



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 IV:
PROPIEDADES DE LOS
MICROENCAPSULADOS BIOCIDA:CD



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

Capítulo 4 -

Propiedades de la microencapsulación biocida-CD

4.1. Introducción.....	129
4.2. Objetivo.....	142
4.3. Parte experimental	143
4.3.1. Estabilidad.....	143
4.3.2. Hidrosolubilidad de los productos microencapsulados.....	144
4.3.3. Eficacia del producto encapsulado.....	146
4.4. Resultados.....	149
4.4.1. Estabilidad.....	149
Test En Condiciones Atmosféricas Normales.....	151
Test Acelerado.....	154
Test De Stress.....	156
Caracterización de los productos de degradación.....	159
Test De Hidrólisis.....	167
4.4.2. Hidrosolubilidad de los productos microencapsulados.....	171
4.4.3. Solidificación de biocidas líquidos.....	172
4.4.4. Eficacia del producto encapsulado.....	173
CONCLUSIONES.....	176

4. PROPIEDADES DE LOS MICROENCAPSULADOS BIOCIDA:CD

4.1. INTRODUCCIÓN

La formación de los complejos de inclusión de los biocidas estudiados constituye la primera etapa para la posterior fabricación de un cebo medioambientalmente compatible que pueda ser elaborado en base agua, sea eficaz contra los insectos y aplicable en entornos ganaderos y humanos.

La encapsulación de biocidas con CDs tiene como objetivo fundamental modificar propiedades del biocida, según el interés requerido, en los productos comerciales²⁶⁸.

La microencapsulación con CDs, como ha quedado recogido en el Capítulo 1, presenta ventajas frente al biocida libre: proporciona protección contra la hidrólisis y la degradación inducida por la luz y el calor, lo que aumenta su estabilidad en condiciones de almacenamiento^{269,270,271,272,273}, permite conseguir un aumento de la solubilidad del biocida^{274,275,276,277,278,279,280} y facilita su manipulación²⁸¹.

²⁶⁸Singh M., Sharma R., Banerjee UC. Biotechnological applications of cyclodextrins. *Biotechnology Advanced*, 2002; 20: 341-359.

²⁶⁹Loftsson T., Brewster M. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1996; 85(10): 1017-1025.

²⁷⁰Uekama K., Hirayama F., Irie T. Cyclodextrin Drug Carrier Systems. *Chemical Review*, 1998; 98(5): 2045-2076.

²⁷¹Krenn MP., Gamcsik GB., Vogelsang OM., Leong KW. Improvements in solubility and stability of thalidomide upon complexation with hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Journal of Pharmaceutical Science*, 1992; 81: 685-689.

²⁷²Yuan 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: 264-2668.

²⁷³Szejtli J. Ciclodextrins in pesticidas. *Hungry Patent Application* 1984; 37 (11):386.390.

²⁷⁴Jing B., Chen X., Wang X., Yang C., Xie Y., Qiu H. Self-Assembly vesicles made from a cyclodextrin supramolecular complex. *Chemical European Journal*, 2007; 13: 9137 - 9142.

²⁷⁵Nagarsenker M., Joshi M., Celecoxib-cyclodextrin systems: characterization and evaluation of In vitro and in vivo advantage. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 2005; 31(2): 169-178.

La estabilidad determina la capacidad que tiene un principio activo o un producto de mantener durante un determinado tiempo sus propiedades originales, es decir, su calidad y eficacia. Los estudios de estabilidad tienen como objetivo proporcionar evidencias sobre la variación de la calidad de un compuesto con el tiempo, bajo la influencia de diferentes factores medioambientales: temperatura, humedad y luz²⁸², permitiendo establecer:

- Períodos de validez comprobados. Así, se puede asegurar que el principio activo y el producto mantendrán sus características de calidad bajo **condiciones naturales de almacenamiento**.
- Su impacto medioambiental. La mayor parte de los pesticidas, sufren procesos de degradación y transformación total o parcial, que conducen a la formación de nuevos productos, que en ocasiones, pueden ser más persistentes y peligrosos que los de partida. Estos compuestos están considerados como biomarcadores de la exposición a los biocidas²⁸³.
- **Seguridad** de la manipulación diaria por el operario.
- Método de **gestión de los residuos** obtenidos de estos biocidas (vías de eliminación).

Es importante señalar que, los estudios de estabilidad de los complejos de inclusión se referirán al tiempo que permanece el biocida dentro de la matriz de CD.

²⁷⁶Reddy MN., Rehana T., Ramakrishna S., Chowdary KPR., Diwan PV. β -Cyclodextrin complexes of celecoxib: Molecular modeling, characterization, and dissolution studies, AAPS Pharmaceutical Sciences, 2004; 6(1): 1–9.

²⁷⁷Rodis PS., Karathanos VT., Mantzavinou A. Partitioning of olive leaf antioxidants between oil and water phases. Journal of Agriculture Food Chemistry, 2002; 50: 596–601.

²⁷⁸Hassonville SHD., Perly B., Piel G., Hees TV., Barillaro V., Bertholet P., Delattre L., Evrard B. Inclusion Complexes of Cyproterone Acetate with Cyclodextrins in Aqueous Solution. Journal Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry, 2002; 44: 289.

²⁷⁹Rawat S., Jain SK. Solubility enhancement of celecoxib using β -cyclodextrin inclusion complexes. European Journal of Pharmaceutical Biopharma, 2004; 57: 263-267.

²⁸⁰Yañez C., Salazar R., Nuñez-Vergara LJ., Chaires L., Jimenez J., Marquez M., Ramos E. G. Aplicaciones biotecnológicas de la microencapsulación. Avance y perspectiva, 21.

²⁸¹Szente L., Szejtli J. Cyclodextrins as food ingredients. Trends Food Science Technology, 2004; 15: 137–142.

²⁸²ICH (International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use). Harmonised Tripartite Guideline. Stability testing of new drug substances and products-Q1A1 (R2), 2003.

²⁸³Elrassi Z. Isotope Dilution High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method for Quantifying Urinary Metabolites of Synthetic Pyrethroids Insecticides. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 2004; 46-3: 281-288.

Los estudios de estabilidad se realizan, para los complejos de inclusión y los biocidas libres, durante un período mínimo de tres meses, en base a métodos internacionalmente establecidos^{284,285} que comprenden diversos ensayos:

- **Test en condiciones atmosféricas** normales (temperatura y luz).
- **Test acelerado**, a una temperatura superior a la media anual (54 °C)²⁸⁶.
- **Test de stress**, en condiciones extremas de temperatura, humedad y luz.

El test de stress de un componente activo, permite identificar los productos de degradación estables, los cuales ayudan a conocer el mecanismo de degradación y la estabilidad intrínseca de la molécula. La naturaleza de este test dependerá de la sustancia a estudiar y del tipo de producto involucrado.

Este tipo de test se realiza empleando cámaras de envejecimiento, en las cuales se utilizan fuentes de luz como lámparas de Xenón o lámparas fluorescentes, bajo condiciones de temperatura y humedad controladas²⁸⁷. La radiación ultravioleta es la parte del espectro solar (4,6%) que causa la mayor degradación y, en concreto, la zona UVB, de longitudes de onda comprendidas entre 280-315 nm²⁸⁸ (Figura 4.1).

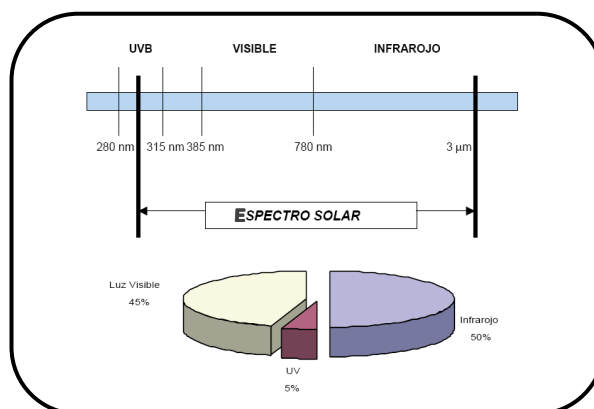


Fig. 4.1 Espectro de la luz ultravioleta y de radiación solar.
Porcentaje de luz UV en la luz solar.

²⁸⁴ICH (International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use). Stability testing of new drug substances and products, Q1A (R2), 2003.

²⁸⁵Guidance on the storage stability data requirements for non-agricultural pesticide products. BPU (HSE), 2004.

²⁸⁶Collaborative International Pesticides Analytical Council-Cipac Handbook. MT 46.3. Accelerated storage procedure. Miscellaneous techniques, 950-955.

²⁸⁷ICH Harmonised Tripartite Guideline. Stability testing: photostability of new drug substances and products-Q1B, 1996.

²⁸⁸Cabot Corporation, Productores de cámaras de test de stress. Boston- USA.

Las lámparas de Xenón proveen la mejor simulación de la luz solar natural, proporcionando un espectro de irradiación con un amplio intervalo de longitudes de onda.

La radiación solar media anual en España fué aproximadamente 6221 MJ/m², en el año 2006, calculada a partir de la gráfica, Figura 4.2, obtenida por diferentes agencias internacionales ^{289,290,291,292}.

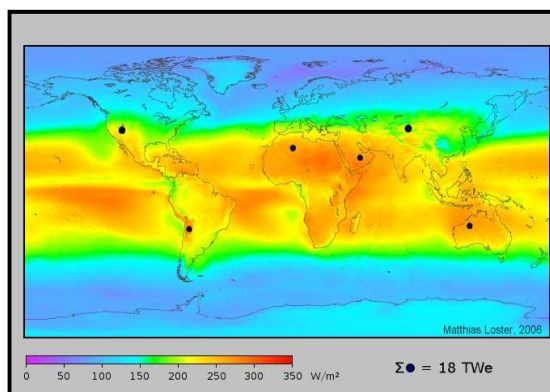


Fig. 4.2. Energía solar media anual

Por otro lado, el Ministerio de Medioambiente, Rural y Marino, publica los valores medios anuales (1971-2001) de humedad, temperatura y radiación solar correspondientes a las diferentes zonas de España, que recoge concretamente los datos para Bilbao, Figura 4.3²⁹³.

²⁸⁹Bishop JKB., Rossow WB. Spatial and temporal variability of global surface solar irradiance. *Journal of Geophysical Research*, 1991; 96: 16839-16858.

²⁹⁰International Satellite Cloud Climatology Project (ISCCP). <http://isccp.giss.nasa.gov/>

²⁹¹National Geophysical Data Center (NGDC), NOAA Satellite and Information Service, Coastline Extractor. <http://rimmer.ngdc.noaa.gov/mgg/coast/>

²⁹²International Energy Agency (IEA), Key World Energy Statistics 2008. <http://www.iea.org>

²⁹³Ministerio de fomento. http://www.ign.es/espmmap/mapas_clima_bach/Mapa_clima_07.htm

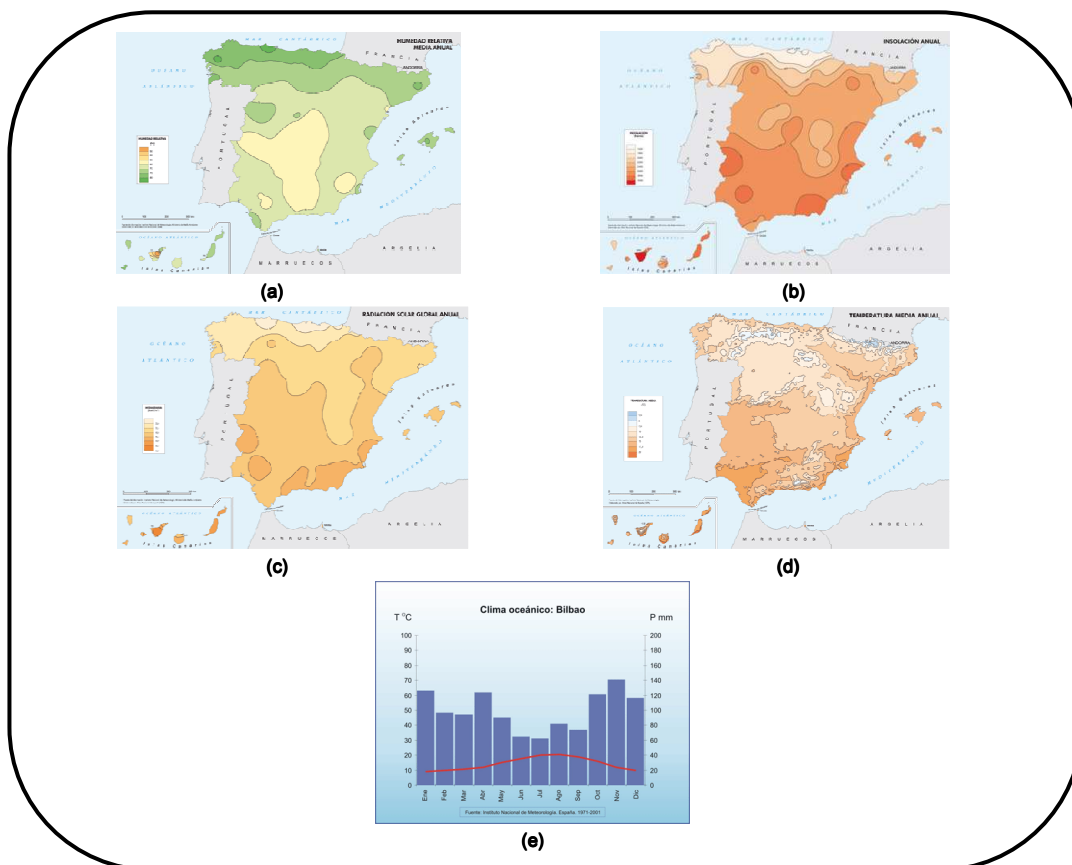


Fig. 4.3. (a) Humedad relativa media anual en España
 (b) Insolación anual en España.
 (c) Radiación solar global anual en España. (Media diaria)
 (d) Temperatura media anual en España
 (e) Temperatura y pluviosidad media anual en Bilbao.

La **humedad relativa** media anual en España, Figura 4.3a, varía entre el 60% en la submeseta sur y el 80% en las zonas costeras atlántica y cantábrica. Son significativos los reducidos valores de humedad relativa registrados en el interior de la isla de Tenerife, que se explican por la notable altitud del Teide (3.718 m).

La **insolación** es la cantidad de radiación solar que incide sobre la superficie terrestre en un período de tiempo. En la Figura 4.3b, se muestra la insolación anual obtenida a partir del número de horas de sol registradas a lo largo del año, que aumenta de forma regular de norte a sur con valores de 1.600 a 2.800 horas.

La **radiación solar global** es la energía procedente del sol, recibida sobre una superficie horizontal, durante un tiempo determinado. El valor de la radiación solar depende de la latitud, pues ésta hace que varíe el ángulo de incidencia, también de la duración del periodo de luz, así como del número de horas de sol, variable según las características climáticas de cada punto del Planeta. En España, los valores más elevados de radiación global anual se producen en la mitad sur de la Península, con máximos en el Sureste, debido al elevado número de horas de sol, Figura 4.3c. Los máximos de España se dan, no obstante, en las áreas de menor nubosidad, como son las Islas Canarias, donde coinciden una latitud subtropical y un elevado número de horas de sol.

En la Figura 4.3d se muestra la **temperatura** media anual. Su distribución es muy irregular y, también, está estrechamente ligada a la configuración del relieve. La isoterma de 10 °C parece delimitar los sistemas montañosos de la mitad norte peninsular: Cordillera Cantábrica, Pirineos y Sistemas Ibérico y Central. De igual manera, en la mitad sur, la isoterma de 12,5 °C marca la zona montañosa: sector meridional del Sistema Ibérico y Sistema Bético. En la Submeseta norte, la temperatura media es de 12,5 °C y, en la sur, de 15 °C. Las zonas más cálidas delimitadas a partir de las isotermas de 17,5 °C se localizan en el valle del Guadalquivir, en las costas del sur, sureste y levante, así como, en algunas áreas litorales de las Islas Canarias.

En la Figura 4.3e se muestran los datos de temperatura y pluviosidad media anual para el caso particular de Bilbao. Esta ciudad se caracteriza por una temperatura media de 15°C, reducida amplitud térmica (inferior a 8 °C), elevada pluviosidad (humedad relativa de 75-80%) y radiación solar media diaria de 12,6 MJ/m², obtenida a partir de la Figura 4.3c.

Estos datos se tendrán en cuenta a la hora de interpretar los resultados obtenidos en los ensayos de estabilidad, en el test de stress.

Los biocidas, objeto de estudio de este trabajo, pueden participar en diversos mecanismos de degradación, siendo los más comunes los que se detallan a continuación:

Los insecticidas **carbamatos** se degradan al ser sometidos a fotólisis mediante luz ultravioleta, obteniéndose como metabolitos finales principalmente fenoles²⁹⁴. La degradación de bendiocarb da lugar a 2,3-isopropilidenedioxifenol, junto con metilamina y

²⁹⁴Climent MJ., Miranda MA., Erratum: Gas chromatographic–mass spectrometry study of photodegradation of carbamate pesticides, Journal of Chromatogr. A, 1997; 761:41.

finalmente CO₂. La hidrólisis básica de este compuesto produce 2,2-dimetil-1,3-benzodioxol-4-ol, metilamina y CO₂²⁹⁵.

La hidrólisis acuosa vía fotólisis (UVB de 290 nm) de los **nicotinoideos**, que se produce por la ruptura del enlace N-NO₂, del puente metileno y posterior hidroxilación del anillo de imidazolidina^{296,297,298,299} da lugar a los siguientes metabolitos:

6-cloronicotinaldehído, N-metilnicotinamida, 1,6-cloronicotinilimidazolidona, 6-cloro-3-piridilmetiletilendiamina, 1,6-cloro-3-piridinilmetil-2-imidaolidinona, (E)-3-(6-cloro-3-piridilmetil)-2-(nitroimino)imidazolidin-4-ol, 1-(6-cloro-3-piridilmetil)-N-nitro-1,3-dihidro-2H-imidazol-2-ilideneamina y 1-(6-cloro-3-piridilmetil)-imidazolidin-2-ilideneamina.

Cuando los insecticidas **piretroides** entran en contacto con el suelo y/o con el agua, pueden sufrir diferentes procesos de transformación biológica y no biológica. Las transformaciones biológicas son debidas a los microorganismos existentes en el medio y las no biológicas, debidas al efecto de la luz solar, del pH y a las características físicas y químicas del medio en el que se encuentren. Las reacciones más comunes que experimentan los insecticidas piretroides recogidas en la bibliografía³⁰⁰ aparecen reflejadas en la Figura 4.4.

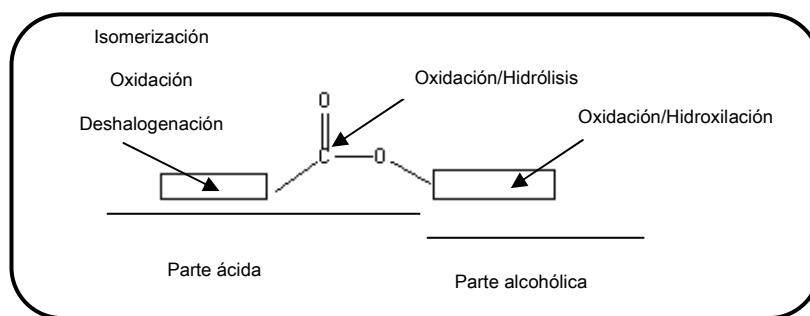


Fig 4.4. Reacciones químicas que experimentan los insecticidas piretroides en su degradación.

²⁹⁵Roberts TR., Hutson DH. Metabolic pathways of agrochemicals: Herbicides and plant growth, 1998, Royal Society of Chemistry, Cornwall, United Kingdom, pp. 7-8.

²⁹⁶Khan A., Haque MM., Mir NA., Muneer M., Boxal C. Heterogeneous photocatalysed degradation of an insecticide derivative acetamiprid in aqueous suspensions of semiconductor. Desalination, 2010;261: 169-174.

²⁹⁷Dell'Arciprete ML., Santos-Juanes L., Arques A., Vercher RF., Amat AM., Furlong JP., Mártire DO., Gonzalez MC. Reactivity of neonicotinoid pesticides with singlet oxygen. Catalysis Today, 2010; 151(1-2):137-142.

²⁹⁸Rancan M., Sabatini AG., Achilli G., Galletti GC. Determination of Imidacloprid and metabolites by liquid chromatography with an electrochemical detector and post column photochemical reactor. Analytica Chimica Acta, 2006; 555(1): 20-24.

²⁹⁹Burrows HD., Canle M., Santaballab JA., Steenkenc S. Invited Review. Reaction pathways and mechanisms of photodegradation of pesticides. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2002;67: 71-108.

³⁰⁰IPCS, International Programme on Chemical Safety. "Environmental Health Criteria 96", EPA, 1997.

La deshalogenación de la parte ácida y la hidroxilación ocurrida en los anillos aromáticos de la parte alcohólica son debidas a reacciones químicas, mientras que las reacciones de isomerización ocurren preferentemente por reacciones fotoquímicas que involucran al anillo ciclopropano existente en todos los insecticidas piretroides, produciéndose la transformación de la molécula de la configuración cis a trans. La hidrólisis de los grupos ester, ciano y éter puede transcurrir a través de reacciones fotoquímicas y químicas. Hay que tener en cuenta que la temperatura favorece estas reacciones de degradación³⁰¹.

El factor fotoquímico es el que más interviene en la degradación³⁰² a través de la hidrólisis del grupo éster para dar ácido crisantémico, ácido 3-fenoxibenzoico, así como sus derivados halogenados: ácido 3-(2,2-diclorovinil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxílico (DCCA) y ácido 3-(2,2-dibromovinil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxílico (DBCA). El 3-fenoxibenzaldehído se suele formar en menor proporción (Tabla 4.2).

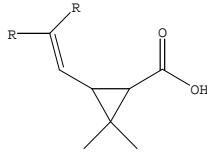
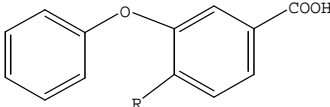
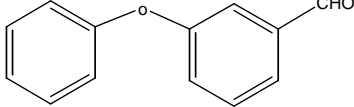
Los insecticidas piretroides que presentan un grupo ciano y grupos halógenos son más fotoestables, ya que la presencia de un grupo electrófilo fuerte no favorece la formación de radicales.³⁰³

³⁰¹Sanchez-Martin MJ., Sanchez-Camazano M. Kinetic study of the thermal decomposition of pesticides. *Thermochemica Acta*, 1988; 126: 319-324.

³⁰²Yue Y., Hua R. Photosensitive degradation of pyrethroid insecticides. *Huanjing Kexue Xuebao*, 1992; 12(4): 466-472.

³⁰³Albert LA. Los plaguicidas persistentes y sus efectos a largo plazo. Simposio Internacional sobre Agricultura sostenible, 1998. México D.F.

Tabla 4.2. Productos de degradación más comunes de los insecticidas piretroides.

Compuesto	Piretroide de partida
 <p>Ácido crisantémico</p> <p>R= CH₃ Ácido Crisantémicodicarboxílico, (CDCA)</p>	Esbiotrina Tetrametrina d-Fenotrina
<p>R=-Cl Ácido 3-(2,2-diclorovinil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxílico, (DCCA=Cl₂CA)</p>	α-cipermetrina Permetrina Ciflutrina Praletrina Bifentrina
<p>R=-Br Ácido 3-(2,2-dibromovinil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxílico, (DBCA=Br₂CA)</p>	Deltametrina
 <p>Ácido 3-fenoxibenzoico</p>	
 <p>3-fenoxibenzaldehido</p>	
<p>R= H 3-PBA</p>	α-cipermetrina Deltametrina Permetrina Fenotrina
<p>R= -F Ácido 4-fluoro-3-fenoxibenzoico, (F-PBA)</p>	Ciflutrina

La fragmentación final de los productos de degradación indicados pueden dar lugar a CO₂, H₂O y/o halógenos. Este proceso se ha seguido mediante el uso de radiomarcadores de ¹⁴C³⁰⁴.

La cromatografía de alta resolución ha sido utilizada para la determinación de algunos de los productos de degradación de estos insecticidas, pero una correcta identificación, precisa la utilización de la espectrometría de masas^{305,306}.

³⁰⁴Katagi T. Hydrolysis of trans-tetramethrin in buffered aqueous solutions. *Journal of Pesticide Science*, 1993; 18(4): 343-351.

³⁰⁵Ding, Y., Catherine A. White, S. Determination of Deltamethrin and its metabolite 3-phenoxybenzoic acid in male rat plasma by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, 2004; 810 (2): 221-227.

A parte de los ensayos que aparecen regulados por la normativa ICH, los estudios de estabilidad deben evaluar además, la capacidad de **hidrólisis** del compuesto en un amplio intervalo de pH, bien en disolución o en suspensión.

El objetivo primordial del estudio del efecto del pH, en la estabilidad de los complejos de inclusión, se centra en observar cuales son las condiciones en las que el biocida se liberará y actuará contra la plaga a tratar. La acción del biocida se produce por ingestión, y el pH de la saliva y de los jugos gástricos del insecto son los responsables de la liberación del principio activo. Para ello, primero es necesario conocer el pH de su aparato digestivo. El intestino medio de la mosca doméstica presenta tres regiones morfológicas a tres valores de pH distintos, en la parte anterior 6,1, en el medio 3,1 y en la región posterior 6,8³⁰⁷.

La bibliografía sobre estudios de estabilidad de complejos de inclusión de biocidas con CD es escasa. Únicamente se han encontrado dos trabajos sobre la estabilidad frente a la fotodegradación del herbicida norflurazon³⁰⁸ y de pesticidas organofosforados^{309,310}. Los demás artículos encontrados hacen referencia preferentemente a compuestos de interés farmacéutico, en los cuales aplican el test acelerado, el de stress^{311,312,313,314,315}. Subrayan el hecho de que la estabilidad de la encapsulación depende de la estructura, polaridad y geometría de los diferentes huéspedes, que a medida que la concentración de CD

³⁰⁸Fesenius J. Automated determination of pyrethroid insecticides in surface water by HPLC with diode array uv detection, using on-line micelle mediated sample preparation. *Analytical Chemistry*, 1994; 350: 487-495.

³⁰⁷Terra WR., Regel R. pH buffering in Musca midguts. *Comparative Biochemistry Physiology*, 1995; 112A: 559-564.

³⁰⁸Villaverde J., Maqueda C., Undabeytia T., Morillo E. Effect of various cyclodextrins on photodegradation of a hydrofobic herbicide in aqueous suspensions of different soil colloidal components. *Chemosphere*, 2007; 69: 575-584.

³⁰⁹Antoniadou-Vyza E., Buckton G., Michaleas SG., Loukas YL., Efentakis M. The formation of an inclusion complex of methocarbamol with hydroxypropyl- β -cyclodextrin: the effect on chemical stability, solubility and dissolution rate. *International Journal of Pharmaceutics*, 1997; 158: 233-239.

³¹⁰Kayima M., Nakamura K. Cyclodextrin inclusion effects on photodegradation rates of organophosphorus pesticides. *Environment International*, 1995; 21(3) :299-304.

³¹¹Hladon T., Pawlaczyk J., Szafran B. Stability of Ibuprofen in its Inclusion Complex with Cyclodextrin. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 2000; 36: 1-8.

³¹²Waterman KC., Adami RC. Accelerated aging: Prediction of chemical stability of pharmaceuticals. *International Journal of Pharmaceutics*, 2005; 293: 101-125.

³¹³Anselmi C., Centini M., Maggiore M., Gaggelli N., Andreassi M., Buonocore A., Beretta G., Facino RM. Non-covalent inclusion of ferulic acid with cyclodextrin improves photo-stability and delivery: NMR and modeling studies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2008; 46: 645-652.

³¹⁴Szente L., Szejtli J. Cyclodextrins as food ingredients. *Trends in Food Science and Technology*, 2004; 15:137-142.

³¹⁵Yuan C., Jin X., Xu X., Zhuang H., Shen W. Preparation and stability of the inclusion complex of astaxanthin with hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Food Chemistry*, 2008; 109:264-268.

aumenta, la estabilidad que ofrece la encapsulación es mayor³¹⁶. Asimismo, destacan la influencia de la composición de las disoluciones tampón sobre la estabilidad de los encapsulados³¹⁷. También se ha encontrado que la biodegradación bacteriana de un complejo de inclusión se ve favorecida frente a la biodegradación del biocida libre³¹⁸, lo que supone una gran ventaja medioambiental.

Todos los trabajos recogen el aumento de estabilidad que el biocida experimenta con la encapsulación. En esta memoria se estudia la estabilidad en términos de liberación del biocida de la cavidad de la CD.

Los ensayos de estabilidad recogidos en la bibliografía^{319,320} de algunos biocidas estudiados en esta memoria, se han realizado para valores de pH 5, 7 y 9, Tabla 4.3. Donde los resultados están expresados en forma de DT₅₀, tiempo en el cual la concentración de biocida ha disminuido a la mitad, a 25 °C³²¹. No se ha encontrado ninguna referencia bibliográfica sobre la estabilidad del nicotinoide tiacloprid, ni del piretroide praletrina. Además, las condiciones experimentales a las que se llevan a cabo estos estudios de estabilidad no están claramente especificadas.

³¹⁶Kang J., Kumar V., Yang D., Chowdhury PR., Hohl RJ. Cyclodextrin complexation: influence on the solubility, stability, and cytotoxicity of camptothecin, an antineoplastic agent. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2002; 15: 163-170.

³¹⁷Ansari MT., Iqbal I., Sunderland VB. Dihydroartemisinin-cyclodextrin Complexation: Solubility and Stability. *Archives of Pharmaceutical Research*, 2009; 32(1): 155-165.

³¹⁸Cai B., Gao S., Lu G. Cyclodextrin and its derivatives-enhanced solubility and biodegradation of 2-nitrophenyl. *Journal of Environmental Sciences*, 2006; 18(6): 1157-1160.

³¹⁹Hill IR. En *The Pyrethroid Insecticides*, 1985. J.P. Leahey (ed), Taylor & Francis, London, pp. 151-247.

³²⁰Pesticide Manual. ISBN 1 901396 23 1 Copyright ©2000. The British Crop Protection Council. Software developed by Wise & Loveys Information Services.

4. Propiedades de lo microencapsulados biocida-CD

Tabla 4.3. Datos de condiciones de estabilidad de biocidas recogidos en bibliografía.

	Bifentrina	Praletrina	Esbiotrina	Tetrametrina	Deltametrina	Cifutrina	Permetrina	α-Cipermetrina	Fenotrina	Bp
Luz uv	/	/	Se degrada	/	Isomerización cis-trans, ruptura enlace ester, pérdida del Br.	/	Se degrada	/	/	/
Luz solar	255 días	/	/	/	Estable	/	/	Estable	/	Se degrada
pH 5	21 días	/	1410 días	16-20 días	Estable	36/17/30/25 días*	Estable	Estable	Estable	Estable
pH 7	21 días	/	547 días	1 día	Estable	17/20/11/11 días*	Estable	Estable	Estable	Estable
pH 9	21 días	/	4 días	<1 hora	3 días	7/6/3/5 días*	50 días	1,8 días	Hidrólisis	Estable
50 °C	Estable	/	/	Estable	/	/	Estable	Estable	/	/

* Esteroisómeros

	Acetamiprid	Imidacloprid	Tiacloprid	Bendiocarb
Luz uv	/	/	/	Estable
Luz solar	Estable	/	/	Estable
pH 5	Estable	hidrólisis	/	Hidrólisis lenta
pH 7	Estable	hidrólisis	/	4 días
pH 9	Hidrólisis lenta	hidrólisis	/	Hidrólisis rápida
50 °C	Se degrada	/	/	Estable

La microencapsulación de biocidas ofrece otras ventajas como: la **solidificación** de compuestos líquidos, de gran importancia a nivel industrial, en cuanto a manejo, pesada o limpieza y el aumento de la **hidrosolubilidad** de los productos encapsulados, debido a la parte exterior hidrofílica de la CD³²¹, lo cual facilita la preparación del producto comercial en base agua, con el consecuente beneficio medioambiental.

Una vez estudiadas las propiedades de los microencapsulados formados, es imprescindible comprobar su **eficacia insecticida**. Los insecticidas actúan sobre el sistema nervioso central de los insectos, teniendo su efecto biocida por ingestión, contacto o por inhalación, hasta producir la muerte. Por efecto de la encapsulación con CD, es de esperar que los complejos de inclusión actúen por ingestión, ya que por inhalación y contacto el efecto biocida queda eliminado, ya que el biocida se encuentra protegido. Esta protección puede suponer una gran ventaja para aquellos insecticidas como los piretroides³²², que producen irritación y repelencia, bien para la seguridad del operario, o por que pueden tener un impacto dramático en la eficacia del control químico sobre los insectos vectores^{323,324}.

³²¹Hapiot F., Tilloy S., Monflier E. Cyclodextrins and supramolecular hosts for organometallic complexes. Chemical Review, 2006; 106: 767-781.

³²²Ayala-Sulca YO., Ibarra-Juarez L., Grieco JP., Achee N., Mercado-Hernandez R., Fernández-Salas I. Respuesta conductual de *aedes aegypti* (linnaeus, 1762) frente a adulticidas piretroides de uso frecuente en salud pública. Revista Peruana en Medicina Experimental y Salud Pública, 2008; 25(1):26-34

³²³Sungvornyothin S., Chareonviriyaphap T., Prabaripai A., Thirakhupt V., Ratanatham S., Bangs MJ. Effects of nutritional and physiological status on behavioral avoidance of *Anopheles minimus* (Diptera: Culicidae) to DDT, deltamethrin and lambda-cyhalothrin. Journal of Vector Ecology, 2001; 26(2): 202-15.

³²⁴Surtees G. The distribution, density and seasonal prevalence of *Aedes aegypti* in West Africa. Bull World Health Organic, 1967; 36(4): 539-540.

4.2. OBJETIVO

El objetivo principal de esta parte de la investigación se centra en:

“El estudio de las ventajas de los productos encapsulados biocida-CD frente al biocida libre”

Se comprobará:

La **estabilidad** del complejo de inclusión biocida-CD y del biocida libre, a lo largo del tiempo, al someterlo a distintas condiciones de temperatura, humedad, luz y pH

La modificación de las propiedades físicas que experimenta el biocida incluido en la CD, como es el caso de la **solidificación** de biocidas líquidos y aumento de la **hidrosolubilidad**.

Por último, se estudiará la **eficacia insecticida** del producto encapsulado para combatir la plaga de insectos a tratar.

Se pretende llegar a conocer a **nivel de laboratorio**, la influencia de los factores citados sobre la estabilidad de los productos encapsulados, con el fin de obtener información sobre su comportamiento en el lugar de aplicación y en condiciones de almacenamiento.

La información obtenida de esta investigación será utilizada con posterioridad a nivel industrial, permitiendo determinar las condiciones óptimas de calidad que debe tener el producto comercial, introduciendo en el mismo otros compuestos con el fin de retardar los efectos degradativos de éstos.

4.3. PARTE EXPERIMENTAL

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

4.3.1. Estabilidad

El estudio de estabilidad se ha llevado a cabo durante un período de 3 meses, tanto para los productos encapsulados como para los biocidas libres.

Las medidas asociadas a los ensayos de estabilidad en condiciones atmosféricas normales y en el test de hidrólisis, se realizaron diariamente durante la primera semana; una vez por semana hasta concluir el primer mes y una medida el último día del segundo y tercer mes.

Los ensayos de estabilidad de los biocidas libres se realizaron sobre disoluciones de 10 mg/L en ACN de cada uno de los biocidas, preparadas por dilución de las disoluciones stock de concentración 100 mg/l en ACN. Asimismo, el test de stress se llevó a cabo sobre los biocidas comerciales puros, haciendo uso de una cámara de envejecimiento en las siguientes condiciones: 40 °C, 70% de humedad relativa y con una potencia de 2,15 MJh/m², proporcionada por una lámpara de Xenón.

Estos ensayos se realizaron sobre los productos encapsulados en estado sólido (0,05 g de cada complejo biocida:CD) y concretamente para el test de stress, también, en suspensión acuosa (0,05 g de cada complejo en 10 mL de H₂O).

En el caso del test de hidrólisis, se prepararon disoluciones de cada biocida de concentración 10 mg/L, por dilución de las disoluciones stock de 100 mg/L de los biocidas libres en ACN, en las diferentes disoluciones tampón (pH 3 HCOOH/NHCOOH, pH 5- HAc/NaAc, pH 6 hidrogenocarbonato/HCl, pH 7- KH₂PO₄/K₂HPO₄ y pH 9-NH₄Cl/NH₃) y en disoluciones fuertemente ácidas (1 M de HCl) y fuertemente alcalinas (1 M de NaOH). Previo a la determinación analítica de estas disoluciones en condiciones extremas de pH, se llevó a cabo una extracción líquido-líquido³²⁵. Sobre una alícuota de la disolución se adicionó el doble de volumen de hexano y se agitó haciendo uso de un baño de ultrasonidos. Se realizaron tres extracciones sucesivas. Se separó la fase orgánica por decantación y se llevó a sequedad con una corriente de nitrógeno a 30 °C, eliminando

³²⁵García-Repetto R., Martínez D., and Repetto M. The Influence of pH on the degradation kinetics of some organophosphorous pesticides in aqueous solutions. *Veterinary and Human Toxicology*, 1997; 36(3): 202-204.

previamente el H₂O con Na₂SO₄ anhidro. El extracto obtenido se reconstituyó en acetonitrilo, se añadió el estándar interno y se procedió a la determinación del biocida mediante HPLC-uv.

Asimismo, los microencapsulados sólidos se suspenden en las diferentes disoluciones tampón utilizadas (0,05 g de cada complejo biocida:CD en 10 mL de disolución tampón).

Los métodos analíticos utilizados para el seguimiento de la estabilidad de los biocidas han sido HPLC-uv para los biocidas de la familia piretroide (Esbiotrina, praletrina, fenotrina, ciflutrina, permetrina, deltametrina, cipermetrina, tetrametrina) y espectrofotometría uv-vis para el piretroide bifentrina, los nicotinoideos (acetamiprid, tiacloprid e imidacloprid), el carbamato bendiocarb y el sinergista Bp.

El seguimiento de los complejos de inclusión biocida:CD se llevó a cabo mediante la técnica de DSC y, por último, la identificación de los productos de degradación obtenidos se elucidó mediante GC-MS.

En la Tabla 4.4 se recogen, a modo de resumen, las condiciones de los ensayos de estabilidad realizados sobre los biocidas libres y los productos microencapsulados. Todos los ensayos se realizan por triplicado. Los ensayos fueron realizados durante los meses de Noviembre a Febrero.

Tabla 4.4. Ensayos de estabilidad realizados.

Test	Estudios		Tratamiento posterior	Análisis
Test en condiciones atmosféricas normales (3 meses)	Luz (artificial y natural)	Biocidas	- ^b	Uv-vis/ HPLC-uv
	T (4 °C/21 °C)	Encapsulado	- ^c	DSC
Test acelerado (15 días)	T (54 °C)	Biocidas	- ^b	Uv-vis/ HPLC-uv
		Encapsulado	- ^c	DSC
Test de condiciones de stress (5 días)	Luz (2,15 MJh/m ²)	Biocidas	Diluir en ACN ^a	Uv-vis
	T (40 °C)		- ^b	
	RH (70%)	Encapsulado	- ^c Evaporar a vacío ^d	DSC
Test de hidrólisis (3 meses)	pH 5, 7 y 9	Biocidas	-	Uv-vis
	pH 1 y 11		Reconstituir en ACN	HPLC-uv
	pH 3, 6 y 9	Encapsulado	Evaporar a vacío ^d	DSC

RH. Humedad relativa

a. Ensayos realizados sobre el producto puro

b. Ensayos realizados sobre el biocida en disolución de 10 mg/L acetonitrilo.

c. Ensayos realizados sobre el complejo de inclusión sólido (0.05 g).

d. Ensayos realizados sobre el complejo de inclusión en suspensión acuosa (0,05 g en 10 mL de H₂O)

Condiciones cromatográficas

En la Tabla 4.5 se recogen las condiciones cromatográficas utilizadas en el sistema HPLC-uv, previamente optimizadas por nuestro grupo de investigación^{326,327}.

Tabla 4.5. Condiciones cromatográficas utilizadas para la determinación de insecticidas piretroides y Bp mediante HPLC -uv.

Fase móvil (v/v):	ACN:H ₂ O (80:20)
Modo	Isocrático
Volumen de Inyección	20 µL
Flujo	1 mL/min
Columna cromatográfica	Waters Symmetry (75 x 4.6 mm x 3.5 µm, 100Å)
T de la columna	(30±5) °C
T del inyector automático	(10±5) °C
λ de detección	220 nm
Estándar interno	Ortofenilfenol(opp)

Para la identificación de los posibles productos de degradación obtenidos en los ensayos de stress se utilizó la cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas, en las condiciones experimentales recogidas en la Tabla 4.6:

Tabla 4.6. Condiciones cromatográficas y parámetros utilizados en el sistema GC-MS.

Inyección:	Volumen de inyección: 1 µl Modo: splitless
GC:	Columna: HP-5, 30 m x 0.25 mm ID x 0.25 µm Horno: 100°C (2 min) 100°C-220°C a 45°C/min 220°C-320°C a 25°C/min (2min) Flujo de gas portador He: 1,5 mL/min constante Temperatura de inyección: 270°C
MS:	Temperatura de línea de transferencia:300°C Temperatura de la fuente: 300°C Temperatura de cuadrupolo: 150°C Intervalo de masas: 50-600 uma Velocidad de escaneo: 4.1 scans/s Solvent delay: 5 min. AutoTune realizado con PFTBA: 1435.3 V

³²⁶Sánchez A. Determinación simultanea de insecticidas piretroides en preparados comerciales y en aguas. Tesis de Licenciatura, UPV/EHU, Leioa, 2004.

³²⁷Alonso ML. Estudio de estabilidad de insecticidas piretroides mediante técnicas cromatográficas. Tesis de Licenciatura, UPV/EHU, Leioa, 2006.

Espectrofotómetro uv -vis

Conocidos los espectros de absorción uv-vis de los biocidas estudiados (Capítulo 2) se eligieron como longitudes de onda de trabajo las recogidas en la Tabla 4.7.

Tabla 4.7. Longitudes de onda de trabajo, λ (nm).

Bendiocarb y Bifentrina	Bp	Imidacloprid	Acetamiprid y tiacloprid
205	205	270	245

Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

El seguimiento de la estabilidad de los complejos de inclusión biocida:CD se llevó a cabo mediante esta técnica, utilizando las mismas condiciones y con los mismos criterios que los empleados para la verificación del proceso de microencapsulación (capítulo 2).

4.3.2. Hidrosolubilidad de los productos microencapsulados

Como ha quedado patente en los estudios de solubilidad de fase (capítulo 2), la formación de un complejo de inclusión biocida:CD puede mejorar la solubilidad acuosa del biocida. Para el cálculo del factor de aumento de la solubilidad de los complejos de inclusión en agua, se han preparado por separado disoluciones saturadas del complejo de inclusión y del biocida libre en agua y se ha medido su absorbancia mediante espectrofotometría uv-vis.

4.3.3. Eficacia del producto encapsulado.

Se ha llevado a cabo un experimento con moscas (Mosca común) para evaluar la eficacia del producto encapsulado,

Se procedió en primer lugar a llevar a cabo la cría de moscas. Las primeras moscas fueron suministradas por el Centro Tecnológico CIDEMCO (Azpeitia, Guipuzcoa), se introdujeron en jaulas de 20x20x20 cm con malla de contención, Figura 4.5, para impedir que se escaparan. Dichas jaulas se mantuvieron en una cámara de cría, Figura 4.6, que se mantuvo a una temperatura entre 20,9°C-27,9°C^{328,329}, con luz artificial y ventilación. En la cámara se colocó un recipiente con agua que proporcionara la humedad adecuada. En todo momento, se simulaban las condiciones externas día/noche propicias para una buena cría.

³²⁸Smallegange R., Kelling F., Den Otter C. Types and numbers of sensilla on antennae and maxillary palps of small and large houseflies, *Musca domestica* (Diptera, Muscidae). *Microscopy Research and Technique*, 2008; 71: 880-886.

³²⁹Miskiewicz K., Schürmann FW. Circadian release of pigment – dispersing factor in the visual system of the housefly, *Musca domestica*. *The Journal of Comparative Neurology*, 2008; 509: 422-435.



Fig 4.5. Jaulas de contención.



Fig 4.6. Cámara de cría.

Se alimentó a las moscas con leche en polvo como fuente proteica, agua, azúcar y una mezcla formada por 200 g de salvado, 50 g de levadura en polvo, 150 g de malta y 100 g de hierba fresca, macerada en agua durante 72 h. La ovoposición por parte de la hembra se produce en dicho sustrato húmedo³³⁰.

Una vez que aparecen las larvas, el recipiente se introduce en otra jaula limpia, sobre una capa de vermiculita, donde se transforman en pupa y finalmente en la mosca adulta (aproximadamente 10 días). La limpieza de las jaulas se lleva a cabo cada tres días, renovando el agua de los bebederos³³¹.

Previo al estudio de la eficacia de los encapsulados se realiza un experimento para observar cuál es el modo de acción de los insecticidas estudiados incluidos en la CD. Para observar este hecho, se eligieron cucarachas de la familia *Batella Germánica*, ya que los ensayos suelen ser mucho más reproducibles que los trabajos realizados con moscas. Como se ha comentado anteriormente, se recoge en bibliografía que la acción de los insecticidas sobre los insectos es por ingestión y por contacto. Asimismo, una de las ventajas de la microencapsulación de biocidas con CD es la capacidad de enmascaramiento del huésped, en este caso del biocida, por lo cual, es de esperar que la acción del microencapsulado biocida:CD quede solamente restringida a la ingestión.

Para realizar este experimento, se introdujeron en una jaula 10 cucarachas a las que previamente se ha depositado sobre su dorso, a la suficiente distancia para que las antenas

³³⁰Çakir S., Kence A. The distribution of males having XY and XX chromosomes in housefly populations of Diptera Muscidae. *Genetica*, 1996; 98: 205-210.

³³¹Gullan PJ., Cranston PS. The insects: an outline of entomology. *Journal of Insect Conservation*, 2005; 14(6): 745-746.

no puedan alcanzar el producto, unas con una gota de una suspensión de biocida y otras con biocida microencapsulado con CD, en agua, al 0,3% de biocida. La mortalidad se evaluó al de 1, 4, 12 y 24 h. Se eligió el insecticida acetamiprid para llevar a cabo este estudio.

Para llevar a cabo el experimento de eficacia del complejo de inclusión comparativamente con la del biocida, se utilizaron dos jaulas por cada biocida ensayado (0.5 y 5L). En una de ellas se colocaron tres recipientes, uno con agua, otro con 200mg de azúcar y un tercero con 200 mg de azúcar en polvo al que se le adiciona el complejo de inclusión biocida:CD, equivalente a una concentración de producto activo de 0,3% peso/peso, que se molturó manualmente para asegurar su homogeneidad. En otra jaula se introdujeron tres recipientes con: agua, azúcar en polvo y azúcar dopado con el biocida exento de ciclodextrina (200 mg) y homogeneizado con ayuda de un mortero. Para el estudio de la eficacia de los biocidas se eligieron: acetamiprid, imidacloprid, bifentrina, α -cipermetrina y bendiocarb.

Se introdujeron 10 adultos de vida media 5 días (tasa de vida 30 días), en cada una de las jaulas. Previamente, las moscas se durmieron utilizando CO₂. La mortalidad se evaluó al de 1, 2, 4 y 24 horas y cada día durante una semana. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

4.4. RESULTADOS

4.4.1. Estabilidad

En primer lugar y debido a que el ACN es el disolvente elegido para la preparación de las disoluciones stock, se estudia la estabilidad de estas disoluciones, contenidas en frascos topacio, a 4 °C (temperatura de conservación).

Los resultados obtenidos, expresados como relación de áreas del pico cromatográfico del biocida y del estándar interno (I.S) en HPLV-uv, o la relación de absorbancias a los distintos tiempos estudiados mediante espectrofotometría uv-vis, demuestran que las disoluciones stock de los biocidas son estables al menos durante tres meses conservadas en frascos topacio y a 4 °C.

Asimismo, se comprobó la estabilidad de los insecticidas piretroides y del butóxido de piperonilo en ACN:H₂O (80:20), fase móvil utilizada en HPLC-uv para el seguimiento de la estabilidad de estos biocidas. Estos compuestos son estables durante el análisis y al menos hasta un mes en estas condiciones, como se muestra en la Figura 4.7 para el insecticida piretroide tetrametrina.

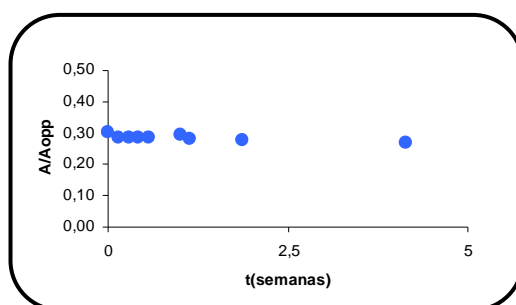


Fig. 4.7. Variación de la relación de áreas de los picos cromatográficos tetrametrina/I.S. de disoluciones de 10 mg/L en ACN:H₂O (80:20), en función del tiempo.

En un intento de estudiar la estabilidad de los complejos de inclusión en términos de liberación del biocida, se planteó la utilización de HPLC-uv en las condiciones cromatográficas recogidas en la parte experimental.

Para todos los complejos estudiados la técnica cromatográfica no permite diferenciar entre biocida libre y complejo de inclusión, como se muestra en los cromatogramas de la Figura 4.8, para el insecticida nicotinoide acetamiprid a un tiempo de retención de 7,5 min.

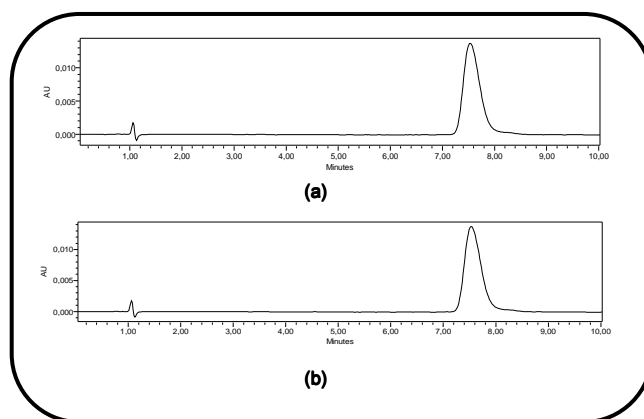


Fig.4.8. Cromatogramas de acetamiprid (a) y acetamiprid:CD (b) analizados mediante HPLC-Uv según condiciones cromatográficas recogidas en la Tabla4.4.

Con el fin de buscar una explicación al comportamiento observado, se estudió si el ACN era responsable de la liberación instantánea del biocida del complejo de inclusión, lo que proporcionaría un único pico cromatográfico debido al biocida libre.

Para ello, se puso en contacto una cantidad (0,05 mg) de complejo de inclusión con 2mL de ACN durante 1 h. Posteriormente, se llevó a sequedad haciendo uso del Turbopap y se determinó mediante DSC.

En la Figura 4.9 se recogen los termogramas DSC para acetamiprid, donde se observa que no ha existido la liberación del biocida del complejo de inclusión, ya que no aparece el pico de fusión característico a 100 °C, por lo que se puede deducir que la cromatografía líquida no es adecuada para la determinación del biocida encapsulado y se utilizará DSC como técnica para el seguimiento de la liberación del biocida.

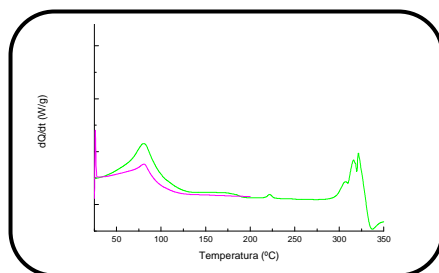


Fig.4.9. Termograma DSC para el complejo de inclusión acetamiprid:CD (verde) y el complejo después de 1h en contacto con ACN (rosa).

Test en condiciones atmosféricas normales.

- ***Estudio de la estabilidad con la temperatura.***

Biocidas:

Mediante el estudio de análisis de varianza (ANOVA) y tomando como referencia las disoluciones de cada biocida a 4 °C, se puede concluir que todos los biocidas en disolución de ACN, mantenidas en frascos topacio, se mantienen estables durante al menos tres meses a 21 °C ($p>0,05$)³³².

Complejos de inclusión:

Los complejos de inclusión son estables a las dos temperaturas ensayadas, al menos durante tres meses, excepto el complejo bifentrina:CD donde se observa la liberación del biocida al cabo de un mes a temperatura ambiente (aparece el pico de fusión característico de bifentrina a 69 °C), Figura 4.10

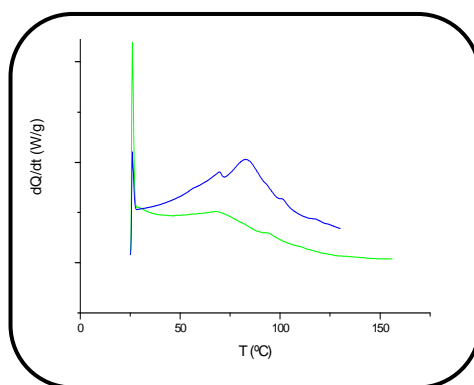


Fig.4.10. Termogramas DSC del complejo de inclusión de Bifentrina:CD a tiempo cero (verde) y tras un mes a 21 °C (azul).

³³²Alonso ML. Estudio de estabilidad de insecticidas piretroides mediante técnicas cromatográficas. Tesis de Licenciatura de la Universidad del País Vasco, UPV/EHU, Leioa, 2006.

- **Estudio de la estabilidad frente a luz.**

Las disoluciones de los biocidas en ACN y de los complejos de inclusión en estado sólido se introdujeron en viales de cristal transparente (la fracción de luz solar que atraviesa dicho cristal es la correspondiente a longitudes de onda corta)³³³ y se colocaron en dos laboratorios, uno interior, con luz artificial y otro exterior, con luz artificial y luz solar directa, durante tres meses. Para eliminar el posible efecto de la temperatura, se realizaron los mismos experimentos, utilizando viales de cristal topacio. Los datos obtenidos se emplearán como referencia en el test de ANOVA para la comparación con las muestras expuestas a la luz.

Biocidas:

Los biocidas se mantuvieron estables durante los tres meses de exposición a la luz artificial, ($p > 0,05$). En presencia de luz solar únicamente algunos insecticidas piretroides sufren degradación ($p < 0,05$).

En la Figura 4.11 se muestran, a modo de ejemplo, los cromatogramas obtenidos para disoluciones de tetrametrina y el I.S, en el momento de su preparación y al de tres meses de exposición a la luz solar.

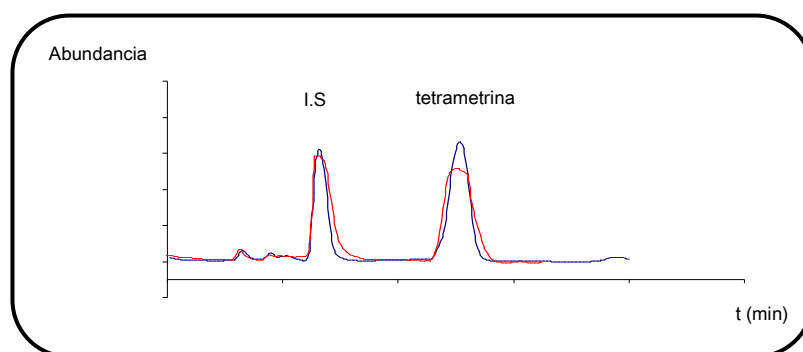


Fig. 4.11. Cromatogramas obtenidos de disoluciones de tetrametrina en ACN ($t_r=2,5$ min) a tiempo inicial (**azul**) y después de la exposición a luz solar (**rojo**), tras tres meses de exposición.

En la Tabla 4.8 se recogen los porcentajes de degradación obtenidos a lo largo del período de tiempo estudiado³³⁴.

³³³Pearson C. Manual del vidrio plano. Caviplan. TOD producciones S.A. Argentina, 2009, pp. 26.

³³⁴Alonso ML. Estudio de estabilidad de insecticidas piretroides mediante técnicas cromatográficas. Tesis de Licenciatura de la Universidad del País Vasco, UPV/EHU, Leioa, 2006.

Tabla 4.8. Porcentajes de degradación de los insecticidas piretroides tras tres meses de exposición a la luz solar.

%	Esbiotrina	Praletrina	Permetrina	Fenotrina	Tetrametrina
	34	39	10	13	24

Si se clasifican los insecticidas piretroides en Tipo I y II, según la ausencia o presencia del grupo ciano en su estructura, el orden de fotoestabilidad que presentan de mayor a menor es el siguiente:

Tipo I: *Bifentrina* > *Permetrina* > *Fenotrina* > *Tetrametrina* > *Esbiotrina* > *Praletrina*

Tipo II: *Ciflutrina* > *Deltametrina* > α -*cipermetrina*

Por lo cual como se puede observar, los piretroides de tipo II son más estables que los de tipo I. En ambos casos, aquellas moléculas que contienen grupos halógenos en su estructura presentan mayor estabilidad.

Complejos de inclusión:

Los microencapsulados formados permanecieron estables frente a la luz, a excepción del complejo de inclusión de bifentrina:CD, Figura 4.12, donde se observa el pico característico de fusión de bifentrina (69 °C), lo que indica que ha tenido lugar su liberación.

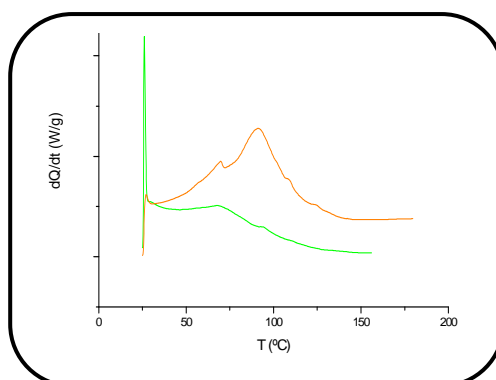


Fig.4.12. Curvas calorimétricas del complejo de inclusión de Bifentrina:CD a tiempo cero (verde) y tras tres meses expuesto a la luz (naranja)

Test acelerado.

Los biocidas y microencapsulados introducidos en frascos de cristal topacio y mantenidos en estufa a una temperatura de 54 °C³³⁵ mostraron el siguiente comportamiento, tomando como referencia las disoluciones mantenidas en frascos topacio a 4 °C:

Biocidas:

Únicamente las disoluciones de los insecticidas piretroides ciflutrina, praletrina y deltametrina en ACN, experimentan una degradación con la temperatura, tras 15 días de exposición, en un porcentaje de 20, 34 y 45 %, respectivamente, ($p < 0,05$)³³⁶.

Complejos de inclusión:

La temperatura no afecta a la liberación del biocida del microencapsulado, excepto para el complejo bifentrina:CD, donde la liberación del biocida se observa tras 15 días a 54 °C. En la Figura 4.13, se muestran los termogramas DSC obtenidos para este sistema.

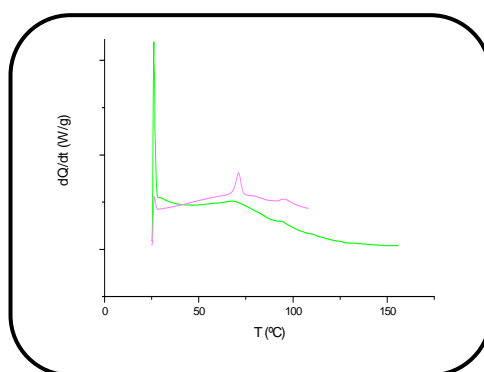


Fig.4.13. Termogramas DSC del complejo de inclusión de Bifentrina:CD a tiempo cero (verde) y tras 15 días sometido a 54°C (magenta)

Los termogramas de bendiocarb:CD, representativo de un complejo estable a lo largo del tiempo, en las condiciones de los test realizados hasta el momento, se muestran en la Figura 4.14.

³³⁵MT46.3. Accelerated Storage Procedure. Collaborative International Pesticides Analytical Council (CIPAC) Ltd, 1994 (Dobrat and Martin, Eds.).

³³⁶Alonso ML. Estudio de estabilidad de insecticidas piretroides mediante técnicas cromatográficas. Tesis de Licenciatura de la Universidad del País Vasco, UPPV/EHU, Leioa, 2006.

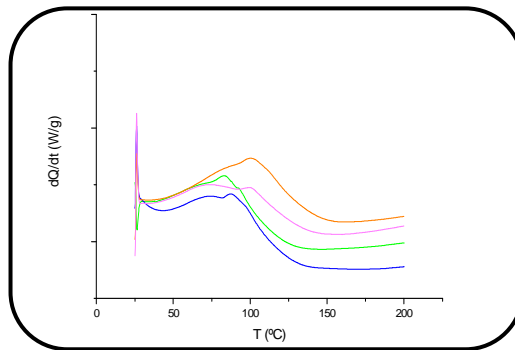


Fig.4.14. Termogramas del complejo de inclusión Bendiocarb:CD a tiempo cero (**verde**), tras 3 meses en condiciones atmosféricas normales: 21 °C (**azul**) y luz (**naranja**) y en condiciones del test acelerado (**magenta**).

Se observa que el pico característico de fusión de bendiocarb (125 °C) no aparece en ninguno de los experimentos realizados tras tres meses de exposición, por lo que se confirma su estabilidad. Mientras que, como hemos observado anteriormente, el insecticida bifentrina se ha liberado en todos los casos, de la cavidad de la CD.

Test de stress.

El biocida comercial, las disoluciones en acetonitrilo de cada biocida y los complejos de inclusión sólidos y en suspensión acuosa, se introdujeron en frascos de cristal transparente y se colocaron en el interior de una cámara de envejecimiento. Las muestras se expusieron durante 5 días a la luz de todo el intervalo del espectro solar, a una temperatura de 40 °C y a 70% de humedad. La radiación total recibida por las muestras fue 258 MJ/m². Para el estudio de estabilidad se realiza una comparación de las absorbancias, obtenidas entre el momento inicial y final, mediante espectroscopía uv-vis.

Biocidas:

La degradación de los principios activos comerciales es significativa, imidacloprid, ciflutrina, praletrina y esbiotrina experimentan la mayor degradación, alrededor de un 80%; tiacloprid, acetamiprid, cipermetrina, tetrametrina, deltametrina, fenotrina y Bp entre un 25-50% y bifentrina y permetrina entre un 5-15%, siendo el bendiocarb prácticamente estable, Figura 4.15a. Sin embargo, la degradación presentada por los biocidas en disolución es menor (inferior al 30%) y en algunos casos inapreciable, a excepción de imidacloprid, praletrina y esbiotrina, cuya degradación es similar a la presentada por los principios activos comerciales, Figura 4.15b³³⁷.

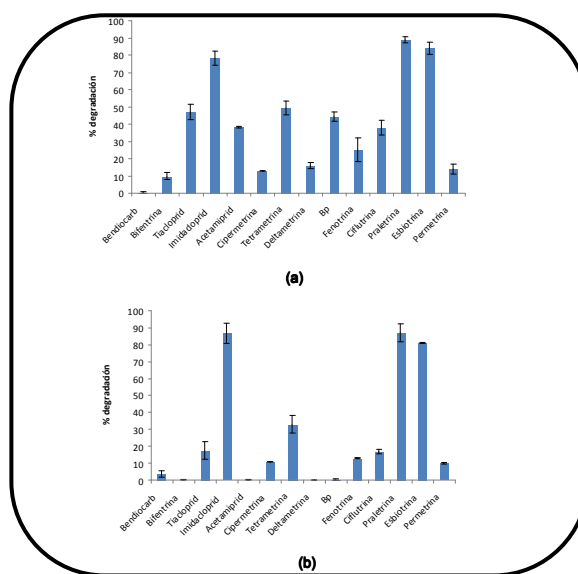


Figura 4.15. Porcentajes de degradación de los biocidas (a) como principio activos comerciales y (b) en disolución de 10mg/L de acetonitrilo.

³³⁷Alonso ML. Estudio de estabilidad de insecticidas piretroides mediante técnicas cromatográficas. Tesis de Licenciatura de la Universidad del País Vasco, UPV/EHU, Leioa, 2006.

El orden de estabilidad de los insecticidas piretroides en las condiciones de stress, de mayor a menor es el siguiente:

Como producto comercial:

Tipo I: Bifentrina > Permetrina > Fenotrina > Tetrametrina > Esbiotrina > Praletrina

Tipo II: α -cipermetrina > Deltametrina > Ciflutrina

En disolución de ACN:

Tipo I: Fenotrina > Tetrametrina > Esbiotrina > Praletrina

Tipo II: Ciflutrina

Como se puede observar los resultados de estabilidad de los piretroides clasificados dentro del tipo II presentan mayor estabilidad, que los de tipo I, excepto para la ciflutrina. La presencia de grupos halógenos en la estructura confiere en general una mayor estabilidad a la molécula, excepto para la ciflutrina.

Entre los insecticidas nicotinoides el orden de estabilidad, debido a los grupos CN que presenta la estructura de acetamiprid y tiacloprid, es el siguiente:

Acetamiprid > Tiacloprid > Imidacloprid

Complejos de inclusión:

Todos los complejos de inclusión tanto en forma sólida como en suspensión acuosa se mantienen estables en estas condiciones exceptuando el caso del imidacloprid en suspensión acuosa. En la Figura 4.16a, se recogen los termogramas de este sistema en el que se observa el pico característico de fusión a 145 °C. Además se muestran, a modo de ejemplo, los termogramas DSC de los complejos de inclusión que no han experimentado liberación: bifentrina, Figura 4.16b y bendiocarb, Figura 4.16c.

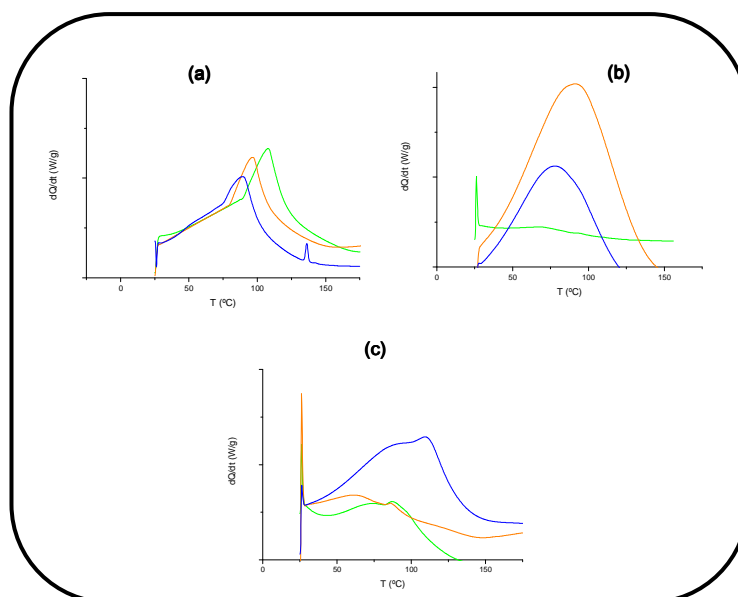


Fig.4.16. Curvas calorimétricas de (a) Imidacloprid:CD, (b) Bifentrina:CD y (c) Bendiocarb:CD, expuestos a las condiciones stress, al cabo de 5 días: complejo de inclusión (verde), como principio activo (naranja) y en suspensión acuosa (azul).

La cámara de envejecimiento recogió que por metro cuadrado la exposición fue de 258 MJ. Según referencias bibliográficas^{338,339,340,341} la energía solar media anual **en España** es de aproximadamente 6221 MJ/m², por lo tanto el resultado experimental correspondería a **15 días** de exposición y en **Bilbao** según el Ministerio de fomento³⁴², como se registra una media anual de 4599 MJ/m², sería correspondiente a **20 días**.

Por lo tanto 1 día en la cámara de envejecimiento equivaldría a 4 días en Bilbao. Estos resultados son orientativos porque aunque la humedad a la que han estado expuestos los productos puede considerarse media (70%), la temperatura de exposición es mayor a la media (40°C), por lo tanto el tiempo que el producto tendría que estar fuera de la cámara, para alcanzar en mismo estado de degradación que en el interior, debe ser mayor.

³³⁸Bishop JKB., Rossow WB. Spatial and temporal variability of global surface solar irradiance. Journal of Geophysical Research, 1991;96: 16839-16858.

³³⁹International Satellite Cloud Climatology Project (ISCCP). <http://isccp.giss.nasa.gov/>

³⁴⁰National Geophysical Data Center (NGDC), NOAA Satellite and Information Service, Coastline Extractor. <http://rimmer.ngdc.noaa.gov/mgg/coast/>

³⁴¹International Energy Agency (IEA), Key World Energy Statistics 2008. <http://www.iea.org/>

³⁴²Ministerio de fomento. http://www.ign.es/esmap/mapas_clima_bach/Mapa_clima_07.htm

- **Caracterización de los productos de degradación**

Los productos de degradación, obtenidos tras someter a los biocidas a las condiciones de stress, se caracterizaron mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas, en las condiciones cromatográficas recogidas en la parte experimental (Tabla 4.6) ³⁴³.

De todas las disoluciones de biocidas expuestas por separado a las condiciones de stress, solamente en las disoluciones de los insecticidas piretroides deltametrina, α -cipermetrina, permetrina, fenotrina y ciflutrina, en acetonitrilo, se pudieron identificar productos de degradación.

En la Figura 4.17 se muestra el cromatograma que se obtuvo para cada disolución de deltametrina, α -cipermetrina, permetrina y fenotrina, tras ser sometidas a condiciones de stress, donde se pueden observar los picos cromatográficos correspondientes a los tres productos de degradación identificados.

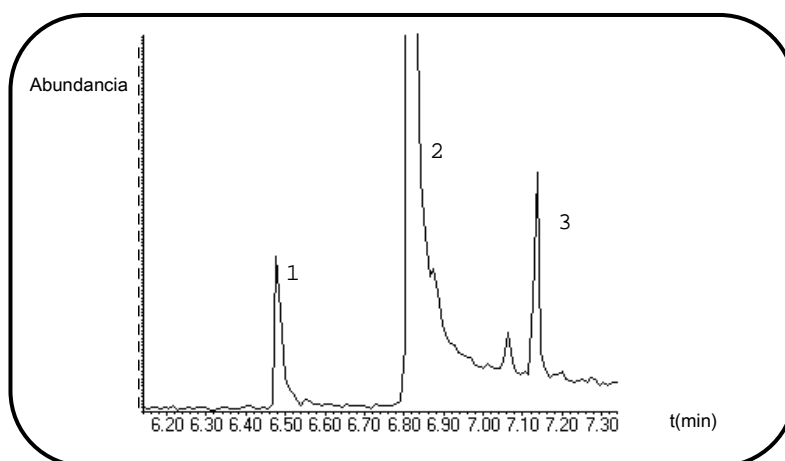


Fig. 4.17. Cromatograma obtenido para disoluciones de deltametrina, α -cipermetrina, permetrina y fenotrina, sometidas a condiciones de stress: **(1)** 3-fenoxibenzaldehído $t_r=6,5$ min., **(2)** 3-fenoxibencilalcohol, $t_r=6,81$ min., **(3)** Ácido 3-fenoxibenzoico, $t_r=7,13$ min.

Se han caracterizado solamente tres productos de degradación para los insecticidas piretroides deltametrina, α -cipermetrina, permetrina y fenotrina, *el 3-fenoxibenzaldehído*, *el 3-fenoxibencilalcohol* y *el ácido 3-fenoxibenzoico*.

³⁴³Alonso ML. Estudio de estabilidad de insecticidas piretroides mediante técnicas cromatográficas. Tesis de Licenciatura de la Universidad del País Vasco, UPV/EHU, Leioa, 2006.

Los espectros de masas de cada producto de degradación obtenido y del compuesto identificado por la librería Wiley, se muestran en las Figuras 4.18-4.20 y en el Esquema 4.1 se recoge la fragmentación propuesta para el ácido 3-fenoxibenzoico.

Ácido 3-fenoxibenzoico (3-PBA)

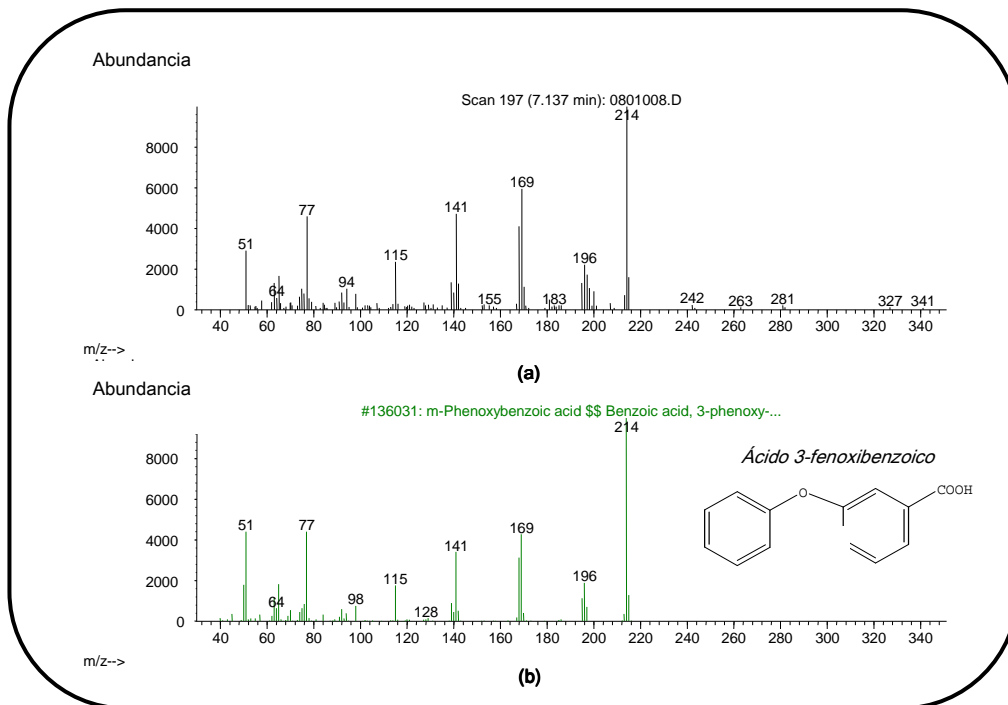
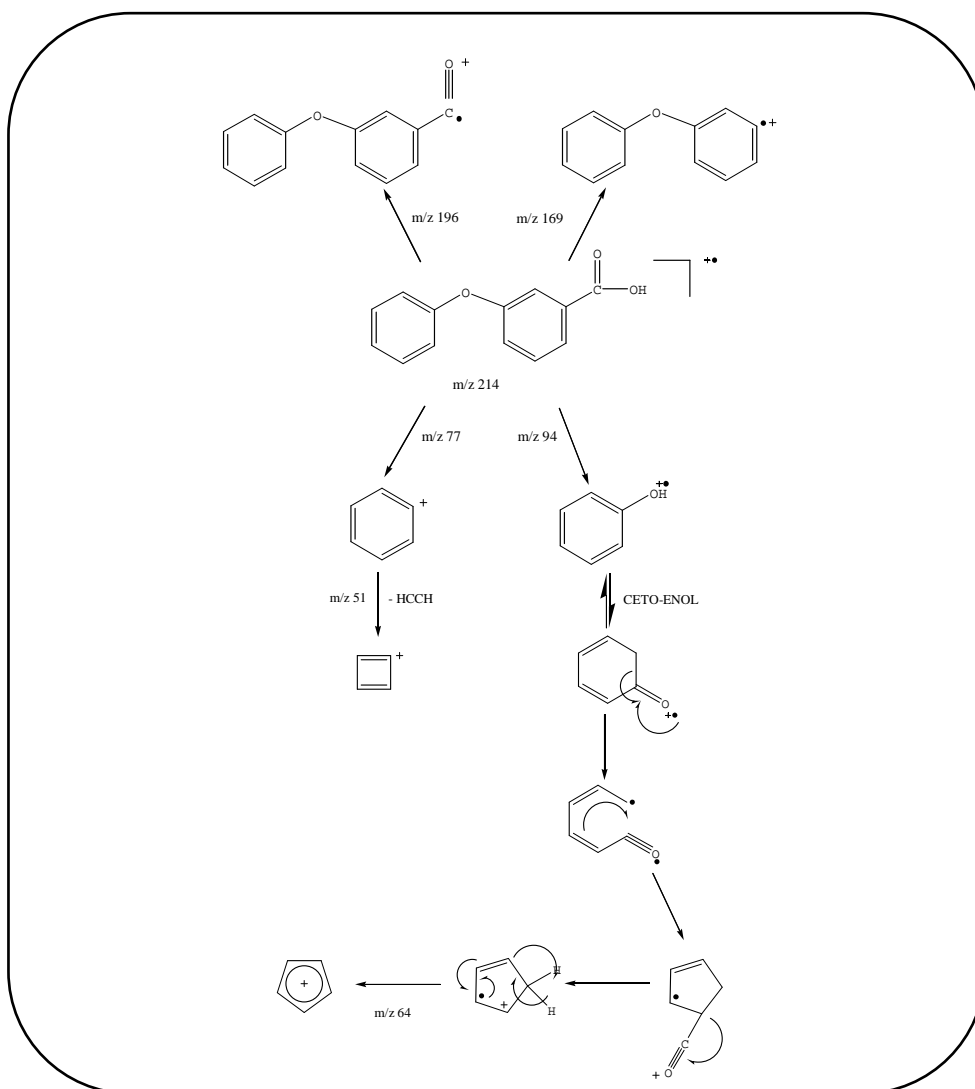


Fig. 4.18. Espectros de masas del producto de degradación obtenido (a) y del compuesto identificado por la librería Wiley (b): Ácido 3-fenoxibenzoico.



Esquema 4.1. Fragmentaciones del ácido 3-fenoxibenzoico.

El ácido 3-fenoxibenzoico forma el ión molecular, M^+ (m/z 214), al ser un éter cíclico saturado. Los iones más abundantes se producen por eliminación del sustituyente unido al carbono oxigenado, seguido de una deshidratación. La presencia de un ácido carboxílico aromático hace que la pérdida del radical HO^\bullet sea muy importante, formando iones benzoílo^{344,345,346}.

³⁴⁴Pretsch E., Clerc T., Seibl J., Simon W. Tablas para la determinación estructural mediante métodos espectroscópicos, 1998. Springer Verlag, New York.

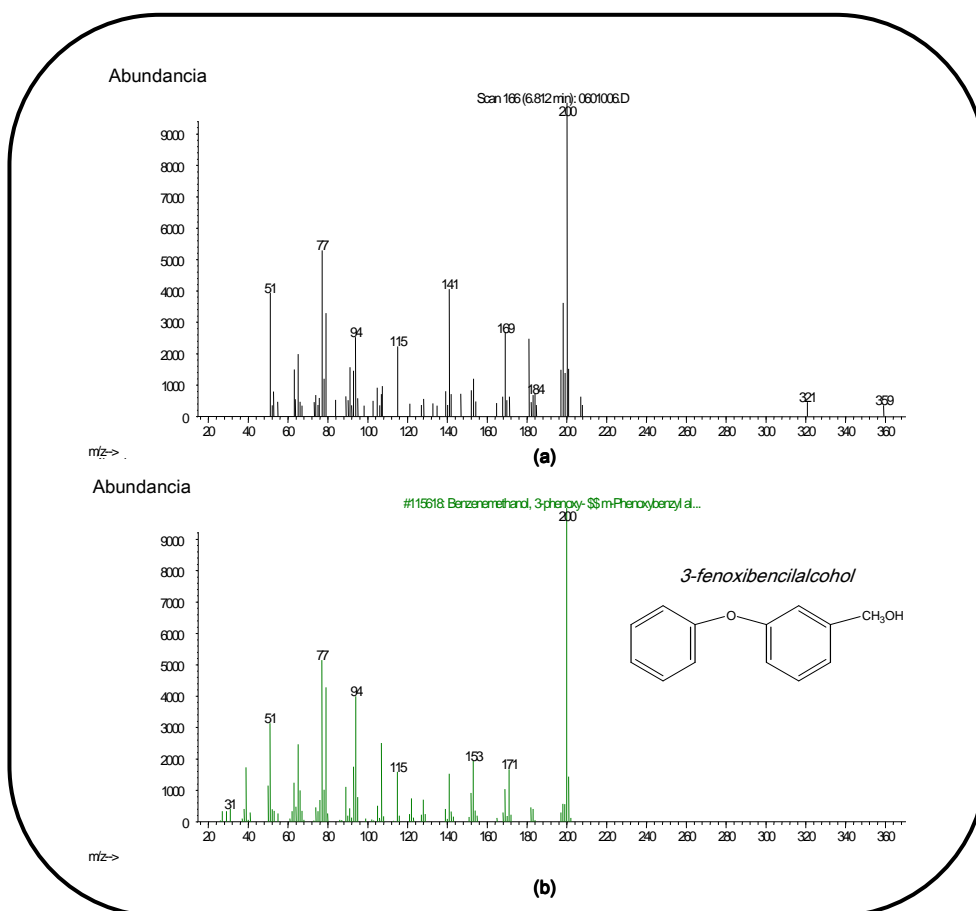
***3-fenoxibencilalcohol**

Fig.4.19. Espectros de masas del producto de degradación obtenido (a) y del compuesto identificado por la librería Wiley (b): 3-fenoxibencilalcohol

En el espectro de masas aparece el ión molecular de relación m/z 200, característico del compuesto. El resto de iones coinciden con los indicados en el Esquema 4.1 de fragmentaciones del ácido fenoxibenzoico.

³⁴⁵Hesse M., Meier H., Zeeh B. Métodos espectroscópicos en Química Orgánica, 1995. Síntesis, Madrid.

³⁴⁶Martin S.R. Understanding mass spectra, 2005. Wiley, New York.

* 3-fenoxibenzaldehido

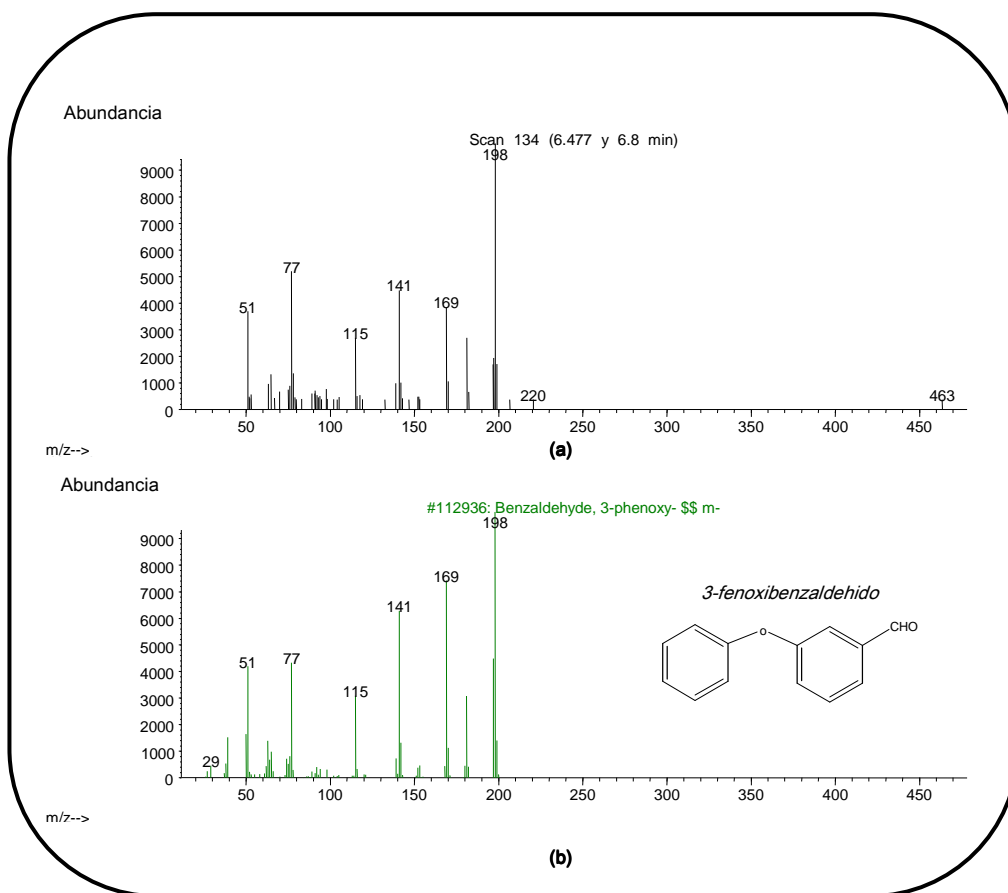


Fig.4.20. Espectros de masas del producto de degradación obtenido (a) y del compuesto identificado por la librería Wiley (b): 3-fenoxibenzaldehido

Como se puede observar en el espectro de masas del 3-fenoxibenzaldehido, aparece el ión molecular de m/z 198 y los demás iones obtenidos coinciden también con los indicados en el Esquema 4.1.

En los aldehídos aromáticos, la fragmentación más favorecida es la pérdida de H para formar un catión benzoilo, m/z 105, que posteriormente se descarbonila para dar lugar al ión m/z 51³⁴⁷.

³⁴⁷Pretsch E., Bühlmann P., Affolter C., Herrera A., Martínez R. Determinación estructural de compuestos orgánicos, 2005, Masson, Barcelona, pp. 321-370.

En la Figura 4.21, se muestra el cromatograma entre 6 y 7 min. obtenido para la disolución del insecticida piretroide ciflutrina. Aparece un pico cromatográfico correspondiente a su producto de degradación, que ha sido identificado como el ácido 4-fluoro-3-fenoxibenzoico.

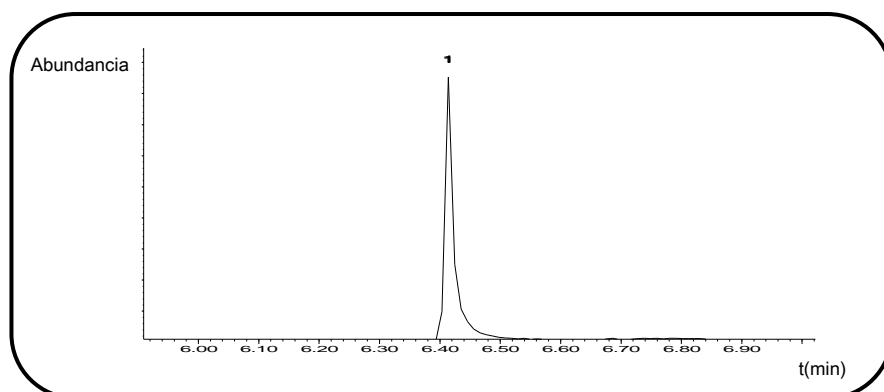


Fig.4.21. Cromatograma obtenido para una disolución de ciflutrina sometida a condiciones de stress:
(1). Ácido 4-fluoro-3-fenoxibenzoico $t_r=6,41$ min.

El espectro de masas y la fragmentación de este producto de degradación se recogen en la Figura 4.22 y en el Esquema 4.2, respectivamente.

***Ácido 4-fluoro-3-fenoxibenzoico (F-PBA)**

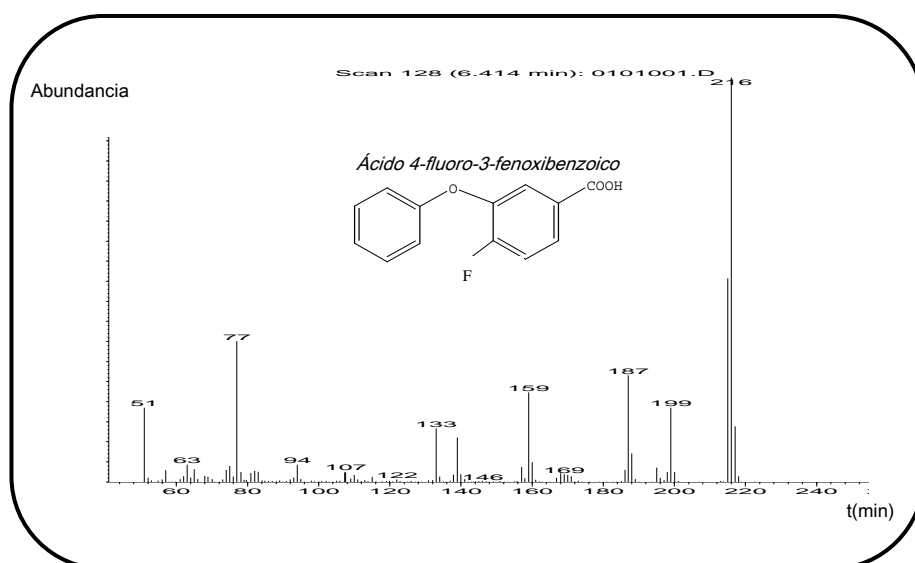
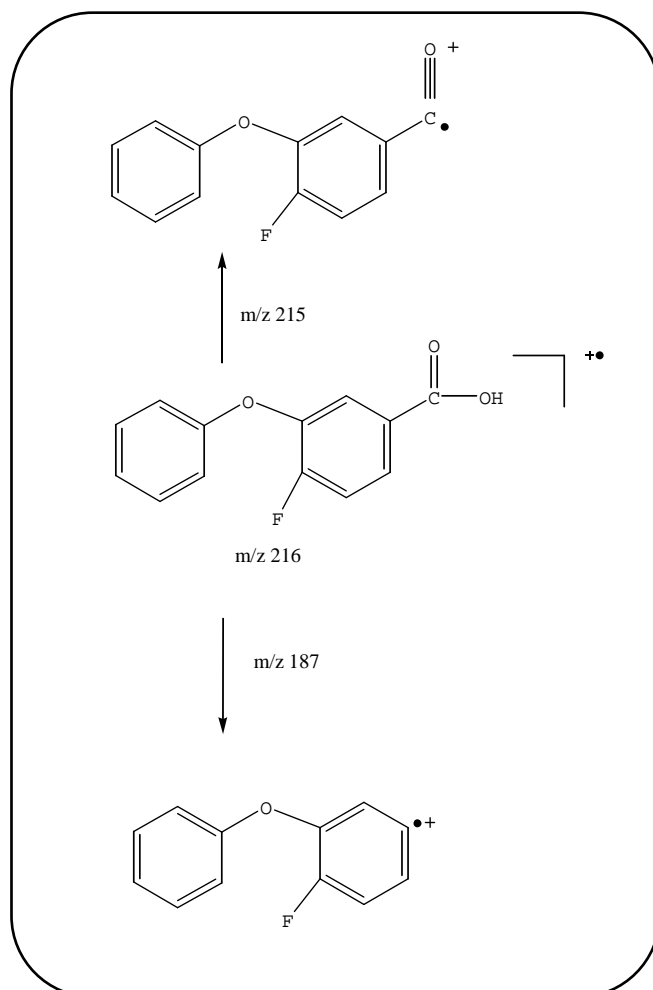


Fig. 4.22. Espectro de masas del producto de degradación ácido 4-fluoro-3-fenoxibenzoico.

La librería Wiley no identifica este compuesto, sin embargo, el ión molecular m/z 216 y los iones obtenidos hacen que se proponga el ácido 4-fluoro-3-fenoxibenzoico como producto de degradación.

Los fragmentos correspondientes a las relaciones m/z 51, 63, 77 y 94, quedan explicados en el Esquema 4.1. El resto de las rupturas que experimenta la molécula se recogen en el Esquema 4.2.



Esquema 4.2. Fragmentaciones características del ácido 4-fluoro-3-fenoxibenzoico.

La bibliografía, como se ha indicado anteriormente, recoge otros productos de degradación de los insecticidas piretroides, detectados en fluidos biológicos, como son, DCCA/Cl₂CA, DBCA/Br₂CA y CDCA, cuya determinación precisa de una etapa de derivatización previa a su análisis mediante cromatografía de gases. El derivatizante normalmente utilizado es N-tert-butildimetilsilil-N-metiltrifluoroacetamida (MTBSTFA)³⁴⁸. La reacción de derivatización precisa un calentamiento a 70° C durante 45 min³⁴⁹, lo que puede producir una adicional degradación de la muestra.

En este trabajo no se ha empleado un procedimiento de derivatización previo al análisis cromatográfico, por lo que sólo han sido detectados los productos de degradación anteriormente citados.

Los productos de degradación identificados no presentan toxicidad, según la bibliografía consultada^{350,351,352}.

³⁴⁸Schettgen T., Koch HM., Drexler H., and Angerer Journal of New gas chromatographic-mass spectrometric method for the determination of urinary pyrethroid metabolites in environmental medicine. *Journal of Chromatography B*. 2000; 778: 121-130.

³⁴⁹Leng G., Gries W. Simultaneous determination of pyrethroid and pyrethrin metabolites in human urine by gas chromatography-high resolution mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 2005; 814 (2): 285-294.

³⁵⁰Gray AJ., Souderlund DM., Hutson DH. *Insecticides Progress in Pesticide Biochemistry and Toxicology*, 1986. Wiley, New York, pp. 193.

³⁵¹Hutson DH. Dipeptide conjugation of 3-phenoxybenzoic acid in the Mallard Duck. *Progress in Drug Metabolism*, 1979; 5: 215.

³⁵²Landrigan PJ., Claudio L., Markowitz SB., Berkowitz GS., Brenner BL., Romero H., Wetmur JG., Matte TD., Gore AC., Godbold JH., Wolff MS. Pesticides and Inner-City Children: Exposures, Risks, and Prevention, *Environmental Health Perspectives Supplements Environmental Health Perspectives Supplements*. S3, 1999; 107.

TEST DE HIDRÓLISIS.

Biocidas:

Se estudió el efecto del pH en condiciones fuertemente ácidas (HCl 1 M) y fuertemente básicas (NaOH 1 M), sobre la estabilidad de las disoluciones de los insecticidas piretroides y el sinergista Bp. Dicho estudio se llevó a cabo a lo largo de 15 días, manteniendo, en todo momento, todas las disoluciones a 4 °C y protegidas de la luz. Los resultados obtenidos provienen de la comparación de la relación de áreas del pico cromatográfico del biocida y del estándar interno en HPLC-uv, obtenidas en el momento inicial y a lo largo del tiempo que dura el experimento, Figura 4.23.

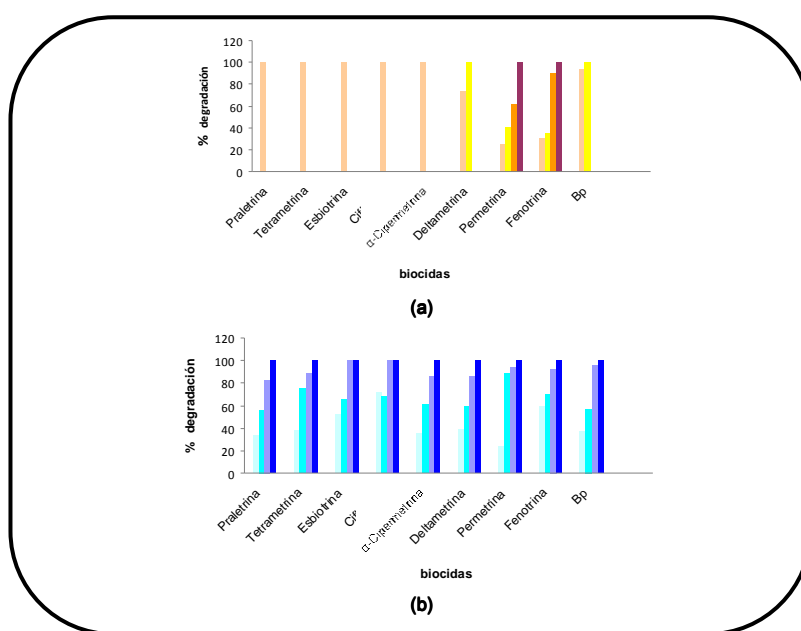


Fig. 4.23. Porcentajes de degradación de los biocidas sometidos a: (a) pH básico y (b) a pH ácido, a tiempo cero, tras 24h, 1 semana y tras 2 semanas.

Como se puede observar en la Figura 4.23, en el medio fuertemente alcalino estudiado, se produce la degradación instantánea de pralletrina, tetrametrina, esbioctrina, ciflutrina y α -cipermetrina, mientras que para deltametrina y Bp la degradación total se alcanza al de 24 h. Para permetrina y fenotrina se produce una degradación total al cabo de 2 semanas.

En medio fuertemente ácido, el proceso de degradación es más lento que en medio fuertemente alcalino, alcanzándose para todos los compuestos estudiados un porcentaje de degradación mayor del 80% al cabo de una semana, lo que concuerda con los datos bibliográficos recogidos en la Tabla 4.3.

Dada la escasa bibliografía sobre la hidrólisis del nicotinoide tiacloprid, se ha estudiado la influencia del pH del medio (5, 7 y 9), sobre su estabilidad. Se comprobó que las disoluciones de tiacloprid permanecían estables para los tres valores de pH ensayados durante al menos 3 meses.

Complejos de inclusión:

Se estudió la liberación del producto encapsulado, de los biocidas acetamiprid, imidacloprid, bifentrina, tetrametrina, deltametrina, bendiocarb y de Bp, para los valores de pH 3 y 6. Se eligieron estos valores de pH en base a la bibliografía consultada sobre la acidez del aparato digestivo de las moscas. Se amplió este estudio a valores de pH alcalinos (pH 9), con el fin de comprobar las ventajas que ofrece la microencapsulación en lo relativo a la estabilidad.

Las suspensiones de los encapsulados en los diferentes medios, se llevaron a sequedad y se monitorizaron mediante DSC, a lo largo de un mes (1, 4, 6 y 30 días).

Los complejos de inclusión se mantienen estables a los tres valores de pH ensayados durante al menos un mes, en la Figura 4.24 se muestran a modo de ejemplo los resultados obtenidos para los complejos de inclusión de los biocidas acetamiprid, bendiocarb, bifentrina y Bp con CD.

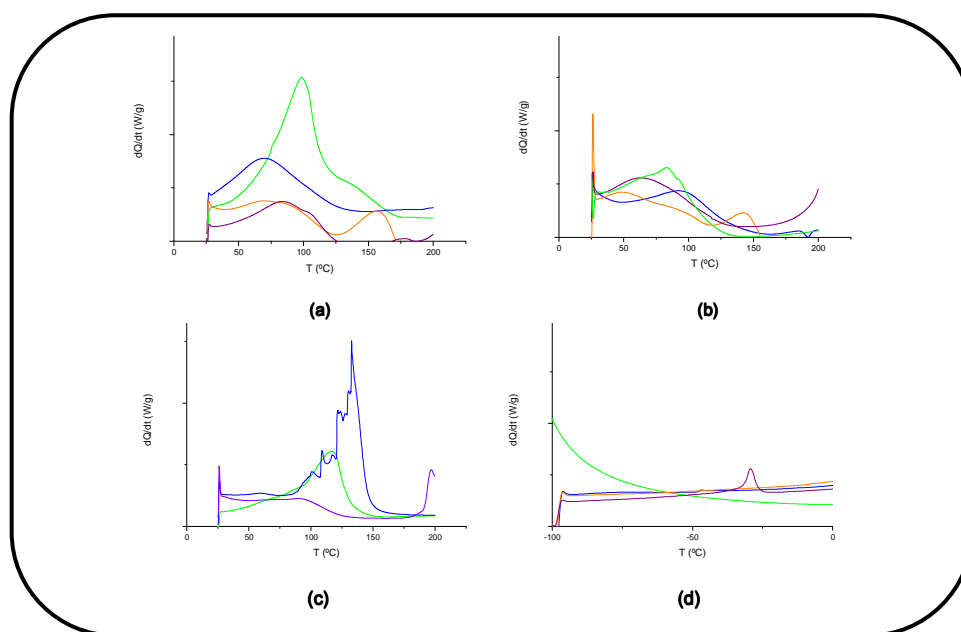


Fig.4.24. Termogramas DSC de (a) Acetamiprid:CD, (b) bendiocarb:CD, (c) bifentrina:CD y (d) Bp:CD. Complejos de inclusión (verde) y complejos sometidos a pH3 (naranja) pH6 (azul) y pH9 (violeta), tras un mes de exposición.

Como se puede observar de la Figura 4.24a y b, los picos de fusión de acetamiprid (100 °C) y Bendiocarb (125 °C) no se observan después de que las disoluciones sean expuestas a los diferentes valores de pH a lo largo de 1 mes.

El complejo de inclusión de bifentrina:CD es estable durante al menos un mes a valores de pH 6 y 9, ya que el pico característico de fusión de la bifentrina a 69 °C no es apreciable en los termogramas obtenidos (Figura 4.24c). Los picos que aparecen de 100-150 °C se deben a la sal utilizada para la preparación del tampón de pH 6.

El termograma obtenido para el complejo Bp:CD a pH 9 muestra un pico a -25 °C, Figura 4.24d, debido a la sal empleada en la disolución tampón. El pico de fusión característico del Bp (-75 °C) no aparece a ningún valor de pH, indicando la estabilidad de este complejo a los valores de pH estudiados.

En la Figura 4.25a se muestran los termogramas obtenidos para el complejo de inclusión imidacloprid:CD, tras 24 horas a pH 3 y 9, donde se puede observar el pico característico del punto de fusión del biocida, 140 °C, lo que indica la liberación del imidacloprid del complejo de inclusión con CD. Con respecto a la estabilidad del complejo a pH 6, no se pueden obtener conclusiones debido a la interferencia que presentan las sales utilizadas para mantener este valor de pH (acético/acetato), Figura 4.25b.

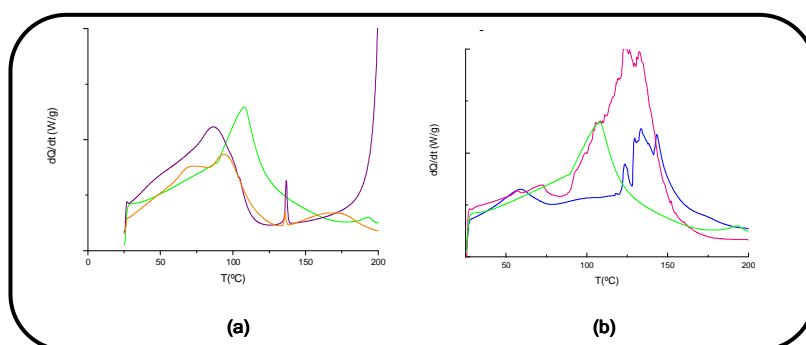


Fig.4.25. Termogramas DSC recogidos al cabo de 24 h de:

- (a) complejo de inclusión Imidacloprid:CD (verde) y complejos sometidos a pH 3 (naranja) y pH 9 (violeta),
 (b) disolución tampón pH 6 (fucsia), complejo de inclusión imidacloprid:CD (verde) y complejo de inclusión sometido a pH 6 (azul).

A la vista de los resultados obtenidos utilizando el tampón acético/acetato, se prepararon distintas disoluciones tampón a pH6 utilizando otras sales. En las Figuras 4.26 y 4.27 se

muestran las curvas calorimétricas de las disoluciones tampón ensayadas: tampón Mcllvaine (ácido cítrico/ Na_2HPO_4) y tampón hidrogenocarbonato.

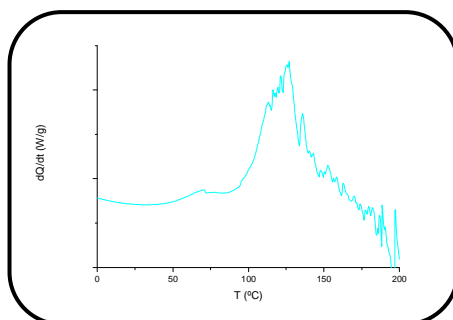


Fig.4.26. Termogramas DSC de la disolución tampón de Mslvaine a pH 6.

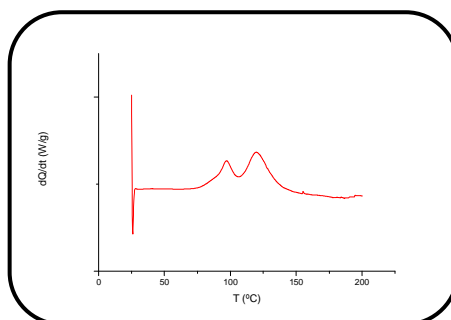


Fig.4.27. Termogramas DSC de la disolución tampón hidrogenocarbonato a pH 6.

Como se puede observar en ambos casos el pico característico de fusión del imidacloprid a 140 °C, quedaría enmascarado por los picos propios de las distintas sales.

Se puede concluir que los complejos de inclusión ofrecen una gran ventaja en la estabilidad frente a la hidrólisis de los insecticidas piretroide, bendiocarb (ya que según la Tabla 4.3 se degrada a pH 5, 7 y 9) y acetamiprid (se degrada a pH 9 como queda recogido en la Tabla 4.3).

4.4.2. Hidrosolubilidad de los microencapsulados

En Tabla 4.10 se recoge el factor de aumento de solubilidad en agua experimentado por los biocidas encapsulados, respecto a los biocidas libres.

Tabla 4.10. Factor de aumento de la hidrosolubilidad de los biocidas en presencia de ciclodextrina.

Complejos de inclusión con CD	Factor de aumento de la hidrosolubilidad
Deltametrina	6
α-cipermetrina	45
Praetrina	13
Tetrametrina	16
Bifentrina	25
Ciflutrina	21
Permetrina	71
Fenotrina	7
Esbiotrina	5
Bendiocarb	7
Acetamiprid	2
Imidacloprid	3
Tiacloprid	3
Butóxido de piperonilo	3

Es de señalar el gran aumento de hidrosolubilidad presentado por la mayoría de los insecticidas piretroides una vez encapsulados. Orgoványi y col.³⁵³ observaron un comportamiento semejante para el complejo de inclusión del insecticida cipermetrina con ciclodextrina, asimismo el aumento de solubilidad obtenido para el complejo Bp:CD concuerda con los resultados presentados por Szejtli y col.³⁵⁴ para este sistema (factor de aumento entre 2,5 a 4).

³⁵³Orgoványi J., Hóttai K., Pfpplá L., Fenyvesib E., Za'raya G. Spectrophotometric and thermoanalytical study of cypermethrin/cyclodextrin complexes. *Microchemical Journal*, 2005; 79: 77–82.

³⁵⁴Szejtli J., Budai S., Radványi H.E., Papp L., Koermoeoczy G., Pap IG. Piperonyl butoxide-cyclodextrin inclusion complexes. 4524068. USA Patent, 1985.

4.4.3. Solidificación de biocidas líquidos

Se han obtenido encapsulados sólidos a partir de los biocidas líquidos praletrina, esbiotrina, permetrina, fenotrina, ciflutrina y el sinergista Bp. Szejtli y col.³⁵⁵ y Abdel-Mohdy y col.³⁵⁶ consiguieron los mismos resultados para praletrina y para el sinergista Bp.

En la Figura 4.27 se muestra a modo de ejemplo el complejo de inclusión sólido homogéneo, formado a partir de Bp líquido y el encapsulante CD. Como ha quedado recogido en el capítulo 2, se ha utilizado la técnica de DSC para la verificación de la formación del producto encapsulado.



Figura 4.27. Fotografía que representa la solidificación del Bp, al estar encapsulado con CD.

³⁵⁵Szejtli J., Budai S., Radvány H.E., Papp L., Koermoecky G., Pap IG. Piperonyl butoxide-cyclodextrin inclusion complexes. 4524068. USA Patent, 1985.

³⁵⁶Abdel-Mohdy F.A., Fouda M.G., Rehan M.F., Aly A.S. Repellency of controlled-release treated cotton fabrics based on cypermethrin and prallethrin. Carbohydrate Polymers, 2008; 73: 92–97

4.4.4. Eficacia insecticida del producto encapsulado.

Los ensayos realizados con cucarachas de la familia *Batella Germánica*, con el fin de comprobar el efecto insecticida por contacto del biocida microencapsulado, mostraron que tras 24 horas el 100% de las cucarachas expuestas al encapsulado acetamiprid:CD seguían vivas, lo que demuestra que la microencapsulación elimina el efecto insecticida por contacto.

Los resultados obtenidos en los experimentos llevados a cabo con moscas de la familia Muscidae, para determinar la eficacia insecticida de los microencapsulados sintetizados, se representan en las Figuras 4.18 y 4.19, para las jaulas de 0,5 y 5 L, respectivamente. Se recogen los porcentajes de mortalidad medios, obtenidos por triplicado para los microencapsulados imidacloprid:CD, acetamiprid:CD, α -cipermetrina:CD, bifentrina:CD y bendiocarb:CD, en comparación con los resultados correspondientes a los biocidas libres en las dos jaulas utilizadas.

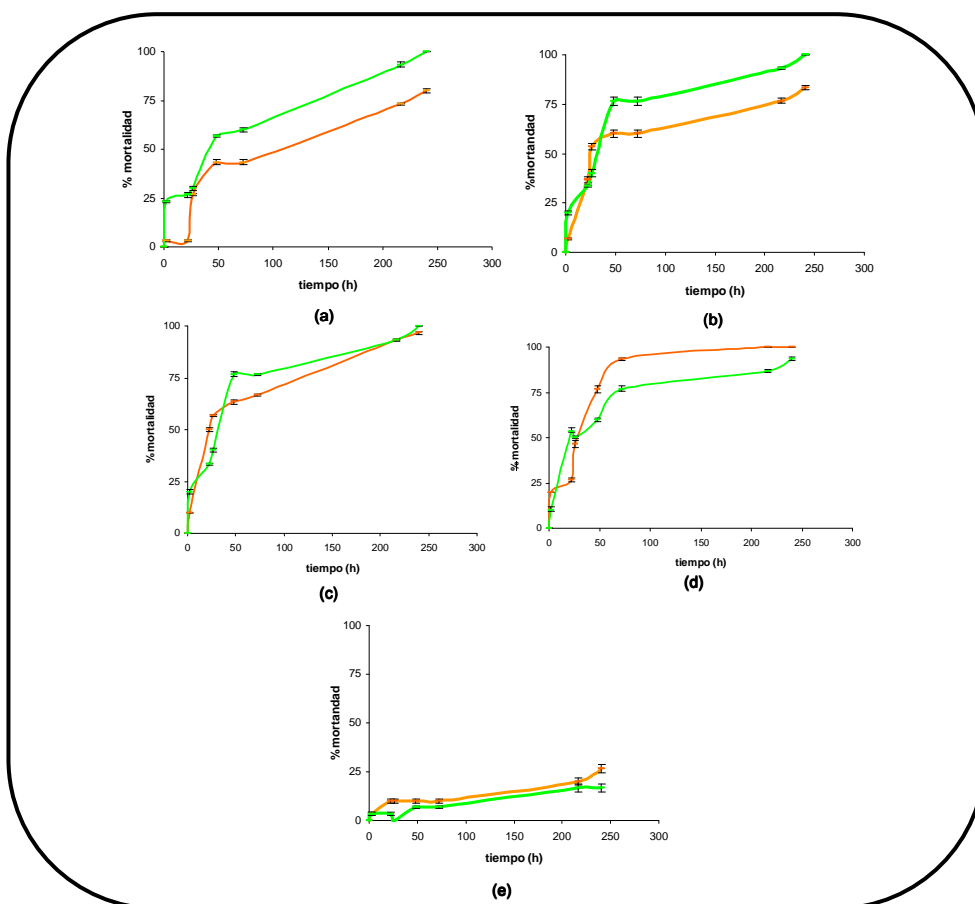


Fig. 4.18. Porcentaje de mortalidad de la mosca común expuesta a biocida (naranja) y al complejo de inclusión (verde) en jaulas de tamaño 0,5 L. N=3 para: (a) imidacloprid, (b) acetamiprid, (c) α -cipermetrina (d) bifentrina y (e) bendiocarb.

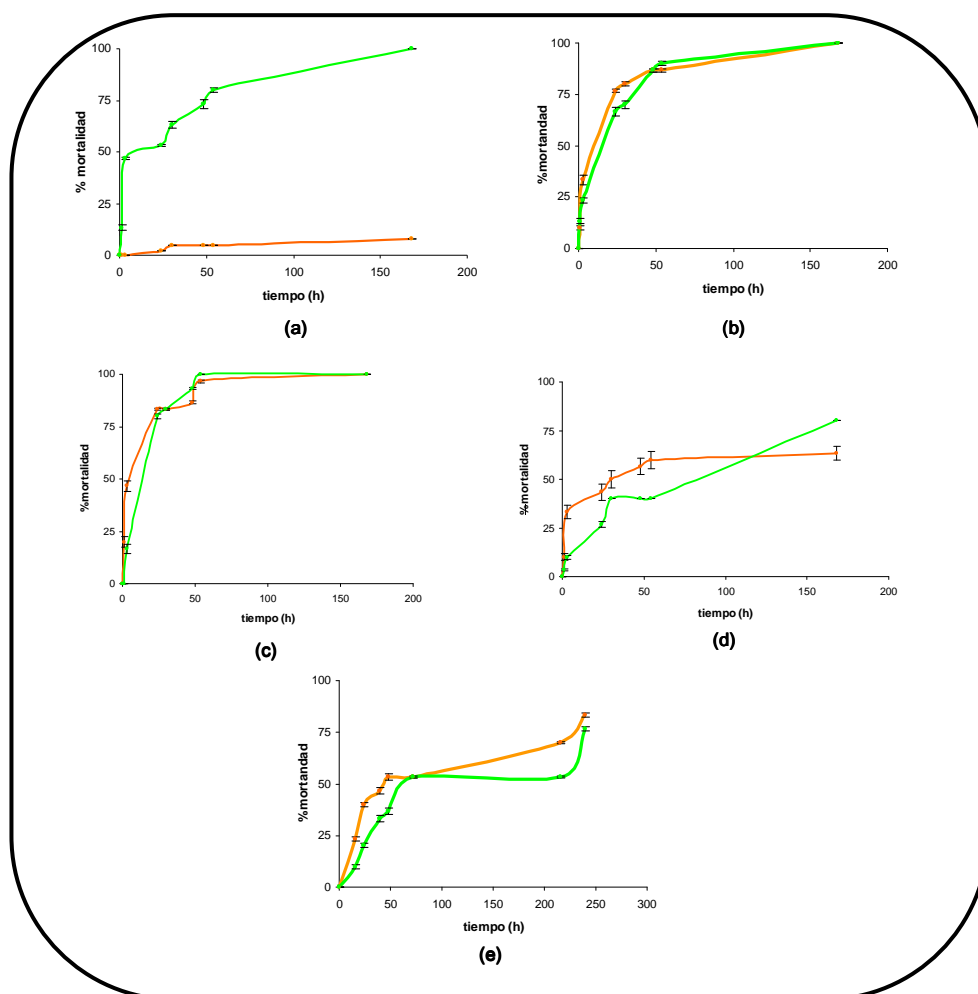


Fig. 4.19. Porcentaje de mortalidad de la mosca común expuesta a biocida (naranja) y al complejo de inclusión (verde) en jaulas de tamaño 5 L. N=3 para: (a) imidacloprid, (b) acetamiprid, (c) α -cipermetrina, (d) bifentrina y (e) bendiocarb.

Se obtiene resultados similares en ambas jaulas, aunque las moscas posean más espacio para moverse. La evolución a lo largo del tiempo de la eficacia insecticida de los microencapsulados es mayor que la de los principios activos, para todos los biocidas estudiados excepto para el caso de la bifentrina y del bendiocarb, aunque al final del experimento se alcancen los mismos resultados, Figuras 4.18/4.19 d y e.

La mosca domestica tiene un comportamiento muy variable. Estos insectos son muy activos y curiosos, caen en la comida constantemente de forma que el producto se queda adherido al cuerpo y lo ingieren al limpiarse, por lo que, no podemos sacar conclusiones acerca de si

los insectos son capaces de diferenciar el encapsulado del biocida libre o si son atraídos más por uno que por otro.

El principio activo actúa tanto por ingestión como por contacto y el microencapsulado con CD solamente por ingestión, como hemos observado anteriormente. Por lo tanto, como ambos consiguen la misma eficacia insecticida quiere decir que los insectos comieron más cantidad del microencapsulado.

Para el caso del bendiocarb no se observa una mejora de los resultados de eficacia insecticida por efecto de la microencapsulación.

Conclusiones

❖ La microencapsulación con ciclodextrinas protege al biocida de los efectos de agentes externos como luz, temperatura, humedad y pH, por lo que permanecerá estable hasta su liberación.

❖ Los microencapsulados formados son estables en las condiciones de los test ensayados, Tabla 4.13, con la excepción de:

-bifentrina que transcurrido un mes se libera, aún preservándolo de la luz y temperatura. Esto puede ser debido a que el encapsulante utilizado no es adecuado para este biocida, o bien porque su estructura, la cual difiere del resto de insecticidas piretroides en su parte alcohólica, le confiere mayor rigidez y no le permite introducirse de forma adecuada en la cavidad de la CD, o bien porque los átomos de fluor le otorgan a la molécula una electronegatividad que desfavorece la unión a los grupos hidroxilo de la molécula de CD.

-imidacloprid, que en condiciones de stress se libera, puede deberse a que según los resultados obtenidos mediante RMN-H¹, los enlaces intermoleculares biocida:CD son menores que los enlaces que presentan el resto de insecticidas nicotinoides, por lo cual se puede deducir que la estabilidad de este complejo puede ser menor al resto. Además, de los estudios de solubilidad de fases resultó que la constante de este complejo fue la menor de los nicotinoides 50, 72 M⁻¹.

Tabla 4.13. Porcentajes de degradación de biocidas libres y su liberación de los microencapsulados biocida:CD, en los diferentes test ensayados.

Exposición Biocida	Test de condiciones atmosféricas normales			Test acelerado	Test de stress	
	3 meses			15 días	5 días	
Biocida	4/21°C	luz artificial	luz solar	54 °C	40 °C / 70% RH / 2,15 MJ h/m ²	
	Biocida en disolución ACN			Biocida en disolución ACN	Biocida en disolución ACN	Biocida como principio activo
Bifentrina	-	-	-	-	-	10
Acetamiprid	-	-	-	-	-	38
Imidacloprid	-	-	-	-	87	78
Tiacloprid	-	-	-	-	17	47
Bendiocarb	-	-	-	-	-	-
Bp	-	-	-	-	-	44
Esbiotrina	-	-	34	-	81	84
Praletrina	-	-	39	34	87	89
Tetrametrina	-	-	24	-	33	49
Fenotrina	-	-	13	-	13	25
Deltametrina	-	-	-	45	-	16
Ciflutrina	-	-	-	20	17	38
Permetrina	-	-	10	-	10	14
αCipermetrina	-	-	-	-	10	13
Biocida-CD	Liberación de bifentrina			Liberación de bifentrina	Liberación de imidacloprid en suspensión acuosa	

❖ Los resultados obtenidos en condiciones de almacenamiento, no se pueden extrapolar a lo que puede ocurrir en el medioambiente, ya que, el comportamiento de los biocidas viene condicionado por otra serie de factores (degradación microbiana, reacciones enzimáticas), muchos de ellos inter-relacionados, de manera que no puede definirse un único parámetro responsable de su degradación en los productos finales en el medio ambiente.

❖ El complejo de inclusión imidacloprid con CD es el único complejo afectado por la hidrólisis. Se ha observado que la liberación del biocida se produce al cabo de un día a pH 3 y 9.

❖ El aumento de **hidrosolubilidad** de los microencapsulados favorece la fabricación de cebos en base agua, más respetuosos con el medioambiente.

❖ Por medio de la microencapsulación con ciclodextrinas se ha podido **solidificar los biocidas líquidos**, lo cual ofrece ventajas de gran importancia a nivel industrial, en cuanto a manejo, pesada o limpieza.

❖ El compuesto microencapsulado posee una eficacia insecticida similar a la del biocida libre.