



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 III:

INFORMACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS
COMPLEJOS DE INCLUSIÓN BIOCIDA: CD



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

Información estructural de los complejos de inclusión

3.1. Introducción.....	83
SEM.....	85
Distribución del tamaño de partícula mediante dispersión láser.....	87
Difracción Rayos X en polvo.....	88
Difracción de Rayos X en monocristal.....	90
FT-IR.....	91
RMN.....	91
3.2. Objetivo.....	95
3.3. Procedimiento experimental.....	96
3.4. Resultados y Discusión.....	99
3.4.1. Caracterización de los complejos de inclusión Biocida-CD en estado sólido	
SEM.....	99
Distribución del tamaño de partícula mediante dispersión láser.....	101
Difracción Rayos X en polvo.....	103
Difracción de Rayos X en monocristal.....	105
FT-IR.....	110
RMN-C ¹³	116
3.4.2. Caracterización de los complejos de inclusión Biocida-CD en disolución	
RMN-H ¹	118
CONCLUSIONES.....	126

3. INFORMACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS COMPLEJOS DE INCLUSIÓN BIOCIDA:CD

3.1. INTRODUCCIÓN

Una vez elegido como método de formación de complejos de inclusión el de disolución con disolventes orgánicos y calculada la estequiometría de los productos formados, se pretende caracterizar los complejos de inclusión biocida:CD mediante diferentes técnicas, tanto en estado sólido como en disolución.

En estado sólido se emplearán: técnicas de microscopía electrónica de barrido (Scanning Electron Microscopy, SEM), dispersión por láser, difracción de Rayos X en polvo y monocristal, espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) y resonancia magnética nuclear de carbono (RMN-¹³C). Los estudios de caracterización en disolución se han realizado mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protón (RMN-¹H).

Estas técnicas se han seleccionado en base a la bibliografía consultada sobre caracterización de productos encapsulados con aplicación al campo farmacéutico^{181,182,183,184,185,186}, alimentario^{187,188,189} y a la microencapsulación de

¹⁸¹Masson M., Loftsson T. Cyclodextrins in topical drug formulations: theory and practice. *International Journal of Pharmaceutics*, 2001; 225(1-2): 15-30.

¹⁸²Figueiras A., Carvalho RA., Ribeiro L., Torres-Labandeira JJ., Veiga FJB. Solid-state characterization and dissolution profiles of the inclusion complexes of omeprazole with native and chemically modified β -cyclodextrin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2007; 67(2): 531-539.

¹⁸³Oh N., Lee MY., Lee YB., Shin SC., Park I. Spectroscopic characterization of ibuprofen/2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex. *International Journal of Pharmaceutics*, 1998; 175(2): 215-223.

¹⁸⁴Jullian C., Morales-Montecinos J., Zapata-Torres G., Aguilera B., Rodríguez J., Arán V., Olea-Azar C. Characterization, phase-solubility, and molecular modeling of inclusion complex of 5-nitroindazole derivative with cyclodextrins. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2008; 16(9): 5078-5084.

¹⁸⁵Williams III RO., Mahaguna V., Sriwongjanya M. Characterization of an inclusion complex of cholesterol and hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 1998; 46(3): 355-360.

biocidas^{190,191,192,193,194} y otros compuestos^{195,196,197,198,199,200,201}. No se han encontrado en la bibliografía trabajos relacionados con la caracterización estructural de los complejos de inclusión biocida:CD estudiados en esta memoria.

¹⁸⁶Ficarra R., Ficarra P., Di Bella MR., Raneri D., Tommasini S., Calabro ML., Gamberini MC., Rustichelli C. Study of β -blockers: β -cyclodextrins inclusion complex by NMR, DSC, X-ray and SEM investigation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2000; 23: 33–40.

¹⁸⁷Tsai Y., Tsai HH., Wu CP., Tsai FJ. Preparation, characterisation and activity of the inclusion complex of paeonol with β -cyclodextrin. *Food Chemistry*, 2010; 120(3): 837-841.

¹⁸⁸Wang J., Cao Y., Sun B., Wang C. Characterisation of inclusion complex of trans-ferulic acid and hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Food Chemistry*, 2001; 124(3): 1069-1075.

¹⁸⁹Abdul Z., Saim N., Said M., Illias RM., Mustapha WAW., Hassan O. Characterization of cyclodextrin complexes with turmeric oleoresin. *Food Chemistry*, 2009; 114(2): 459-465.

¹⁹⁰Manolikar MK., Sawant MR. Study of solubility of isoproturon by its complexation with β -cyclodextrin. *Chemosphere*, 2003; 51(8): 811-816.

¹⁹¹Villaverde J., Pérez-Martínez JI., Maqueda C., Ginés JM., Morillo E. Inclusion complexes of α - and γ -cyclodextrins and the herbicide norflurazon: I. Preparation and characterisation. II. Enhanced solubilisation and removal from soils. *Chemosphere*, 2005; 60(5): 656-664.

¹⁹²Balmas V., Delogu G., Sposito S., Rau D., Migheli Q. Use of a complexation of tebuconazole with α -cyclodextrin for controlling foot and crown rot of durum wheat Incited by *Fusarium Culmorum*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2006; 54: 480.

¹⁹³El Bahri Z., Taverdet JL. Elaboration and characterisation of microparticles loaded by pesticide model. *Powder Technology*, 2007; 172: 30–40.

¹⁹⁴Zhou S., Wang L., Zhang A., Lin K., Weiping L. Preparation, Stabilization, and Bioefficacy of Cyclodextrin Inclusion Compounds of Chloramidophos. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2008; 56: 2708–2713.

¹⁹⁵Giordano F., Novak C., Moyano JR. Thermal analysis of cyclodextrins and their inclusion compounds. *Thermochimica Acta*, 2001; 380(2): 123-151.

¹⁹⁶Wang EJ., Lian ZX., Cai J. The crystal structure of the 1:1 inclusion complex of β -cyclodextrin with benzamide. *Carbohydrate Research*, 2007; 342(5): 767-771.

¹⁹⁷Netto-Ferreira JC., Wintgens V., Vieira Ferreira LF., Garcia AR., Ilharco LM., Lemos MJ. Solid complexes between N-(para-alkylphenyl)-2,3-naphthalimides and β -cyclodextrin: characterization by diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy and laser induced luminescence studies. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2000; 132(3): 209-217.

¹⁹⁸Chen G., Xia J., Li Z., Yu GA., Jin S., Liu SH. A novel conjugated [2]rotaxane with an Ru-containing axle constructed from a carboxy-functionalized bis-terpyridyl ruthenium complex and β -cyclodextrin: Synthesis, characterization, and properties. *Journal of Organometallic Chemistry*, 2010; 695(3): 323-326.

¹⁹⁹Janz S., Shacter E. A new method for delivering alkanes to mammalian cells: preparation and preliminary characterization of an inclusion complex between β -cyclodextrin and pristane (2,6,10,14-tetramethylpentadecane). *Toxicology*, 1991; 69(3): 301-315.

²⁰⁰He Y., Fu P., Shen X., Gao H. Cyclodextrin-based aggregates and characterization by microscopy. *Micron*, 2008; 39(5): 495-516.

²⁰¹Bonenfant D., Niquette P., Mimeault M., Furtos-Matei A., Hausler R. UV-VIS and FTIR spectroscopic analyses of inclusion complexes of nonylphenol and nonylphenol ethoxylate with β -cyclodextrin. *Water Research*, 2009; 43(14): 3575-3581.

Microscopía electrónica de barrido (SEM):

El Microscopio Electrónico de Barrido es una herramienta que permite la observación y caracterización superficial de materiales inorgánicos y orgánicos y proporciona información morfológica del material analizado, utilizando un haz de electrones para formar una imagen^{202,203}.

Tiene una gran profundidad de campo, la cual permite que se enfoque simultáneamente una gran parte de la muestra. Su alta resolución posibilita estudiar la morfología de partículas de muy pequeño tamaño (~100 Å) y obtener una visión tridimensional, que puede ser identificativa. La morfología se entiende como la forma que adquiere la materia cuando se divide finamente, en función de su estructura y de los procesos de cambio que induce dicha forma²⁰⁴.

Esta técnica permite evaluar la existencia de homogeneidad del preparado obtenido, aún cuando exista una clara diferencia en el estado de cristalización del biocida puro y de los complejos formados^{205,206,207}.

La preparación de las muestras es relativamente sencilla, ya que la mayoría de los SEMs sólo requieren que éstas sean conductoras. Ésto se consigue recubriendo la muestra con una capa de carbón o una capa delgada de un metal como oro para darle propiedades conductoras a la muestra. Posteriormente, se introduce la muestra en el microscopio.

²⁰²Utsuki T., Brem H., Pitha J., Loftsson T., Kristmundsdottir T., Tyler BM., Olivi A. Potentiation of anticancer effects of microencapsulated carboplatin by hydroxypropyl-cyclodextrin. *Journal of Controlled Release*, 1996; 40: 251-260.

²⁰³He Y., Fu P., Shen X., Gao H. Cyclodextrin-based aggregates and characterization by microscopy. *Micron*, 2008; 39(5): 495-516.

²⁰⁴Beddow JK. Recent applications of morphological analysis. *Particle Characterization in Technology. Morphological analysis*, 1986. CRC Press, Florida, pp. 149-122.

²⁰⁵Prakash Rao B., Suresh S., Narendra C. Physicochemical characterization of β -cyclodextrin and hydroxy ethyl β -cyclodextrin complexes of rifampicin. *Ars Pharmaceutica*, 2006; 47(1): 37-59.

²⁰⁶Ficarra R., Ficarra P., Di Bella MR., Raneri D., Tommasini S., Calabro ML., Gamberini MC., Rustichelli C. Study of β -blockers:cyclodextrins inclusion complex by NMR, DSC, X-ray and SEM investigation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2000; 23: 33-40.

²⁰⁷Villaverde J., Pérez-Martínez JI., Maqueda C., Ginés JM., Morillo E. Inclusion complexes of α - and γ -cyclodextrins and the herbicide norflurazon: I. Preparation and characterisation. II. Enhanced solubilisation and removal from soils. *Chemosphere*, 2005; 60: 656-664.

El microscopio puede estar equipado con diversos detectores, entre los que se pueden mencionar: un detector de electrones secundarios para obtener imágenes de alta resolución, SEI (Secondary Electron Image), un detector de electrones retrodispersados que permite la obtención de imágenes de composición y topografía de la superficie, BEI (Backscattered Electron Image), y un detector de energía dispersiva, EDS (Energy Dispersive Spectrometer) que permite coleccionar los Rayos X generados por la muestra y realizar diversos análisis e imágenes de distribución de elementos en superficies pulidas. El más común de éstos, es el que detecta electrones secundarios, la muestra se barre con electrones acelerados que viajan a través del cañón. Cuando el haz de electrones incide sobre la muestra, se producen interacciones entre los electrones del mismo haz y los átomos de la muestra; puede haber, por ejemplo, electrones rebotados. Por otra parte, la energía que pierden los electrones al "chocar" contra la muestra puede hacer que otros electrones salgan despedidos (electrones secundarios) y producir rayos X, etc.²⁰⁸

En el microscopio electrónico de barrido es necesario acelerar los electrones en un campo eléctrico, para aprovechar de esta manera su comportamiento ondulatorio, lo cual se lleva a cabo en la columna del microscopio, donde se aceleran por una diferencia de potencial cuyo intervalo oscila de 1,000 a 30,000 voltios. Los electrones acelerados por un voltaje pequeño se utilizan para muestras muy sensibles, como podrían ser las muestras biológicas sin preparación adicional, o muestras muy aislantes. Los voltajes altos se utilizan para muestras metálicas, ya que éstas, en general, no sufren daños como las biológicas y, de esta manera, se aprovecha la menor longitud de onda para tener una resolución mejor. Los electrones acelerados salen del cañón y son enfocados por las lentes condensadora y objetiva, cuya función es reducir la imagen del filamento, de manera que incida en la muestra un haz de electrones lo más pequeño posible para así tener una mejor resolución. Con las bobinas deflectoras se barre este fino haz de electrones sobre la muestra, punto por punto y línea por línea. Cada punto leído de la muestra corresponde a un píxel en un monitor de televisión. Cuanto mayor sea el número de electrones contados por el dispositivo, mayor será el brillo del píxel en la pantalla. Se producen imágenes tridimensionales reales de la superficie del objeto, proyectadas en una imagen de TV o una imagen digital. Su resolución está entre 3 y 20 nm, dependiendo del microscopio utilizado.

²⁰⁸Goldstein J., Newbury DE., Joy DC., Lyman CE., Echlin P., Lifshin E., Sawyer L., Michael JR. Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis. 2003, Springer, New York, pp. 21-60.

Distribución del tamaño de partícula mediante dispersión por láser

Para la determinación del tamaño de partícula se utiliza una técnica rápida, la dispersión por láser, basada en el cálculo matemático del diámetro del volumen medio de partículas existentes en una dispersión^{209,210,211,212}.

Es de esperar que el tamaño de partícula del complejo de inclusión, sea de aproximadamente 10^2 nm (0,1 μ m), al encontrarse en forma de agregados^{213,214}. Cabe destacar que las micropartículas se refieren a partículas cuyo diámetro está comprendido entre 0.1 y 100 μ m y las nanopartículas entre 1 y 100 nm.

Aunque las CDs están ampliamente estudiadas desde hace más de 100 años, son escasas las técnicas analíticas capaces de analizar la agregación de las moléculas. Existen dos factores que afectan en gran medida a esta agregación: la concentración de la CD en agua y la hidratación que poseen en el medio, surgiendo enlaces de H entre las moléculas. Son numerosas las publicaciones que recogen diversas posibilidades para reducir esta agregación^{215,216,217}, como:

- modificar químicamente (metilar, hidroxipropilar...) los grupos hidroxilo de la CD.
- incrementar la temperatura de la disolución.
- aplicar agentes disruptores de los puentes de H, por ejemplo, la urea.
- incrementar el pH de la disolución por encima de 12, para ionizar los grupos hidroxilo de la CD.

²⁰⁹Zhang WF., Vhen XG., Li PW., He QZ., Zhou HY. Preparation and characterization of theophylline loaded chitosan/*b*-cyclodextrin microspheres. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2008; 19: 305–310.

²¹⁰Egawa Y., Shimura Y., Nowatari Y., Aiba D., Juni K. Preparation of molecularly imprinted cyclodextrin microspheres. *International Journal of Pharmaceutics*, 2005; 293: 165–170.

²¹¹Rojtanatanya S., Pongjanyakul T. Propranolol–magnesium aluminum silicate complex dispersions and particles: Characterization and factors influencing drug release. *International Journal of Pharmaceutics*, 2010; 383: 106–115.

²¹²Pongjanyakul T., Rongthong T. Enhanced entrapment efficiency and modulated drug release of alginate beads loaded with drug–clay intercalated complexes as microreservoirs. *Carbohydrate Polymers*, 2010; 81: 409–419.

²¹³He Y., Fu P., Shen X., Gao H. Cyclodextrin-based aggregates and characterization by microscopy. *Micron*, 2008; 39(5): 495-516.

²¹⁴Messner M., Kurkov SV., Jansook P., Loftsson T. Self-assembled cyclodextrin aggregates and nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 2010; 387(1-2): 199-208.

²¹⁵Gonzalez-Gaitano G., Rodríguez P., Isasi JR., Fuentes M., Tardajos G., Sanchez M. The aggregation of cyclodextrins as studied by photon correlation spectroscopy, *Journal of Inclusion Phenomena Macrocyclic Chemistry*, 2002; 44: 101–105.

²¹⁶Szente L., Szejtli J., Kis GL. Spontaneous opalescence of aqueous gamma-cyclodextrin solutions: complex formation or self-aggregation. *Journal and Pharmaceutical Science*, 1998; 87(6): 778–781.

²¹⁷Coleman AW., Nicolis I. Aggregation of cyclodextrin: an explanation of the abnormal solubility of beta-cyclodextrin, *Journal of Inclusion Phenomena and Molecular Recognition in Chemistry*, 1992; 13: 139–143.

El tamaño de partícula del microencapsulado influye de forma significativa en las propiedades del producto formado. Afecta, principalmente, a la liberación del principio activo inmerso en la ciclodextrina, por lo que, el tamaño medio recomendado del diámetro de la partícula debería ser inferior a 100 μm . No menos importante es que debe ser mayor que 20 μm para evitar la toxicidad por inhalación y la pérdida de producto por acción del aire²¹⁸. Teniendo en cuenta la aplicabilidad de los productos encapsulados objeto de estudio, para combatir plagas de insectos, el tamaño de partícula debe ser el menor posible, ya que será menos detectable por los insectos y mayor será la superficie tratada. El problema de toxicidad y pérdida por volatilidad será solventado en la preparación del formulado final del producto comercial.

Difracción de Rayos X en polvo

La difracción de Rayos X es una técnica analítica que permite estudiar la estructura interna de los sólidos cristalinos. Se basa en el hecho de que, en función de su estructura interna y de los tipos de átomos que la componen, cada fase cristalina tiene un difractograma propio y característico. Es importante recalcar que no se trata de un análisis químico, sino de la identificación de fases o compuestos cristalinos²¹⁹.

De esta forma, la técnica de difracción de RX es útil para caracterizar un complejo de inclusión, ya que establece que se ha producido encapsulación si la estructura y, por lo tanto, el difractograma característico obtenido del encapsulado, difiere de las señales obtenidas para el biocida y la CD puros^{220,221}.

Los RX son ondas electromagnéticas, al igual que la luz visible, pero con una longitud de onda mucho menor, en el intervalo comprendido entre 0.1 y 10 Å , por lo que se trata de radiaciones ionizantes muy energéticas.

Los rayos X se generan normalmente mediante tubos a vacío, donde un filamento de wolframio (cátodo) es sometido a una corriente eléctrica de varios mA, estableciéndose una

²¹⁸Smith KL. Dispersible Microparticles. Controlled-release delivery systems for pesticide. 1999, HB. Scher, California, pp. 4-11.

²¹⁹Jenkins R., Snyder RL. Introduction to X-ray Powder Diffractometry, 1996, John Wiley & Sons, New York.

²²⁰Li Ning., Zhang YH., Wu YN., Xiong XL., Zhang YH. Inclusion complex of trimethoprim with cyclodextrin. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2005; 39; 824-829.

²²¹Chen M., Diao G., Zhang E. Study of inclusion complex of β -cyclodextrin and nitrobenzene. Chemosphere, 2006; 63: 522-529.

diferencia de potencial de varios kV entre ese cátodo y un ánodo metálico, habitualmente de cobre. En esas condiciones, se produce la emisión de electrones desde el cátodo, que impactan con mucha energía en el ánodo, arrancando electrones de las capas internas de la estructura electrónica del metal que constituye el cátodo. Es importante destacar que la mayor parte de esa energía se disipa en forma de calor, necesitando refrigeración continua.

Por otro lado, en la materia cristalina los átomos están dispuestos de una manera ordenada y periódica en el espacio, formando planos cristalinos que están separados un valor constante. Estos espaciados son de la misma magnitud que la longitud de onda de los RX y cada plano difractará a un ángulo de incidencia concreto, θ , por lo cual, los rayos incidentes pueden difractarse por las redes cristalinas de acuerdo con la Ley de Bragg, Ecuación 3.1.

$$n\lambda = 2d \sin \theta \quad \text{Ec.3.1}$$

Donde n es el orden de reflexión y d la distancia interplanar de la red cristalina.

En las técnicas de polvo, al estar la muestra reducida a partículas muy finamente molidas, todas las orientaciones posibles quedan representadas en su superficie y, por tanto, expuestas al haz de RX.

El detector de RX es un dispositivo que convierte la radiación emitida en impulsos eléctricos, de modo que puedan ser procesados mediante un contador electrónico puntual o lineal, y ser representados gráficamente en forma de intensidad (eje vertical) frente al ángulo 2θ (eje horizontal) recorrido por el detector.

El difractograma de una fase cristalina muestra un fondo continuo al que se le superponen una serie de "picos" o máximos de difracción, también llamados "reflexiones", dispuestos en determinados valores del ángulo 2θ , directamente equiparable al valor interplanar. Su intensidad o altura se suele asignar de manera relativa, dando una intensidad del 100% al pico más alto y el resto proporcionalmente.

El número y la posición de los máximos de difracción en el difractograma son el resultado de la simetría interna de la fase cristalina y de la celda unidad (que se define como la porción más simple de la estructura cristalina que al repetirse mediante traslación reproduce todo el cristal). La intensidad de las reflexiones depende de la cantidad y tipo de átomos de la celda unidad. La anchura de las reflexiones es función de la configuración del difractómetro y de diferentes características inherentes a la muestra, como el tamaño del

cristal o la existencia de microtensiones en la estructura²²². Un difractograma estándar utilizado para identificación puede medirse en menos de una hora, con lo cual es un método de análisis rápido.

Difracción de RX de monocristal

Las técnicas de monocristal se emplean fundamentalmente para conocer la simetría y la estructura interna de los cristales. La técnica consiste en hacer llegar un haz de rayos X blancos policromáticos a lo largo de un eje de simetría de un monocristal, obteniendo en una placa fotográfica una imagen de su ordenamiento interno. Además, se monta sobre un mecanismo que permite mover el cristal y rotar según varios ejes de giro, obteniendo más información estructural²²³.

La estructura de un cristal de un complejo de inclusión con CD se puede clasificar, según Saenger y col., en dos tipos: tipo jaula y tipo canal²²⁴, aunque no hay una regla general para definir que tipo de modelo tendrá lugar en la formación de un complejo de inclusión y se han encontrado pocas referencias bibliográficas para la caracterización de la estructura de un complejo de inclusión por esta técnica^{225,226}.

En el modelo tipo jaula las cavidades de una molécula de CD están bloqueadas por los dos lados por otra CD adyacente. Dentro de este modelo se pueden distinguir otros dos: el modelo tipo espina (Figura 3.1a) y el modelo tipo ladrillo (Figura 3.1b). En el modelo tipo canal (Figura 3.1c), las moléculas de CD están dispuestas linealmente una encima de la otra²²⁷.

²²²Sangüesa FJ. El análisis mineralógico mediante difracción de RX (DRX) y sus aplicaciones. *Tierra y Tecnología*, 2007; 32: 75-86.

²²³Blake AJ., Clegg W., Cole JM., Evans JSO., Main P., Parsons S., Watkin DJ. *Crystal Structure Analysis Principles and Practice*, 2008, Oxford University Press Inc., New York., pp. 1- 8.

²²⁴Saenger W., Jacob J., Gessler K., Steiner T., Hoffmann D., Sanbe H., Koizumi K., Smith SM., Takaha T. Structures of the common cyclodextrins and their larger analogues-beyond the doughnut. *Chemical Review*, 1998; 98: 1787-1802.

²²⁵Kokkinou A., Yannakopoulou K., Mavridis IM., Mentzafosa D. Structure of the complex of cyclodextrin with naphthyloxyacetic acid in the solid state and in aqueous solution. *Carbohydrate Research*, 2001; 332: 85-94.

²²⁶Wang EJ., Lian ZX., Cai J. The crystal structure of the 1:1 inclusion complex of β -cyclodextrin with benzamide. *Carbohydrate Research*, 2007; 342(5): 767-771.

²²⁷He Y., Fu P., Shen X., Gao H. Cyclodextrin-based aggregates and characterization by microscopy. *Micron*, 2008; 39(5): 495-516.

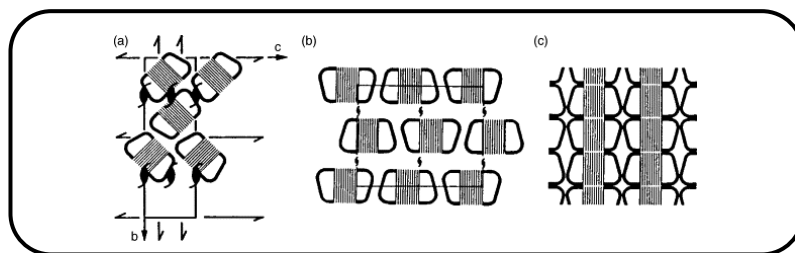


Fig. 3.1. Estructuras formadas por un cristal de un complejo de inclusión con CD. (a) modelo tipo espina, (b) modelo tipo ladrillo y (c) modelo tipo canal.

Espectroscopía Infrarroja con transformada de Fourier (FTIR):

La técnica de FTIR es una de las técnicas empleadas para la elucidación estructural del complejo biocida:CD formado y ayuda a demostrar qué parte de la molécula del principio activo se encuentra dentro o fuera de la cavidad de la CD^{228,229,230}. En los espectros infrarrojo aparecen absorciones a frecuencias características, que pueden atribuirse a grupos químicos específicos²³¹.

La espectroscopia infrarroja es la rama de la espectroscopia que estudia las interacciones de la materia con la región infrarroja del espectro electromagnético. Se basa en el hecho de que los enlaces químicos de las sustancias tienen frecuencias de vibración específicas, que corresponden a los distintos niveles de energía de la molécula. Estas frecuencias dependen de la forma, de la superficie de energía potencial molecular, de la geometría molecular, de las masas atómicas y, posiblemente, del acoplamiento vibracional.

Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN)

La espectroscopía RMN es una técnica empleada principalmente para la elucidación de estructuras moleculares, aunque también se puede emplear con fines cuantitativos.

La técnica de resonancia magnética nuclear es una herramienta muy útil para caracterizar los complejos de inclusión, puesto que ofrece gran cantidad de información:

²²⁸Manollikar MK., Sawant MR. Study of solubility of isoproturon by its complexation with β -cyclodextrin. *Chemosphere*, 2003; 51: 811–816.

²²⁹McMullan RK., Saenger W., Fayos J., Mootz D. Cyclodextrin inclusion complex. *Carbohydrate Research*, 1973; 31(1): 37-46.

²³⁰Lin SY., Hsu CH., Sheu MT. Curve-fitting FTIR studies of loratadine/hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex induced by co-grinding process. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2010; 53(3): 799-803.

²³¹Stuart B. *Infrared spectroscopy: fundamentals and applications*, 2004. Wiley, Chichester (U.K), pp.1-13.

- (i) la confirmación de la formación del complejo de inclusión por desplazamiento de la señal
- (ii) datos necesarios para poder calcular la estequiometría de formación del complejo
- (iii) datos que permiten establecer la geometría del nuevo compuesto.

La inserción de la molécula huésped dentro de la cavidad hidrofóbica de la CD da lugar a una modificación del espectro de RMN y, más concretamente, a variaciones del desplazamiento de las señales del complejo de inclusión con respecto a las de las sustancias puras ($\Delta\delta$). Sólo se han considerado los desplazamientos significativos del orden de 10^{-1} o 10^{-2} ppm^{232,233,234,235,236,237,238}.

Algunos núcleos atómicos sometidos a un campo magnético externo absorben radiación electromagnética en la región de radiofrecuencias. Como la frecuencia exacta de esta absorción depende del entorno de estos núcleos, se puede emplear para determinar la estructura de la molécula. Además, los electrones producen modificaciones en los núcleos, débiles pero observables y esos efectos electrónicos darán lugar a los desplazamientos químicos y a las constantes de acoplamiento.

Para que se pueda emplear esta técnica, los núcleos deben tener un momento magnético distinto de cero. Esta condición no la cumplen los núcleos con número másico y número atómico par (^{12}C , ^{16}O , ^{32}S). Es importante que el isótopo sea abundante en la naturaleza, ya

²³²Bernini A., Spiga O., Ciutti A., Scarselli M., Bottoni G., Mascagni P., Niccolai N. NMR studies of the inclusion complex between β -cyclodextrin and paroxetine. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2004; 22: 445–450.

²³³Chen M., Diao G., Zhang E. Study of inclusion complex of β -cyclodextrin and nitrobenzene. *Chemosphere*, 2006; 63: 522–529.

²³⁴Ali SM., Upadhyay SK., Maheshwari A., Koketsu M. Complexation of Fluvastatin Sodium with Cyclodextrin: NMR Spectroscopic Study in Solution. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 2006; 55: 325–328.

²³⁵Balmas V., Delogu G., Sposito S., Rau D., Migheli Q. Use of a Complexation of Tebuconazole with cyclodextrin for controlling foot and crown rot of durum wheat incited by fusarium culmorum. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2006; 54: 480-484.

²³⁶Ribeiro ACF., Lobo VMM., Valente AJM., Simões SMN., Sobral AJFN., Ramos ML., Burrows HD. High-resolution solid-state ^{13}C -NMR study of per(3,6-anhydro)- α -cyclodextrin based polymers and of their chromium complexes. *Polyhedron*, 2006; 25: 3581–3587.

²³⁷Ali SM., Upadhyay SK. Complexation study of midazolam hydrochloride with β -cyclodextrin: NMR spectroscopic study in solution. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 2008; 46: 676–679.

²³⁸Vianna RFL., Bentley MVLB., Ribeiro G., Carvalho FS., Neto AF., de Oliveira DCR., Collett JH. Formation of cyclodextrin inclusion complexes with corticosteroids: their characterization and stability. *International Journal of Pharmaceutics*, 1998; 167: 205–213.

que la intensidad de la señal dependerá de la concentración de esos núcleos activos. Por esta razón, uno de los más útiles en la elucidación de estructuras es el ^1H , dando lugar a la espectroscopia de resonancia magnética nuclear de protón y también es ampliamente estudiado el ^{13}C , aunque se trata de un núcleo poco abundante y poco sensible²³⁹. Otros núcleos importantes en química son: ^{31}P , ^{19}F y ^{15}N .

En espectroscopía RMN- ^1H en disolución los disolventes habituales son aquellos que la experiencia ha demostrado que reúnen una serie de propiedades: disolver un 2-5% en peso del mayor número de sustancias posible, ser químicamente inerte, presentar el menor número de señales posible (transparencia magnética) y ser productos deuterados. Habitualmente se han seleccionado el cloroformo deuterado (CD_3Cl), el dimetilsulfóxido y la acetona perdeuterada (DMSO-d_6 y $\text{CD}_3\text{-CO-CD}_3$), el hexadeuterobenceno (C_6D_6), la pentadeuteropiridina ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$), el metanol deuterado (CH_3OD , CD_3OH y CD_3OD) y el ácido trifluoroacético ($\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$ y $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{D}$)²⁴⁰.

En espectroscopía RMN- ^{13}C de estado sólido las moléculas están estáticas y no existe, como ocurre con las moléculas en disolución, un promediado de la señal de RMN por el efecto de la rotación térmica de las moléculas respecto a la dirección del campo magnético. Las moléculas de un sólido están prácticamente inmóviles, y cada una de ellas experimenta un entorno electrónico ligeramente distinto, dando lugar a una señal diferente. Esta variación del entorno electrónico disminuye la resolución de las señales y dificulta su interpretación. En general, el espectro de RMN en estado sólido presenta señales más anchas que los obtenidos en líquidos, por lo que presentan menor resolución²⁴¹. Por lo tanto, dos conceptos importantes para la espectrometría RMN de alta resolución en estado sólido son la limitación de la posible orientación molecular por orientación de la muestra y la reducción de las interacciones magnéticas nucleares anisotrópicas por giro de la muestra. De este último enfoque, destaca el método del giro rápido en torno al ángulo mágico (54.7°). La técnica de la rotación en el ángulo mágico (Magic Angle Spinning, MAS) permitió incrementar la resolución de los espectros en estado sólido varios órdenes de magnitud. En MAS, las interacciones se promedian rotando la muestra a una velocidad lo suficientemente rápida, de varios kilohertzios. El efecto conseguido son espectros mono y bidimensionales de gran calidad, próximos a los obtenidos mediante RMN en disolución.

²³⁹Claridge TDW. High resolution NMR techniques in Organic Chemistry. 2009, Elsevier, Amsterdam, pp.10-50.

²⁴⁰Duddek H., Dietrich W., Tuth G. Elucidación estructural por RMN, 1998, Springer, Alemania, pp. 125-156.

²⁴¹Duer MJ. Solid State NMR Spectroscopy, 2002, Wiley-Blackwell Science, London, pp. 1- 35.

Una señal de RMN se caracteriza por cuatro propiedades: posición, multiplicidad, intensidad y anchura a media altura. A igualdad de todos los demás factores, la intensidad de una señal (singlete o multiplete) es proporcional al número de protones que dan lugar a esa señal. Se entiende por intensidad la superficie, no la altura, ya que las señales pueden diferir en anchura. Los espectrómetros de RMN contienen los programas necesarios para dar, gráfica o numéricamente, la intensidad integrada.

3.2. OBJETIVO

La importancia del conocimiento de la estructura de los productos formados, para el correcto desarrollo de la formulación final, junto con, por una parte, la potenciabilidad demostrada por las técnicas analíticas descritas, para obtener información estructural sobre complejos de inclusión y, por otra, la falta de referencias bibliográficas sobre su aplicación a los complejos de inclusión biocida:CD, objeto de estudio de este trabajo, hace que el objetivo de este capítulo se centre en:

“La caracterización estructural de los complejos de inclusión biocida:CD formados“

3.3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Los reactivos y disoluciones utilizadas se recogen en el Anexo I, mientras que la instrumentación empleada en esta parte de la Memoria se recopila en el Anexo II.

Los estudios de caracterización en estado sólido se han llevado a cabo sobre los biocidas, la CD, los complejos de inclusión biocida:CD y una mezcla física preparada mezclando, con ayuda de un mortero, cada biocida con la CD en la relación estequiométrica determinada.

La obtención de las imágenes de alta resolución mediante **SEM** se realizaron con distintos voltajes de excitación, elegidos en base a la degradación observada de la muestra al incidir el haz de electrones a altos voltajes. Se utilizaron voltajes de excitación de: 30 kV para bendiocarb y bifentrina, 5 kV para la CD y acetamiprid, 3 kV para deltametrina y 15 kV para el resto de biocidas estudiados. Los aumentos para cada muestra se definieron en base a sus características morfológicas, variando desde X50 hasta X4 k.

Las medidas de **distribución del tamaño de partícula mediante dispersión por láser**, se llevaron a cabo sobre muestras dispersadas en 15 mL de agua destilada en la propia celda de dispersión del equipo. Mediante una serie de ensayos preliminares, se seleccionaron las condiciones óptimas de agitación (1050 rpm) y de aplicación de ultrasonidos (50%), a fin de obtener una correcta dispersión de la muestra en la celda sin provocar la formación de burbujas. Una vez establecidas esas condiciones, el procedimiento de medida para cada muestra consistió en los siguientes pasos:

1. Se añadió la cantidad de dispersante (H₂O) necesaria para llenar la celda y se tomó una medida del fondo (background).
2. Se adicionó poco a poco la muestra, hasta obtener un valor apropiado de oscurecimiento, comprendido entre el 10% y el 20%.
3. Se realizaron 5 ciclos de medida, de 10 segundos de duración cada uno de ellos.
4. El resultado final obtenido para cada muestra corresponde al promedio de esos 5 ciclos de medida.

Las medidas realizadas mediante difracción de **RX en polvo**, precisan únicamente la molturación de la muestra y su preservación de la humedad en un desecador. Posteriormente, la muestra se coloca en un portamuestras de fondo cero, monocristal de Si, de forma que se quede adherido a él una superficie correspondiente a aproximadamente 1cm de diámetro. El portamuestras se introduce en el cargador de muestras del equipo y se le somete a una potencia de generador de 40 kV y 40 mA. La adquisición de datos y su procesado se llevó a cabo utilizando el software Difrac plus XRD Commander de Bruker.

La obtención de un **monocristal** para su estudio mediante difracción de RX se realizó saturando con la CD disoluciones de los distintos biocidas en agua, en continua agitación, posteriormente se dejó evaporar lentamente a temperatura ambiente durante un día. La cristalización se lleva a cabo en un cristalizador a temperatura ambiente tapado con una lámina de parafilm, previamente agujereado, con el fin de que la evaporación del disolvente sea lo más lenta posible y se forme el monocristal deseado. Las condiciones experimentales utilizadas en el difractor se recogen en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Condiciones experimentales del difractor Xcalibur 2²⁴².

Condiciones experimentales	
Detector	CCD (Saphire 2)
Temperatura (K)	100(1)
λ (MoKα) (Å)	0.71073
Monocromador	Grafito
Colimador (mm)	0.5
Modo de barrido	Rotación ω
Anchura de barrido (°)	1.0
Tiempo por placa (s) (Total, h)	65 (18)
Intervalo de θ (°)	2.94-26.5
(hkl) mínimo	(-18 -19 -16)
(hkl) máximo	(18 19 19)
Reflexiones medidas	24204
Reflexiones independientes (R_{int})	18848 (0.031)
Reflexiones observadas [$I > 2\sigma(I)$]	11474
Corrección de absorción	Multi-scan

En espectroscopía **FTIR** las muestras se preparan triturando finamente una mínima cantidad de cada uno de los biocidas o los complejos de inclusión o las mezclas físicas, con la adecuada cantidad de KBr. Esta mezcla en polvo se comprime en una prensa de troquel mecánica para formar una pastilla translúcida a través de la cual puede pasar el rayo de luz

²⁴²Xcalibur 2 CrysAlis Pro, 2010, Oxford Diffraction Ltd., Oxford (U.K).

del espectrómetro. En el caso de los biocidas líquidos a temperatura ambiente (Bp, ciflutrina, praletrina y fenotrina) se utilizó la celda de líquidos, empleando cloroformo como disolvente. Para estos biocidas no se pudo obtener la mezcla física por dificultades de homogenización. El intervalo de medida fue de 0-4000 cm^{-1} . El software utilizado para la recogida de datos fue WinFIRST.

En la determinación estructural mediante **RMN- ^1H** en disolución, el disolvente elegido para el estudio fue D_2O , ya que aseguraba la estabilidad de los complejos de inclusión formados. Los biocidas estudiados fueron los insecticidas nicotinoides y el carbamato bendiocarb, dada su solubilidad en agua. Las muestras se preparan disolviendo cada compuesto en D_2O con la ayuda de un baño de ultrasonidos hasta su total disolución y posteriormente se introduce la disolución en tubos de RMN de 5 mm de diámetro. La adquisición de datos y el procesado de los mismos se llevó a cabo con el software Top-spin 1.3 de Bruker. Las secuencias de pulsos fueron los estándares de Bruker, 4 μs y 3 segundos de repetición entre barridos.

Los estudios de **RMN- ^{13}C** en estado sólido se han llevado a cabo sobre un insecticida piretroide, la α -cipermetrina, poco soluble en agua. Las muestras se introdujeron en estado sólido en un rotor de zirconita de 7mm de grosor, se taparon con tapones de Kel-F y se introdujeron en la sonda. La adquisición de datos se llevó a cabo con el Software Top-spin 1.3 de Bruker.

3.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.4.1. Caracterización de los complejos de inclusión Biocida:CD en estado sólido

Microscopía electrónica de barrido (SEM):

Las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido muestran la morfología general de la ciclodextrina, del biocida puro, de la mezcla física y del complejo de inclusión en el sólido cristalino obtenido. A modo de ejemplo, en la Figura 3.2 se recogen las imágenes correspondientes a biocidas representativos de cada familia de los compuestos estudiados: acetamiprid, bifentrina y bendiocarb. Esta técnica no fue aplicada a praletrina, esbiotrina, ciflutrina, fenotrina ni al Bp, biocidas líquidos a temperatura ambiente. En el Anexo III se recogen las imágenes obtenidas para los nicotinoides imidacloprid y tiacloprid y para los piretroides tetrametrina, α -cipermetrina y deltametrina.

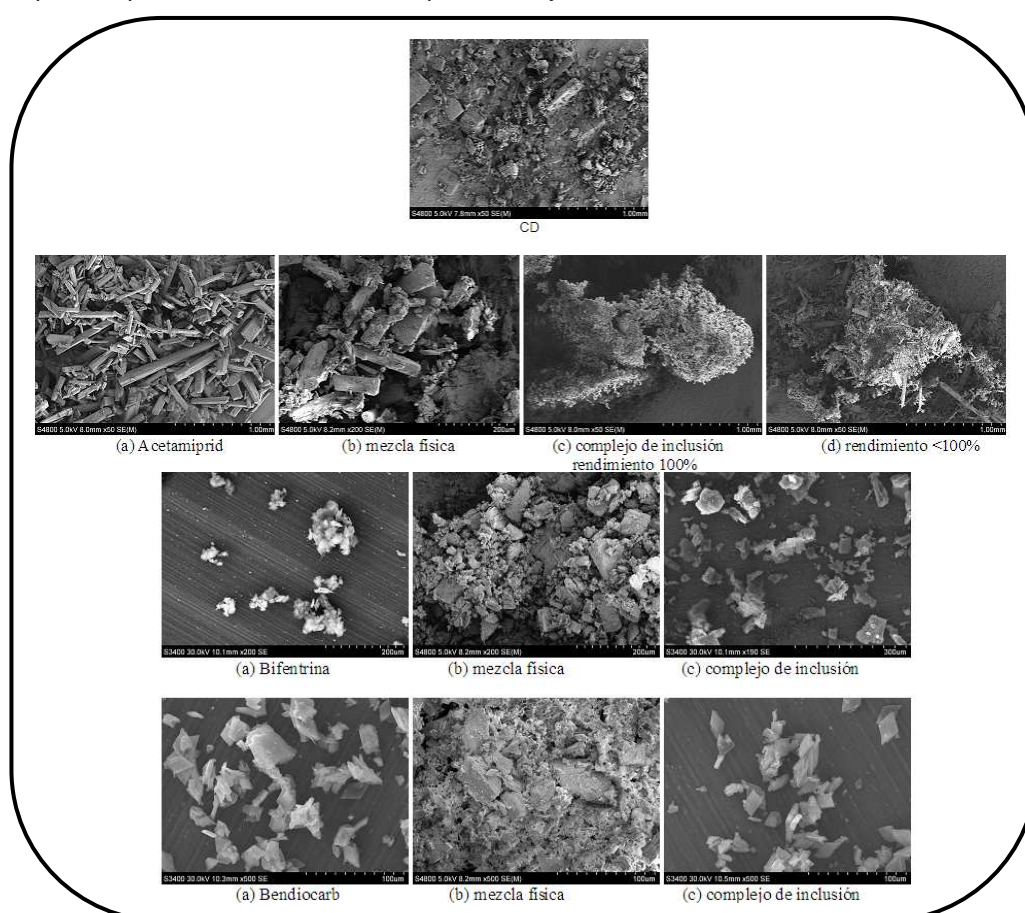


Fig.3.2. Imágenes de microscopía electrónica de barrido para los sistemas biocida:CD en las condiciones instrumentales recogidas en el apartado 3.3.

Se puede observar como la morfología de la mezcla física es una combinación entre la del biocida y la CD, mientras que el complejo de inclusión presenta una estructura diferente. Asimismo, en el caso del complejo acetamiprid:CD, en las imágenes obtenidas para un encapsulado formado con un rendimiento inferior al 100%, muestran cristales característicos del biocida, lo que indica la presencia de acetamiprid libre junto con el complejo de inclusión.

La fragilidad de las estructuras, no ha permitido realizar las medidas a voltajes superiores a 30 kV. Los aumentos obtenidos con estos voltajes no hacen posible calcular el tamaño de partícula, sino que sólo se pueden observar los agregados formados, cuyo tamaño medio ha sido estimado con la ayuda del programa Image J²⁴³, que establece la media de 100 medidas realizadas considerando la resolución a la que han sido tomadas (tabla 3.2). La irregularidad de los agregados dificulta la realización de estas medidas.

Tabla 3.2. Tamaño medio de los agregados de los complejos de inclusión estudiados mediante SEM, con el programa Image J.

Complejo de inclusión	Tamaño de los agregados obtenido con SEM (μm)
Acetamiprid:CD	<100
Imidacloprid:CD	18
Tiacloprid:CD	6
Deltametrina:CD	26
Tetrametrina:CD	5
α -Cipermetrina:CD	37
Ciflutrina:CD	-
Esbiotrina:CD	-
Fenotrina:CD	-
Praletrina:CD	-
Permetrina:CD	-
Bifentrina:CD	35
Bp:CD	-
Bendiocarb:CD	30

La utilización de un microscopio de transmisión electrónica con cryo-TEM, haría posible la estabilización de la muestra y permitiría obtener, de forma más precisa, el tamaño de partícula de los encapsulados formados así como su estructura interna^{244,245}.

²⁴³Abramoff MD., Magelhaus PJ., Ram SJ. Image Processing with Image J. Biophotonics International, 2004; 11(7): 36-42.

²⁴⁴Gámiz E., Soriano M., Delgado G., Párraga J., Delgado R. Estudio morfológico de talcos con Microscopio Electrónico de Barrido (SEM). Aplicaciones farmacéuticas. Ars pharmaceutica, 2002; 43(1-2); 173-185.

Distribución del tamaño de partícula mediante dispersión por láser

En la Figura 3.3 se muestran las distribuciones del tamaño de partícula de los encapsulados formados con los biocidas acetamiprid, bifentrina, el sinergista Bp y bendiocarb. En el Anexo IV se recoge la distribución de tamaño del resto de microencapsulados estudiados.

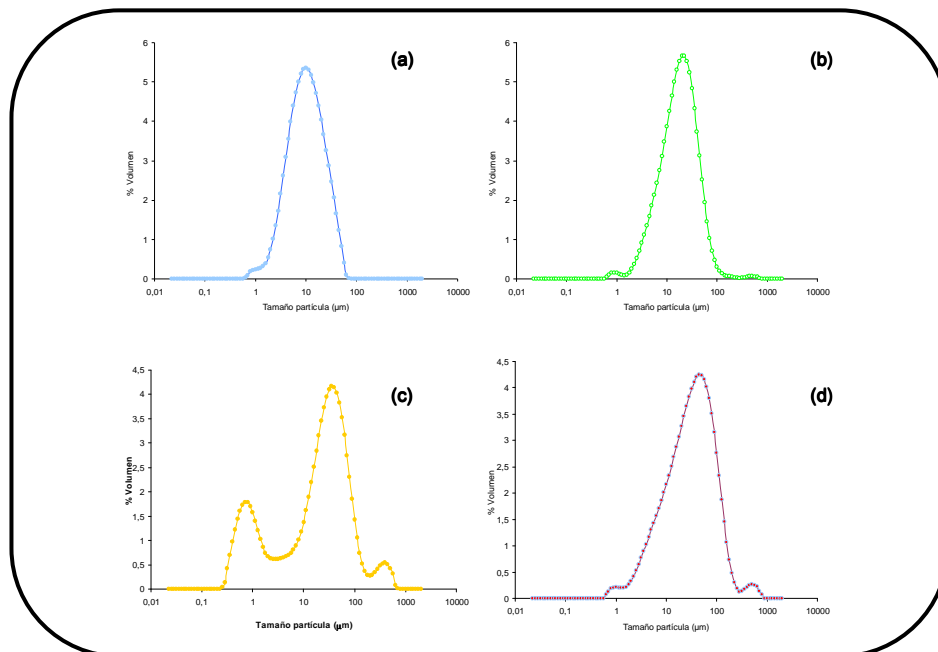


Fig. 3.3. Distribución del tamaño de partícula de (a) acetamiprid:CD, (b) bifentrina:CD, (c) butóxido de piperonilo:CD y (d) bendiocarb:CD, analizado mediante dispersión por láser.

Como se puede observar, se obtiene una distribución aproximadamente gaussiana, en escala logarítmica²⁴⁶. Es de destacar la diferencia en la distribución observada para el sinergista Bp, donde se observa que aparte de partículas con tamaño medio de 34 μm , aparecen otras en torno a 0,79 μm . En la Tabla 3.3, se recoge los tamaños medios de partícula obtenidos para todos los microencapsulados estudiados.

²⁴⁵Bonini M., Rossi S., Karlsson G., Almgren M., Lo Nostro P., Baglioni P. Selfassembly of β -cyclodextrin in water. Part 1: Cryo-TEM and dynamic and static light scattering. *Langmuir*, 2006; 22: 1478–1484.

²⁴⁶Zhao J., Lin D., Wang Y., Yao S. A novel β -cyclodextrin polymer/tungsten carbide composite matrix for expanded bed adsorption: Preparation and characterization of physical properties. *Carbohydrate Polymers*, 2010; 80: 1085–1090.

Tabla 3.3. Tamaños medios de partícula de los complejos de inclusión obtenidos mediante dispersión láser.

Complejo de inclusión	Tamaños de partícula (µm)
Acetamidrid:CD	9
Imidacloprid:CD	15
Tiacloprid:CD	13
Deltametrina:CD	13
Tetrametrina:CD	8
α-Cipermetrina:CD	8
Ciflutrina:CD	12
Esbiotrina:CD	24
Fenotrina:CD	12
Praletrina:CD	19
Permetrina:CD	5
Bifentrina:CD	21
Bp:CD	34
Bendiocarb:CD	42

En todos los casos los tamaños de partícula estimados son superiores a 0,1 µm, tamaño esperado para encapsulados con CD, lo que podría ser debido a que la medida se realiza sobre agregados en suspensión²⁴⁷. En cualquier caso, los resultados obtenidos indican que el proceso ha dado lugar a microencapsulados.

Los valores obtenidos por SEM (Tabla 3.2) y por dispersión por láser (Tabla 3.3), pueden ser comparados, ya que en ambos casos se está midiendo el tamaño medio de los agregados sólidos formados.

²⁴⁷Garnero C., Zoppi A., Genovese D., Longhi M. Studies on trimethoprim:hydroxypropyl-β-cyclodextrin: aggregate and complex formation. Carbohydrate Research, 2010: Accepted manuscript.

Difracción de Rayos X

Difracción de RX en polvo

En la Figura 3.4 se recogen los difractogramas obtenidos para acetamiprid, bifentrina y bendiocarb, la CD, la mezcla física y los complejos de inclusión formados. Los difractogramas se presentan desplazados para poder compararlos. En el Anexo V se recogen los difractogramas de RX para el resto de los sistemas biocida:CD estudiados. No se pudo aplicar esta técnica a los biocidas líquidos a temperatura ambiente: praletrina, esbiotrina, ciflutrina, fenotrina, permetrina y al sinergista Bp.

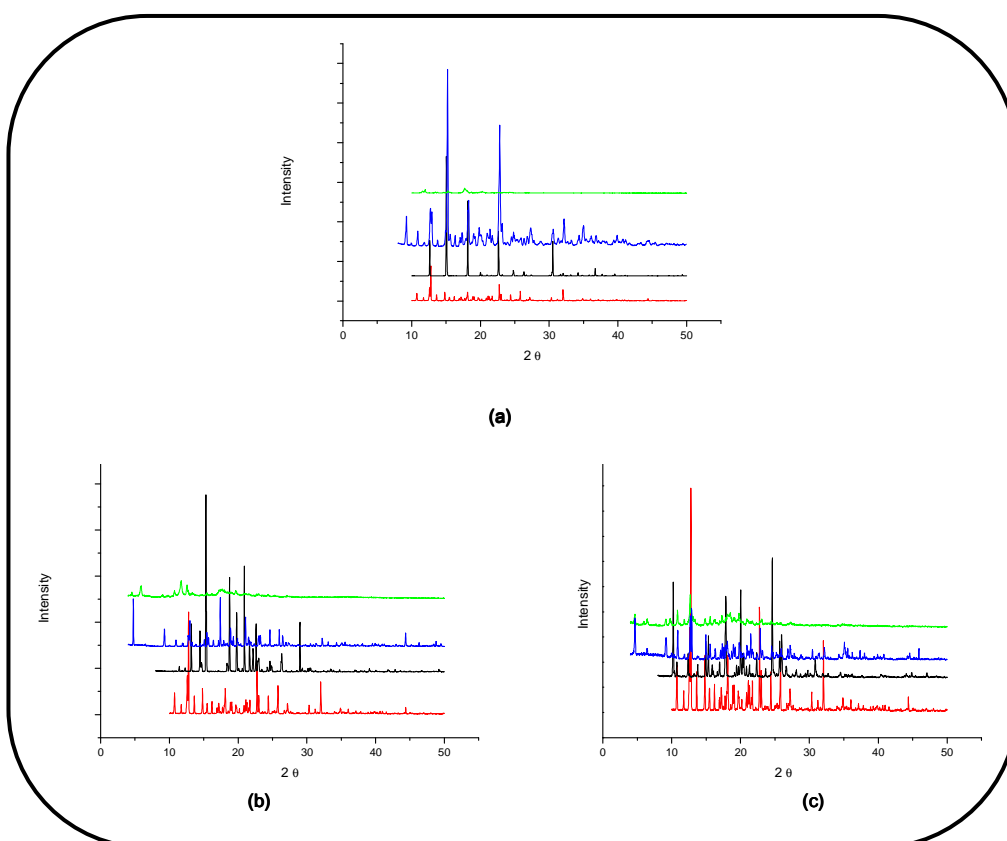


Fig 3.4. Difractogramas de Rayos-X de: acetamiprid (a), bendiocarb (b) y bifentrina (c) (negro), β -ciclodextrina (rojo), mezcla física (azul), complejo de inclusión obtenido por la técnica de disolución con disolventes orgánicos (verde).

La obtención de señales nítidas en los difractogramas indica la naturaleza cristalina de todos los complejos analizados. En los difractogramas de los complejos de inclusión se observa un decrecimiento de los máximos de difracción y un perfil distinto al propio del biocida y la CD, sugiriendo que el producto obtenido posee una nueva estructura debido a la interacción biocida:CD^{248,249}. Los difractogramas de los complejos de inclusión también difieren de los de las mezclas físicas que son una simple suma de las señales de los compuestos aislados, biocida + CD.

Asimismo, la técnica de difracción ha resultado útil para estimar el rendimiento de la reacción de complejación. En el difractograma de un producto parcialmente encapsulado se pueden observar, Figura 3.5, los máximos de difracción correspondientes al biocida puro, que desaparecen cuando el producto se encuentra totalmente encapsulado.

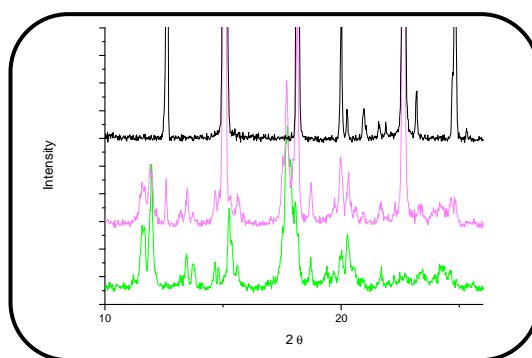


Fig 3.5. Difractogramas de Rayos-X de: Acetamidrid puro (**negro**), encapsulado parcial (**fucsia**), complejo de inclusión total obtenidos por el método de disolución con disolventes orgánicos (**verde**)

²⁴⁸Morales A., Strppe J., Meléndez E. Host-guest between niobocene dichloride and α -, β -, and γ -cyclodextrins: preparation and characterization. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 2008; 60: 263-270.

²⁴⁹Farcas A., Jarroux N., Farcas AM., Harabagiu V., Guegan P. Synthesis and Characterization of Furosemide complex in Cyclodextrin. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 2006; 2: 55-60.

Difracción de RX de monocristal

Los experimentos realizados para la obtención de un monocristal, de los distintos complejos de inclusión, sólo proporcionaron un resultado positivo para el encapsulado formado por el insecticida nicotinoide acetamiprid, Figura 3.6.

Los cristales del complejo de inclusión acetamiprid:CD pierden cristalinidad y se fragmentan en unas pocas horas al aire, por lo que tras visualizar la muestra en sus aguas madres con una lupa con polarizadores cruzados, se eligió un monocristal de buena calidad óptica y caras bien formadas, e inmediatamente se sumergió en aceite Paratone N, se montó en una "plumilla" Mitegen y se enfrió a 100 K en el difractor.



Fig.3.6. Imagen ampliada del monocristal del complejo de inclusión acetamiprid:CD, montado en la "plumilla".

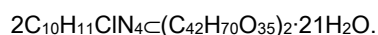
En la Tabla 3.4, se recogen los datos cristalográficos y físicos del sistema cristalino del complejo de inclusión acetamiprid:CD, así como las condiciones experimentales de refinamiento utilizadas.

Aunque los datos presentan buena calidad, y el cristal no se degradó apreciablemente durante la toma de datos, las moléculas de acetamiprid dentro de la cavidad de CD presentan un alto grado de desorden, que aún no se ha conseguido modelar de forma adecuada.

Tabla 3.4. Datos físicos y cristalográficos del sistema acetamiprid:CD, junto con las condiciones de refinamiento utilizadas.

Datos Físicos y Cristalográficos		Condiciones de refinamiento	
Fórmula	2C₁₀H₁₁ClN₄·(C₄₂H₇₀O₃₅)₂·21H₂O	Software	SIR2004 ²⁵⁰ SHELXL97 ²⁵¹
PM (g·mol⁻¹)	3093.6	Número de variables	1701
Sistema cristalino	Triclínico	Número de restricciones	59
Grupo especial	P1	Δσ máximo	0.018
a (Å)	15.0973(7)	Δσ media	0.001
b (Å)	15.4655(5)	Δρ máximo (eÅ⁻³)	1.91
c (Å)	15.6155(6)	Δρ mínimo (eÅ⁻³)	-1.07
α(°)	86.899(3)	S (GOF)	1.008
β(°)	82.039(4)	R(F) (I>2σ, todos los datos)	0.0912, 0.1216
γ(°)	76.189(4)	R_w(F²)^{int} (I>2σ, todos los datos)	0.2398, 0.2556
V (Å³)	3504.8(2)		
Z	1 (Z'=1)		
F (000)	1646		
μ (MoKα) (mm⁻¹)	0.145		
D_x (g·cm⁻³)	1.330(1)		
Morfología	Prisma		
Color	Incoloro		
Tamaño (mm)	0.51x0.26x0.22		

La estructura cristalina obtenida es quirál (grupo espacial P1). En la unidad asimétrica se localizaron claramente dos moléculas de CD y 21 moléculas de agua de hidratación. En este punto, la densidad electrónica residual ($\Delta\rho$) se concentra claramente en el interior del dímero formado por las dos ciclodextrinas (Figura 3.7). Un análisis detallado de la forma e intensidad de la unidad asimétrica indica sin duda la presencia de acetamiprid, probablemente dos moléculas desordenadas en cuatro posiciones. Hasta el momento, se han conseguido modelar sólo dos de las posiciones y todavía queda una elevada densidad residual, lo que hace que los factores de ajuste y calidad del refinamiento (R, R_w , S, $\Delta\rho$ recogidas en la Tabla 3.3) no sean aceptables dada la calidad de los datos. Sin embargo, se puede proponer como fórmula preliminar y probable del compuesto:



²⁵⁰Burla MC., Caliendo R., Camalli M., Carrozzini B., Cascarano GL., De Caro L., Giacovazzo C., Polidori G., Spagna R. SIR2004. Journal of Applied Crystallography, 2005; 38: 381-388.

²⁵¹Sheldrick GM. SHELX97. Acta Crystallographic, 2008; 64: 112-122.

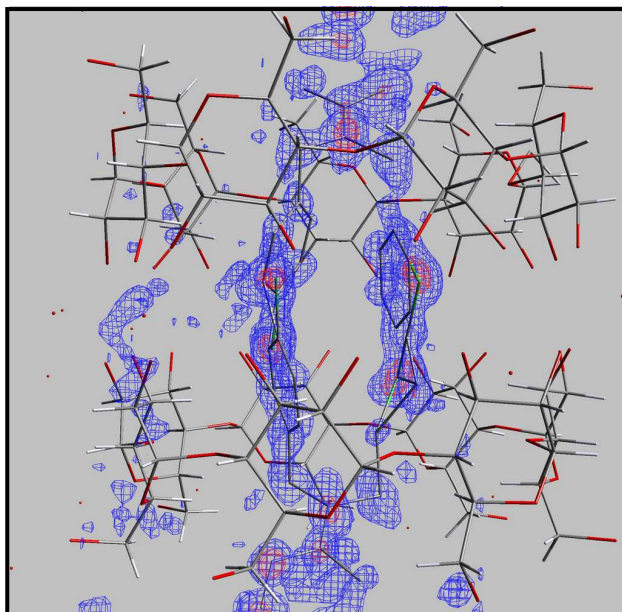


Figura 3.7. Mapa de densidad electrónica residual en el interior de las ciclodextrinas calculado tras localizar y refinar las dos moléculas de CD y 21 moléculas de agua.

Cada molécula de CD expone hacia el exterior los grupos hidroxilo unidos al anillo (cara A) y los grupos $-\text{CH}_2-\text{OH}$ (cara B) (Fig. 3.8). Las dos moléculas de CD forman un dímero con las caras A enfrentadas, mediante la formación de numerosos enlaces de hidrógeno $-\text{OH}\cdots\text{O}$.

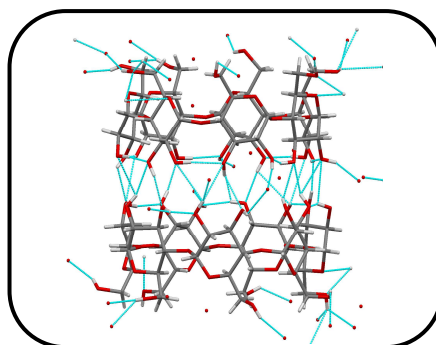


Figura 3.8. Dímero formado por dos moléculas de CD.
Detalle de los enlaces de hidrógeno entre grupos hidroxilo, en los que también intervienen las moléculas de agua de hidratación.

En la cavidad del dímero se localizan dos moléculas de E-acetamiprid, con los grupos cloropiridina hacia el centro del dímero y los grupos nitrilo sobresaliendo del mismo (Figura 3.9a). Respecto a cada monómero, la molécula de acetamiprid expone hacia el exterior los grupos cloro y nitrilo (Figura 3.9b)

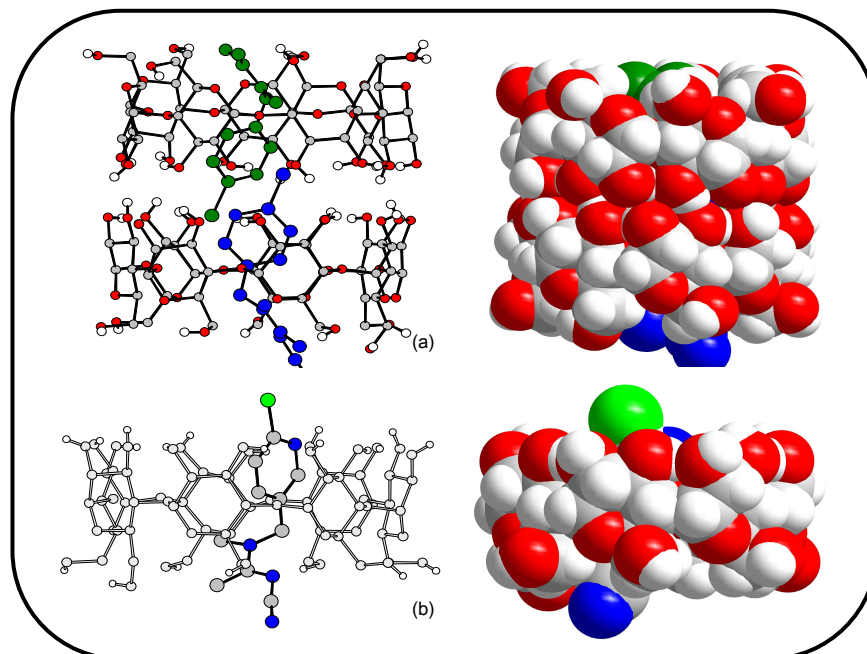


Figura 3.9. (a) Moléculas de acetamiprid en el interior del dímero de CD.

(b) Detalle de la disposición de acetamiprid respecto a CD.

Átomos de La molécula de acetamiprid: N-azul. Cl-verde. C-gris.

Los dímeros interaccionan entre sí por las caras B (grupos $-\text{CH}_2-\text{OH}$) mediante numerosos puentes de hidrógeno a través de las moléculas de agua de hidratación, para dar lugar a columnas en las que cada dímero se encuentra desplazado lateralmente respecto a sus vecinos superior e inferior (Figura 3.10a). Estas columnas se disponen todas en la misma dirección, e interaccionan lateralmente a través de enlaces de hidrógeno con las moléculas de agua de hidratación que llenan las cavidades entre ellas (Figura 3.10b). Es precisamente esta disposición en columnas de las moléculas de agua, lo que favorece la eliminación del agua del cristal al sacarlo de la disolución y, por tanto, la causa de su inestabilidad y rápida pérdida de cristalinidad si no se protege.

Se puede concluir que, en la estructura de acetamiprid:CD, hay una molécula de acetamiprid por cada CD (1:1), que se presentan en forma de dímeros.

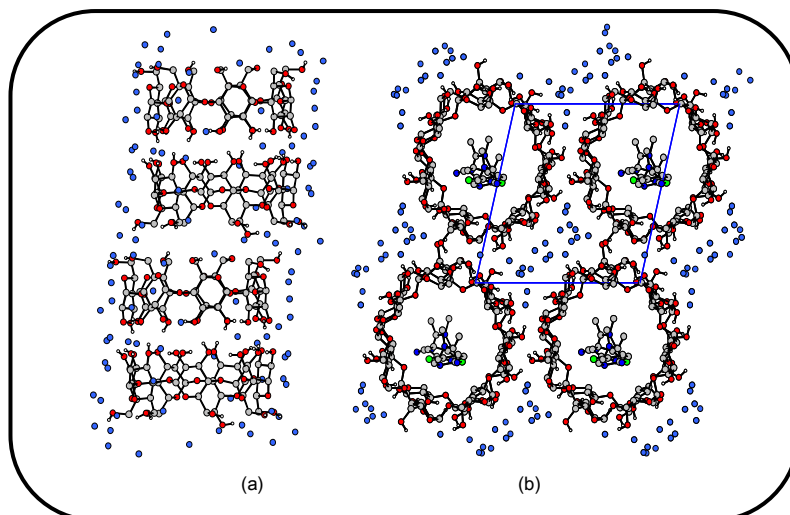


Figura 3.10. Columnas de CD.

(a) Vista lateral, con las moléculas de acetamiprid omitidas por claridad. (b) Vista superior.

Las moléculas de agua se representan en color azul para diferenciarlas de los grupos hidroxilo.

A la vista de estos resultados, la estructura del cristal puede clasificarse según Saenger y col.²⁵² como tipo canal, ya que las moléculas de CD se disponen unas detrás de las otras.

Mediante esta técnica de difracción de RX de monocristal, sólo se ha podido resolver la estructura de uno de los complejos de inclusión formados, acetamiprid:CD, debido a la difícil obtención del monocristal. Con el fin de obtener información estructural sobre el resto de los complejos de inclusión, se ha utilizado la espectrofotometría infrarroja con transformada de Fourier. Asimismo, los espectros FT-IR correspondientes al complejo de inclusión acetamiprid:CD, previamente caracterizado estructuralmente mediante difracción de RX de monocristal, nos permitirá comprobar la validez de la técnica FT-IR para el fin propuesto.

²⁵²Saenger W., Jacob J., Gessler K., Steiner T., Hoffmann D., Sanbe H., Koizumi K., Smith SM., Takaha T. Structures of the common cyclodextrins and their larger analogues-beyond the doughnut. *Chemical Review*, 1998; 98: 1787-1802.

Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)

En las Figuras 3.11-3.14 se recogen los espectros de infrarrojo de cuatro de los sistemas biocida:CD representativos.

Los espectros de infrarrojo del complejo de inclusión y la mezcla física, biocida+CD, son similares, aunque presentan ciertas diferencias en sus bandas de absorción.

Es de reseñar la dificultad de obtener información estructural completa del complejo biocida:CD debido al solapamiento de algunas de las bandas características del biocida con las propias de la CD.

En la Figura 3.11, se muestran las bandas de los espectros de infrarrojo del sistema acetamiprid:CD. Se puede destacar que las bandas características del grupo imina (C=N) a 1600 cm^{-1} y del grupo nitrilo (C≡N) a 2230 cm^{-1} , siguen apareciendo en el encapsulado, lo que significa que la molécula de acetamiprid no están enlazada mediante estos grupos a la CD. En cambio, las bandas del insecticida **acetamiprid** de alrededor de 3000 cm^{-1} han desaparecido en el complejo, indicando que los grupos causantes de estas bandas están incluidos en la cavidad de la CD.

Estos hechos concuerdan con los resultados obtenidos mediante los estudios de RX de monocristal, en los cuales se recoge como el acetamiprid se introduce en la cavidad de la CD por la parte de la molécula que presenta el grupo Cl, siendo la zona del grupo nitrilo e imina la única parte de la molécula de acetamiprid que no establece interacción con la molécula de CD.

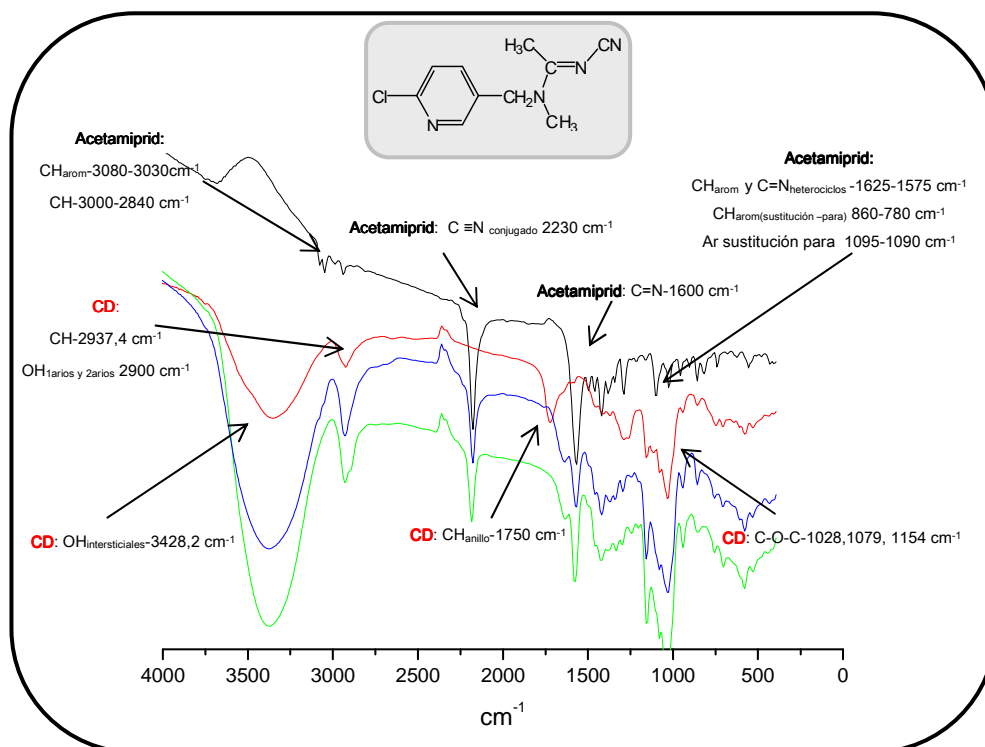


Fig. 3.11. Espectro infrarrojo de Acetamiprid (negro), CD (roja), mezcla física (azul) y complejo de inclusión (verde).

En los espectros de los complejos de inclusión del resto de los insecticidas nicotinoides de estequiometría 1:2, imidacloprid y tiacloprid recogidos en el Anexo VI, se observan las bandas de N-nitroimidazolidin-2-ilideneamina a aproximadamente 1600 cm^{-1} para **imidacloprid** y las del grupo nitrilo a 2250 cm^{-1} y del grupo $\text{C}=\text{N}-\text{CN}$ a 1625 cm^{-1} para **tiacloprid:CD**, lo que indica que estos grupos se encuentran fuera de las dos moléculas de CD.

En el espectro FT-IR del complejo de inclusión del piretroide **bifentrina:CD**, Figura 3.12, se observa la banda a 1750 cm^{-1} , característica del grupo $\text{C}=\text{O}$ de la bifentrina, lo que indica que esta parte de la molécula se encuentra fuera de las dos moléculas de CD. Un comportamiento semejante muestran los piretroides **praletrina**, **permetrina**, **esbiotrina**, **tetrametrina**, **fenotrina**, α -**cipermetrina**, **deltametrina** y **ciflutrina**, cuyos espectros se recogen en el Anexo VI.

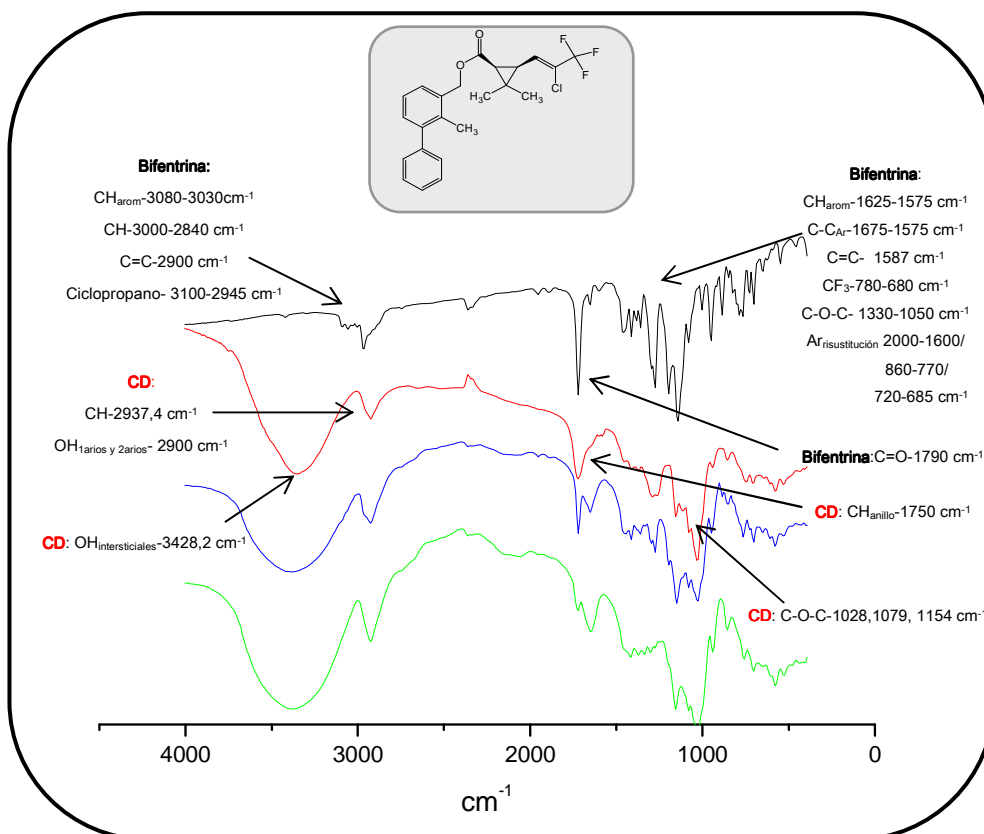


Fig. 3.12. Espectro infrarrojo de Bifentrina (negro),
CD (roja), mezcla física (azul) y complejo de inclusión (verde).

Del estudio de los espectros FT-IR del sistema **bendiocarb:CD**, Figura 3.13, se puede concluir que la mayor parte de la molécula se encuentra dentro de la cavidad de la CD, ya que en el espectro del complejo de inclusión no aparecen las bandas características de las aminas secundarias a 3450 cm^{-1} ni las del grupo ester, a aproximadamente 1700 cm^{-1} , lo cual indica que la vibración queda restringida por la aparición de enlaces intermoleculares con la CD. En cambio, en los espectros de la mezcla física las bandas correspondientes a las aminas secundarias aparecen solapadas con las propias de los OH^- intersticiales de la CD a 3428,2 cm^{-1} y las del grupo ester con la banda de los enlaces $\text{C}-\text{H}$ de la CD, a 1700 cm^{-1} .

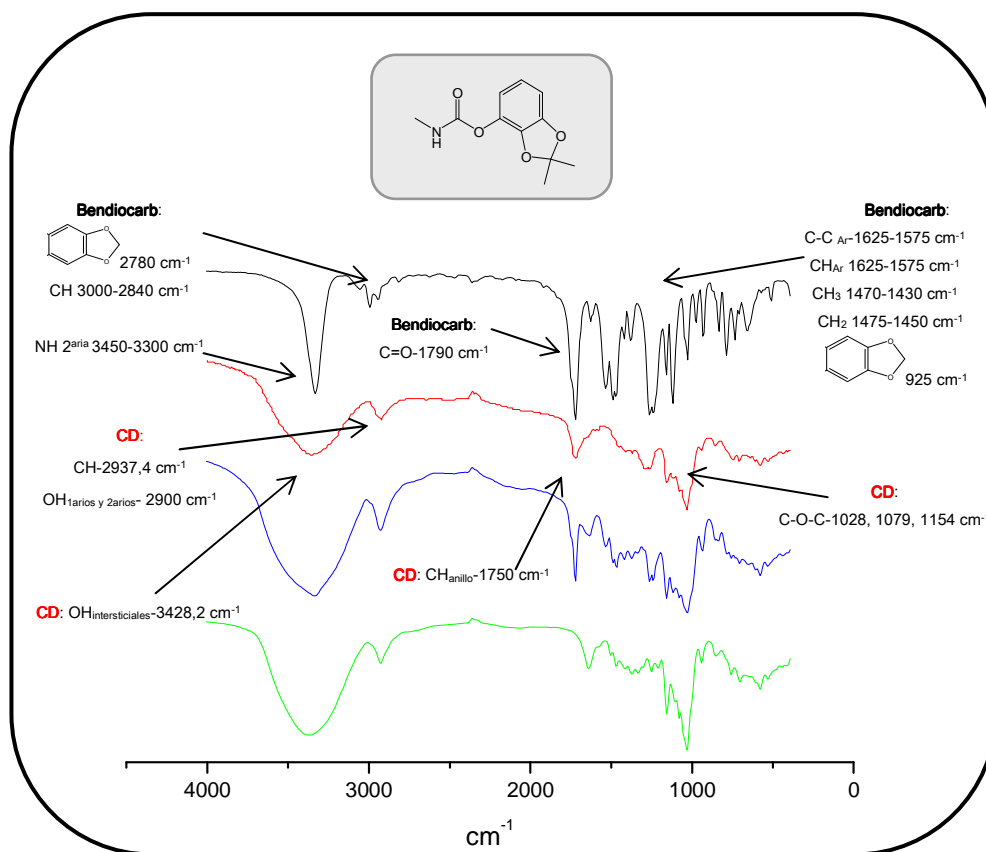


Fig. 3.13. Espectro infrarrojo de Bendiocarb (**negro**), CD (**roja**), mezcla física (**azul**) y complejo de inclusión (**verde**).

El espectro FT-IR en disolución del sinergista **Bp**, Figura 3.14, presenta la banda correspondiente a los enlaces C-Cl a 770-735 cm⁻¹, debida a la utilización de cloroformo como disolvente. El solapamiento observado en algunas de las bandas del espectro FT-IR, junto con la imposibilidad de preparación de la mezcla física, hacen que no se pueda obtener una información concluyente sobre que enlaces del Bp interaccionan con la CD en el producto encapsulado, pero conocido el volumen de la molécula de Bp (Tabla 1.4), superior a la cavidad de la CD, se puede asegurar que parte de la molécula se encuentra fuera de la cavidad de la CD.

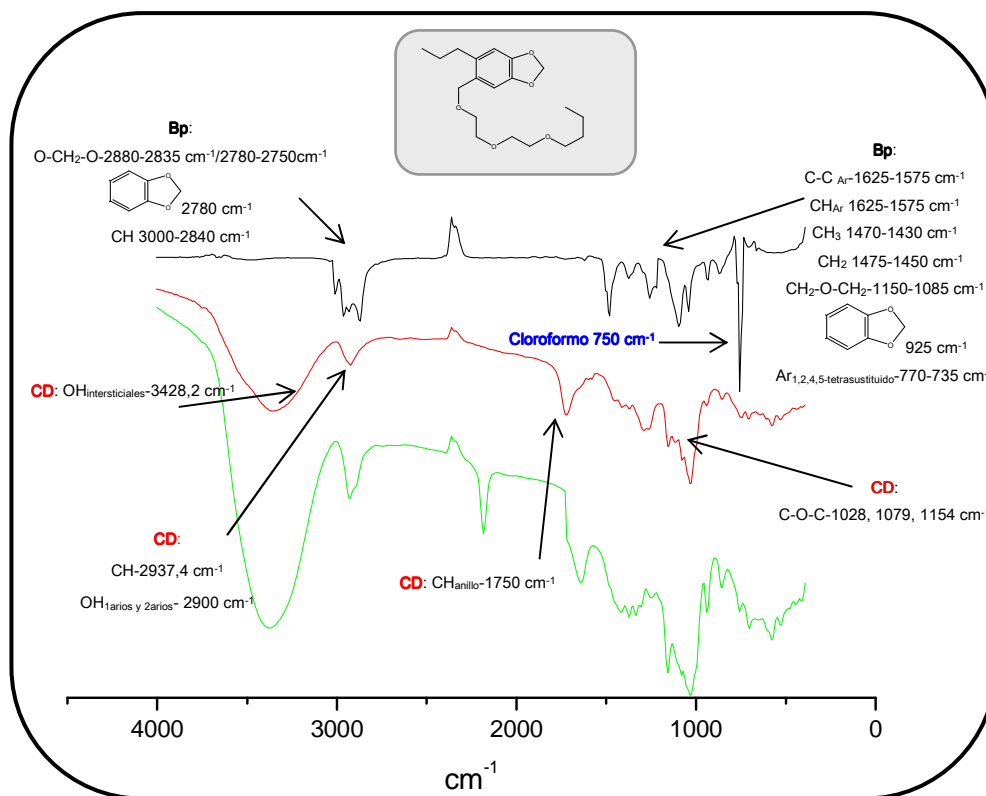


Fig. 3.14. Espectro infrarrojo de Bp (negro), CD (rojo), mezcla física (azul) y complejo de inclusión (verde).

Por otra parte, el desplazamiento de las bandas de vibración correspondientes a los enlaces C-H de 1750 a 1600 cm^{-1} , observados en el espectro de la CD, es atribuido a la interacción CD:biocida, como ha sido propuesto por diversos autores en los estudios de sistemas en los que participan CDs ^{253,254,255,256,257,258}.

²⁵³García-Zubiri G., Alez-Gaitano M., Infrared study of solid dispersions of β -cyclodextrin with naphthalene derivatives. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 2004; 49: 291–302.

²⁵⁴Yuan C., Jin Z., Xu X., Zhuan H., Shen W. Preparation and stability of the inclusion complex of astaxanthin with hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Food chemistry*, 2008; 109: 264–268.

²⁵⁵Stancanelli R., Cupi V., De Luca L., Ficarra P., Ficarra R., Gitto R., Guardo M., Iraci N., Majolino D., Tommasini S., Venuti V. Improvement of water solubility of non-competitive AMPA receptor antagonist by complexation with β -cyclodextrin. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 2008; 16: 8706–8712.

²⁵⁶Prakash Rao B., Suresh S., Narendra C. Physicochemical characterization of β -cyclodextrin and hydroxy ethyl β -cyclodextrin complexes of Rifampicina. *Ars Pharma*, 2006; 47 (1): 37–59.

²⁵⁷Zhou S., Wang L., Zhang A., Lin K., Liu W. Preparation, Stabilization, and Bioefficacy of β -Cyclodextrin Inclusion Compounds of Chloramidophos. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2008; 56: 2708–2713.

La espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier, no establece, por sí sola, las interacciones que tienen lugar en el producto encapsulado, pero una vez asegurada la microencapsulación mediante otras técnicas analíticas, permite conocer, en la mayoría de los casos, los enlaces que se encuentran fuera de la cavidad de la CD.

²⁵⁸Son LX., Wang HM., Guo XQ., Bai L. Comparative Study on the Binding Behaviors of β -Cyclodextrin and Its Two Derivatives to Four Fanlike Organic Guests. *Journal of Organic Chemistry*, 2008; 73 (21): 8305-8316.

Espectroscopía de resonancia magnética nuclear de ^{13}C en estado sólido (RMN- ^{13}C):

Esta técnica ha sido aplicada para intentar elucidar la estructura de aquellos complejos de inclusión que son relativamente insolubles en agua y que no pueden ser determinados mediante resonancia magnética nuclear en estado líquido.

Se ha estudiado el sistema α -cipermetrina:CD mediante RMN- ^{13}C , con el fin de comprobar la utilidad de esta técnica para este tipo de compuestos. En la Figura 3.15 se muestran los espectros de RMN- ^{13}C del insecticida piretroide elegido, de la CD y del complejo de inclusión formado, así como la asignación de los carbonos en la estructura.

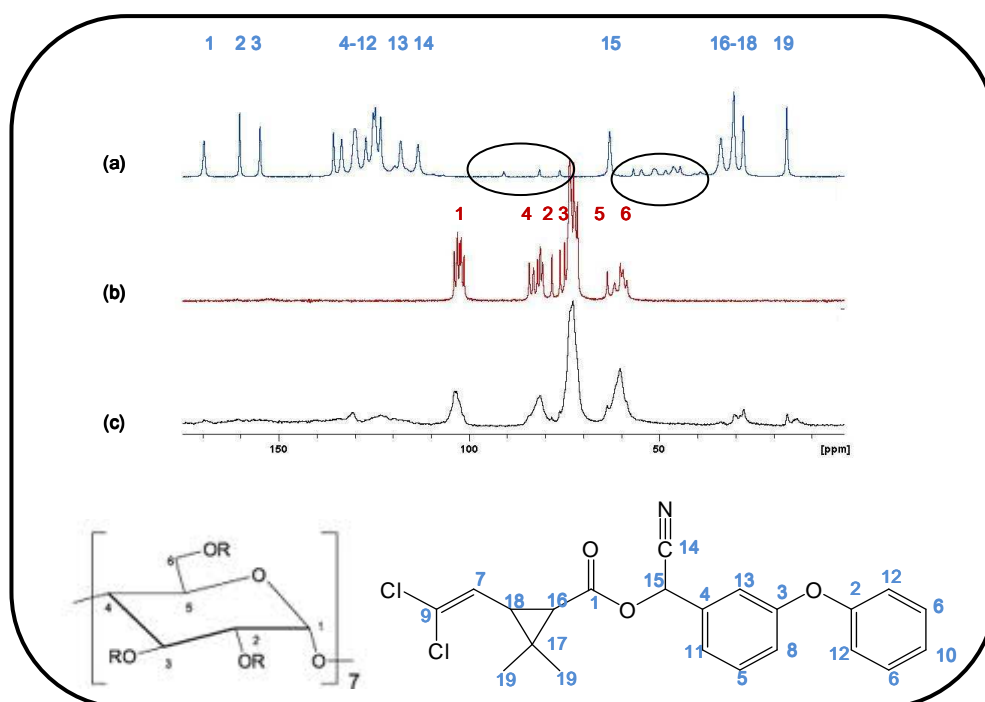


Fig. 3.15. Espectro RMN- ^{13}C de: (a) α -cipermetrina, (b) CD y (c) complejo de inclusión biocida:CD. (Asignación de los carbonos de las estructuras de biocida y CD. (Los círculos representan las *sidebands*).

En el espectro del biocida se pueden observar las bandas denominadas *spinning sidebands*. A pesar de que, como hemos comentado anteriormente, se utiliza MAS para mejorar la resolución, no se consigue eliminar la aparición de estas bandas. Para ello se deberían utilizar imanes de campos muy altos y sondas que permitieran girar a velocidades muy altas, aproximadamente a 70KHz.

En cuanto al estudio del complejo de inclusión de α -cipermetrina con la CD, se observa una pérdida de la resolución en las señales del complejo de inclusión respecto a las señales de los biocidas libres. Ésto se debe a la dispersión del desplazamiento químico, lo cual indica que se ha formado un enlace entre el biocida y la CD^{259,260,261}.

En el complejo de inclusión se puede observar el decrecimiento de las señales de los átomos de C del biocida marcados mediante los números 1, 2, 3, 4, 6, 12, 13 y 14, por un lado debido a la pérdida de resolución y a que la proporción del biocida en el encapsulado es menor que la de CD, 1:2 (biocida:CD). Además el C número 15 se encuentra solapado con los átomos de la CD. Por lo cual no podemos obtener información acerca de la estructura del complejo de inclusión a partir de esta técnica.

²⁵⁹Ribeiro ACF., Lobo VMM., Valente AJM., Simo SMN., Sobral AJFM., Ramos ML. Association between ammonium monovanadate and β -cyclodextrin as seen by NMR and transport techniques. *Burrows Polyhedron*, 2006; 25: 3581–3587.

²⁶⁰Cadars S., Foray MF., Gabelle A., Gerbaud G., Bardet M. High-resolution solid-state ¹³C NMR study of per(3,6-anhydro)- α -cyclodextrin based polymers and of their chromium complexes. *Carbohydrate Polymers*, 2005; 61: 88–94.

²⁶¹Chen Y., Huber JG., Zhang Y., Sinaÿ P. Communication/Preliminary communication Regioselective one-step synthesis of hexahydroxy permethylated β -cyclodextrin and unambiguous NMR analysis. *Comptes Rendus Chimie*, 2005; 8: 27–30.

3.4.2. Caracterización de los complejos de inclusión Biocida:CD en disolución

Una de las técnicas que permite caracterizar estructuralmente un complejo de inclusión en estado líquido es la resonancia magnética nuclear de protón.

Espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protón (RMN- ^1H):

En la Figura 3.16 se muestra la estructura de la CD junto con su espectro de RMN- ^1H . Para la interpretación de los experimentos de RMN- ^1H se consideran a los protones H3 y H5 como los protones situados dentro de la estructura de la CD y como protones exteriores los H1, H2, H4 y H6.

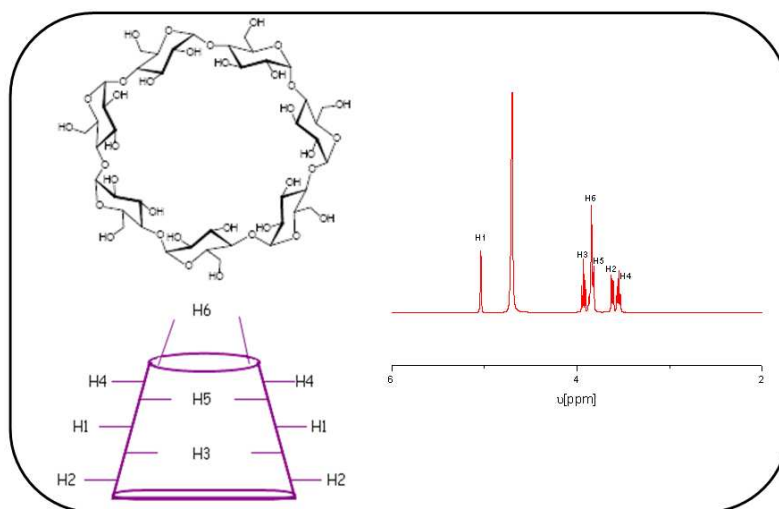


Figura 3.16. Estructura y espectro de RMN- ^1H de CD.

En las Figuras 3.17-3.20 se recogen las estructuras químicas junto con los espectros de RMN- ^1H de los biocidas más solubles en agua, los nicotinoides y el carbamato bendiocarb, así como la superposición de los espectros del complejo de inclusión con los de la CD y del biocida, ampliados por zonas.

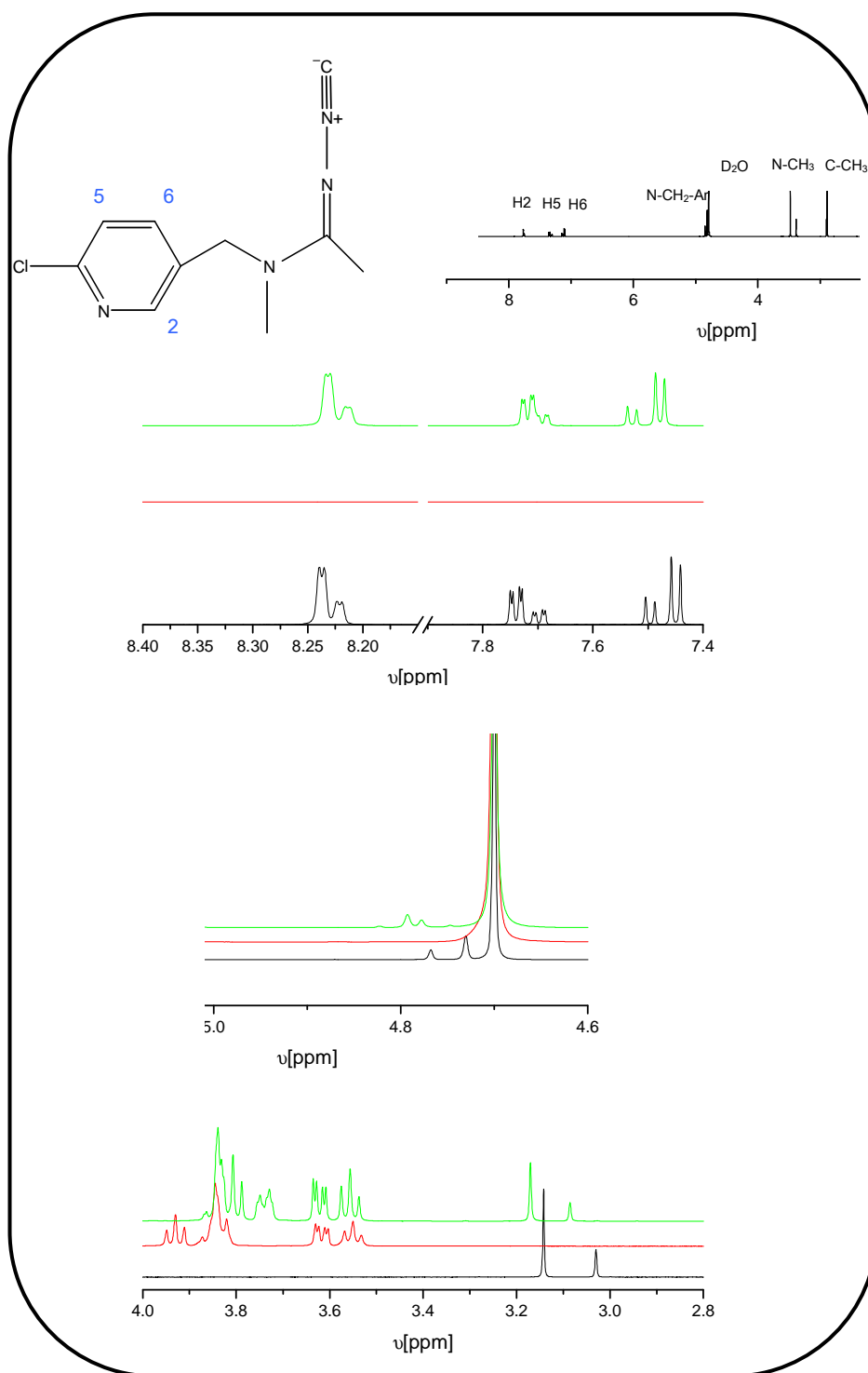


Figura 3.17. Espectros de RMN- ^1H del sistema acetamiprid:CD, acetamiprid puro (negro), CD (rojo) y complejo de inclusión(verde).

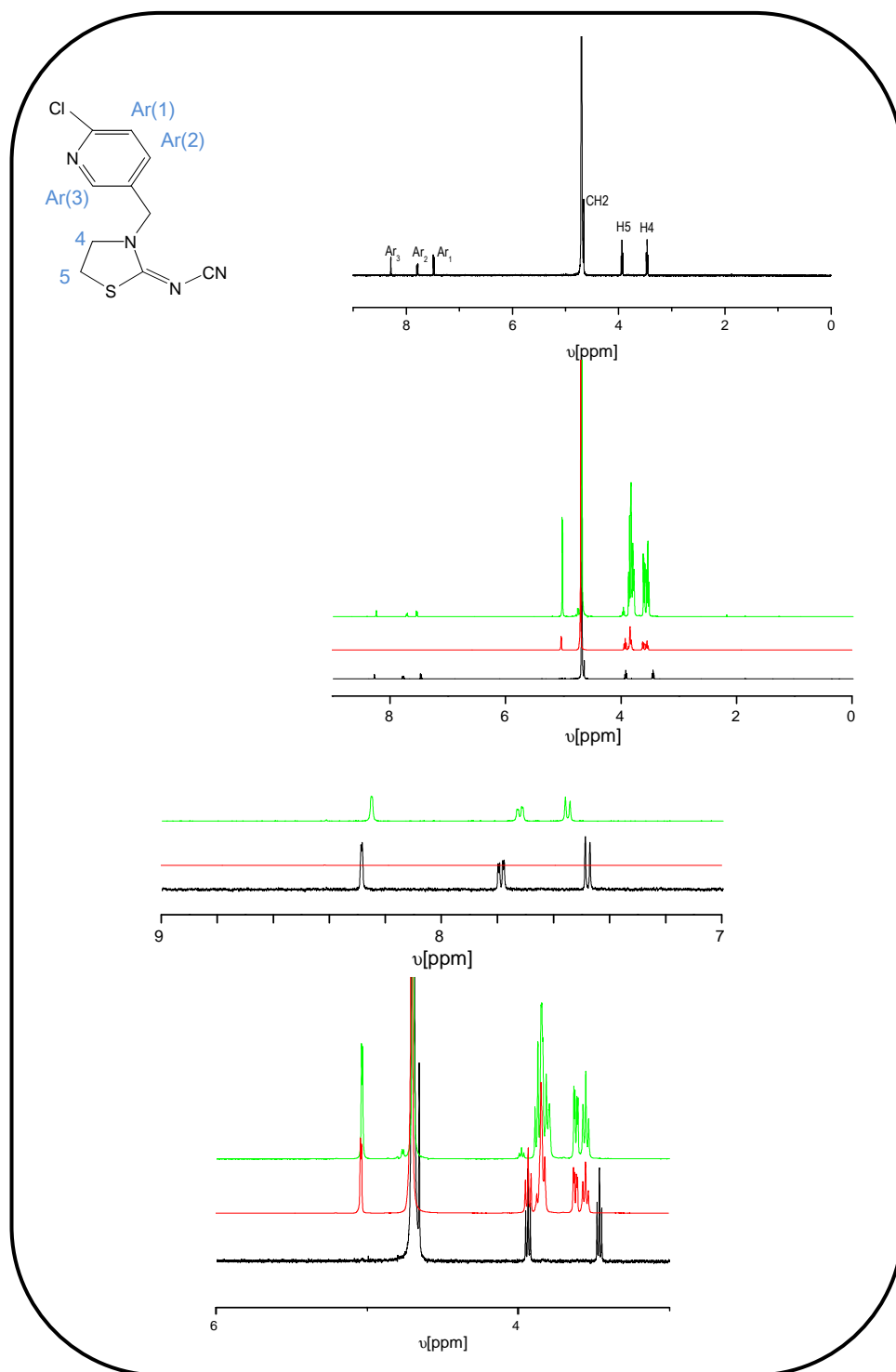


Figura 3.18. Espectros de RMN- ^1H del sistema Tiacloprid:CD, Tiacloprid puro (negro), CD (rojo) y complejo de inclusión(verde).

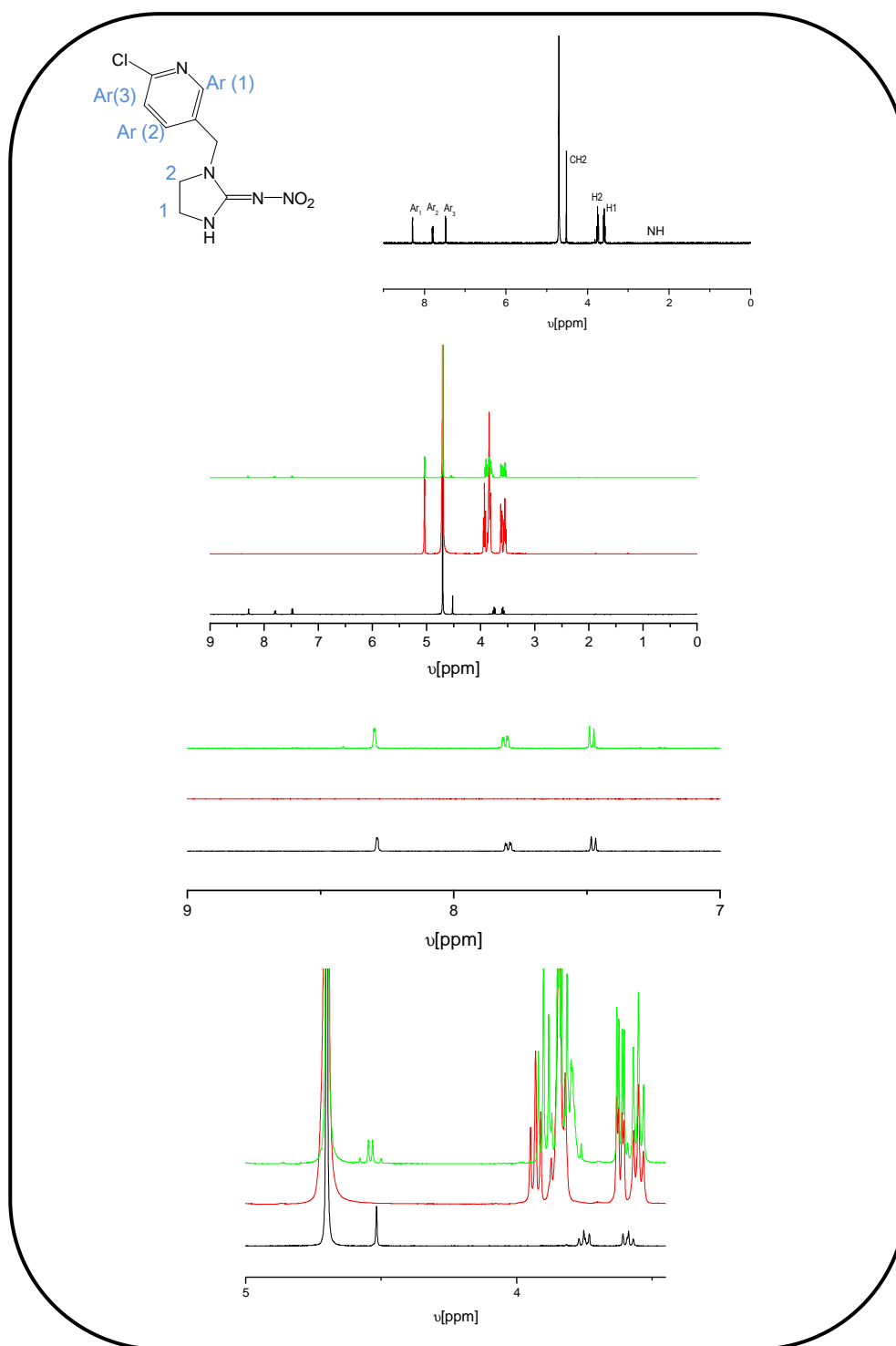


Figura 3.19. Espectros de RMN- ^1H del sistema Imidacloprid:CD, Imidacloprid puro (negro), CD (rojo) y complejo de inclusión (verde).

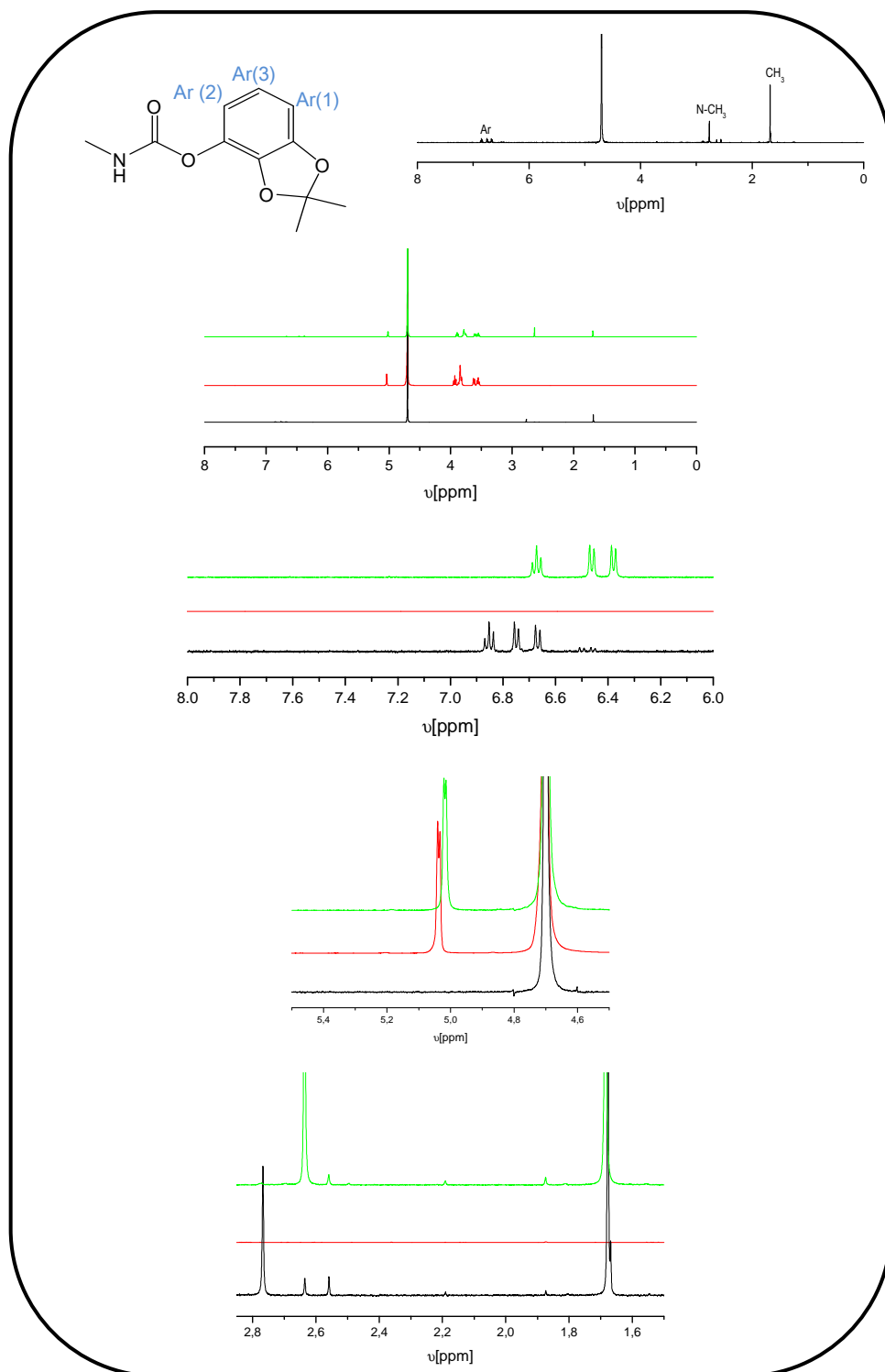


Figura 3.20. Espectros de RMN- ^1H del sistema Bendiocarb:CD, Bendiocarb puro (negro), CD (rojo) y complejo de inclusión (verde).

En las Tablas 3.4-3.7 se recogen las asignaciones de los protones²⁶² junto con aquellas variaciones significativas de los desplazamientos de las señales de protón ($\Delta\delta$) del complejo de inclusión con respecto a los de las sustancias puras. Estas variaciones implican cambios estructurales que pueden atribuirse a la formación de un complejo de inclusión biocida:CD^{263,264,265}.

En los espectros de RMN-¹H para el sistema **acetamiprid:CD**, Figura 3.17, se observan desplazamientos significativos recogidos en la Tabla 3.4, de donde se puede deducir que el acetamiprid se enlaza con los hidrógenos 3 y 5 de la CD por el anillo aromático, los grupos metilo y metileno, lo cual corrobora los resultados obtenidos mediante RX de monocristal.

Tabla 3.4. Desplazamientos de protón $\Delta\delta$ (ppm) del complejo de inclusión acetamiprid:CD(ci), en comparación con la señales de las sustancias puras.

Acetamiprid	δ_{pura}	δ_{ci}	$\Delta\delta$
H6	7,719	7,628	0,091
H5	7,473	7,512	0,039
CH ₃	2,441	2,475	0,034
N-CH ₂ -Ar	4,772	4,784	0,013
N-CH ₃	3,119	3,103	0,017
β -CD	δ_{pura}	δ_{e}	$\Delta\delta$
H3	3,930	3,824	0,106
H5	3,821	3,755	0,066

En los espectros de RMN-¹H para el sistema **tiacloprid:CD**, Figura 3.18, se observan desplazamientos significativos recogidos en la Tabla 3.5, de donde se puede deducir que el tiacloprid se enlaza mediante los hidrógenos 2-6 de la CD por el anillo aromático y por el ciclo tiazolin.

²⁶²Herrera A., Martínez R. Tablas para la determinación estructural por métodos espectroscópicos, 1990. Springer-Verlag, New York, pp. 155-237.

²⁶³Ficarra R., Tommasini S., Raneri D., Calabro ML., Di Bella MR., Rustichelli C., Gamberini MC., Ficarra P. Study of flavonoids β -cyclodextrins inclusion complexes by NMR, FT-IR, DSC, X-ray investigation. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2002; 29: 1005–1014.

²⁶⁴Anguiano-Igea FJ., Otero-Espinar JL., Vila-Jato J. Interaction of clofibrate with cyclodextrin in solution: phase solubility, ¹H NMR and molecular modelling studies. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 1997; 5: 215–221.

²⁶⁵Balmas V., Delogu G., Sposito S. Use of a complexation of tebuconazole with α -cyclodextrin for controlling foot and crown rot of durum wheat Incited by Fusarium Culmorum. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2006; 54: 480.

Tabla 3.5. Desplazamientos de protón $\Delta\delta$ (ppm) del complejo de inclusión tiacloprid-:CD(ci), en comparación con la señales de las sustancias puras.

Tiacloprid	δ_{Ti}	δ_{Ci}	$\Delta\delta$
Ar (1)	7,4805	7.5541	-0,074
Ar (2)	7,7916	7.7221	0,070
Ar (3)	8,2881	8.2529	0,035
H4	3,4657	3.8049	-0,339
H5	3,9384	3.8718	-0,067
CH ₂	4,6579	4.80	-0,142
β-CD	δ_{free}	δ_{e}	$\Delta\delta$
H2	3,6170	3,5554	0,662
H3	3,9299	3,9809	-0,051
H4	3,5502	3,6108	-0,061
H5	3,8208	3,8395	0,018
H6	3,8589	3,8492	0,010

En los espectros de RMN-¹H para el sistema **imidacloprid:CD**, Figura 3.19, se observan los desplazamientos significativos recogidos en la Tabla 3.6, de donde se deduce que la molécula de imidacloprid interacciona con la CD por su parte central, ya que no interacciona con la de CD en la posición 3 del anillo aromático y no se puede asegurar nada acerca de los protones del anillo imidazolidino, H1 y el unido al N, ya que la señal del primero está solapada por los protones de la CD y el segundo es tan débil que no se distingue bien en el complejo de inclusión.

Tabla 3.6. Desplazamientos de protón $\Delta\delta$ (ppm) del complejo de inclusión imidacloprid:CD(ci), en comparación con la señales de las sustancias puras.

Imidacloprid	δ_{Ti}	δ_{Ci}	$\Delta\delta$
H1	3,589	*	*
H2	3,752	3,780	0,028
CH ₂	4,517	4,5004	0,017
Ar(1)	8,287	8,298	-0,010
Ar (2)	7,790	7,806	-0,016
β-CD	δ_{free}	δ_{e}	$\Delta\delta$
H3	3,930	3,901	0,0291

*por solapamiento de espectros es imposible deducir el desplazamiento de la señal.

En los espectros de RMN-¹H para el sistema **bendiocarb:CD**, Figura 3.20, se observan los desplazamientos significativos recogidos en la Tabla 3.7, a partir de los cuales se puede deducir que la molécula de bendiocarb establece interacción con los hidrógenos 1-6 de la CD. Por lo tanto, toda la molécula de bendiocarb está incluida en la CD, lo que corrobora los resultados obtenidos mediante espectroscopía FTIR.

Tabla 3.7. Desplazamientos de protón $\Delta\delta$ (ppm) del complejo de inclusión bendiocarb:CD (ci), en comparación con la señales de las sustancias puras.

Bendiocarb	δ_{Bend}	δ_{ci}	$\Delta\delta$
Ar(1)	6,668	6.379	-0.289
Ar(2)	6,750	6.462	-0.288
Ar(3)	6,853	6.671	-0.181
CH ₃	1.677	1.685	0.010
NCH ₃	2,767	2,800	-0,033
β-CD	δ_{free}	δ_{e}	$\Delta\delta$
H1	5.037	5.018	0.019
H2	3.617	3.548	0.069
H3	3.930	3,893	0.037
H4	3.550	3.602	-0.052
H5	3,821	3,753	0.068
H6	3,859	3.785	0.074

Como se puede observar, en todos los casos son, sobre todo, los protones H3 y H5 de la CD los que han sufrido cambios. Lo que quiere decir que, es a través de estos átomos por donde se establece el enlace intermolecular, lo que concuerda con la bibliografía consultada^{266,267}.

²⁶⁶Son LX., Wang HM., Guo XQ., Bai L. Comparative Study on the Binding Behaviors of β -Cyclodextrin and Its Two Derivatives to Four Fanlike Organic Guests. *Journal of Organic Chemistry*, 2008; 73(21): 8305-8316.

²⁶⁷Lu J., Mirau PA., Tonelli AE. Chain conformations and dynamics of crystalline polymers as observed in their inclusion compounds by solid-state NMR. *Progress in Polymer Science*, 2002; 27: 357.

Conclusiones:

❖El complejo de inclusión presenta una morfología diferente a la mezcla física biocida+CD, observada mediante **SEM**.

❖Según la **distribución del tamaño de partícula obtenida mediante dispersión láser y SEM**, podemos asegurar que los complejos de inclusión, aunque agregados, presentan un tamaño micrométrico, pudiendo clasificarse como **Microencapsulados**. Se pretende en un futuro realizar estudios mediante cryo-TEM para poder determinar exactamente el tamaño de la partícula obtenida.

❖Los microencapsulados obtenidos presentan naturaleza cristalina, lo cual ha sido observado mediante **RX**.

❖La estructura molecular del complejo de inclusión del **insecticida nicotinoide acetamiprid:CD** ha sido perfectamente definida a partir de la información de **RX de monocristal** y corroborada mediante técnicas de FTIR y RMN-¹H. Se propone como estructura más probable para este complejo de inclusión, según todas las técnicas estudiadas, la mostrada en la Figura 3.21.

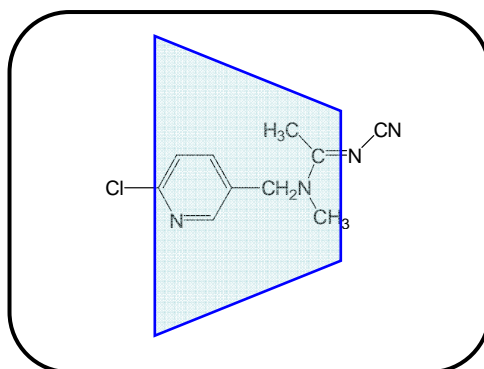


Fig. 3.21. Estructura propuesta para el complejo de inclusión acetamiprid:CD.

❖La estructura molecular de los complejos de inclusión de los **insecticidas nicotinoide, imidacloprid:CD y tiacloprid:CD y el carbamato bendiocarb:CD** ha sido elucidada gracias a la técnica de **RMN-¹H** en disolución y mediante FT-IR. En la Figura 3.22 se propone la estructura más probable para estos complejos de inclusión.

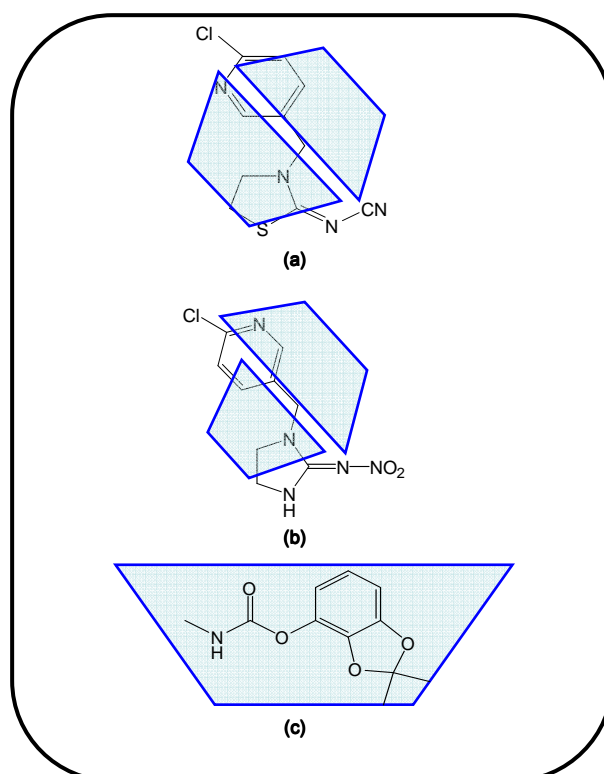


Fig. 3.22. Estructura propuesta para los complejos de inclusión (a) tiacloprid:CD, (b) imidacloprid:CD y (c) bendiocarb:CD

❖ La estructura molecular de los complejos de inclusión de los **insecticidas piretroides sólidos**, deltametrina:CD, bifentrina:CD, α -cipermetrina:CD y tetrametrina:CD ha sido elucidada mediante FT-IR. A modo de ejemplo, y por poseer estructuras similares, se muestra en la Figura 3.23 la estructura más probable para el complejo de inclusión de α -cipermetrina:CD.

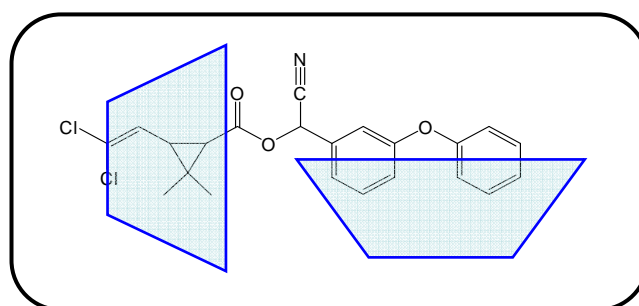


Fig. 3.23. Estructuras más probables para el complejo de inclusión α -cipermetrina:CD.

❖La elucidación estructural de los biocidas líquidos a temperatura ambiente, estudiados en esta memoria: el sinergista **Bp:CD** y los insecticidas piretroide **praletrina:CD**, **fenotrina:CD**, **ciflutrina:CD**, **esbiotrina:CD** y **permetrina:CD**, ha sido insuficiente debido a la falta de cristalinidad de los biocidas.