solid-state β -cyclodextrin complexes containing indomethacin, ammonia and water. II. Solubility studies. International Journal of Pharmaceutics, 1998; 165: 15–22.

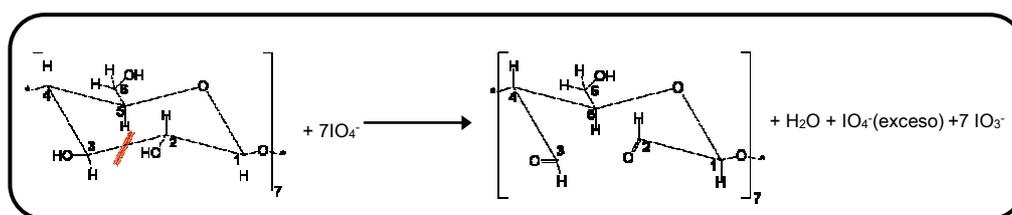
¹⁵⁶Higuchi T, Connors KA. Phase solubility techniques. Adv. Anal. Chem. Instr., 1965; 4:117-212.

¹⁵⁷Yamamoto I., Unai T., Suzuki Y., Katsuda Y. Preparation, stabilization, and insecticidal activity of cyclodextrin-inclusion compounds of pyrethroids. J. Pesticide Sci., 1976; 1: 41-48.

Por otro lado, una vez demostrado por DSC que no existe biocida libre en el complejo de inclusión y por TGA/DTA que no queda CD libre, se podrá determinar la estequiometría de la reacción de complejación haciendo uso de la **espectrofotometría uv-vis**, para la **determinación de la concentración del biocida**, y de la **electroforesis capilar de zona (ECZ)** para la **determinación de CD** a través de la llamada reacción de Malaprade.

Las ciclodextrinas, carbohidratos no reductores, no reaccionan con el reactivo de Fehling, pero pueden ser identificadas por su aducto con 9[10H]-antracena. La bibliografía recoge un método de cuantificación mediante electroforesis capilar de zona (ECZ)¹⁵⁸, aplicable al análisis de rutina, que permite determinar la cantidad de ciclodextrina que está unida al biocida en un complejo de inclusión. Este método se basa en la reacción de Malaprade, en la que la ciclodextrina es oxidada por el ión periodato, originando ión iodato que se monitoriza mediante ECZ.

La reacción de Malaprade¹⁵⁹, Esquema 2.1, consiste en la ruptura de los enlaces C-C que tienen grupos hidroxilo vecinales, mediante una oxidación con exceso de periodato, que se reduce a ión iodato.



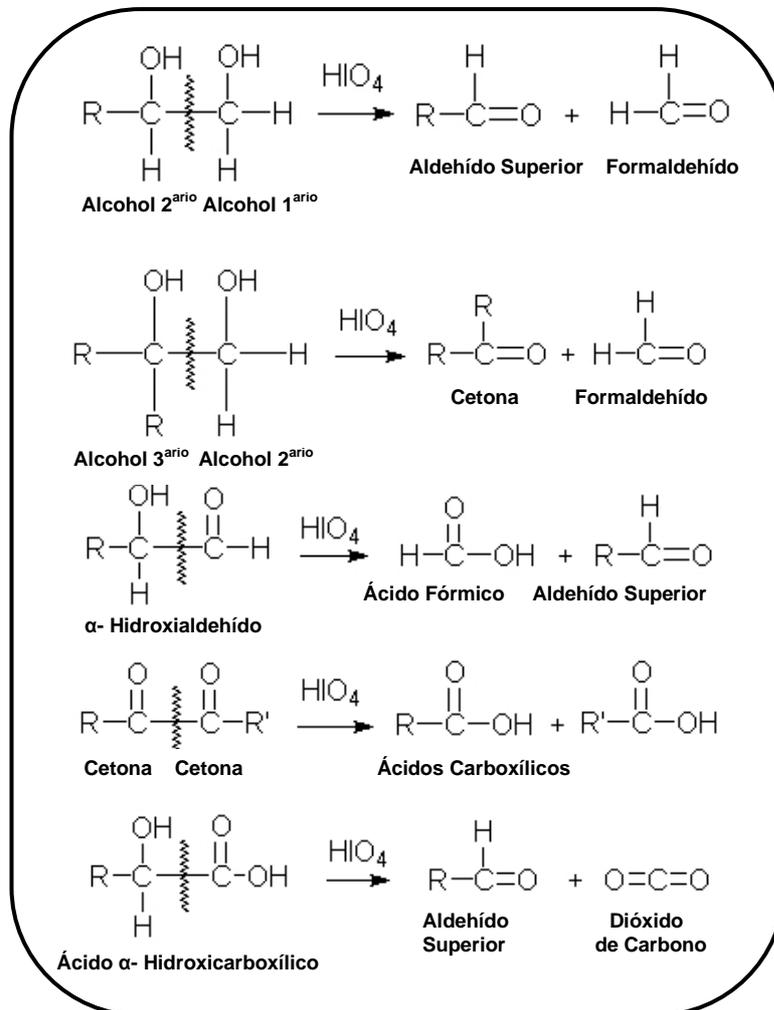
Esquema 2.1. Reacción de Malaprade.

Para llevar a cabo la cuantificación de la CD, Martin Pumera y col.¹⁵⁵ proponen el siguiente procedimiento: 200 μL de la muestra junto con 1,4 mL del doble estequiométrico de periodato (KIO_4) necesario para la oxidación, se someten a una digestión seca a 70°C durante 30 min. Este exceso estequiométrico debe ser controlado con el fin de que no se produzcan reacciones paralelas, como las que se muestran en el Esquema 2.2.

En nuestro caso, otra posible reacción que puede tener lugar, es la oxidación del biocida complejoado con la CD. Para comprobar dicha oxidación se sometió una disolución de cada biocida a las condiciones anteriormente descritas.

¹⁵⁸Pumera M., Jelínek I., Jindřich J., Coufal P., Horský J. Determination of cyclodextrin content using periodate oxidation by capillary electrophoresis. *J. Chromatography A*, 2000; 891: 201–206.

¹⁵⁹Malaprade L. Action of polyalcohols on periodic acid. Analytical application. *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 1928; 4(43): 683.



Esquema 2.2. Reacciones paralelas a la reacción de Malaprade.

2.2. OBJETIVO

Teniendo en cuenta la bibliografía recogida sobre los diferentes procedimientos de encapsulación y las diferentes técnicas analíticas, que se pueden emplear para el seguimiento del proceso y para el cálculo de la razón estequiométrica de los complejos de inclusión biocida:CD formados, el objetivo de esta parte del trabajo se ha centrado en:

“La elección del método de encapsulación CD:biocida que permita obtener la máxima eficacia a escala industrial, con el menor coste económico”

Para verificar la formación del complejo de inclusión tanto en estado sólido como en disolución, se utilizarán diferentes técnicas analíticas:

Calorimetría diferencial de barrido (DSC) para comprobar que no existe biocida libre en el complejo de inclusión.

Análisis termogravimétricos junto con un análisis térmico diferencial (TG/DTA) para monitorizar que toda la CD esté formando el microencapsulado, además de proporcionar información sobre las moléculas de agua de inclusión que han sido sustituidas por el biocida en el complejo de inclusión.

Espectrofotometría uv-vis, para la determinación de la concentración del biocida en el complejo de inclusión formado.

Electroforesis capilar de zona (ECZ) para la determinación de la concentración de la CD en el complejo de inclusión formado.

Técnica de análisis elemental para verificar la estequiometría calculada por otros métodos.

2.3. PARTE EXPERIMENTAL

Los reactivos y disoluciones empleados se recogen en el Anexo I. La instrumentación utilizada se ha recopilado en el Anexo II.

2.3.1. Procedimiento de encapsulación

Como se ha explicado anteriormente, y debido a la elección de CDs como agentes encapsulantes, se han ensayado aquellos procedimientos de formación de complejos de inclusión, que contemplan los requisitos del objetivo propuesto.

En este trabajo se han seleccionado los métodos de: **complejación en disolución, disolución con disolventes orgánicos y fusión**, debido a factores económicos, tiempo, viabilidad a gran escala y no necesitar de maquinaria especial.

El **método de complejación en disolución** y el **método de disolución con disolventes orgánicos** se aplicaron a **todos los biocidas** estudiados.

Para realizar el **método de complejación en disolución** se prepara previamente una disolución acuosa de la ciclodextrina (de 1-10 mmol) y posteriormente se añade 1 mmol de biocida, mientras se agita la disolución.

Para llevar a cabo el **método de disolución con disolventes orgánicos** la cantidad de biocida (1mmol) se añade a la disolución acuosa de ciclodextrina, se disuelve previamente en cloroformo o acetona, ya que ambos disolventes cumplen la premisa de ser menos hidrófobos que las moléculas huésped. El cloroformo, debido a sus propiedades (se evapora rápido, no es miscible con agua y se extiende de manera uniforme ocupando toda la superficie, debido a su tensión superficial) aumenta la superficie de contacto entre las moléculas, facilitando en mayor medida la entrada del biocida dentro de la CD. A pesar de ello, fue descartado por su toxicidad por lo que se eligió la acetona como disolvente. La alta solubilidad de los biocidas en acetona, junto con la total miscibilidad de la acetona en agua, favorece el contacto biocida:CD.

El **método de fusión** se aplicó solamente a la encapsulación de los piretroides **α -cipermetrina, bifentrina y tetrametrina** por poseer puntos de fusión bajos (69-80°C), Tabla 1.3. Se mezcla 1 mmol de biocida con una cantidad de ciclodextrina, que puede variar entre 1-10 mmol, en 10 mL de agua y se somete a la mezcla a una temperatura 10°C

superior a la temperatura de fusión de cada biocida, manteniendo agitación continúa durante 3 h.

Efecto del tiempo de agitación y de la temperatura sobre el procedimiento de encapsulación

Se optimizaron los parámetros, tiempo de agitación y temperatura, requeridos para la formación del complejo de inclusión con el fin de obtener un procedimiento de encapsulación general para todos los biocidas estudiados, que pueda ser utilizado a escala industrial. Para llevar a cabo esta optimización, se consideró que los tiempos de agitación fueran lo más cortos posibles, la maquinaria lo más simple y que el proceso pudiera reproducirse a gran escala con el menor coste de energía.

Este estudio de optimización se ha realizado sobre el piretroide bifentrina, teniendo en cuenta su escasa solubilidad en agua, lo que dificulta el proceso de encapsulación y mediante el método de disolución con disolventes orgánicos. Para lo cual se empleó la agitación máxima que proporcionaba el agitador, 1500 rpm. Se realizó un diseño experimental uniendo el efecto del tiempo (t) y de la temperatura (T). Para ello, se recurrió al programa Unscrambler¹⁶⁰, utilizando Diseño factorial completo, ya que son pocas las variables a optimizar, manteniendo constantes la agitación y el volumen, 50 mL (el máximo para que no haya pérdidas, ni salpicaduras, en el transcurso de los experimentos). Los experimentos se llevaron a cabo variando el tiempo de 12-72 h, y la temperatura de 20-70 °C.

Se utilizó como respuesta la desaparición del pico de fusión característico de la bifentrina, lo cual indica la completa formación del complejo de inclusión. Para ello, se monitorizó esta desaparición mediante DSC, considerando sólo ensayos positivos aquellos que proporcionen una complejación prácticamente total.

Para la realización de las medidas de calorimetría diferencial de barrido se deposita una cantidad de, aproximadamente, 5-10 mg de la muestra correspondiente, en una cápsula de aluminio de 40 µl, con un límite de presión de 0,2 MPa. Una vez introducida la cápsula en el calorímetro, se determina la cantidad de calor desprendido en la reacción llevada a cabo en modo dinámico a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min de 0 a 350 °C en atmósfera de nitrógeno (80 cm³/min).

¹⁶⁰Unscrambler 9.2. CAMO 2005, Noruega.

2.3.2. Seguimiento/Verificación de la formación del complejo de inclusión biocida:CD en estado sólido

Una vez descritos los diferentes métodos de microencapsulación ensayados, se seleccionará como más adecuado aquel que proporcione el máximo rendimiento de la reacción de formación del complejo de inclusión. Se ensayarán para cada uno de los métodos, diferentes relaciones estequiométricas desde 1:1 a 1:10. Se utilizará la técnica DSC^{161,162,163} para el seguimiento de la formación de los complejos de inclusión en estado sólido.

Esta técnica permite diferenciar las sustancias puras CD y biocida y su mezcla física, del complejo de inclusión formado. La mezcla física se obtiene como resultado de la simple homogenización de ambas sustancias en un mortero de ágata. Las disoluciones de los complejos de inclusión formados en cada método ensayado se llevaron a sequedad a vacío y el sólido se homogeneizó en un mortero de ágata.

2.3.3. Seguimiento/Verificación de la formación del complejo de inclusión biocida:CD en disolución

La verificación de la formación del complejo de inclusión en disolución y el establecimiento de su estequiometría, se ha realizado mediante 2 métodos, los denominados estudios de solubilidad de fase (PSA) para todos los biocidas estudiados y el método de Yamamoto y col¹⁶⁴ para los insecticidas piretroides y el sinergista Bp.

Estudios de solubilidad de fase (PSA)

En los estudios de solubilidad de fase, las muestras se mantuvieron bajo agitación a temperatura ambiente. El tiempo de agitación dependerá de la velocidad de formación del complejo de inclusión de cada pesticida en agua, la agitación se mantendrá hasta que el equilibrio se haya establecido. La disolución se centrifuga y el sobrenadante se filtra con filtros de nylon de 0,45 µm y el filtrado se analiza mediante espectrofotometría uv-visible.

¹⁶¹Lu J., Mirau PA., Tonelli AE. Dynamics of isolated polycaprolactone chains in their inclusion complexes with cyclodextrins. *Macromolecules*, 2001; 34: 3276.

¹⁶²Gómez MA., Rusa M., Rusa CC., Shin ID., Tonelli AE., Martínez G., Ellis G., Marco C., Macro 2004, World Polymer Congress, IUPAC, Paris 2004.

¹⁶³Pralhad T., Rajendrakumar K. Study of freeze-dried quercetin–cyclodextrin binary systems by DSC, FT-IR, X-ray diffraction and SEM analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2004; 34:333–339.

¹⁶⁴Yamamoto I., Unai T., Suzuki Y., Katsuda Y. Preparation, stabilization, and insecticidal activity of cyclodextrin-inclusion compounds of pyrethroids. *Journal of Pesticide Science*, 1976; 1: 41-48.

Se obtuvieron los diagramas de solubilidad de fase de los biocidas objeto de estudio; para ello se construyeron curvas de calibrado en disolución acuosa, en el intervalo de concentración de 1-20 mg/L para los insecticidas nicotinoides y para el carbamato bendiocarb. Para los insecticidas piretroides y el sinergista butóxido de piperonilo se prepararon diluciones hidroetanólicas (50%) de 1-15 mg/L de concentración. Posteriormente, se midió la absorbancia a la longitud de onda óptima para cada biocida. Las muestras a analizar tuvieron que diluirse para poder ser interpoladas en las correspondientes rectas de calibrado, excepto para los insecticidas piretroides y Bp.

Método de Yamamoto y col.

Se prepararon complejos de inclusión de los insecticidas piretroides y el sinergista Bp con CDs de forma que la razón molar huésped:CD variara de 0,25 a 3,0. Se toman 100 mg del producto encapsulado tras secarse a vacío, se adicionan 5 mL de H₂O, se extrae el biocida con éter dietílico, se lleva a sequedad y se reconstituye en acetonitrilo. Se construyeron curvas de calibrado de cada biocida en acetonitrilo en el intervalo de concentración de 1-5 mg/L, midiendo las absorbancias de las disoluciones a su longitud de onda máxima mediante espectrofotometría uv-vis. La concentración del biocida en el extracto se determina por interpolación en las curvas de calibrado construidas. La representación del rendimiento de la reacción frente a la relación biocida:CD proporciona la Estequiometría, a partir del punto de máximo rendimiento obtenido.

2.3.4. Verificación de la formación del complejo de inclusión biocida:CD mediante análisis termogravimétrico.

Para realizar este tipo de análisis (TGA/DTA) se toma una pequeña cantidad (aproximadamente 6mg) del complejo de inclusión en estado sólido homogenizado con un mortero y se introduce en una cápsula de alúmina abierta, de 100 µL de capacidad, que se coloca en la termobalanza junto con otra cápsula vacía que actúa de referencia. La temperatura se programa para que se calienten las dos cápsulas desde temperatura ambiente a 800°C a una velocidad de 10 °C/min. El límite de detección de la técnica TGA es de ± 1% en peso y de la técnica DTA de 1µV.

Estos ensayos permiten determinar la relación de las moléculas involucradas en el complejo de inclusión (biocida:CD:H₂O).

2.3.5. Verificación de la estequiometría de los complejos de inclusión

Electroforesis capilar de zona (ECZ)

La concentración de CD en los complejos de inclusión se determinó mediante ECZ. Una vez comprobada la reacción de Malaprade con el patrón 2,3-butanodiol y con una muestra de CD, se analizó la muestra del complejo de inclusión, resultante del método de encapsulación elegido como óptimo. Se eligieron dos biocidas que proporcionaban diferente estequiometría 1:1 para acetamiprid:CD, y 1:2 para tetrametrina:CD. La disolución obtenida se secó a vacío, se homogeneizó en un mortero y se pesó la cantidad del producto adecuado para preparar disoluciones de concentración 2mM de 2,3- butanodiol, 10 mM del biocida, 10 mM de la CD y del complejo de inclusión que contenga 10 mM de CD. 200 μ L de cada disolución se hicieron reaccionar con la cantidad de KIO_4 necesaria para llevar a cabo la reacción. Mediante ECZ se monitoriza la cantidad de IO_4^- que queda sin reaccionar o la cantidad de IO_3^- que se ha formado, mediante interpolación en las curvas de calibrado construidas para cada especie en disolución acuosa, en el intervalo de concentración de 3-20 mmol/L. La relación estequiométrica de la reacción recogida en el esquema 2.1 es de 1 mol de CD por cada 7 moles de IO_4^- o 7 moles de IO_3^- , para el caso del 2,3-butanodiol por poseer solamente un enlace susceptible a oxidación por la reacción de Malaprade, la relación estequiométrica esperada es mol a mol. Las muestras se analizaron por triplicado y de cada una de ellas se realizaron dos medidas mediante ECZ. En la Tabla 2.4, se recogen las condiciones electroforéticas utilizadas para el análisis.

Previamente se aplicó la reacción de Malaprade a la oxidación de disoluciones de cada uno de los biocidas en acetonitrilo (10 mg/L) y del propio disolvente (200 μ L) con el fin de demostrar la inexistencia de reacciones paralelas.

Tabla 2.4. Condiciones electroforéticas utilizadas para la determinación de IO_4^- y IO_3^- obtenidos de la reacción de Malaprade.

Capilar	(75 μ m I.D. x 375 μ m O.D) de sílice fundida recubiertos de poliimida
Longitud total	67,1 cm
Longitud efectiva al detector	54,5 cm
Electrolito	20 mM de tetraborato disodico con 1 mM de TTAB (Bromuro de 1-tetradeciltrimetilamonio)
$P_{inyección}$	10 mbar
$t_{inyección}$	6 s
Voltaje	-15 KV
Corriente	-39,1 μ A
T	30 \pm 5 $^{\circ}$ C
λ de detección	200 nm

Espectrofotometría ultravioleta-visible.

La determinación de la concentración de biocida presente en los complejos de inclusión acetamiprid:CD y tetrametrina:CD se realizó mediante espectrofotometría uv-vis. Para ello, se construyeron curvas de calibrado con disoluciones de los biocidas en ACN:H₂O (50:50) en el intervalo de concentración de 1-20 mg/L para acetamiprid y de 1-15 mg/L para tetrametrina y se mide la absorbancia a la longitud de onda del máximo de absorción de cada biocida.

La interpolación de la absorbancia obtenida para el complejo de inclusión disuelto en ACN:H₂O (50:50) en la curva de calibrado, permite el cálculo de la concentración de biocida presente que, junto con la concentración de CD obtenida mediante ECZ, permite calcular la relación estequiométrica de ambos complejos.

Análisis elemental

Para verificar la estequiometría de la reacción según los métodos antes descritos de PSA, Yamamoto y col. y mediante la combinación de la espectrofotometría uv-vis con ECZ, se realizan estudios de análisis elemental (AE)¹⁶⁵.

Para obtener resultados significativos, repetitivos y fiables en la determinación cuantitativa de una muestra mediante AE, los productos a analizar deben estar perfectamente secos para desechar los errores debidos a la humedad. En este caso, la CD presenta moléculas de agua de inclusión, que son muy difíciles de extraer. Por lo tanto, en estos cálculos se tendrán en cuenta los resultados proporcionados por las medidas realizadas mediante TGA. También debe considerarse como parámetro importante la utilización de muestras con un elevado grado de homogeneización y, en el caso de muestras sólidas, deben estar bien molidas o trituradas para facilitar su combustión. La cantidad mínima recomendada para cada muestra es de 0.5 mg.

Con el objeto de confirmar la presencia de los biocidas asociados a la ciclodextrina en el complejo de inclusión se realizan medidas elementales de Carbono, Hidrógeno, Nitrógeno y en algún caso Oxígeno. En la Tabla 2.5, se recogen los límites de cuantificación, detección y precisión del analizador elemental para O, C, H y N.

Tabla 2.5. Precisión, límites de cuantificación y detección del analizador elemental para O, C, H y N.

Elemento	Precisión (% RSD)	Límite de cuantificación (% en peso)	Límite de detección (% en peso)
O	2	2.6	0.8
C	1	4.2	1.3
H	2	1.2	0.3
N	2	0.9	0.3

¹⁶⁵Arbós P., Wirth M., Arango MA., Gabor F., Irache JM. Gantrez ©AN as a new polymer for the preparation ligand-nanoparticle conjugates. J. Control Release, 2002; 83: 321.

2.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.4.1. Efecto del tiempo de la agitación y de la temperatura

El diseño factorial completo para dos variables determina la matriz de experimentos (2^4), recogida en la Tabla 2.6. Ambas variables han resultado ser significativas en el proceso de encapsulación. En un único experimento (nº9) se obtuvo una desaparición total del pico de fusión del biocida, lo que indica un rendimiento óptimo del proceso. En otro caso (nº16) se obtuvo encapsulado pero con rendimiento menor y para el resto de los casos el proceso de encapsulación no puede reconocerse como óptimo. En la Figura 2.7 se muestran las curvas DSC obtenidas para los experimentos realizados a diferentes temperaturas y tiempos.

Tabla 2.6. Matriz de experimentos propuesta para 2 variables mediante diseño factorial completo.

Experimento nº	T (°C)	t(h)	Respuesta
1	70	24	-
2	38	24	-
3	38	72	-
4	50	48	-
5	25	72	-
6	25	12	-
7	70	12	-
8	25	48	-
9	70	72	++
10	25	24	-
11	50	72	-
12	50	24	-
13	38	48	-
14	50	12	-
15	38	12	-
16	70	48	+

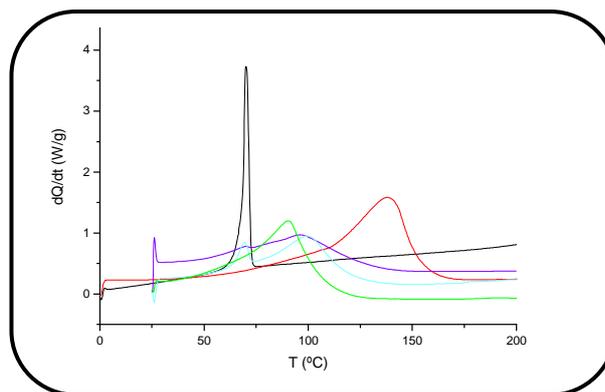


Fig.2.7. Termogramas del producto obtenido mediante el procedimiento de disolución con disolventes orgánicos a 1500rpm de bifentrina:CD a diferente tiempo de agitación y temperatura:

Bifentrina (**negro**), 50 °C - 72 h (**azul**), 70 °C -48 h (**violeta**), 70 °C - 72h (**verde**).

La encapsulación implica la desaparición del pico característico de la bifentrina, que aparece a 69 °C, como se observa en la curva calorimétrica correspondiente a 70 °C -72 h, condiciones que fueron consideradas como óptimas. Se ha superpuesto el termograma obtenido en las condiciones 70 °C - 48 h, en el cual el pico de fusión es mínimo y el correspondiente a 50 °C - 72 h, en el cual se observa que gran parte de la bifentrina se encuentra fuera de la CD, ya que aparece su pico característico de cambio de estado.

El elevado tiempo de agitación y temperatura necesarios para conseguir una eficacia adecuada del proceso de encapsulación, dificultan su implantación para una producción a escala industrial, por lo que se optó por utilizar otro sistema que proporcionara resultados óptimos y asegurara la rentabilidad industrial, mejorando más de 100 veces la rapidez de este proceso (este nuevo proceso de microencapsulación está sujeto a patente). En la Figura 2.8 se muestra, a modo de ejemplo, el termograma correspondiente al producto encapsulado acetamiprid:CD y bifentrina:CD a un tiempo de agitación de 15 min, en estas condiciones el resultado es óptimo, ya que no se observa el pico característico de la fusión del acetamiprid a 98,9°C ni de la bifentrina 69 °C.

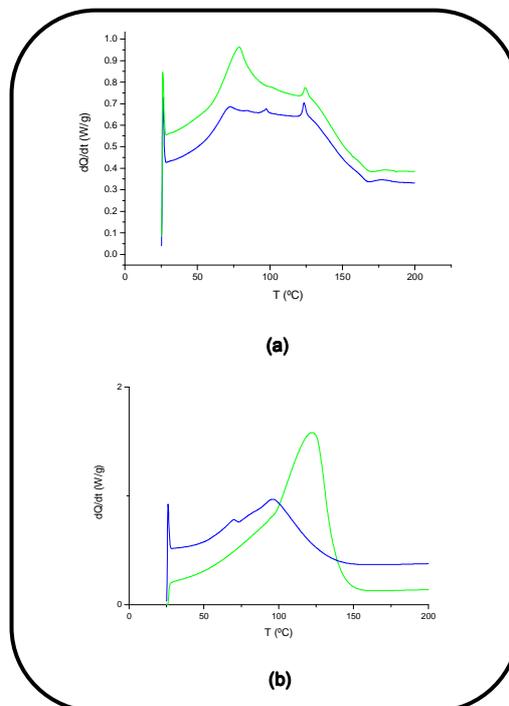


Fig. 2.8. Termogramas del producto obtenido mediante el método de disolución de disolventes orgánicos mejorado (sujeto a patente) del sistema (a) acetamiprid:CD y (b) bifentrina:CD a diferentes tiempos: 5 min (azul), 15 min (verde)

2.4.2 Seguimiento/Verificación de la formación de los complejos de inclusión en estado sólido

La selección del procedimiento de encapsulación más adecuado se realiza en base a la comparación del comportamiento termogravimétrico de los complejos de inclusión en estado sólido, de los biocidas, de la CD pura y de la mezcla física, en las mismas condiciones de tiempo y temperatura optimizados. Dicha selección se ha realizado en base al rendimiento obtenido para cada uno de los procedimientos. En la Figura 2.9 se muestran los termogramas obtenidos para los sistemas biocida:CD de acetamiprid, bifentrina, bendiocarb y Bp como representativos de las familias estudiadas.

En el caso del Bp y de los biocidas líquidos (praletrina, esbiotrina, ciflutrina y fenotrina) no se pudo preparar la mezcla física por las dificultades de obtención de una mezcla homogénea. Por otra parte, debido a que se encuentran en estado líquido a temperatura ambiente, el intervalo utilizado en DSC para estos compuestos es de -100 °C a 0 °C en lugar de 0 °C-350 °C, intervalo empleado para el resto de biocidas.

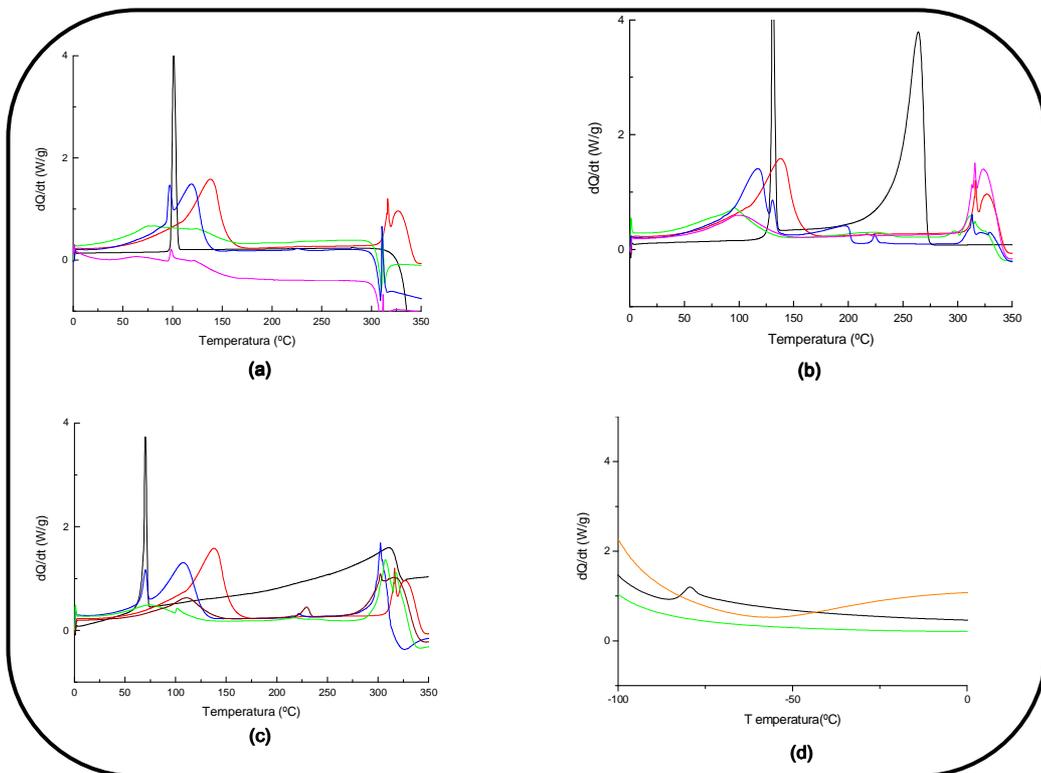


Fig. 2.9. Termogramas de (a) Acetamiprid, (b) Bendiocarb, (c) Bifentrina y (d) Butóxido de piperonilo (**negro**), CD (**rojo**), mezcla física (**azul**) y complejo de inclusión: mediante el método de disolución con disolventes orgánicos (**verde**), método de complejación en disolución (**rosa**), y método de fusión (**marrón**).

Los termogramas obtenidos para los biocidas puros proporcionan picos endotérmicos correspondientes a su fusión, y un pico sobre 165-350 °C normalmente exotérmico que corresponde a la temperatura de ebullición del biocida, a excepción de bifentrina y bendiocarb, que presentan picos endotérmicos. Estos resultados concuerdan con los recogidos en la Tabla 1.3. A temperaturas superiores a 350 °C se produce la degradación del biocida. El termograma de la CD pura presenta dos picos endotérmicos a 125 °C y 320 °C asociados a la pérdida de humedad y a la degradación, respectivamente. Los termogramas de las mezclas físicas son una combinación entre los termogramas de los biocidas puros y de la CD pura, por lo cual podemos deducir que no se ha establecido ninguna interacción entre las sustancias. Los complejos de inclusión formados por cualquiera de los procedimientos ensayados dan lugar a termogramas diferenciados de los anteriormente descritos, lo que indica la formación de un complejo de inclusión^{166,167}.

Con el objetivo de conocer el rendimiento de los procedimientos de microencapsulación, se calculó el porcentaje mínimo de biocida detectable, por medio de la técnica DSC. Para ello, a un complejo de inclusión, cuyo termograma no muestre el pico característico del biocida libre, se le adicionaron diferentes cantidades de biocida y se realizó el análisis de la mezcla mediante esta técnica. A modo de ejemplo, en la Figura 2.10 se muestran los termogramas de los complejos de inclusión de acetamiprid:CD y bendiocarb:CD con los correspondientes a los complejos dopados con 1% y 2% de cada biocida (respecto a la cantidad de biocida en el complejo). Por lo que se puede deducir que el rendimiento del procedimiento de encapsulación es de al menos un 99% para aquellos casos en los que el termograma no muestra el pico de fusión característico del biocida.

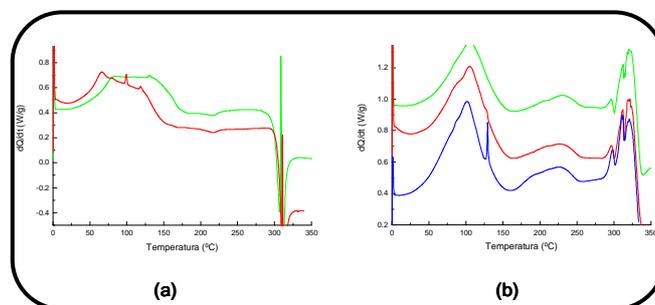


Fig. 2.10. Termogramas del complejo de inclusión de: (a) Acetamiprid:CD (b) Bendiocarb:CD (verde), dopado con un 1% (rojo), dopado con un 2% (azul)

¹⁶⁶Cerchiara T., Luppi B., Bigucci F., Zecchi V. Effect of chitosan on progesterone release from hydroxypropyl-cyclodextrin complexes. *International Journal of Pharmaceutics*, 2003; 258: 209-215.

¹⁶⁷Lezcano M. Novo M. Al.Soufi W., Rodriguez-Nuñez E., Vázquez J. Complexation of several fungicides with cyclodextrin:determination of the association constants and isolation of the solid complexes. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 2003; 51: 5036-5040.

A la vista de los resultados que proporciona el DSC para la encapsulación, utilizando el método de complejación en disolución, Figura 2.9, se puede descartar este método, ya que el rendimiento obtenido es inferior al 99%.

La selección entre el método de disolución con disolventes orgánicos y el método de fusión se debe realizar en base a otros criterios. El método de fusión, aunque efectivo para elaborar el producto final a gran escala, según recogen los estudios realizados por Orgoványi y col.¹⁶⁸ para el caso de α -cipermetrina, supondría un gasto adicional de energía y tiempo. Por lo tanto, se decide que el método de microencapsulación que reúne las características de mínimo tiempo y energía y máximo rendimiento es:

el método de disolución con disolventes orgánicos, utilizando las condiciones de temperatura y tiempo de agitación optimizadas.

¹⁶⁸Orgoványi J., H.-Ottaa K, Pfppla L, Fenyvesib E., Za'raya G. Spectrophotometric and thermoanalytical study of cypermethrin/cyclodextrin complexes. Microchemical Journal, 2005; 79: 77-82.

2.4.3. Seguimiento/Verificación de la formación de los complejos de inclusión en disolución

La utilización de la espectrofotometría uv-vis como técnica analítica para llevar a cabo el estudio de los complejos de inclusión en disolución, hizo necesario la obtención de los espectros de absorción uv-vis de los biocidas en distintos disolventes.

Espectros de absorción y rectas de calibrado de los biocidas en los complejos de inclusión formados.

Las CDs no presentan absorción en la región uv-vis del espectro electromagnético. No se observan diferencias entre los espectros de absorción de los biocidas libres y los complejos de inclusión biocida:CD en las mismas condiciones experimentales. A modo de ejemplo, en la Figura 2.11 se muestran los espectros de absorción de disoluciones acuosas de acetamiprid puro y encapsulado.

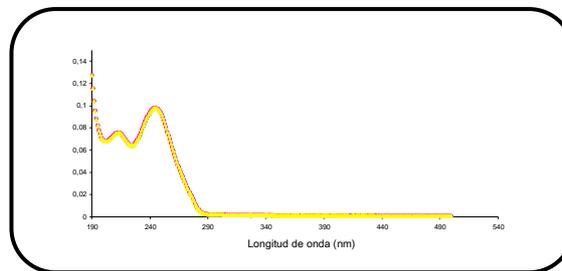


Fig. 2.11. Superposición de los espectros de absorción de acetamiprid, puro, encapsulado parcialmente y encapsulado total en disolución acuosa.

En la Figura 2.12 se muestran los espectros de absorción uv-vis de disoluciones de los biocidas estudiados en ACN y en la Tabla 2.7, se recogen las longitudes de onda de trabajo correspondientes a los máximos de absorción para cada biocida. Se ha comprobado que no existen diferencias significativas en los máximos de absorción obtenidos para disoluciones de estos biocidas en agua, ACN y ACN:H₂O (50%).

Tabla 2.7. Longitudes de onda máxima de absorción, λ (nm).

Biocida	λ (nm)
Acetamiprid y Tiacloprid	245
Imidacloprid	270
Piretroides excepto Bifentrina	220
Bifentrina, Bendiocarb y Bp	205

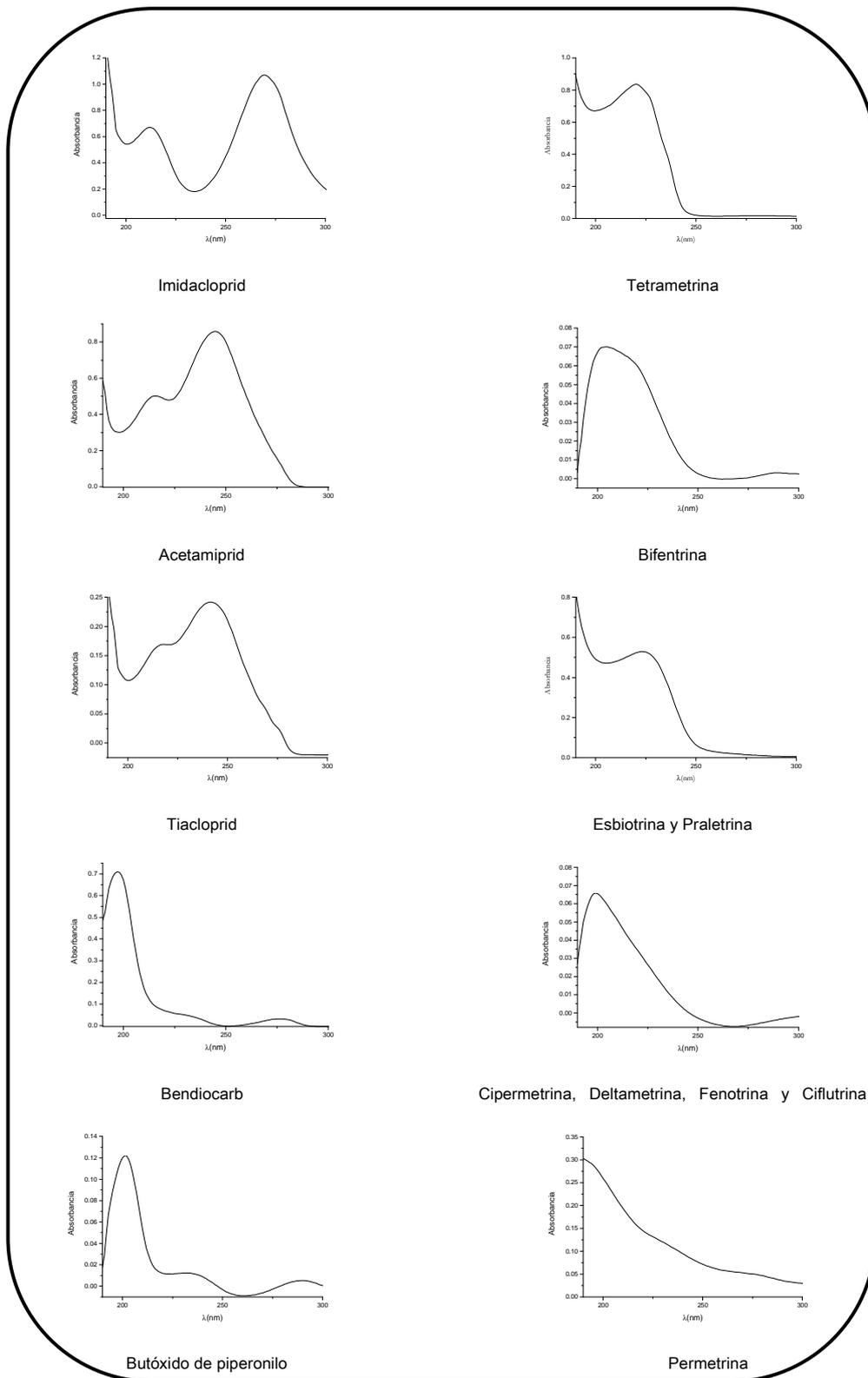


Fig. 2.12 Espectros de absorción UV-Vis de disoluciones en ACN (10 mg/L) de los biocidas estudiados.

La aplicación del método de solubilidad de fases a los insecticidas piretroides y al sinergista Bp, requiere la utilización de disoluciones hidroetanólicas al 50%, como se ha indicado en la parte experimental. Conocida la absorción del etanol a longitudes de onda inferiores a 250nm, se eligió como longitud de onda de trabajo 280 nm.

En la Tabla 2.8 se recogen las ecuaciones de regresión lineal obtenidas para las diferentes curvas de calibrado construidas en diferentes medios H₂O, EtOH:H₂O (50%) y ACN, de los biocidas objeto de estudio.

Tabla 2.8. Ecuaciones de regresión de los distintos biocidas estudiados en los distintos medios (N= 6).

Biocida	Medio	Ecuación	Intervalo de concentración lineal (mg/L)	r ²
Acetamiprid	H ₂ O	0,09x+0,01	1-20	0,9999
Tiacloprid	H ₂ O	0,08x-0,08	1-20	0,9987
Imidacloprid	H ₂ O	0,025x+0,001	1-20	0,9999
Bendiocarb	H ₂ O	0,030x-0,004	1-20	0,9999
Bp	EtOH:H ₂ O (50%)	0,1x+0,2	1-15	0,9999
	ACN	0,10x+0,04		0,9995
Bifentrina	EtOH:H ₂ O (50%)	0,002x+0,004	1-15	0,9998
	ACN	0,050x+0,002		0,9999
Praletrina	EtOH:H ₂ O (50%)	0,0059x	1-15	0,9999
	ACN	0,060x+0,001		1,0000
Ciflutrina	EtOH:H ₂ O (50%)	0,01x-0,06	1-15	0,9998
	ACN	0,54x-0,02		0,9989
Esbiotrina	EtOH:H ₂ O (50%)	0,005x-0,017	1-15	0,9998
	ACN	0,09x-0,01		0,9994
Tetramerina	EtOH:H ₂ O (50%)	0,0029x-0,0007	1-15	0,9999
	ACN	0,05x-0,01	15-25	0,9982
Deltametrina	EtOH:H ₂ O (50%)	0,004x+0,013	1-15	0,9991
	ACN	0,05x+0,01		0,9987
α-Cipermetrina	EtOH:H ₂ O (50%)	0,008x-0,004	1-15	0,9987
	ACN	0,04x-0,01		0,9997
Permetrina	EtOH:H ₂ O (50%)	0,005x+0,028	1-15	0,9997
	ACN	0,05+0,01		0,9993
Fenotrina	EtOH:H ₂ O (50%)	0,007x-0,019	1-15	0,9999
	ACN	0,06x-0,01		0,9947

Estudios de solubilidad de fase (PSA)

Insecticidas nicotinoides y el carbamato bendiocarb

En la Figura 2.14 se representa la solubilidad intrínseca de cada uno de los compuestos respecto a la concentración de CD adicionada. Como se puede observar la solubilidad aumenta para los diferentes sistemas estudiados. En el caso de acetamiprid y bendiocarb se obtiene una meseta a partir de una determinada concentración de CD. La meseta se puede alcanzar por dos razones:

- 1.- Todo el biocida está solubilizado.
- 2.- Se alcanza la saturación de la disolución de CD en agua.

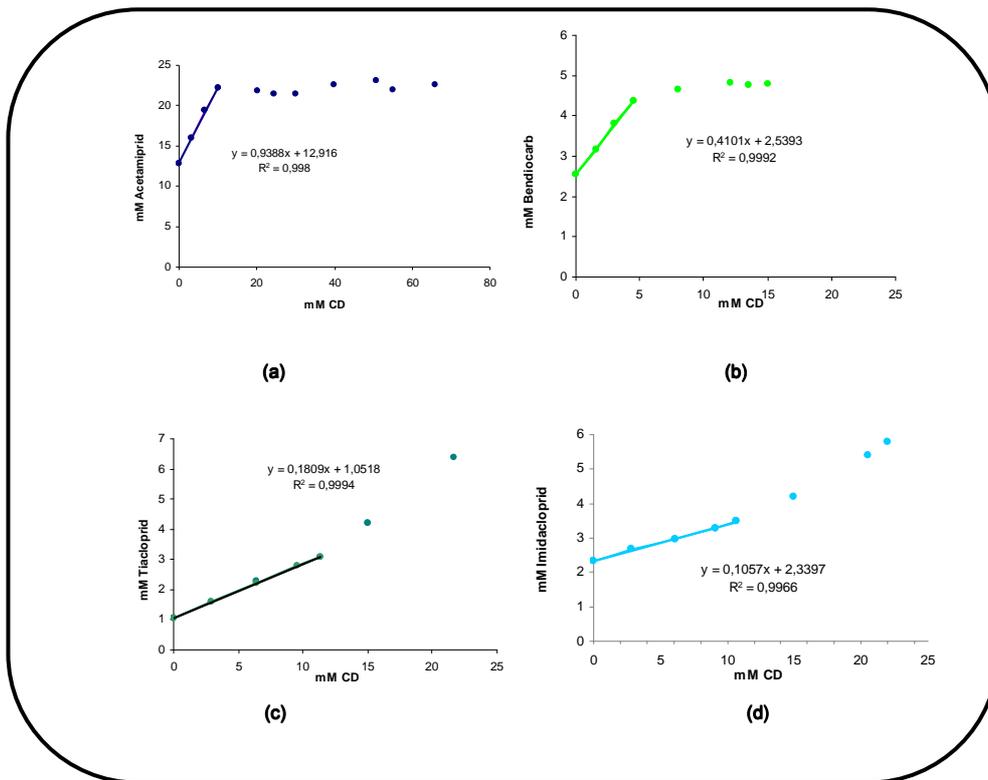


Fig. 2.14. Diagramas de solubilidad de fase (PSA) de acetamiprid (a), bendiocarb (b), tiacloprid (c) e imidacloprid (d).

La recta inicial obtenida en todos los casos se ajusta, según Higuchi y Connors a un diagrama de tipo A (Figura 2.4).

Para el caso del complejo acetamiprid:CD y bendiocarb:CD los diagramas de solubilidad de fase se ajustan concretamente a tipo A_L, por lo tanto la estequiometría de los complejo de inclusión que se forma es del tipo 1:1. Según la ecuación 2.1 se obtiene que K_{1:1} para

acetamiprid es $4112,53 \text{ M}^{-1}$, lo que indica una fuerte interacción componente activo-CD¹⁶⁹ y para bendioacrb:CD el valor de $K_{1:1}$ es $265,99 \text{ M}^{-1}$.

Las curvas de PSA tipo A_P obtenidas para el caso del imidacloprid y tiacloprid indican que la estequiometría de estos complejos es 1:2 (biocida:CD). El cálculo de las constantes se realiza también sobre la ecuación 2.1, a diferencia de que la pendiente de la recta se calcula de la línea tangente a la curva en $[\text{CD}]=0$, de esta forma las constantes de estabilidad para el complejo de inclusión imidacloprid:CD $K_{1:2}$ es $50,72 \text{ M}^{-1}$ y para el caso del complejo tiacloprid:CD $K_{1:2}$ es $142,60 \text{ M}^{-1}$.

Insecticidas piretroides y sinergista Bp

Los diagramas PSA obtenidos para estos compuestos se ajustan a un sistema de tipo B_s. Para estos biocidas se forman precipitados a partir de una concentración determinada de CD. A modo de ejemplo, en la Figura 2.15, se muestran los diagramas PSA para Bp:CD y permetrina:CD.

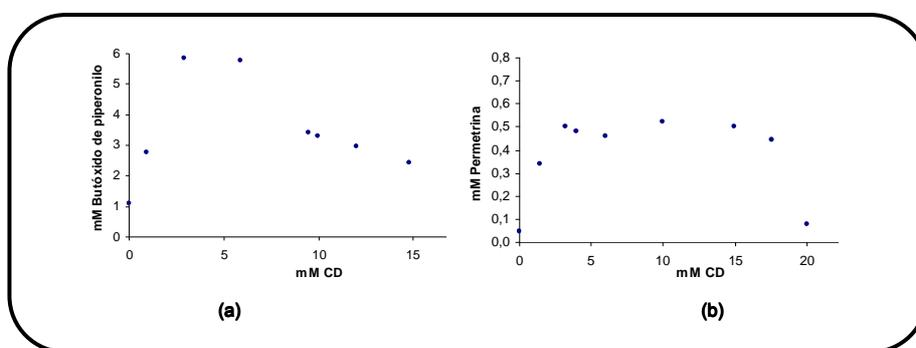


Fig.2.15. Diagramas de solubilidad de fase (PSA) de Bp (a) y permetrina (b) en función de la adicción de CD. (biocida:CD, mM).

Para el cálculo de la estequiometría de los complejos formados se opta por aplicar el método de Yamamoto y col.

Método de Yamamoto y col.

Se aplicó el método descrito por Yamamoto y col. para la determinación de la estequiometría de los complejos de inclusión, formados por los insecticidas piretroides y el butóxido de piperonilo.

¹⁶⁹Szetli J. Molecular entrapment and release properties of drugs by cyclodextrins. In: Smollen VF, Ball L, eds. Controlled drug bioavailability: bioavailability control by drug delivery system design. Vol 3. Wiley Interscience Publication, 1985, New York, pp. 365-420.

A modo de ejemplo, se muestra en la Figura 2.16 la variación del rendimiento de la reacción de formación del complejo tetrametrina:CD y del Bp:CD, con diferentes relaciones estequiométricas de biocida:CD.

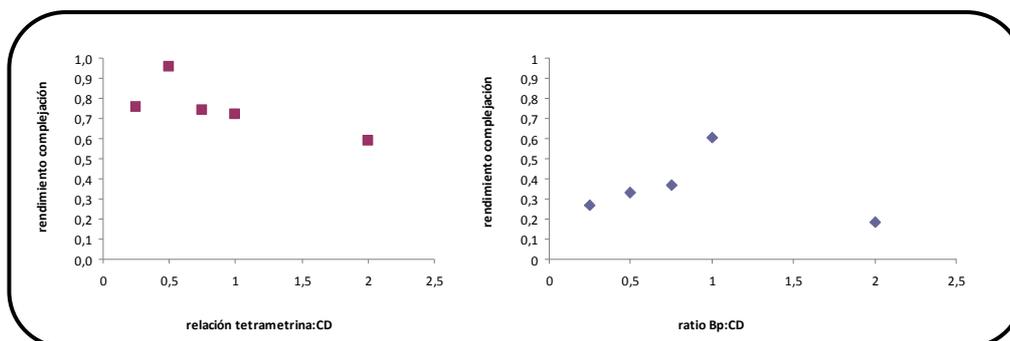


Fig.2.16. Variación del rendimiento de la reacción de encapsulación tetrametrina:CD y Bp:CD con la relación estequiométrica molar.

En la Tabla 2.9 se recoge la estequiometría obtenida para los diferentes sistemas biocida:CD estudiados, que concuerdan con los datos bibliográficos para los insecticidas piretroides (tetrametrina¹⁷⁰, permetrina^{171,172} y α -cipermetrina^{173,174}) y Bp¹⁷⁵.

Tabla. 2.9. Estequiometría de la reacción de formación de los complejos de inclusión biocida:CD.

Estequiometría de los complejos de inclusión biocida:CD	
Bp	1:1
Deltametrina, tetrametrina, bifentrina, fenotrina, permetrina, ciflutrina, α-cipermetrina, esbiotrina y praletrina.	1:2

¹⁷⁰Yamamoto I., Unai T., Suzuki Y., Katsuda Y. Preparation, stabilization, and insecticidal activity of cyclodextrin-inclusion compounds of pyrethroids. *Journal of Pesticide Science*, 1976; 1: 41-48.

¹⁷¹Yamamoto I., Ohsawa K., Plapp F. Effects of the inclusion compounds of pyrethroids and methyl parathion on certain cotton insects. *Journal of Pesticide Science*, 1977; 2: 41-49.

¹⁷²Yamamoto I., Katsuda Y. Cyclodextrin inclusion complexes of pyrethroids. *Pesticide Science*, 1978; 11 (2): 134-140.

¹⁷³Orgoványi J., H.-Ottaa K., Pfppla L., Fenyvesib E., Za'raya G. Spectrophotometric and thermoanalytical study of cypermethrin/cyclodextrin complexes. *Microchemical Journal*, 2005; 79: 77-82.

¹⁷⁴Katsuda Y., Shinzo Y. Stabilization of pyrethroids by β -CD. 57061261. Japanese Patent, 1982.

¹⁷⁵Szejtli J., Budai S., Radvany H.E., Papp L., Koermoeoczy G., Pap IG. Piperonyl butoxide-cyclodextrin inclusion complexes. 4524068. USA Patent, 1985.

2.4.4. Verificación de la formación del complejo de inclusión biocida:CD mediante análisis termogravimétrico.

Se obtuvieron los termogramas TGA/DTA de los principios activos, CD y producto encapsulado y se compararon con los obtenidos para la mezcla física. Para el sinergista Bp y los insecticidas líquidos, no se pudo realizar dicha comparación por las dificultades de obtención de una mezcla física homogénea. En la Figura 2.17 se muestran los termogramas de los sistemas acetamiprid:CD, bifentrina:CD, Bp:CD y bendiocarb:CD.

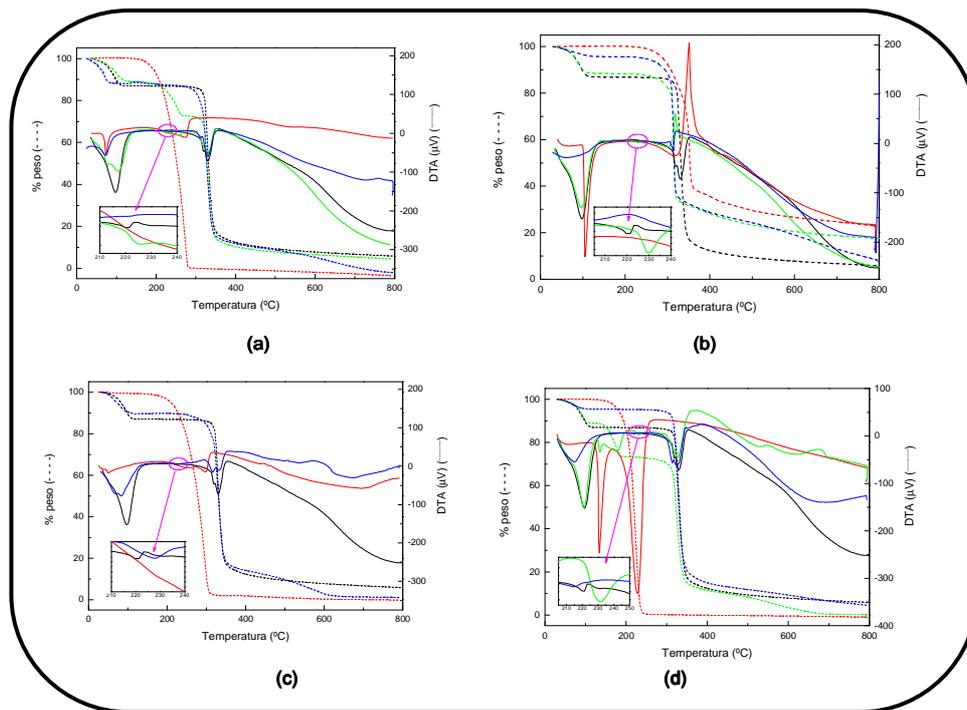


Fig. 2.17. Termogramas TGA (- - -) y curvas DTA(-) de acetamiprid (a), bifentrina (b), Bp (c) y Bendiocarb (d) puro (rojo), Ciclodextrina pura (negro), mezcla física (verde) y encapsulado (azul).

La CD utilizada para los experimentos fue secada previamente. Las pérdidas de masa reflejadas en la curva de TGA corresponden: la primera, a la pérdida de agua y la siguiente a la degradación del biocida, de la ciclodextrina o del complejo de inclusión. Por lo tanto, realizando los cálculos correspondientes a la pérdida de agua que todavía está enlazada en la CD y que corresponde al agua de inclusión, y conociendo la estequiometría del complejo, se recogen en la Tabla 2.10 los moles de H₂O/mol biocida/mol de CD que presentan, tanto

las mezclas físicas, como los complejos de inclusión para cada biocida estudiado^{176,177}. Previo a este estudio se calculó que la relación de moléculas CD/H₂O era de 1/9.

Tabla. 2.10. Moléculas CD/biocida/H₂O para los complejos de inclusión estudiados, obtenidas mediante TGA/DTA.

	Mezclas físicas	Complejos de inclusión
Acetamiprid	1/1/9	1/1/3
Imidacloprid	2/1/19	2/1/14
Tiacloprid	2/1/19	2/1/7
Deltametrina	2/1/19	2/1/6
Tetrametrina	2/1/19	2/1/10
Bifentrina	2/1/18	2/1/10
Cipermetrina	2/1/ 20	2/1/13
Bendiocarb	1/1/9	1/1/4

A la vista de estos resultados, se puede concluir que, en el complejo de inclusión existen menos moléculas de agua que en la mezcla física, lo que se puede atribuir a la inclusión del biocida en la ciclodextrina.

En los termogramas de DTA se observan tres picos endotérmicos para la descomposición de la CD. El primer pico entre 50 y 120 °C corresponde a su deshidratación¹⁷⁸. El segundo pico a 223 °C es un pico característico de la CD, no corresponde con una pérdida de peso en el TGA, pero no se sabe realmente a que es debido, puede ser asociado a una transformación molecular de naturaleza desconocida, según Bergamasco y col.¹⁷⁹. Aparece tanto en las curvas de CD pura como en la mezcla física pero no en el encapsulado, por lo que se puede deducir que **no existe CD libre en el complejo**. Excepto para el caso del complejo de inclusión Bp:CD que sí presenta ese pico, lo que indica que sí existe CD libre en el complejo. Finalmente, el último pico se relaciona con la degradación de la CD a aproximadamente 350 °C. En cuanto a los biocidas, los resultados de DTA muestran picos endotérmicos o exotérmicos, dependiendo del biocida a 100-200 °C debidos a la fusión y entre 240-400 °C, correspondientes al proceso de degradación.

¹⁷⁶Yilmaz V.T., Karada A., Jgbudak H. Thermal decomposition of cyclodextrin inclusion complexes of ferrocene and their derivatives. *Thermochimica Acta*, 1995; 261:107-118.

¹⁷⁷Kohata S., Jyodoi K., Ohyoshi A. Thermal decomposition of cyclodextrins (α -, β -, γ -, and modified β -CD) and of metal-(β -CyD) complexes in the solid phase. *Thermochim. Acta*, 1993; 217: 187-198.

¹⁷⁸Szafranek A., Szafranek J. Kinetic parameters of thermal decomposition of complex of β -cyclodextrin with water. *Journal of Thermal and Analysis Calorimetry*, 1988, 34, 917-926.

¹⁷⁹Bergamasco R., Zanin GM., Moraes F. Sulfuramid Volatility Reduction by α -Cyclodextrin. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 2005; 53: 1139-1143.

2.4.5. Verificación de la estequiometría de los complejos de inclusión

Electroforesis capilar de zona (ECZ) y Espectrofotometría uv-vis

Se ha comprobado la estequiometría de los complejos de inclusión acetamiprid:CD y tetrametrina:CD como ejemplos representativos de complejos de estequiometría 1:1 y 1:2, respectivamente, en base a la determinación, en los complejos de inclusión formados, de la concentración de CD mediante ECZ y del biocida por espectroscopía uv-vis.

En la Figura 2.18 se muestra, a modo de ejemplo, la comparación entre los electroferogramas obtenidos para una muestra patrón $\text{KIO}_4/\text{KIO}_3$ (10mM), una de 2-butanodiol (2 mM) y una de CD (10mM) tras su reacción con IO_4^- , para comprobar la estequiometría de la reacción de Malaprade.

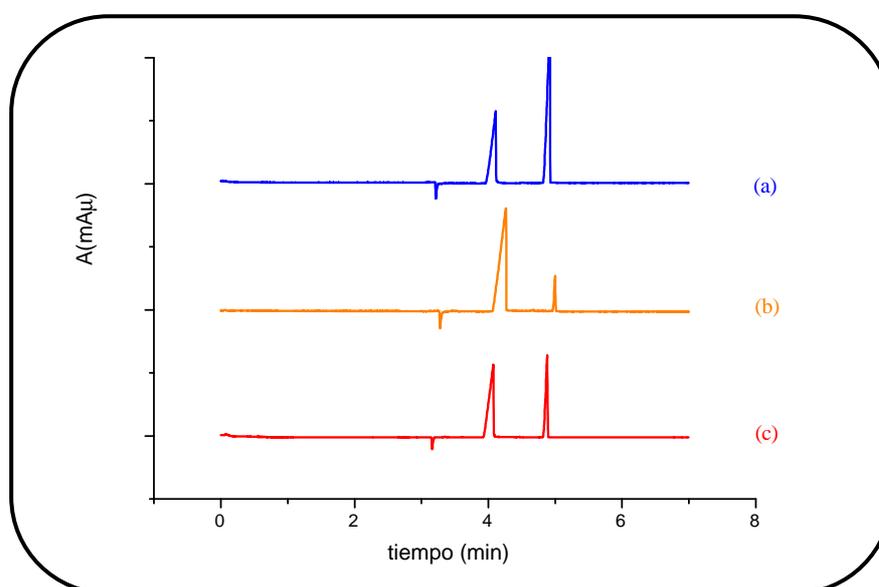


Figura 2.18. Electroferogramas obtenidos de disoluciones acuosas de concentración 10 mM sometidas a la reacción de Malaprade de (a) IO_4^- (4 min) y IO_3^- (5 min), (b) 2-butanodiol y (c) CD.

Como se puede observar, el pico correspondiente al ión IO_3^- (5 min) obtenido de la oxidación de la CD, difiere del de 2-butanodiol en área de pico, debido a la estequiometría de la reacción de Malaprade. Tras determinar la concentración de los iones formados, a partir de las curvas de calibrado se verifica que la estequiometría de la reacción de Malaprade para el 2-butanodiol resulta ser 1:1, mientras que la de CD 1:7, la cual depende, como se ha explicado anteriormente, del número de enlaces C-C con grupos hidroxilo vecinales.

En la Figura 2.19, se muestra la comparación de los electroferogramas resultantes de someter a la reacción de Malaprade al complejo de inclusión acetamiprid:CD, así como al biocida libre acetamiprid en concentración 10 mM en ACN y a la disolución blanco de ACN.

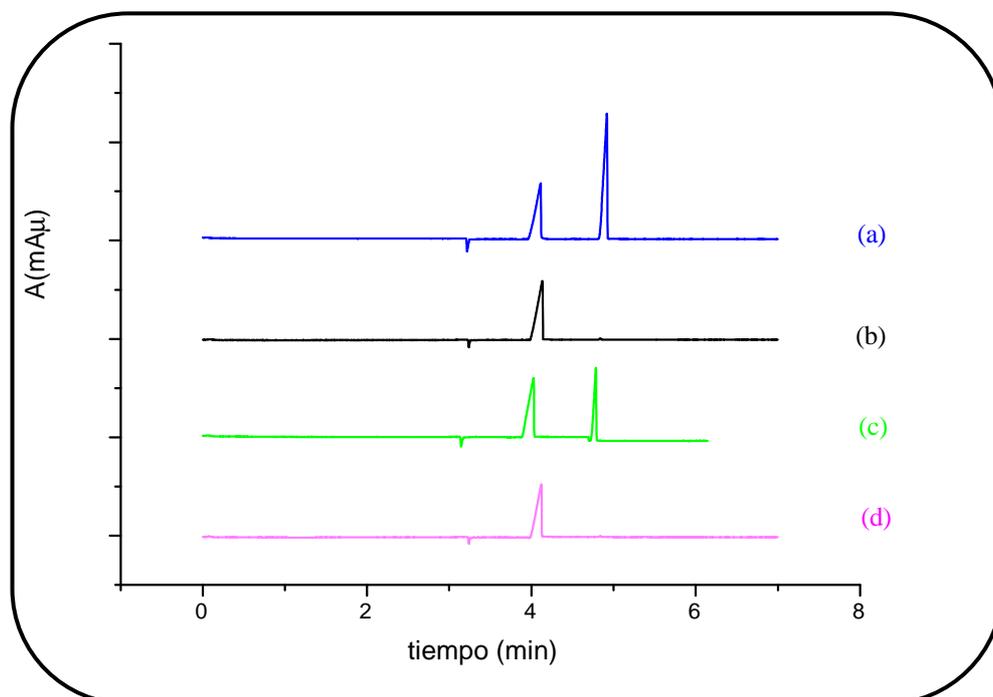


Figura 2.19. Electroferogramas obtenidos de disoluciones acuosas de concentración 10 mM sometidas a la reacción de Malaprade de (a) IO_4^- (4 min) y IO_3^- (5 min): (b) biocida acetamiprid (ACN), (c) complejo de inclusión acetamiprid:CD (ACN/ H_2O) y (d) blanco de ACN.

Como se puede observar, en el electroferograma correspondiente a la muestra de acetamiprid y a la disolución blanco, no aparece el pico característico de IO_3^- , lo que indica que no se ha producido la reducción de IO_4^- . Este hecho demuestra la inexistencia de reacciones paralelas debidas a la oxidación del biocida.

Se determinó la concentración del producto formado, IO_3^- y del IO_4^- en exceso, a partir de las curvas de calibrado realizadas para ambos aniones. Teniendo en cuenta la estequiometría de la reacción de Malaprade, esquema 2.1, y las concentraciones obtenidas, se calculó la concentración de CD en los encapsulados, Tabla 2.11, que junto con la concentración de biocida en los encapsulados, determinada mediante espectrofotometría uv-vis, permitió determinar la estequiometría de los complejos de inclusión, recogida en la Tabla 2.11.

Tabla 2.11. Número de moles de biocida y CD en un complejo de inclusión biocida:CD. Cálculo de la estequiometría del microencapsulado.

	Acetamiprid:CD	Tetrametrina:CD
Ecuación de regresión de KIO₄ para la determinación de CD	y=41,5x-24,5 r ² =0,9997	
mol CD	(5,7±0,5)*10 ⁻⁵	(4,6±0,7)*10 ⁻⁵
Ecuación de regresión del biocida en ACN:H₂O (50%)	y=0,08x-0,01 r ² =0,9999	y=0,04x-0,02 r ² =0,9998
mol Biocida	(5,70±0,01)*10 ⁻⁵	(2,02±0,01)*10 ⁻⁵
Estequiometría de la reacción	1:1	1:2

Análisis elemental

El análisis elemental es otra técnica que puede ser aplicada al cálculo de la relación biocida:CD en los complejos de inclusión, a partir de los porcentajes de C, H, O y N obtenidos.

En las Tablas 2.12-2.15 se recogen los porcentajes de C, H, O y N teóricos y los obtenidos para un complejo de inclusión representativo de cada una de las familias de biocidas estudiadas: nicotinoideas (acetamiprid), carbamato (bendiocarb), piretroides (bifentrina) y el sinergista (Bp). Se recopilan asimismo, los porcentajes correspondientes a los biocidas y al agente encapsulante. Los datos teóricos han sido calculados teniendo en cuenta las estructuras, el peso molecular de cada compuesto y las moléculas de agua de inclusión determinadas mediante TGA/DTA (Tabla 2.10).

Tabla 2.12. Porcentajes de C, H, O y N teóricos y los obtenidos por análisis elemental para el complejo de inclusión acetamiprid:CD.

Compound	%C	%H	%N	%O
Datos teóricos Acetamiprid				
C ₁₀ H ₁₁ N ₄ Cl (222,7g/mol)	53,9	5,00	25,1	-
Datos experimentales acetamiprid	53,7±0,4	5,10±0,1	25,0±0,1	-
Datos teóricos β-Ciclodextrina				
C ₄₂ H ₇₀ O ₃₅ (1135g/mol) *9H ₂ O	38,9	6,8	/	54,3
Datos experimentales β-Ciclodextrina	38,6±0,1	7,0±0,3	/	54,4±0,1
Datos teóricos acetamiprid:CD (1:1)*3H₂O				
C ₅₂ H ₈₁ O ₃₈ N ₄ Cl(1410/mol)	44,3	6,2	4,0	43,1
Datos experimentales acetamiprid:CD	45,2±0,2	6,3±0,1	4,1±0,1	43,1±0,1

Tabla 2.13. Porcentajes de C, H, O y N teóricos y los obtenidos por análisis elemental para el complejo de inclusión bendiocarb:CD.

Compound	%C	%H	%N	%O
Datos teóricos Bendiocarb				
C ₁₁ H ₁₃ NO ₄ (223,2 g/mol)	59,1	5,9	6,3	28,7
Datos experimentales Bendiocarb	59,6±0,3	6,0±0,1	6,4±0,1	28,6±0,3
Datos teóricos β-Ciclodextrina				
C ₄₂ H ₇₀ O ₃₅ (1135g/mol)*9H ₂ O	38,9	6,8	/	54,3
Datos experimentales β-Ciclodextrina	38,6±0,1	7,0±0,3	/	54,4±0,1
Datos teóricos Bendiocarb:CD (1:1)				
C ₅₃ H ₈₃ O ₃₉ N (1358,2 g/mol)*9H ₂ O	44,5	6,40	0,98	48,1
Datos experimentales Bendiocarb:CD	44,5±0,3	6,42±0,03	<L.D	48,1±0,1

Tabla 2.14. Porcentajes de C, H y O teóricos y los obtenidos por análisis elemental para el complejo de inclusión bifentrina:CD.

Compound	%C	%H	%O
Datos teóricos Bifentrina			
C ₂₃ H ₂₃ O ₂ F ₃ Cl (422,9 g/mol)	65,26	5,4	65,26
Datos experimentales Bifentrina	65,05±0,2	5,09±0,1	65,26±0,03
Datos teóricos β-Ciclodextrina			
C ₄₂ H ₇₀ O ₃₅ (1135g/mol) *9H ₂ O	38,9	6,8	54,3
Datos experimentales β-Ciclodextrina	38,6±0,1	7,0±0,3	54,4±0,1
Datos teóricos Bifentrina:CD (1:2)			
C ₁₉₇ H ₁₇₃ O ₈₂ F ₃ Cl (2692,9 g/mol) *10H ₂ O	44,7	6,02	45,16
Datos experimentales Bifentrina:CD	44,3±0,3	6,05±0,03	45,15±0,03

Tabla 2.15. Porcentajes de C, H y O teóricos y los obtenidos por análisis elemental para el complejo de inclusión Bp:CD.

Compound	%C	%H	%O
Datos teóricos Bp			
C ₂₁ H ₃₀ O ₅ (338 g/mol)	67,4	8,9	23,7
Datos experimentales Bp	67,1±0,3	9,1±0,1	23,85±0,1
Datos teóricos β-Ciclodextrina			
C ₄₂ H ₇₀ O ₃₅ (1135g/mol) *9H ₂ O	38,9	6,8	54,3
Datos experimentales β-Ciclodextrina	38,6±0,1	7,0±0,3	54,4±0,1
Datos teóricos Bp:CD (1:1)			
C ₆₃ H ₁₀₀ O ₄₀ (1473 g/mol)*9H ₂ O	44,8	7,2	47,0
Datos experimentales Bp:CD	44,3±0,5	6,9±0,5	47,2±0,5

CONCLUSIONES

- ❖ El método de disolución con disolventes orgánicos ha resultado ser el más adecuado para la formación de los complejos de inclusión biocida:CD con fines industriales, con un rendimiento del proceso de encapsulación superior al 99%.
- ❖ La técnica DSC es rápida y eficaz como técnica de rutina para monitorizar la formación de los complejos de inclusión biocida:CD y para demostrar cuantitativamente el rendimiento de la reacción de complejación.
- ❖ Los resultados proporcionados por TGA/DTA permiten comprobar la existencia de CD libre en el microencapsulado.
- ❖ La estequiometría de los complejos de inclusión formados recogidos en la Tabla 2.16, ha sido determinada por diferentes métodos analíticos.

Tabla. 2.16. Estequiometría de la reacción de formación de los complejos de inclusión biocida:CD.

Estequiometría de los Complejos de inclusión Biocida:CD	
Acetamiprid	1:1
Imidacloprid	1:2
Tiacloprid	1:2
Insecticidas piretroides	1:2
Bp	1:1
Bendiocarb	1:1