

NANOENCAPSULACIÓN DE TIMOL PARA SU APLICACIÓN COMO INSUMO FITOSANITARIO

J.Arata¹, M. Córdoba², L.Hermida¹

INTI Química, ¹Lab. Sistemas de Liberación Controlada, ²Lab. Desarrollo Analítico y Control de Procesos
jarata@inti.gov.ar

Introducción

Las enfermedades bacterianas y fúngicas de cultivos representan un serio problema para los rendimientos de las cosechas por lo que es necesario el empleo de cantidades masivas de productos fitosanitarios, en ocasiones de efectos poco estudiados o controvertidos para el medio ambiente.

Muchas especies de plantas producen compuestos que tienen un rol fundamental en su mecanismo defensivo frente a bacterias, virus, hongos, parásitos e insectos como agentes naturales antimicrobianos e incluso se han identificado los componentes que producen el efecto biocida¹.

Entre estos, el timol es uno de los más efectivos frente a varias especies de hongos y bacterias que afectan a las plantas. Está presente en los aceites esenciales de tomillo y orégano, presenta una baja toxicidad en humanos y una baja volatilidad. Aunque su aplicación como compuesto fitosanitario se encuentra limitado, producto de su baja solubilidad en agua, su reactividad y su degradación frente a condiciones ambientales adversas. Por ello, al nanoencapsular el agente activo, se podría proteger del calor, la humedad, los cambios de pH, el oxígeno y otros compuestos reactivos. Por otro lado, permitiría modular la liberación y disminuir la dosis a emplear por incremento en el área superficial (nanosistema)².

Asimismo existen publicaciones que hacen referencia al uso de quitosano (Q) para el recubrimiento de diferentes superficies. Este polímero es biocompatible, biodegradable, no tóxico y bioadhesivo. Además, posee actividad biocida frente a bacterias y hongos. Todas estas características le aportarían una mayor funcionalidad al nanosistema. De este modo se contaría con un efecto antimicrobiano prolongado (Ti encapsulado) sumado a la acción inmediata (Q), con posibles efectos sinérgicos y podría adherirse a la superficie de las plantas (cargada negativamente).

Objetivo

Optimizar el proceso de obtención de las nanopartículas de Timol (Np-Ti), Caracterizar

las formulaciones, evaluar la eficiencia de encapsulación y estudiar el recubrimiento de las Np-Ti con Q.

Descripción

Las Np-Ti se obtuvieron usando etilcelulosa (EC), un polímero biocompatible y no tóxico que se comercializa en el país, a través de la técnica de encapsulación conocida como Nanoprecipitación. Se optimizaron los siguientes parámetros de formulación:

Parámetros Fijos	Parámetros Variables
Solvente: Acetona Homogenización alto cizallamiento Relación Fase Orgánica (FO)/Fase acuosa (FA) EC peso molecular [EC]	Relación Ti/EC [tensioactivo] [Sólidos] Temperatura de agregado de FO

Tabla 1. Parámetros fijos y variables para la optimización de la obtención de Np-Ti. *[] = concentración.

Las variables de respuesta fueron: el rendimiento (R%), la eficiencia de encapsulación (EE%), el diámetro medio (Z-Ave) y la carga superficial de las Np (Pot-Z) determinado por difracción dinámica de la luz (DLS) y la morfología evaluada por microscopía de barrido electrónico (SEM).

El contenido de activo y la eficiencia de encapsulación se determinaron por cromatografía líquida de alta performance con detector UV (HPLC-UV). Para ello fue necesario desarrollar el método de extracción y cuantificación.

A su vez se evaluó el recubrimiento por interacción electrostática de las Np-Ti con Q. Se determinó la relación óptima de EC:Q en ácido cítrico (QC), acético (QAc) y mezcla de cítrico/acético (QAcC); en la cual el Q no estuviera en exceso. Además, se estudió la fijación del Q (formación de enlace covalente) en las Np-Ti, utilizando ácido cítrico como ligante y persulfato de potasio (K₂S₂O₈) como catalizador calentando a 60°C durante 5hs. Se centrifugó la suspensión, se descartó el sobrenadante y se cuantificó el Q presente en

las Np-Ti a través de la técnica colorimétrica de Wischke.

Resultados

Los mejores resultados se hallaron con: una relación de Ti:EC de 1:1; una [sólidos] de 4%; una temperatura de agregado de 15°C y sin tensioactivo. En caso de ser necesario también se podría trabajar con [sólidos] del 6% o superiores. La Tabla 2 muestra los resultados obtenidos en estas condiciones.

R%	EE%	Z-Ave (nm)	Pot-Z (mV)
93 ± 2	96,1 ± 0,2	173 ± 3	40 ± 6

Tabla 2. Caracterización de las Np-Ti obtenidas con las variables de proceso optimizadas.

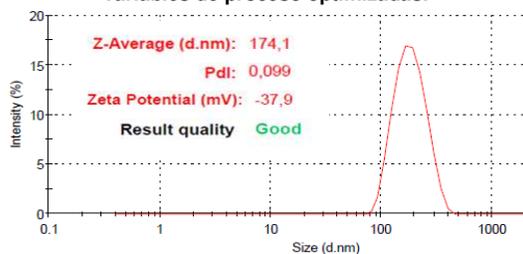


Figura 1. Reporte de distribución de tamaño de partícula y Pot-Z de Np-Ti.

Como se observa en la Figura 1 se obtuvieron partículas menores a 200nm, monodispersas (Pdl < 0,15) y con una carga superficial de alrededor de -40 mV, datos que explicarían la estabilidad de la suspensión durante seis meses.

En la Figura 2 se aprecia la morfología superficial de las Np-Ti, se obtuvieron partículas regulares y esféricas.

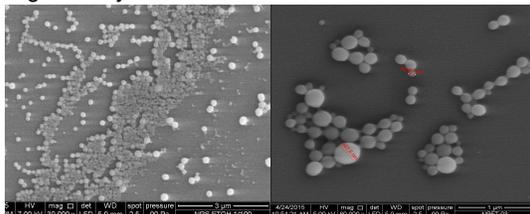


Figura 2. Micrografías SEM de Np-Ti de 30000x (Izq.) y 80000x (Der.)

Respecto al recubrimiento de las Np-Ti con Q, como se observa en la Figura 3, a relaciones EC:Q entre 75:1 y 5:1 el Pot-Z se mantuvo constante alrededor de los 20 mV, por debajo de 5:1 el Q deja de depositarse sobre las Np-Ti, encontrándose en exceso. Por microscopía óptica se observó además que a relaciones mayores o iguales a 30:1 se formaban aglomerados macroscópicos.

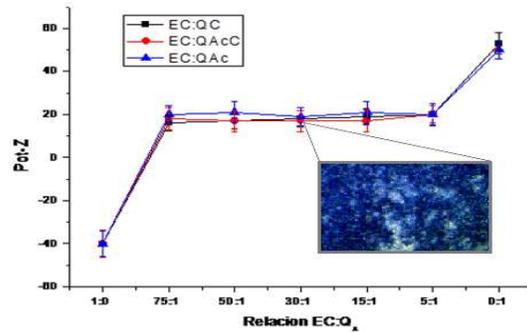


Figura 3. Pot-Z en función de la relación EC/Q en QC (negro); en QAcC (rojo) y en QAc (azul).

Para el estudio de la fijación de Q se evaluaron relaciones EC:Q entre 15:1 y 5:1. En la Figura 4 se observa que, al formarse la unión covalente entre el Q y las Np-Ti, el contenido del mismo es 3 veces superior al del Q unido electrostáticamente para las 3 relaciones de EC:Q estudiadas. El mayor contenido de Q en las Np-Ti se obtuvo con las relaciones 10:1 y 5:1, no existiendo diferencias significativas entre las mismas.

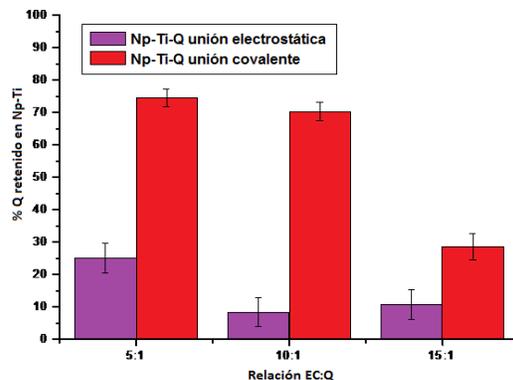


Figura 4. % Q retenido en las Np-Ti en función de la relación EC:Q para Q unido electrostáticamente (violeta) y Q unido covalentemente (rojo).

Conclusiones

En este trabajo se optimizó la obtención de Np-Ti recubiertas y entrecruzadas con Q y se caracterizaron los sistemas obtenidos.

Restan completar los ensayos de poder biocida frente a patógenos comunes, habiéndose obtenido resultados preliminares alentadores. Falta estudiar las propiedades mecánicas (Resistencia a la deformación, módulo de Young), la caracterización por DSC y FTIR y evaluar de la estabilidad acelerada y fotoestabilidad.

Bibliografía

- Bakkali et al. 2008. *Biological effects of essential oils – A review.* Food Chem. Toxicol. 46, 446–475.
- Watsanacha et al. 2012. *Thymol nanospheres as an effective anti-bacterial agent.* Int J Pharm 434. 360–365.