



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 V:

APLICACIÓN DE LA
MICROENCAPSULACIÓN CON CDs AL
FUNGICIDA TEBUCONAZOL



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

Aplicación de la Microencapsulación con CDs al fungicida Tebuconazol

| | |
|---|-----|
| 5.1. Introducción | 179 |
| 5.2. Objetivo..... | 182 |
| 5.3. Parte experimental..... | 183 |
| 5.4. Resultados.... | 184 |
| 5.4.1. Seguimiento/Verificación de la formación del complejo de inclusión Tebuconazol:CD en estado sólido..... | 184 |
| 5.4.2. Seguimiento/Verificación de la formación del complejo de inclusión Tebuconazol:CD en disolución..... | 185 |
| 5.4.3. Verificación de la formación del complejo de inclusión tebuconazol:CD mediante análisis termogavimétrico..... | 187 |
| 5.4.4. Verificación de la estequiometría de los complejos de inclusión..... | 189 |
| 5.4.5. Caracterización de los complejos de inclusión Biocida-CD en estado sólido..... | 190 |
| SEM..... | 190 |
| Distribución del tamaño de partícula mediante dispersión láser..... | 190 |
| Difracción Raxos X en polvo..... | 191 |
| Difracción de Rayos X en monocristal..... | 191 |
| FT-IR..... | 191 |
| RMN-C ¹³ | 192 |
| 5.4.6. Caracterización de los complejos de inclusión Biocida-CD en disolución..... | 192 |
| RMN-H ¹ | 192 |
| 5.4.7. Propiedades del microencapsulado del fungicida Tebuconazol:CD..... | 194 |
| Estabilidad..... | 194 |
| Hidrosolubilidad de los productos microencapsulados..... | 195 |
| CONCLUSIONES..... | 196 |

5. APLICACIÓN DE LA MICROENCAPSULACIÓN CON CDs AL FUNGICIDA TEBUCONAZOL

5.1. INTRODUCCIÓN

En la última parte de este trabajo, se pretende comprobar la viabilidad del procedimiento de encapsulación desarrollado, para obtener encapsulados de otro biocida comercializado de forma conjunta con algunos de los insecticidas estudiados.

En concreto se ha elegido un fungicida de la familia triazol, el **tebuconazol**, debido a que se comercializa junto a los insecticidas **permetrina** o **α -cipermetrina**, para su utilización contra insectos y hongos destructores de la madera, en tratamientos preventivos y curativos^{357,358} y también junto con el insecticida nicotinoide **imidacloprid**, para su uso en el tratamiento de semillas de cereales³⁵⁹. En la zona este de España se suele utilizar en el cultivo de arroz, como alternativa a otros fungicidas como tricyclazole y prochloraz. Además, el tebuconazol puede ser utilizado en cultivos y plantaciones de ajo, cebada, plátano, trigo, vid y plantas ornamentales. Su uso está indicado para evitar las enfermedades producidas por los microorganismos que cohabitan y son transportados por los insectos hasta la población³⁶⁰.

Los fungicidas son compuestos que actúan inhibiendo la síntesis de ergosterol, que es un componente lipídico de la membrana celular de los hongos y microorganismos, impidiendo así su crecimiento³⁶¹.

³⁵⁷www.DTS-OABE.com

³⁵⁸www.Quimunsa.es

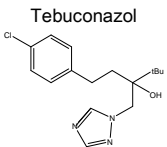
³⁵⁹www.BayercropscienceSL.es

³⁶⁰Sancho E., Villarroel MJ., Fernandez C., Andreu E., Ferrando MD. Short-term exposure to sublethal tebuconazole induces physiological impairment in male zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2010; 73: 370–376.

³⁶¹Ragsdale NN., Sisler HD. The nature, modes of action and toxicity of fungicides. *Hanbook of pest management in agriculture*. Pimentel D. CRC press, 1999, Boca Ratón, USA, pp. 461-469.

En la Tabla 5.1 se recogen las propiedades físico-químicas del tebuconazol extraídas del CRC Handbook of pesticides³⁶².

Tabla 5.1. Propiedades físico-químicas de tebuconazol.

| | Cas number | PM (g/mol) | Tamaño (x, y, z) Å | DL ₅₀ : Oral Dermal (mg/Kg) Inhalación (mg/L) | S _{H₂O} (g/L) | S _{acetona} (g/L) | P.eb (°C) | M.P (°C) |
|---|-------------|---------------|-------------------------|---|--------------------------------------|-------------------------------|--------------|-------------|
|  | 107534-96-3 | 307.82 | 7.31, 4.88, 10,96 | 1700 >2000 >5,09 | 0.04 | >1000 | 476 | 102.4 |

PM-Peso molecular/ S_{H₂O} -Solubilidad en agua/ S_{acetona} -Solubilidad en acetona

P.eb-Punto de ebullición/ M.P-Punto de fusión

La bibliografía recoge datos sobre la estabilidad de este fungicida expuesto a la luz, temperatura y distintos valores de pH^{363,364}, Tabla 5.2. No se han encontrado referencias sobre la estabilidad de los complejos de inclusión de tebuconazol.

Tabla 5.2. Datos de condiciones de estabilidad de tebuconazol recogidos en bibliografía.

| Tebuconazol | |
|-------------|------------|
| Luz uv | Se degrada |
| Luz solar | Se degrada |
| pH5 | hidrólisis |
| pH7 | hidrólisis |
| pH9 | hidrólisis |
| 50°C | Estable |

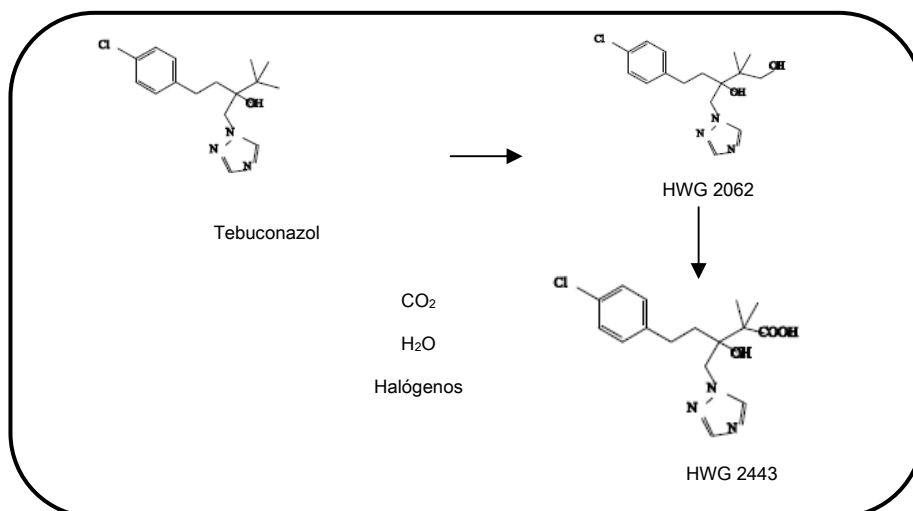
El tebuconazol sufre fotodegradación en medio acuoso, dando lugar a los productos de degradación recogidos en el Esquema 5.1, produciéndose, finalmente, la descomposición total del compuesto hasta la formación de CO₂, H₂O y/o halógenos. Este proceso se ha seguido mediante radiomarcadores de ¹⁴C^{365,366}.

³⁶²CRC Handbook of pesticides. Milne GWA, 2005, CRC press, Boca Ratón, Florida, U.S.A. pp.11-200.

³⁶³Roman M. Stability of some complex insecticide and fungicide mixtures. Analele Sectiei de Protectia Plantelor. Institutul Central de Cercetari Agricole, Bucharest, 1965; 3: 405-409.

³⁶⁴Pesticide Manual. ISBN 1 901396 23 1 Copyright ©2000. The British Crop Protection Council. Software developed by Wise & Loveys Information Services.

³⁶⁵<http://www.fao.org/ag/AGP/AGPP/Pesticid//tebucona.pdf>



Esquema 5.1. Productos de fotodegradación del tebuconazol

El tebuconazol está clasificado como tóxico para organismos acuáticos y ligeramente tóxico para aves y abejas. Si se usa de forma inapropiada o abusiva, puede causar serios problemas medioambientales y de salud³⁶⁷.

En la bibliografía se han encontrado estudios de encapsulación de este fungicida con polímeros como polimetilmetacrilato (PMMA) y anhídrido poliestirenomaleico (PSMA)^{368,369} y con CD³⁷⁰ como agentes encapsulantes. En este último caso, Balmas y col. realizan un método de encapsulación que necesita 18 h de agitación a 70 °C para obtener un rendimiento del 90 %.

³⁶⁶Konwick BJ., Garrison AW., Avants JK., Fisk AT., Bioaccumulation and biotransformation of chiral triazole fungicides in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Aquatic Toxicology*, 2006; 80: 372–381.

³⁶⁷www.Pesticideinfo.org

³⁶⁸Asrar J., Ding Y., La Monica RE., Ness LC. Controlled Release of Tebuconazole from a Polymer Matrix Microparticle: Release Kinetics and Length of Efficacy. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 2004; 52(15): 4814–4820.

³⁶⁹Asrar J, Ding Y, La Monica RE, Ness LC. Controlled release of tebuconazole from a polymer matrix microparticle: release kinetics and length of efficacy. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2004; 52(15): 4814-4820.

³⁷⁰Balmas V., Delogu G., Sposito S., Rau D., Migheli Q. Use of a Complexation of Tebuconazole with β -Cyclodextrin for Controlling Foot and Crown Rot of Durum Wheat Incited by *Fusarium culmorum*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2006; 54:480-484.

5.2. OBJETIVO

El objetivo principal de este capítulo se centra en:

“La formación del complejo de inclusión tebuconazol:CD, mediante el método de encapsulación de disolución con disolventes orgánicos desarrollado y recogido en esta memoria”

Seguidamente se procederá al seguimiento/verificación del complejo de inclusión formado en estado sólido y en disolución.

Se aplicará la metodología analítica utilizada a lo largo de esta investigación para la determinación de la estequiometría del producto microencapsulado y para la caracterización del complejo de inclusión tebuconazol:CD, mediante SEM, difracción de RX, espectroscopía FT-IR, RMN y análisis elemental.

Por último, se establecerán las propiedades de este microencapsulado en términos de estabilidad y mejora de la hidrosolubilidad con respecto al biocida libre.

5.3. PARTE EXPERIMENTAL

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

Las propiedades fisicoquímicas del tebuconazol nos hizo aplicar, no solo el procedimiento de encapsulación optimizado (método de disolución con disolventes orgánicos), sino también, el método de complejación en disolución, mezclando 1, 2, 3 mmol o exceso de CD en agua y añadiendo 1mmol de biocida disuelto en acetona.

La metodología analítica utilizada para la verificación y la caracterización del microencapsulado tebuconazol:CD será la recogida en la Parte experimental de los Capítulos 2 y 3.

Debido a la escasa solubilidad en agua del tebuconazol (0,04 g/L), la verificación de la formación del complejo de inclusión en disolución, se ha llevado a cabo aplicando el método de Higuchi y Connors³⁷¹ sobre disoluciones hidroetanólicas al 50%³⁷². La determinación de la estequiometría de la reacción de complejación se ha realizado aplicando el método de Yamamoto y col. sobre disoluciones en ACN. Para ello se construyeron curvas de calibrado del fungicida, en ambos medios, en el intervalo de concentración de 1-15 mg/L.

El establecimiento de las propiedades físico-químicas del complejo de inclusión tebuconazol:CD, en términos de estabilidad y mejora de la hidrosolubilidad, se ha realizado en base al procedimiento experimental recogido en el capítulo 4, aplicando los diferentes test de estabilidad sobre el complejo de inclusión tebuconazol:CD en las condiciones experimentales recogidas en el apartado 4.3.

³⁷¹Higuchi T, Connors KA. Phase solubility techniques. *Adv. Anal. Chem. Instr.*, 1965; 4:117-212.

³⁷²Yamamoto I., Unai T., Suzuki Y., Katsuda Y. Preparation, stabilization, and insecticidal activity of cyclodextrin-inclusion compounds of pyrethroids. *Journal of Pesticide Science*, 1976; 1: 41-48.

5.4. RESULTADOS

5.4.1. Seguimiento/Verificación de la formación del complejo de inclusión tebuconazol:CD en estado sólido

Se ha comprobado la viabilidad del método de disolución con disolventes orgánicos, para la encapsulación del fungicida tebuconazol, utilizando CD como agente encapsulante.

En la Figura 5.1 se muestran los termogramas DSC de tebuconazol y CD puros, la mezcla física y el complejo de inclusión obtenido por los dos métodos de encapsulación ensayados, complejación en disolución y disolución con disolventes orgánicos. Se observa que mediante este último método se obtiene un rendimiento mayor del 99%.

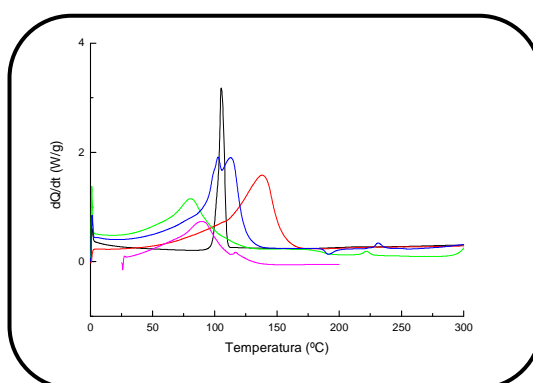


Fig. 5.1. Termogramas de Tebuconazol (negro), CD (rojo), mezcla física (azul) y complejo de inclusión obtenidos mediante el método de disolución en disolventes orgánicos (verde) y el método de complejación en disolución (rosa).

La encapsulación, como ya se ha explicado anteriormente, implica la desaparición del pico característico del biocida tebuconazol, que aparece a 102 °C, como se observa en la curva calorimétrica del método de disolución con disolventes orgánicos, Figura 5.1, mientras que en la curva del método de complejación en disolución se observa que una parte del tebuconazol se encuentra fuera de la CD, ya que aparece su pico característico del cambio de estado. Lo que demuestra que el método de encapsulación utilizado para el resto de biocidas es aplicable a este fungicida con resultados satisfactorios, mejorando los resultados de rendimiento de Balmas y col.³⁷³

³⁷³Balmas V., Delogu G., Sposito S., Rau D., Migheli Q. Use of a Complexation of Tebuconazole with β -Cyclodextrin for Controlling Foot and Crown Rot of Durum Wheat Incited by *Fusarium culmorum*. J. Agric. Food Chem., 2006; 54:480-484.

5.4.2. Seguimiento/Verificación de la formación del complejo de inclusión tebuconazol:CD en disolución

La utilización de la espectrofotometría uv-vis como técnica analítica para llevar a cabo el estudio del complejo de inclusión en disolución, hizo necesaria la obtención del espectro de absorción uv-vis del tebuconazol en ACN, Figura 5.2. Se eligió como longitud de onda de trabajo 220nm.

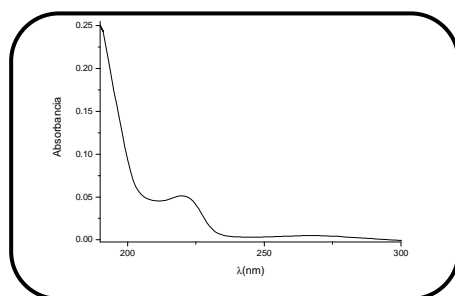


Fig. 5.2. Espectros de absorción UV-Vis de disoluciones de tebuconazol en ACN

No se han observado diferencias entre los espectros de absorción de tebuconazol libre y encapsulado, comportamiento semejante al presentado por el resto de complejos de inclusión biocida:CD estudiados. La aplicación del método de solubilidad de fases requiere la utilización de disoluciones hidroetanólicas (50%), como se ha indicado anteriormente. Conocida la absorción del etanol a longitudes de onda inferiores a 250nm, se eligió como longitud de onda de trabajo 280 nm.

En la tabla 5.3 se recogen las ecuaciones de regresión obtenidas para las dos curvas de calibrado, en disolución hidroetanólica y en ACN.

Tabla 5.3. Ecuaciones de regresión de tebuconazol en los distintos medios (N= 6).

| Medio | λ (nm) | Ecuación | Intervalo de concentración lineal (mg/L) | r^2 |
|-----------------------------|----------------|--------------|--|--------|
| EtOH:H ₂ O (50%) | 280 | $0,09x+0,05$ | 1-15 | 0,9997 |
| ACN | 220 | $0,08x+0,02$ | | 0,9996 |

Estudios de solubilidad de fase (PSA)

Los estudios de solubilidad de fase se llevan a cabo como en el capítulo 2, siguiendo el método propuesto por Higuchi y Connors³⁷⁴. Como se puede observar en la Figura 5.3, la solubilidad intrínseca del tebuconazol aumenta al añadir CD hasta alcanzar un límite, en el cual se forma un complejo insoluble ajustándose a un diagrama de fases tipo Bs.

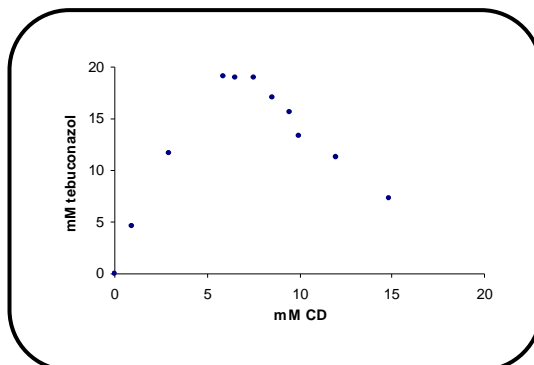


Fig.5.3. Diagramas de solubilidad de fase (PSA) de tebuconazol en función de la adición de CD. (biocida:CD, mM).

Para el cálculo de la estequiometría del complejo formado se opta por aplicar el método de Yamamoto y col.

Método de Yamamoto y col.

La aplicación del método descrito por Yamamoto y col., muestra en la Figura 5.4 la variación del rendimiento de la reacción de formación del complejo tebuconazol:CD con las diferentes relaciones estequiométricas biocida:CD, obteniéndose un máximo para una relación estequiométrica de 0,33.

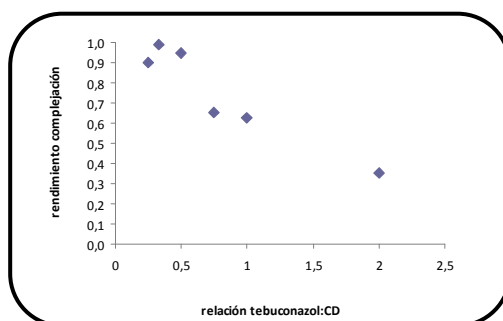


Fig.5.4. Variación del rendimiento de la reacción de encapsulación tebuconazol:CD con la relación estequiométrica molar.

³⁷⁴Higuchi T, Connors KA. Phase Solubility Techniques. Adv Anal Chem Instr., 1965; 4:117-212.

Por lo tanto se puede concluir que la estequiometría del complejo tebuconazol:CD que ofrece mayor rendimiento es 1:3.

El procedimiento de encapsulación utilizado por Balmas y col.³⁷⁵ dió lugar a complejos de inclusión de estequiometría 1:2 con un rendimiento del 90% y de 1:3, con un rendimiento del 60%.

5.4.3. Verificación de la formación del complejo de inclusión tebuconazol:CD mediante análisis termogravimétrico

Se obtuvieron los termogramas TGA/DTA del principio activo, de la CD y del producto encapsulado y se compararon con los obtenidos para la mezcla física, Figura 5.5

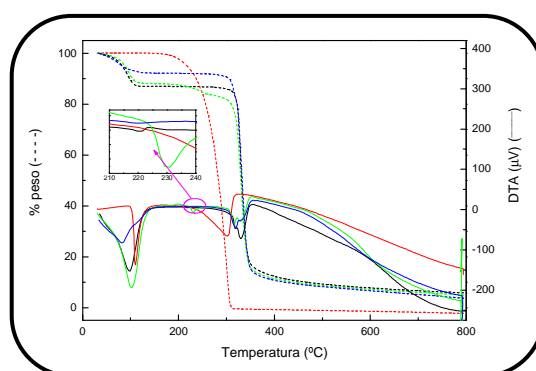


Fig. 5.5. Termogramas TGA (- - -) y curvas DTA (-) de de tebuconazol (rojo), Ciclodextrina pura (negro), mezcla física (verde) y encapsulado (azul).

La CD utilizada para los experimentos fue secada previamente. Las pérdidas de masa reflejadas en la curva de TGA corresponden: la primera, a la pérdida de agua y la siguiente a la degradación del biocida, de la ciclodextrina o del complejo de inclusión. Por lo tanto, realizando los cálculos correspondientes a la pérdida de agua que todavía está enlazada en la CD y que corresponde al agua de inclusión y conociendo la estequiometría del complejo, se determinan los moles de H₂O/mol tebuconazol/mol de CD que presenta, tanto la mezcla física, como el complejos de inclusión^{376,377} (Tabla 5.4). Pevio a este estudio se calculó que la relación molecular CD/H₂O era de 1/9.

³⁷⁵Balmas 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*. J. Agric. Food Chem., 2006; 54:480-484.

³⁷⁶Yilmaz V.T., Karada A., Jgbudak H. Thermal decomposition of cyclodextrin inclusion complexes of ferrocene and their derivatives. Thermochemica Acta, 1995; 261:107-118.

Tabla. 5.4. Mol CD/tebuconazol/H₂O obtenidas mediante TGA/DTA.

| CD/H ₂ O [1/9] | Mezcla física | Complejo de inclusión |
|---------------------------|---------------|-----------------------|
| Tebuconazol | 3/1/29 | 3/1/17 |

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

En los termogramas de DTA se observan tres picos endotérmicos para la descomposición de la CD. El primer pico entre 50 y 120 °C corresponde a su deshidratación³⁷⁸. El segundo pico a 223 °C es un pico característico de la CD, no corresponde con una pérdida de peso en el TGA, pero no se sabe realmente a que es debido, puede ser asociado a una transformación molecular de naturaleza desconocida, según Bergamasco y col.³⁷⁹. Aparece tanto en las curvas de CD pura como en la mezcla física pero no en el encapsulado, por lo que se puede deducir que **no existe CD libre en el complejo**. Por lo tanto, aunque Balmas y col. obtengan un complejo 1:2, nosotros podemos asegurar que el complejo 1:3 se obtienen con un máximo rendimiento, al no observarse ni CD, ni biocida libres.

Finalmente, el último pico se relaciona con la degradación de la CD a aproximadamente 350 °C. En cuanto al tebuconazol, los resultados de DTA muestran picos endotérmicos o exotérmicos, a 102 °C debidos a su fusión y entre 240-260 °C, correspondientes al proceso de degradación.

³⁷⁷Kohata S., Jyodoi K., Ohyoshi A. Thermal decomposition of cyclodextrins (α -, β -, γ -, and modified β -CD) and of metal—(β -CyD) complexes in the solid phase. *Thermochim. Acta*, 1993; 217: 187-198.

³⁷⁸Szafranek A., Szafranek J. Kinetic parameters of thermal decomposition of complex of β -cyclodextrin with water. *Journal of Thermal and Analysis Calorimetry*, 1988, 34, 917-926.

³⁷⁹Bergamasco R., Zanin GM., Moraes F. Sulfuramid Volatility Reduction by α -Cyclodextrin. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 2005; 53: 1139-1143.

5.4.4. Verificación de la estequiometría de los complejos de inclusión

Electroforesis capilar de zona/Espectrofotometría uv-vis

Se calculó la concentración de CD del encapsulado, a partir de la oxidación del complejo de inclusión llevada a cabo con IO_4^- y según la reacción de Malaprade, esquema 2.1 y la concentración de biocida existente en el producto tebuconazol:CD formado, mediante espectrofotometría uv-vis.

De los resultados obtenidos, Tabla 5.5, se confirma que la estequiometría del complejo de inclusión formado es 1:3.

Tabla 5.5. Resultados obtenidos del número de moles de biocida y CD en un complejo de inclusión biocida:CD. Cálculo de la estequiometría de la microencapsulación.

| | Tebuconazol:CD |
|---|---|
| Ecuación de regresión de KIO_4 para la determinación de mol CD | 41,5x-24,5 $r^2=0,9997$ $(3,2\pm 0,4)*10^{-5}$ |
| Ecuación de regresión del biocida en ACN:H₂O (50%) mol tebuconazol | 0,04x-0,02 $r^2=0,9996$ $(1,0\pm 0,01)*10^{-5}$ |
| Estequiometría de la reacción | 1:3 |

Análisis elemental

En la Tabla 5.6 se recoge el porcentaje de C, H, O y N que presenta el complejo de inclusión tebuconazol:CD. De esta forma se puede calcular la relación estequiométrica en el encapsulado, corroborando que los resultados experimentales concuerdan con los datos teóricos, considerando un complejo de estequiometría 1:3.

Tabla 5.6. Porcentajes de C, H, O y N obtenidos por análisis elemental para el caso del complejo de inclusión Tebuconazol:CD y datos calculados teóricamente.

| Compuesto | %C | %H | %N | %O |
|---|----------|---------|----------|----------|
| Datos teóricos de Tebuconazol | 62,37 | 7,1 | 13,64 | 16,9 |
| $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{NO}_4$ (307,82 g/mol) | | | | |
| Datos experimentales de Tebuconazol | 62,6±0,3 | 7,2±0,1 | 13,5±0,1 | 16,7±0,3 |
| Datos teóricos de β-Ciclodextrina | 38,9 | 6,8 | / | 54,3 |
| $\text{C}_{42}\text{H}_{70}\text{O}_{35}$ (1135g/mol) *9H ₂ O | | | | |
| Datos experimentales de β -Ciclodextrina | 38,6±0,1 | 7,0±0,3 | / | 54,4±0,1 |
| Datos teóricos de Tebuconazol:CD (1:3) | 36,59 | 5,08 | 0,85 | 58,3 |
| $\text{C}_{64}\text{H}_{96}\text{O}_{43}\text{N}_2$ (3939,82 g/mol) *17H ₂ O | | | | |
| Datos experimentales de Tebuconazol:CD | 36,5±0,6 | 5,3±0,3 | <L.D | 58,3±0,1 |

5.4.5. Caracterización del complejo de inclusión tebuconazol:CD en estado sólido

Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido muestran la morfología general del tebuconazol, de la mezcla física y del complejo de inclusión en el sólido cristalino obtenido, Figura 5.6.

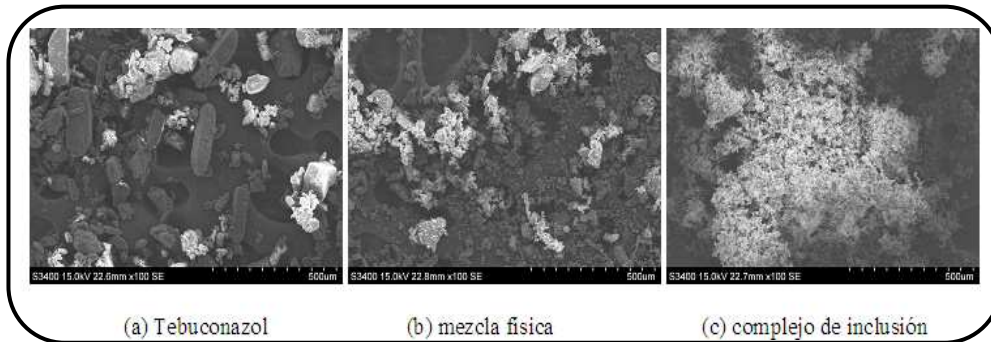


Fig.5.6. Imágenes de microscopía de barrido electrónico para los sistemas tebuconazol:CD.

Se puede observar que la morfología del complejo de inclusión difiere de la mezcla física. La irregularidad de los agregados dificulta el cálculo del tamaño de partícula que se lleva a cabo mediante el programa Image J, explicado en el capítulo 2, y que da como resultado un valor medio del tamaño de partícula de 50 μm.

Distribución del tamaño de partícula mediante dispersión por láser

En la Figura 5.7 se muestra el resultado obtenido de la distribución del tamaño medio de partícula observado por dispersión láser, en escala logarítmica.

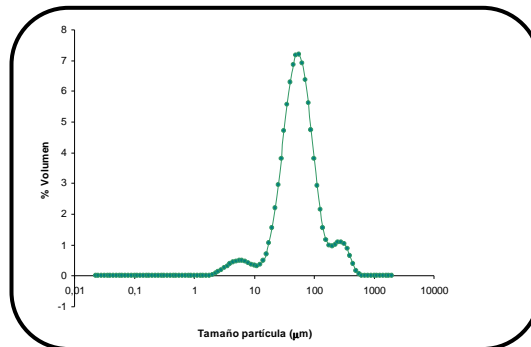


Fig. 5.7. Distribución del tamaño de partícula de tebuconazol:CD analizado mediante difracción láser.

El resultado obtenido de 50 μm concuerda con el calculado por SEM.

Difracción de RX

En la Figura 5.8 se recogen los difractogramas de RX obtenidos para tebuconazol, CD, mezcla física y complejo de inclusión formado. Se deduce el carácter cristalino del complejo tebuconazol:CD en base a las nítidas señales obtenidas, así como la formación de un nuevo tipo de estructura, debido a la interacción fungicida:CD.

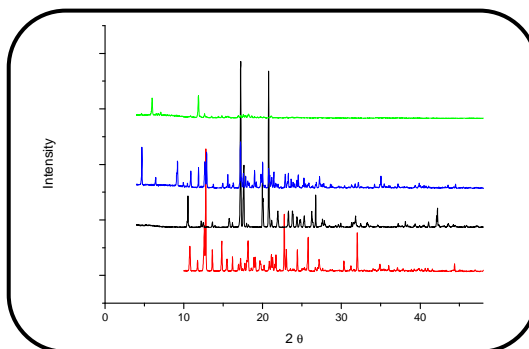


Fig 5.8. Difractogramas de Rayos-X de: tebuconazol (**negro**), β -ciclodextrina (**rojo**), mezcla física (**azul**), complejo de inclusión obtenido por la técnica de disolución con disolventes orgánicos (**verde**).

Difracción de RX de monocristal

No se ha obtenido un monocristal del complejo de inclusión, en las condiciones experimentales recogidas en el apartado 3.3.

Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)

En la Figura 5.9 se muestran los espectros FTIR del sistema tebuconazol:CD. El espectro FTIR de la mezcla física y del complejo de inclusión son prácticamente similares, no pudiendo interpretarse qué enlaces de la molécula de tebuconazol se encuentran dentro o fuera de la cavidad de la CD, debido al solapamiento de las bandas de la CD, pero sí se puede observar el desplazamiento existente en las bandas correspondientes a los enlaces C-H de la CD, de 1750 a 1600 cm^{-1} , lo cual explica que ha ocurrido una interacción CD-biocida.

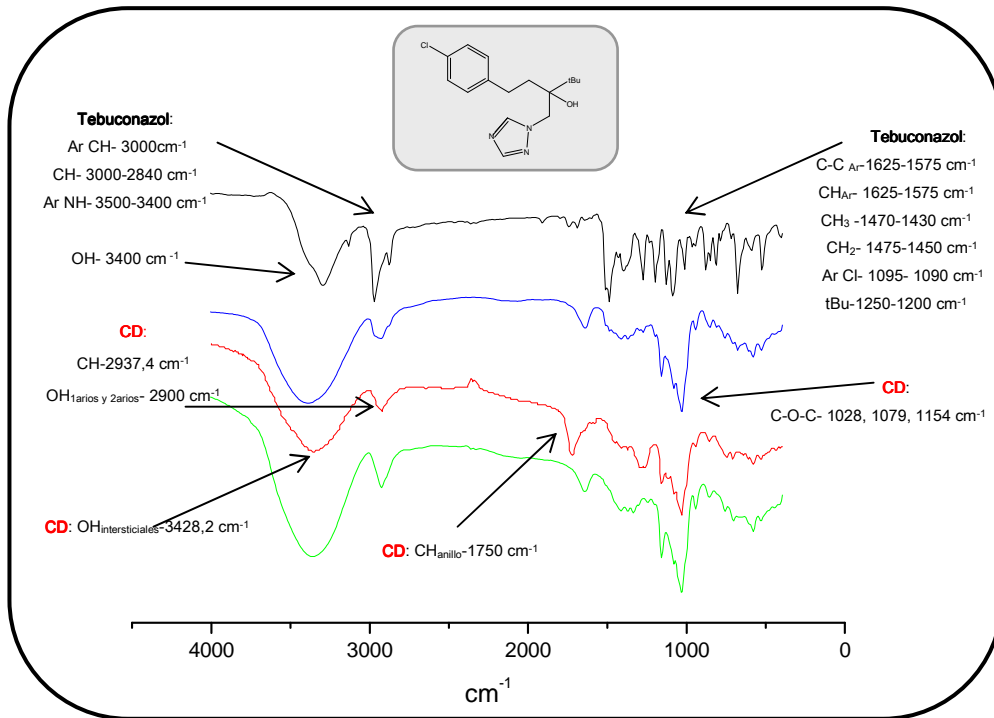


Fig. 5.9. Espectro infrarrojo de Tebuconazol (negro), CD (roja), mezcla física (azul) y complejo de inclusión (verde).

5.4.6. Caracterización del complejo de inclusión tebuconazol:CD en disolución

Con el fin de obtener información estructural del complejo formado en disolución se ha aplicado la técnica RMN-H¹.

Espectroscopía de resonancia magnética nuclear de próton (RMN-H¹)

En la Figura 5.10 se muestran los espectros de RMN-H¹ obtenidos para la sustancia pura y el complejo de inclusión en disolución de D₂O. La Tabla 5.7 recoge los desplazamientos químicos observados como resultado del proceso de microencapsulación.

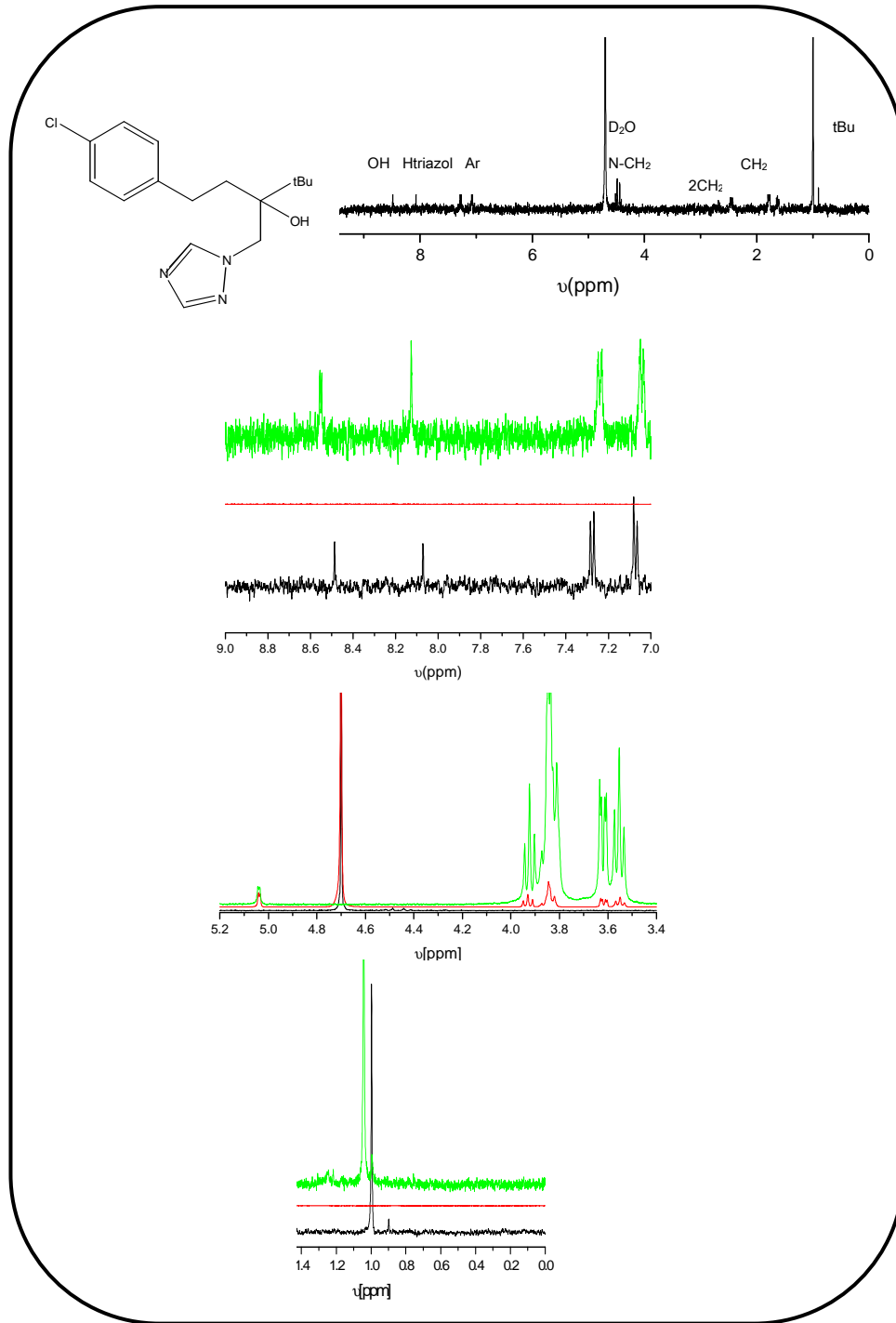


Figura 5.10. Espectros de RMN- H^1 del sistema Tebuconazol:CD, tebuconazol puro (negro), CD (rojo) y complejo de inclusión (verde).

Tabla 5.7. Desplazamientos de protón $\Delta\delta$ del complejo de inclusión Tebuconazol:CD(cj), en comparación con la señales de las sustancias puras.

| Tebuconazol | δ_{Tebu} | δ_{ci} | $\Delta\delta$ |
|-------------|-----------------|---------------|----------------|
| OH | 8,4916 | 8,5478 | -0,0562 |
| Htriazol | 8,0835 | 8,1270 | -0,0435 |
| Ar-H | 7,2815 | 7,2396 | 0,0420 |
| Ar-H | 7,0774 | 7,0437 | 0,0337 |
| tbut | 1,0025 | 1,0427 | 0,0402 |
| β -CD | δ_{free} | δ_e | $\Delta\delta$ |
| H3 | 3,93 | 3,90 | 0,01 |
| H5 | 3,82 | 3,79 | 0,03 |

A la vista de estos desplazamientos se puede deducir que existe interacción de toda la molécula de tebuconazol con los hidrógenos 3 y 5 de la CD, excepto por los grupos metileno.

5.4.7. Propiedades del microencapsulado del fungicida tebuconazol con CD.

Estabilidad

A partir de los termogramas DSC del sistema tebuconazol:CD, donde no aparece el pico característico de la fusión de tebuconazol a 102 °C, se puede deducir que el complejo de inclusión se mantuvo estable al menos 3 meses bajo **condiciones atmosféricas normales** y 15 días sometidos a las condiciones del **test acelerado**, tomando como referencia en el test de ANOVA la disolución de tebuconazol en ACN almacenada a 4 °C en frascos de cristal topacio, Figura 5.11.

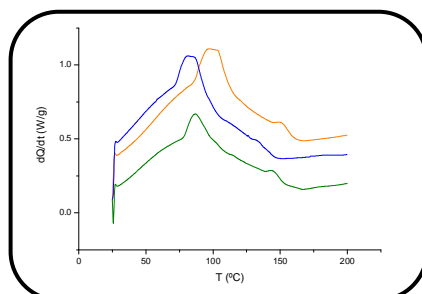


Fig. 5.11. Termogramas DSC de Tebuconazol:CD sometidos a las condiciones de: test en condiciones atmosféricas normales (temperatura **azul**) y luz (**naranja**) y test acelerado (**verde**).

El complejo de inclusión de tebuconazol se mantiene estable en las condiciones del **test de stress**, mientras que el fungicida puro sometido a las mismas condiciones se degrada (15%) en estado sólido y es prácticamente estable (< 0,5%) en disolución de acetonitrilo, Figura 5.12a. Los resultados se obtienen de la comparación a tiempo inicial y final de las absorbancias medidas mediante espectrofotometría uv-vis.

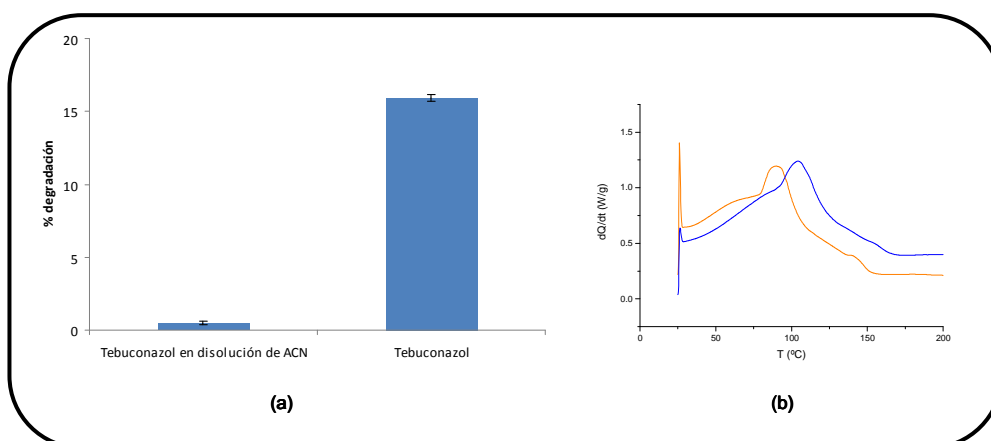


Figura 5.12. Porcentajes de degradación en condiciones del test de stress para (a) tebuconazol (en disolución de 10mg/L de acetonitrilo y como principio puro) y (b) tebuconazol:CD (en estado sólido (naranja) y en suspensión acuosa (azul)).

A partir de los termogramas DSC, Figura 5.12b, obtenidos para el microencapsulado tebuconazol:CD tras ser sometido al test de **hidrólisis**, se puede observar que a pH 3 el complejo es estable al menos durante 1 mes, mientras que se produce la liberación del principio activo al cabo de 4 días para valores de pH 6 y 9. Los resultados se obtienen de la comparación, a tiempo inicial y final del experimento, de las absorbancias medidas mediante espectrofotometría uv-vis.

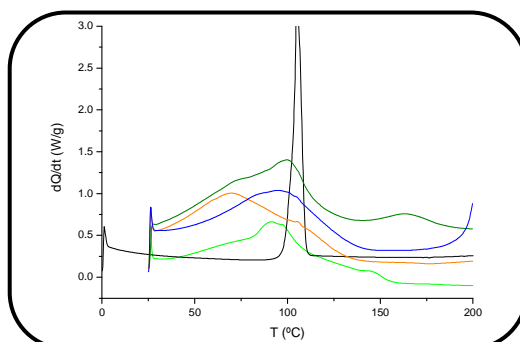


Fig. 5.12. Termogramas DSC de tebuconazol (negro), complejos de inclusión (verde) y complejos sometidos a pH3 (verde) durante 1 mes, pH6 (naranja) y pH9 (azul) durante 4 días.

Hidrosolubilidad

Como resultado del método de saturación se observó que el fungicida tebuconazol experimenta un gran cambio en su hidrosolubilidad en presencia de ciclodextrina, su solubilidad aumenta en un factor de 265, lo que supone una gran ventaja en la preparación de un producto comercial en base agua de este fungicida.

Conclusiones:

- ❖ El procedimiento de encapsulación de disolución con disolventes orgánicos, es adecuado para encapsular fungicidas como el tebuconazol, utilizando CD como encapsulante, con un rendimiento de complejación mayor del 99%.
- ❖ 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 por láser y SEM**, podemos asegurar que el complejo de inclusión, aunque en forma de agregados, presenta un tamaño micrométrico, pudiendo clasificarse como **Microencapsulado**.
- ❖ El microencapsulado obtenido presenta naturaleza cristalina, lo cual ha sido observado por difracción de **RX**.
- ❖ A partir de los resultados obtenidos por las distintas técnicas de caracterización utilizadas, se propone la estructura recogida, en la Figura 5.13, como la más probable para el complejo de inclusión tebuconazol:CD.

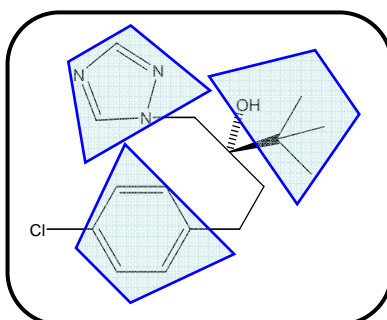


Fig. 3.23. Estructura propuesta para el complejo de inclusión tebuconazol:CD.

- ❖ La encapsulación mejora la estabilidad del tebuconazol en las condiciones de los test estudiados (condiciones normales, test acelerado y de stress)
- ❖ Se observa un gran aumento de la hidrosolubilidad de tebuconazol cuando se produce la microencapsulación con CD.