

**DISEÑO DE MATRICES POLIMÉRICAS
BIODEGRADABLES PARA LA LIBERACIÓN
CONTROLADA DE FEROMONAS EN EL
CONTROL DE PLAGAS.**



TESIS DOCTORAL

Gabriela A. Valladares



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA
INSTITUTO MULTIDISCIPLINARIO DE BIOLOGIA VEGETAL
Ciudad Universitaria, 5000 Córdoba
ARGENTINA**

El presente trabajo de Tesis Doctoral fue realizado en el Departamento de Química Orgánica, Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal, de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba, el cual se presenta a consideración de dicha Facultad para optar al título de Doctora en Ciencias Químicas.

Directora

Prof. Dra. Miriam C. Strumia

Codirectora

Prof. Dra. Paola A. González Audino

Comisión de tesis

Prof. Dra. Susana Rubiales

Prof. Dr. Roberto Rossi

Evaluador/a externo

Prof. Dra. Mirta Aranguren

La presente tesis doctoral surge del interés conjunto de diferentes centros de investigación del país interesados en la búsqueda de alternativas novedosas para enfrentar un serio problema de plagas en dos de los principales polos productivos forestales del país como son el Delta entrerriano y la Llanura Bonaerense.

Los centros de investigación que hicieron posible este trabajo fueron:

- CEVE (Centro Experimental de la Vivienda Económica) y CIECS (Centro de Investigaciones y Estudios sobre la Cultura y Sociedad). Es desde estos institutos donde surge la motivación de obtener tablas de madera de álamo de calidad adecuada para la construcción de vivienda.
- CIPEIN (Centro de Investigaciones de Plagas e Insecticidas). Este fue el centro de investigación que aportó a la tesis su conocida trayectoria en tratamientos de control de plagas alternativos y amigables con el ambiente. Particularmente sus trabajos y experiencia en *Megaplatus mutatus* aportaron al proyecto sus conocimientos en ecología química y cómo desde esta ciencia abordar la problemática surgida por este insecto.
- IMBIV (Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal). Es finalmente en el Laboratorio de Polímeros de este instituto donde se pudieron reunir los intereses de las distintas disciplinas y llevar a cabo el trabajo experimental multidisciplinario que compone la presente tesis doctoral.

En este marco tripartito se desarrolló el siguiente trabajo de tesis, donde a partir de los conocimientos aportados por cada uno de los centros nombrados se intentó abordar de manera novedosa una problemática local.

ABREVIATURAS

NEA	Noreste Argentino
CAT	Certificado de Aptitud Técnica
NOA	Noroeste Argentino
PEBD	Polietileno de Baja Densidad
SPME	Microextracción en Fase Sólida
C_0	Cantidad de compuesto en un dispositivo al comienzo de la evaporación
C_t	Cantidad de compuesto en un dispositivo en tiempo t
k	Tasa de evaporación constante
QS	Quitosano
AL	Alginato de Sodio
STOL	Sulcatol: 6-metil-5-hepten-2-ol
STONA	Sulcatona: 6-metil-5-hepten-2-ona
3-PEN	3-Pentanol
NaOH	Hidróxido de Sodio
CaCl ₂	Cloruro de Calcio
ESF♥QUI	Esferas combinadas corazón de quitosano y cubierta de alginato
ESF♥AL	Esferas combinadas corazón de alginato y cubierta de quitosano
HCl	Ácido clorhídrico
Ca ²⁺	Calcio
COO ⁻	Grupo carboxílico
FTIR	Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
SEM	Microscopía de barrido electrónico
UV	Ultravioleta
G	unidades de ácido gulurónico
M	unidades de ácido manurónico
rpm	revoluciones por minuto
BC	Beta Caroteno
RC	Rojo Congo

CHCl_3

THF

H_2O

Cloroformo

Tetrahidrofurano

agua

Resumen

El presente trabajo de Tesis Doctoral consiste en el desarrollo de diversos dispositivos poliméricos para liberación controlada de feromonas a partir del uso de polímeros de orígenes naturales y biodegradables como el quitosano y el alginato. El diseño de estos dispositivos estuvo enfocado hacia la obtención de cinéticas de liberación adecuadas de los tres compuestos que integran el blend feromonal de un insecto de importancia económica y forestal llamado *Megaplatypus mutatus*. Los compuestos son sulcatol, sulcatona y 3-pentanol y su uso en el control de esta plaga es una técnica novedosa de escasos antecedentes en el país. Los dispositivos poliméricos planteados tenían como requisitos: ser biodegradables para evitar tener que recolectarlos una vez concluido el control de la plaga, tener una alta proporción de compuesto incorporado, así como una baja concentración residual, liberar los compuestos de interés de manera lenta y sostenida, y ser de rápida aplicación y de bajo costo de elaboración. La secuencia de dispositivos desarrollados fue avanzando y modificándose según los resultados así lo demostraban y requerían, adquiriendo de estos resultados el criterio para fundamentar la preparación de un nuevo dispositivo. Para tal fin, se estudió la conveniencia del uso de una vía seca ó de una vía húmeda. Para el primer caso se prepararon películas y para el segundo caso, se prepararon geles y esferas de quitosano y alginato simples y combinadas.

Las películas fueron generadas a partir del entrecruzamiento de quitosano con genipina y a partir de alginato. Se realizaron por el método de evaporación del solvente. En el caso de la película de quitosano se pudo demostrar cualitativamente que este dispositivo incorporó el sulcatol y que lo liberó gradualmente por un período de 13 días. En el caso de la película de alginato, la misma no resultó estable y resultaron materiales muy flexibles con una muy baja estabilidad de forma.

En cuanto a los geles, su forma de síntesis supone una clara ventaja en cuanto a la incorporación de un compuesto de interés, ya que al ser un proceso sencillo, que no posee medios o pasos intermedios de reacción, no supone la pérdida del compuesto en etapas intermedias. La preparación de estos

dispositivos permitió regular la velocidad de difusión y la de liberación, aumentando en el tiempo. En cuanto al comportamiento de incorporación/liberación de STOL, los dos polímeros utilizados mostraron diferencias importantes; mientras que el quitosano mantuvo una liberación controlada por una cantidad considerable de días con un bajo porcentaje de retención de la droga, el alginato lo hizo por un período de tiempo muy reducido. Así, con el fin de aumentar la superficie expuesta al ambiente y de obtener dispositivos más fáciles de transportar y de ubicar en forestaciones, se condujo la experimentación hacia el desarrollo de esferas. Las esferas poseen una alta relación volumen/superficie, lo cual es muy beneficioso para la preparación de dispositivos de liberación controlada y prolongada en el tiempo.

El tercer tipo de dispositivos preparados fue el de esferas simples de alginato y de quitosano. Ambos materiales fueron sintetizados por coacervación simple. El quitosano mostró buena capacidad de formación de esferas y buena incorporación de los compuestos orgánicos evaluados. Sin embargo este polímero se comportó como un agente de retención excesivo ya que el único compuesto posible de cuantificar fue el Beta-Caroteno. Por otro lado, las esferas de alginato mantienen la forma esférica adecuada e incorporan un alto porcentaje de los compuestos de interés. Sin embargo poseen también ciertas debilidades, tales como la salida demasiado rápida del compuesto incorporado, ya sea durante el lavado de las esferas o por sus propiedades de retención intrínsecas. Estas debilidades debieron ser superadas desde la preparación de las mismas, sumando compuestos que recubren la esfera y que colaboren a disminuir la porosidad del mismo. En este sentido, la carga negativa del alginato otorgada por sus grupos COO⁻ le confiere posibilidad de interacción con otros polímeros de carga opuesta y de esta manera amplia posibilidades de mejorar las condiciones desfavorables detectadas.

Así, la experimentación de la presente tesis doctoral se condujo al desarrollo de esferas combinadas. En este sentido, y ya en la segunda etapa de experimentación del presente trabajo, se realizaron esferas combinadas sintetizadas con las dos opciones alternadas de ubicación de los polímeros, es decir se sintetizaron esferas con un corazón de quitosano y una cubierta de alginato y esferas con un corazón de alginato y una cubierta de quitosano.

Las de corazón de quitosano fueron realizadas por el método de coacervación compleja, en el cual a partir del contacto entre ambos polímeros se produce la unión de los grupos carboxílicos del alginato y los grupos amino del quitosano.

Si bien los estudios de caracterización por FT-IR y microscópicos revelaron la presencia de ambos polímeros en los dispositivos, las esferas presentaron pobres propiedades mecánicas, adjudicadas principalmente a la baja eficiencia de las interacciones, electrostáticas o covalentes. Este tipo de interacciones no pudieron dar origen a un retículo estable, por lo que la experimentación se condujo hacia el otro tipo de esferas combinadas, las de corazón de alginato y cubierta de quitosano. Estas esferas fueron ampliamente caracterizadas por medio de estudios de FT-IR, DSC, SEM y fotografías ópticas. Para el estudio de sus propiedades se modificaron diversas variables de síntesis en pos de conocer el efecto sobre el hinchamiento y sus propiedades mecánicas; ya que ambas características se encuentran totalmente relacionadas con el grado de entrecruzamiento de las esferas y por ende con la capacidad y tiempo de liberación de compuestos incorporados en ellas. Las variables que más influyeron en el comportamiento final de los dispositivos fueron el pH de la solución gelificante y la relación molar $\text{Ca}^{2+}/\text{COO}^-$. Estos dos parámetros afectan por un lado el grado de ionización de los grupos COO^- del alginato y por otro lado, el porcentaje de Calcio disponible para conformar la estructura “caja de huevo” característica de esta interacción.

A partir de estos estudios de las propiedades y de los estudios de liberación de BC, STOL, STONA y 3-PEN se pudieron definir las condiciones de preparación consideradas óptimas para los ensayos biocomportamentales de atracción que seguían a esta sección experimental. Así las condiciones de concentración de alginato de 4% p/v, el pH y la relación molar $\text{Ca}^{2+}/\text{COO}^-$ de la solución gelificante de 9 y 3,5 respectivamente y un tiempo de curado de 10 minutos fueron las utilizadas para preparar las esferas con las que se comprobó la efectividad de atracción con el insecto en cuestión.

En la última sección de esta tesis doctoral, se realizaron ensayos de atracción de los insectos hacia los dispositivos por medio del uso de un olfatómetro. Los resultados obtenidos sugieren que los dispositivos elegidos como liberadores de feromonas se comportaron de manera adecuada para provocar el efecto de atracción de hembras de *Megaplatypus mutatus*.

Abstract

This Doctoral Thesis involves the development of various polymeric controlled release devices based on the use of biodegradable and natural sources polymers such as chitosan and alginate. The design for the preparation of these devices was focused on the obtaining of adequate release kinetics of three compounds that form the blend of pheromones of an insect of economic and forest importance called *Megaplatypus mutatus*. Such compounds are identified as sulcatol, sulcatona and 3-pentanol and their use in the control of this pest is a novel technique with limited background in the country.

The polymeric devices developed in this work should meet the requirements of forming a biodegradable system to achieve independence in the removal of them once the pest control becomes effective, must have a high proportion of incorporated compound and a low residual concentration, should also release the compounds of interest in a slow and sustained manner, be quick and economical application in the process. The sequence of development of the devices was constantly modified according to the results obtained so acquiring the results substantiate the criteria for the preparation of a new device. For this purpose, films, gels and beads were prepared separately with alginate or chitosan in a first instance, and in a second stage combined beads with the two polymers were prepared.

The films were generated from the crosslinking of chitosan with genipin and from alginate. They were made by the solvent evaporation method. In the case of chitosan film, sulcatol could incorporated and released for a period of 13 days. In the case of the alginate film, it was not stable and was also too flexible.

The method of preparation of gels offers a clear advantage in terms of the incorporation of a compound of interest, because it is a simple process, has no means or intermediate reaction steps and involves no loss of the compound in intermediate stages of synthesis. The preparation of these devices allows regulating the speed of diffusion and release, increasing over time. On the behaviour of incorporation/release of STOL, the two polymers used showed significant differences, while chitosan allowed the controlled release remained for

a considerable amount of days with a low percentage of drug retention; alginate did it for a very short time period. Thus, in order to increase exposure to the environment and to obtain more easily transported devices to the forestation sites, the experimentation was conducted to the development of beads. This kind of devices has a high volume/surface, which is beneficial for the preparation of controlled release devices and to prolong it in time.

The third type of device development was the simple beads. They were prepared with alginate or chitosan and both materials were synthesized by simple coacervation processes. The chitosan spheres showed good capacity and formation of the device and a good incorporation of the tested organic compounds. For the release of STOL, this polymer functioned as an excessive retention agent, and the only quantifiable compound was Beta-Carotene. On the other hand, the strengths found for alginate beads are maintaining proper spherical shape and incorporating a high percentage of the compounds of interest. However, they also have certain weakness, such as rapid emission of the incorporated compound, either by washing the beads or by intrinsic properties of retention. These weakness were overcome from the preparation of the device by the addition of a polymer that covers the area and reduce porosity. The negatively charged alginate granted by its COO^- groups, gives the possibility of interaction with other polymers of opposite charge and the possibility for improving the unfavourable conditions detected.

Thus, the experiments of this thesis led to the development of combined beads, trying in this way the association of both polymers to achieve the objectives.

In this sense, and in the second stage of experimentation of this study, the combination of chitosan and alginate were used to prepare beads as delivery systems. They were synthesized with the two alternate location options: beads were synthesized with a core of chitosan and a cover of alginate and with a core of alginate and a cover of chitosan.

The spheres with the core of chitosan were made by a complex coacervation method, wherein after contact between the two polymers, the binding of the carboxyl groups of the alginate and the amino groups of chitosan occurs. The characterization of the beads by FT-IR and optical photographs revealed the presence of both polymers in the devices; however, they had poor mechanical properties, mainly ascribed to the low efficiency of the electrostatic or covalent

interactions. Such interactions could not lead to a stable material, so experimentation led to the other combination of beads, the ones with a core of alginate and cover of chitosan. These spheres were widely characterized through studies of FT-IR, DSC, SEM and optical photographs and such results could define the chemical composition of the device, the location of both polymers in the beads, and the effect of increased alginate concentration and the increase in the pH of the gelling solution on the final morphology of the spheres. Furthermore, different synthesis conditions were analyzed to study how they affect the swelling and the texturometry of the devices. Both features are entirely related to the degree of crosslinking of the beads and therefore to the liberation of compounds incorporated therein, as well as the time spent to do it. From these studies of the properties and release studies of BC, STOL, STONA and 3-PEN it was possible to define the preparation conditions considered optimal for behavioural trials followed this experimental section. The conditions of alginate concentration 4% w/v, pH and $\text{Ca}^{2+}/\text{COO}^-$ molar ratio of the gelling solution of 9 and 3.5 respectively and a cure time of 10 minutes, were used to prepare the spheres used to prove the effective attraction to the beads from the insect.

In the last section of this thesis, attraction tests of the devices were performed through the use of an olfactometer. The results suggest that the beads chosen as devices of pheromones, attract *Megaplatus mutatus* females. While the compounds released from the beads that demonstrated such capability (STOL and STONA), are known for their attractiveness as they have been identified as sex pheromone of the species, the novelty of the study is that the polymeric devices used as carriers of such compounds, allowed the release in the proper release rate to cause a sexual attraction.

Indice

Parte I Introducción

Capítulo 1. Introducción	1
1.1 Motivación del tema de investigación	1
1.2 Introducción general	3
1.2.1 La producción forestal en la Argentina	3
1.2.1.1 Álamos	4
1.3 <i>Megaplatypus mutatus</i>	6
1.3.1 La especie	6
1.3.2 El ciclo biológico de <i>M. mutatus</i>	8
1.3.3 Daños ocasionados por <i>M. mutatus</i>	10
1.3.4 Extensión geográfica de <i>M. mutatus</i>	13
1.4 Ecología química	14
1.4.1 Generalidades	14
1.4.2 El uso de feromonas en el manejo de plagas	15
1.4.3 <i>Megaplatypus mutatus</i> : Identificación de los volátiles emitidos por la especie	17
1.4.4 Dispositivos de liberación controlada de feromonas y antecedentes en el uso de estos compuestos en el control de <i>M. mutatus</i> .	18
1.4.4.1 Dispositivos tipo reservorio	20
1.4.4.1.1 Monitoreo poblacional	20
1.4.4.1.2 Confusión sexual o Interrupción de Apareamiento	21
1.4.4.2 Dispositivos tipo matricial	22
1.5 Bibliografía	23
Capítulo 2 Antecedentes	30

2.1 Liberación controlada de compuestos	30
2.2 El uso de polímeros en la formulación de dispositivos de liberación controlada de feromonas	31
2.3 Estudios de cinética de liberación de feromonas	34
2.3.1 Técnicas para estimar las tasas de liberación	34
2.3.2 Factores que afectan la tasa de liberación	35
2.4 Bibliografía	37
Capítulo 3 Objetivos	
3.1 Objetivo general	39
3.2 Objetivos específicos	39
Parte II Metodología	
Capítulo 4. Experimental	
4.1 Materiales	41
4.2 Preparación de los diferentes sistemas poliméricos ensayados como transportadores	42
4.2.1 Películas poliméricas usadas como sistemas de liberación	42
4.2.2 Geles poliméricos usados como sistemas de liberación	43
4.3.3 Esferas poliméricas simples usadas como sistemas de liberación	43
4.2.4 Esferas poliméricas combinadas usadas como sistemas de liberación	44
4.3 Equipos y técnicas de caracterización	47
4.4 Metodología usada para la cuantificación o semicuantificación cualitativa de compuestos liberados	50
4.4.1 Métodos de liberación	50
4.4.1.1 Venteo de Nitrógeno	51
4.4.1.2 Extracción por solvente	51
4.4.1.3 Microextracción en fase sólida (SPME)	53

4.4.2 Métodos de detección	53
4.4.2.1 Cromatografía en placa delgada	53
4.4.2.2 Cromatografía gaseosa-Espectrometría de masa	53
4.4.2.3 Cromatografía gaseosa	54
4.4.3 Métodos de cuantificación	54
4.4.3.1 Curvas de calibración	54
4.4.4 Método de semicuantificación	56
4.5 Bioensayos. Ecología química	57
4.5.1 Colecta de individuos de <i>Megaplatypus mutatus</i>	57
4.5.2 El uso de olfatómetro en ensayos comportamentales de elección	58
4.6 Bibliografía	60

Parte III Resultados

Capítulo 5. Preparación, caracterización y liberación de compuestos desde dispositivos poliméricos.

5.1 Introducción	62
5.2 Dispositivos de liberación	67
5.2.I Películas	67
5.2.I.1 Preparación de película de alginato	68
5.2.I.2 Preparación de película de quitosano	68
5.2.I.2.2 Caracterización	69
5.2.I.2.3 Estudios de liberación	70
5.2.II Geles	72
5.2.II.1 Preparación de gel de quitosano	74
5.2.II.1.1 Caracterización	75
5.2.II.1.2 Liberación de sulcatol	75
5.2.II.2 Preparación de gel de alginato	76

5.2.II.2.1	Caracterización	76
5.2.II.2.2	Liberación de sulcatol	77
5.2.II.3	Conclusiones parciales	78
5.2.III	Esferas	78
5.2.III.1	Preparación esferas simples de quitosano	81
5.2.III.1.1	Caracterización	82
5.2.III.1.2	Estudios de liberación	83
5.2.III.2	Preparación esferas simples de alginato	87
5.2.III.2.1	Caracterización	88
5.2.III.2.2	Estudios de liberación	89
5.2.III.3	Conclusiones parciales	90
5.2.III.4	Esferas combinadas	91
5.2.III.5	Preparación de esferas combinadas: Corazón quitosano-Cubierta alginato	94
5.2.III.5.1	Caracterización	96
5.2.III.5.1.1	Espectroscopía infrarroja (FT-IR)	96
5.2.III.5.1.2	Microscopía óptica (<i>Watershed transformation</i>)	97
5.2.III.5.2	Estudios de propiedades: Hinchamiento	99
5.2.III.6	Preparación de esferas combinadas: Corazón alginato-Cubierta quitosano	101
5.2.III.6.1	Caracterización	102
5.2.III.6.1.1	Espectroscopía infrarroja (FT-IR)	102
5.2.III.6.1.2	Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	104
5.2.III.6.1.3	Microscopia diferencial de barrido (SEM)	105
5.2.III.6.1.4	Microscopía óptica (<i>Watershed transformation</i>)	107
5.2.III.6.2	Estudios de propiedades	109
5.2.III.6.2.1	Hinchamiento	109
5.2.III.6.2.2	Texturometría	113
5.2.III.6.3	Conclusiones parciales	114

5.2.III.4 Estudios de liberación	115
5.2.III.4.1 Liberación de Beta Caroteno	116
5.2.III.4.2 Liberación de sulcatol. Análisis por Cromatografía gaseosa	118
5.2.III.4.3 Liberación de sulcatol, sulcatona y 3-pentanol. Análisis por Microextracción en Fase Sólida (SPME)	119
5.3 Conclusiones	126
5.4 Bibliografía	129
Capítulo 6. Ecología química: Respuesta de <i>Megaplatus mutatus</i> a dispositivos poliméricos de liberación controlada de feromonas	
6.1. Ensayos de atracción en olfatómetro	134
6.2 Bibliografía	139
Capítulo 7. Conclusiones generales y proyecciones	140

Capítulo 1

Introducción

1.1 Motivación del tema de investigación

La presente tesis doctoral se generó por diferentes motivaciones temáticas, académicas y disciplinares; en cierta manera, su abordaje multidisciplinario así lo demuestra. Se considera entonces necesario al comienzo de la misma, especificar las motivaciones que dieron inicio al presente tema de investigación:

La ineficiencia en el uso de los recursos de un país genera una disminución de las posibilidades para resolver las múltiples necesidades de su sociedad. En la localidad de Villa Paranacito (Delta entrerriano) se reconocen dos problemáticas que lejos de estar desconectadas, se encuentran fuertemente vinculadas. El intento de mejora en una situación podría actuar sinérgicamente en pos del abordaje de los problemas detectados en la otra situación: La realidad forestal del Noreste Argentino (NEA) registra un uso ineficiente de la madera de álamo (*Populus deltoides*), ocasionado por una mono producción destinada en un 90% a celulosa para papel y aglomerados que, además del efecto contaminante en su industrialización, no contribuye a la calidad de la producción de la materia prima en campo, con la consecuente limitación en el destino de dicha madera. Al mismo tiempo, existe en la región un déficit habitacional que podría ser afrontado con los recursos que posee la misma zona en que se encuentra la población con esa carencia en particular.

Las plantaciones forestales de álamo son una de las principales actividades económicas del lugar y la construcción de viviendas con ese tipo de madera ha demostrado muy buenos resultados en cuanto a su comportamiento mecánico, hidrófugo, térmico, ignífugo y de durabilidad en el tiempo. Es por estas condiciones de habitabilidad evidenciadas en este tipo de construcciones, que las mismas poseen el Certificado de Aptitud Técnica (CAT) otorgado por la Secretaría de Vivienda de la Nación, el cual valida el uso de madera de álamo para su empleo en una arquitectura no convencional.

Surge de esta manera, la necesidad de un producto maderero de mejor calidad en términos de la producción de troncos de mayor diámetro, recta y libres de imperfecciones ocasionadas por factores bióticos y abióticos. La obtención de este tipo de producto podría colaborar en la alianza entre las problemáticas detectadas en la región: por un lado, se diversificaría el uso de madera de álamo, otorgándole valor agregado a los productos derivados de esa producción y por otro se obtendría un material adecuado para su uso en la construcción.

Uno de los principales factores bióticos que afecta la calidad de la madera, disminuyendo su aptitud como material de construcción, es un insecto que construye galerías dentro del árbol vivo. La consecuencia directa de estas galerías son perforaciones en las tablas de madera producidas de ese ejemplar infestado que reducen las propiedades mecánicas y físicas consideradas óptimas para soportar el peso y los componentes de una vivienda. Este problema fue detectado desde la participación en proyectos de investigación en el Centro Experimental de la Vivienda Económica (CEVE) y desde este Centro es que se plantearon alternativas para la obtención de madera de calidad óptima para la construcción de viviendas.

Fue así entonces que la búsqueda de tal material se convirtió que el motivo disparador del presente trabajo de investigación. La consecuencia inmediata de ese objetivo, fue el intento de aportar desde la química de los polímeros a la posible eliminación del insecto que ocasiona maderas de calidad insuficiente para su adecuado uso en arquitectura no convencional.

1.2 Introducción general

En esta sección se desarrolla una breve introducción sobre los marcos disciplinarios que se abordaron en la presente tesis doctoral. En primera instancia se caracterizan brevemente las producciones forestales de la Argentina, luego se describe tanto la biología de una especie de insecto de importancia económica en las plantaciones de álamos del país, como las formas de comunicación química del mismo y por último se explica cómo desde la ecología química se pueden plantear alternativas amigables con el ambiente en el control de este insecto.

1.2.1 La producción forestal en la Argentina

La lógica indica que para expandir el uso de la madera y atender las necesidades de la población no se debería aumentar la intensidad del aprovechamiento del bosque nativo, sino mejorar la productividad de plantaciones basadas en especies de rápido crecimiento.

El cultivo forestal puede ser parte de la solución para crear el recurso maderero y reducir la presión sobre los bosques nativos.

Hoy, los bosques cultivados proveen el 30% de la madera para industria del mundo y ocupan el 4% de la cubierta boscosa mundial. Pero una hectárea de bosque cultivado puede rendir 10 veces más que una de bosque nativo (Scarpa, 2008), además de los beneficios que esto indica en cuanto a la manutención de los bosques nativos, recurso de importancia ecológica indiscutible.

Según la actualización del Inventario de Plantaciones Forestales del año 2012 (Dirección de Forestación, SAGPyA), los bosques cultivados en Argentina cubren 1.152.752 hectáreas. Estas producciones están conformadas casi exclusivamente por tres grandes grupos de especies exóticas de rápido crecimiento como son: Pinos (Familia Pinaceae), eucaliptos (Familia Myrtaceae) y álamos y sauces (Familia Salicaceae) (Tabla 1.1)

Aproximadamente el 80% de las forestaciones a nivel nacional se concentran en la Mesopotamia y el Delta del río Paraná (Figura 1.1). Particularmente en las provincias de Misiones y de Corrientes existen aproximadamente 720.000 hectáreas forestadas, siendo dos especies de pinos (*Pinus elliottii* y *Pinus taeda*) quienes suman el 85% del porcentaje total

implantado; *Eucalyptus grandis* conforma la tercer especie en importancia implantada en esa región, conformando así estas provincias el Polo Foresto-Industrial más importante del país.

En la provincia de Buenos Aires la superficie forestada alcanza las 100.000 hectáreas; la mitad de este porcentaje corresponde a Salicáceas ubicadas en su mayoría en el Delta del río Paraná y el porcentaje restante corresponde a especies del género *Eucalyptus* formando cortinas rompevientos, montes de reparo y macizos.

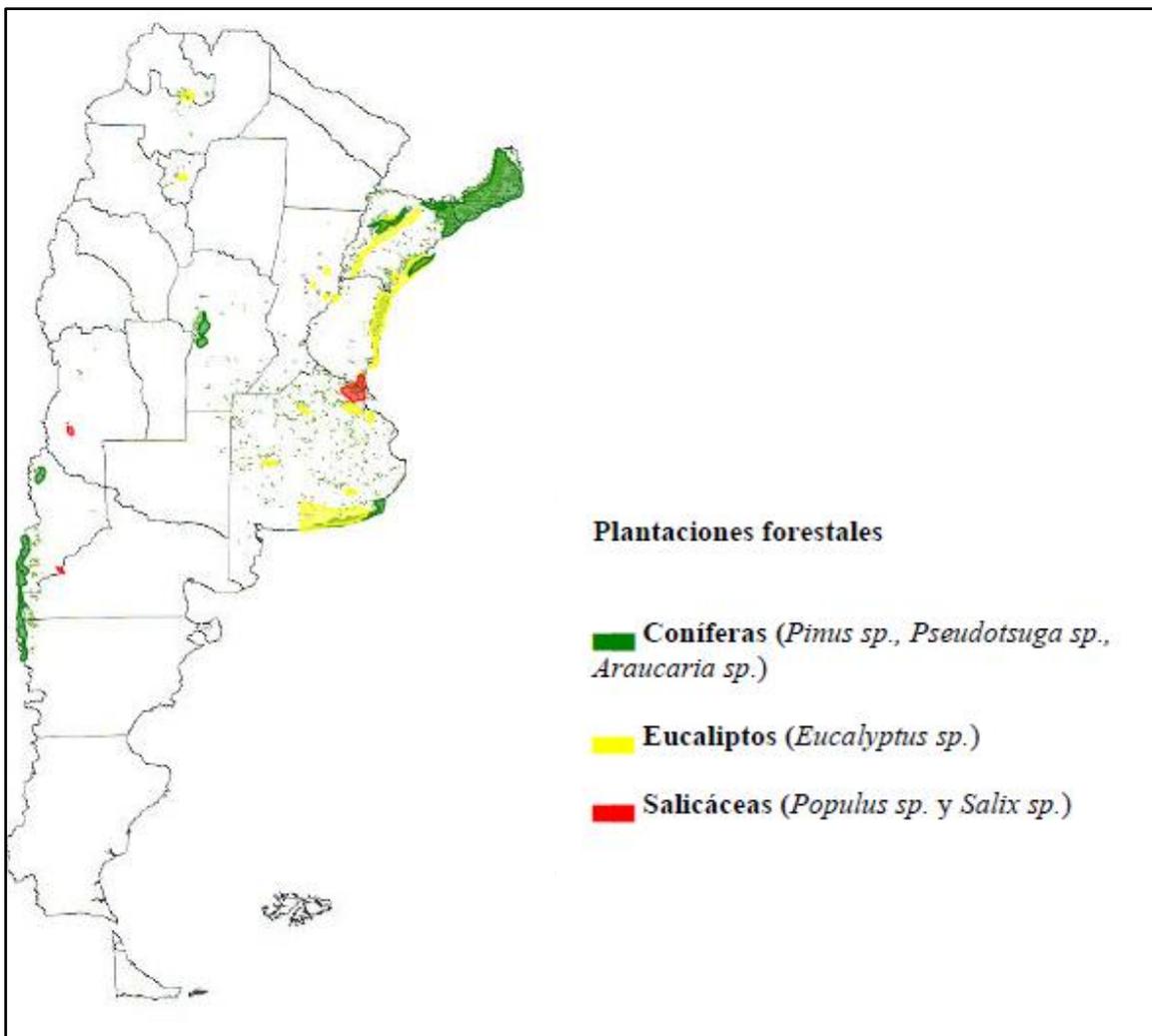


Figura 1.1: Plantaciones forestales en la Argentina. Borodowski 2012

1.2.1.1 Álamos

Los álamos pertenecen a la familia de las Salicáceas, agrupación taxonómica que reúne a sauces y álamos. Desde tiempos remotos, los álamos han sido de

utilidad para el hombre gracias a su rápido crecimiento juvenil, facilidad de propagación vegetativa, buena capacidad de rebrote, adaptabilidad a diferentes sitios, alta plasticidad en respuesta a cambios ambientales y variados usos de la madera (aserrado, debobinado, celulosa, fibras y/o partículas para la producción de tableros y biomasa con fines energéticos), además de tratarse de un cultivo que se adapta a las características agro ecológicas zonales, requerir una menor inversión inicial frente a otros cultivos, y tener rentabilidad superior a la media de otras producciones (Zsuffa 1996; Dillen *et al.* 2010).

Se los puede encontrar en bosques nativos en el hemisferio norte y en plantaciones en latitudes templadas de ambos hemisferios ya sea en macizos, cortinas o pequeños grupos de árboles aislados, según cuál sea el objetivo o en sistemas silvopastoriles (Dickman 2006; Pincemin *et al.* 2007).

Los usos de este tipo de madera son variados: carpintería, construcción de muebles, cajonería, embalajes, lápices, pasta para papel, paneles aglomerados, maderas terciadas y placas.

La madera de álamo tiene un valor superior a la del sauce, debido a su mayor aptitud industrial tanto para aserradero como para debobinado.

Debido a su alta tasa de crecimiento, excelente forma, adaptabilidad a distintas condiciones de sitio, facilidad de propagación, y diversidad genética en el área de distribución natural, es la especie más importante en todos los programas de mejoramiento genético en plantaciones forestales de todo el mundo (Steenackers, 2000).

Populus deltoides es la especie de álamo más implantada en la Argentina y fue introducida en el país en el año 1961 por la Estación Experimental Agropecuaria Delta perteneciente al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) (Alonzo 1987).

Las plantaciones de álamos en nuestro país alcanzan las 23.500 hectáreas bajo sistemas agroforestales y 40.500 hectáreas en plantaciones propiamente dichas (Borodowski 2012).

Los principales centros productores del país se ubican en la llanurabonaerense, Delta de los ríos Paraná y Uruguay. También se encuentran en sectores bajo riego de zonas áridas (Mendoza, Alto Valle del Río Negro, La Pampa y Santiago del Estero) (Comisión Nacional del Álamo, 2010).

El cultivo de esta familia de árboles comenzó a tener mayor relevancia económica en el país luego de su implantación masiva en la zona del Delta del Paraná. Esta zona se configura como el marco físico más importante en el cultivo de álamos en nuestro país. La llanura bonaerense particularmente, contiene el 23% de la superficie total ocupada por álamos en el país (Achinelli *et al.* 2004)

Su gran difusión se debe a que las características climáticas y territoriales de la zona constituyen el medio más favorable para la producción en gran escala, de maderas de rápido crecimiento y en especial de maderas blandas.

La amplia difusión mundial del álamo (género *Populus*) es debida a su facilidad de cultivo y rápido crecimiento, que permiten obtener grandes volúmenes de madera por hectárea en plazos cortos de tiempo (Álvarez Moreno, 2009).

Uno de los principales objetivos de la silvicultura es la producción de madera como materia prima, de fundamental importancia en las plantaciones forestales de alto rendimiento. La producción física de las plantaciones es uno de los factores que inciden en la rentabilidad de las mismas y es netamente dependiente de la calidad del sitio. Spurr (1952) y Daniel *et al.* (1982) definieron la calidad del sitio forestal como la suma de todos los factores ambientales que interactúan y determinan la capacidad de producción de un área específica. Teniendo en cuenta este concepto se analizará a continuación un factor ambiental de importante incidencia en la cantidad y calidad de madera extraída como es un insecto considerado de amenaza nacional para las plantaciones de álamos del país: *Megaplatypus mutatus*, comúnmente conocido como taladrillo grande de los forestales.

1.3 *Megaplatypus mutatus*

1.3.1. La especie

En los últimos años hubo una controversia en cuanto a la denominación taxonómica de este insecto, antiguamente conocido como *Platypus sulcatus* o *Platypus mutatus*. La nomenclatura completa, correcta y actual del taladrillo grande de los forestales es la siguiente (Wood, 1993):

Supereino: Eukaryota; Reino: Animalia; Subreino: Eumetazoa; Phylum: Arthropoda; Subphylum: Hexapoda; Clase: Insecta; Subclase: Pterygota; División: Neoptera; Subdivisión: Endopterygota; Orden: Coleoptera; Suborden: Polyphaga;

Infraorden: Cucujiformia; Superfamilia: Platypodidae; Familia: Platypodinae; Subfamilia: Platypodini; Género: *Megaplatypus*; Especie: *mutatus*.

Es una especie nativa de Sudamérica (Wood 1993; Wood and Bright 1993) y su presencia es detectable en el continente europeo desde el año 2001 (Allegro and Della Beffa 2001).

Es considerada una plaga primaria por afectar árboles vivos en pie y vigorosos, diferenciándose de otras especies de su grupo que lo hacen sobre madera cortada o ejemplares muertos no apeados (Cerrillo 1996).

Es un insecto de aproximadamente 8 mm de longitud que pertenece a un grupo conocido como “escarabajos de ambrosía”, que poseen como característica común el transporte de esporas de un hongo simbiote (hongo de ambrosía) dentro de pequeños orificios de sus exoesqueletos denominados micangias (Alfaro 2003). Las esporas son depositadas en las paredes internas de las galerías que la hembra de la especie construye, sirviéndole así de alimento a la futura descendencia de la misma.

Los graves daños que el Taladrillo grande de los forestales infiere en el leño de árboles en pie preocuparon siempre a silvicultores e industriales resultando un serio problema forestal. Bréthes determinó su presencia en 1918 en la Argentina sobre eucaliptos, citándolo para las provincias de Buenos Aires, Corrientes y Misiones (Bréthes en Gimenez and Ettienot 2003)

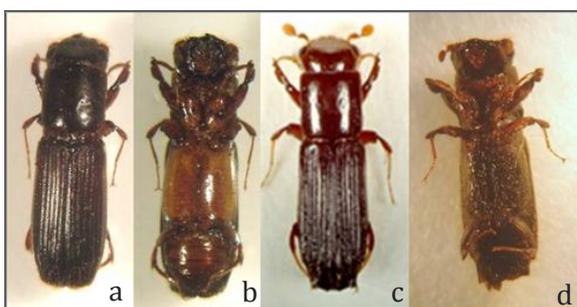


Figura 1.2. Adultos de *Megaplatypus mutatus*.

a) Hembra vista dorsal b) Hembra vista ventral
c) Macho vista dorsal d) Macho vista ventral.

Fotos 3a, 3b y 3d: Hernán Funes. Foto 3c: Dr. Allegro



Figura 1.3. Adulto de *Megaplatypus mutatus*.

Detalle de su morfología. Foto: Dr. Alfaro

1.3.2. El ciclo biológico de *M. mutatus*

El ciclo biológico de este insecto corresponde a un ciclo con metamorfosis completa, por lo tanto, es posible encontrar en la ontogénesis de la especie los cuatro estadios correspondientes: huevo, larva, pupa y adulto.

El ciclo comienza con la emergencia de un macho de un árbol infestado que actuará como insecto pionero: inmediatamente después de salir de su galería comienza a buscar un árbol apto para reproducirse y multiplicarse. Una vez que localiza al huésped adecuado, cava una galería perpendicular al tronco con una profundidad de 3 a 6 centímetros y con el aserrín producido forma un arreglo circular alrededor de la entrada a la galería que se denomina *cono llamador*. Las partículas leñosas que lo forman, se denominan aserrín imaginal, son de aspecto alargado, de 2 a 3 milímetros de longitud y de 0,13 a 0,15 milímetros de ancho (Santoro 1963) (Figura 1.4).



Figura 1.4. Orificio de entrada de *M. mutatus* circundado por partículas leñosas o cono llamador en álamo (*Populus deltoides*)

Foto: Hernán Funes

Una vez que el macho comienza la construcción de la galería, expone su región caudal a la salida de la misma y emite feromonas sexuales para atraer a la hembra. Durante este período también comienza a estridular con su abdomen para emitir sonidos con el objetivo de advertir sobre su presencia (Santoro 1963). La emisión de feromonas sexuales comienza aproximadamente a los dos días de colonizado el árbol y continua por un lapso de aproximadamente 10 días, momento en el cual cesa la emisión de tal llamado si es que ninguna hembra respondió al mismo (Gatti *et al.* 2011).

En el caso de que una hembra responda al llamado sexual, se acerca al árbol donde se encuentra el macho, éste sale de la galería, se produce la cópula fuera de la misma y luego tanto el macho como la hembra reingresan en la galería. A partir de ese momento, la hembra continúa extendiendo esta galería parental en

sentido perpendicular a la superficie del árbol y siguiendo la dirección de los anillos de crecimiento del ejemplar. De esta manera también se produce un tipo de aserrín particular que difiere en calidad del que previamente eliminó el macho en el momento de entrada y colonización del ejemplar arbóreo. Cuando la galería tiene un largo adecuado, la hembra fecundada coloca sus huevos en una cantidad variable (Santoro 1963) (Fig. 1.5).

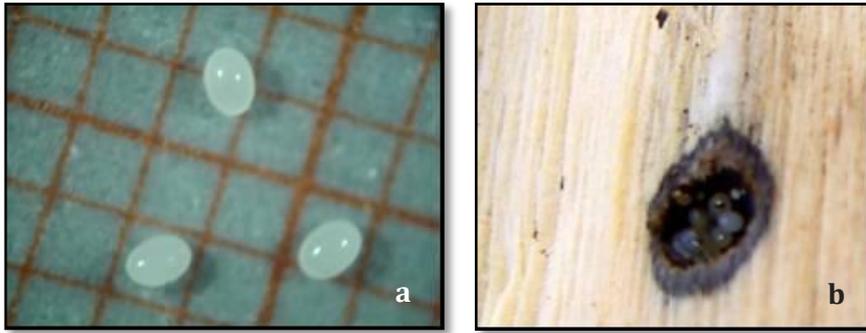


Figura 1.5. a) Huevos de *Megaplatypus mutatus* Foto: Hernán Funes

b) Oviposición dentro de la galería Foto: Guliano Carleo

Luego de un periodo de incubación las larvas eclosionan y comienzan a prolongar las galerías intensificando el daño ocasionado. Las larvas modifican su alimentación a medida que se desarrollan de larva I a larva V, pasando de hábitos micetófagos (alimentación a base de hongos) a xilomicetófagos (alimentación a base de madera y hongos) (Thomas *et al.* 2005; Gimenez and Ettienot 2003) (Fig. 1.6)

El leño masticado atraviesa el aparato digestivo de las larvas y es excretado. La acumulación de este aserrín se denomina aserrín larval y tanto su expulsión hacia el exterior de la galería, como el de las secreciones del propio árbol afectado, es indicador de la presencia de estadios juveniles en el interior (Fig. 1.7).

Figura 1.6. Larva de *M. mutatus*

Foto: Hernán Funes

Figura 1.7. Ataque de *M. mutatus* donde se observa aserrín larval y savia cayendo por el tronco (Gimenez y Ettienot 2003)

La larva es del tipo ápoda curculioniforme con potentes mandíbulas capaz de triturar las fibras del leño. El período de alimentación dentro del árbol depende de la temperatura ambiente, pero ésta dura aproximadamente entre dos y tres meses. Una vez alcanzado el último estadio larval, éstas realizan pequeñas galerías perpendiculares denominadas cámaras pupales, para allí empupar. La pupa es del tipo exharata o desnuda y de esa pupa eclosiona el adulto sexualmente desarrollado para así repetir el ciclo. Una hembra puede llegar a producir hasta 300 adultos por galería iniciada.

Bajo las condiciones agroclimáticas normales de estas latitudes poseen dos generaciones anuales, con máximas emergencias de adultos en los meses de abril y octubre (Gatti *et al.* 2008). Existe un dimorfismo sexual en esta especie: el macho posee una coloración negra en posición ventral del abdomen mientras que la hembra, que normalmente tiene un mayor tamaño, posee una coloración marrón en la misma posición.

1.3.3. Daños ocasionados por *M. mutatus*

Megaplatypus mutatus es una plaga de interés forestal en la Argentina afectando tanto especies nativas como exóticas, pero su daño es esencialmente importante en plantaciones comerciales de álamos (*Populus deltoides*) (Giménez y Ettiennot, 2003). Ataca en los principales núcleos productivos de álamo del país como son el Delta del Río Paraná y la Pampa Ondulada (Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca, 1994). En ellos la cantidad de madera extraída supera las

200.000 tn/año (Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca, 2004) y esta plaga origina un serio problema comercial en plantaciones de esta especie forestal. La especie es también encontrada en polos productivos menores de otras regiones del país (Fig. 1.8).

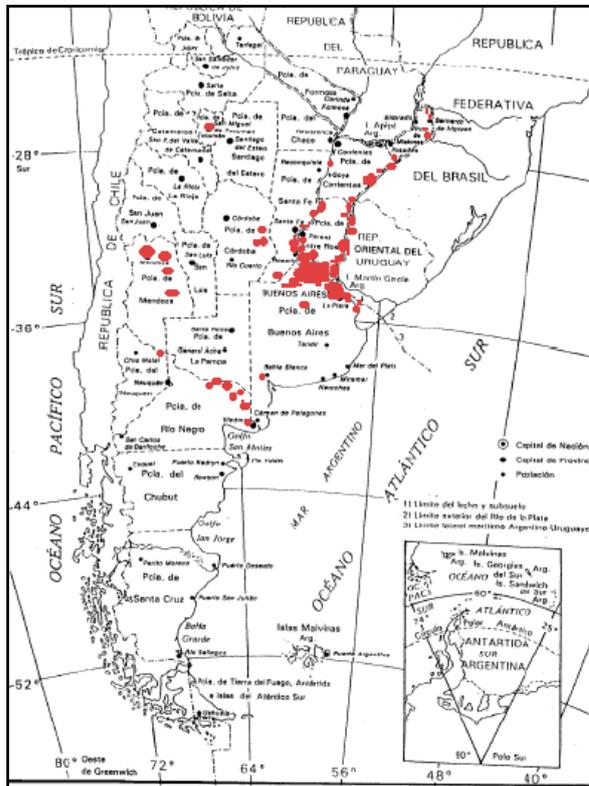


Figura 1.8. Distribución geográfica de *M. mutatus* en la Argentina (Gimenez y Ettienot 2003)

Entre los efectos negativos de la presencia de este insecto en el árbol se pueden citar: merma en los volúmenes útiles de la madera debido a la quebradura de los fustes por efecto del viento a la altura de las galerías y del volumen de madera de calidad especialmente cuando su destino es el aserrado o debobinado (Ñuñez Cresto *et al.* 2001), dificultad en la posibilidad de manejo de los rebrotes como continuidad de la explotación luego del corte (por la pérdida de pies correspondientes a árboles quebrados), inconvenientes en el aprovechamiento mediante cosecha mecánica debido a los planos de debilidad generados en los fustes aumentando significativamente de los costos de producción. Asimismo, al daño generado por las galerías se agrega la proliferación del hongo en el leño, y por eso este insecto restringe el uso de la madera en la fabricación de productos de mayor valor agregado (Casaubon *et al.*, 2006) (Fig. 1.9).



Figura 1.9. Troncos de álamos con galerías construidas por *M. mutatus*.

El hongo que transporta el adulto en cavidades especiales de su cuerpo es el *Raffaelea santoroi* (Guerrero, 1966) el cual es inoculado en las paredes de las galerías cuando los adultos la inician. La constante presencia de dicho hongo, que tapiza y ennegrece las paredes de las galerías excavadas en el xilema disminuye así más aún la calidad de la madera y el valor comercial de la misma.

Aunque es considerada la principal plaga en álamos, hay muchas especies arbóreas donde se han registrado ataques de *M. mutatus*, aunque no en todas las especies se ha demostrado que cumpla su ciclo de vida. (Tabla 1.1) (Giménez y Etiennot 2003).

Tabla 1.1: Especies susceptibles de ser atacadas por *M. mutatus*

Familia	Especie	Nombre vulgar
Acereceae	<i>Hacer negundo</i>	Arce
Casuarinaceae	<i>Casuarina cunninghamia</i>	Casuarina
Fabaceae	<i>Erythrina cristagalli</i>	Ceibo
	<i>Robinia pseudo acacia</i>	Acacia blanca
Fagaceae	<i>Quercus borealis</i>	Roble americano
	<i>Quercus palustris</i>	Roble de los pantanos
	<i>Quercus robur</i>	Roble europeo
Laureaceae	<i>Laurus novilis</i>	Laurel
Magnoliaceae	<i>Magnolia grandiflora</i>	Magnolia
Meliaceae	<i>Cedrela tuburflora</i>	Cedro misionero
	<i>Melia azedarach</i>	Paraíso
Mirtaceae	<i>Eucalyptus dunni Smith</i>	Eucalipto blanco
	<i>Eucalyptus camaldulensis</i>	Eucalipto colorado
	<i>Eucalyptus tereticornis</i>	Eucalipto
Oleaceae	<i>Ligustrum lucidum</i>	Ligustro
	<i>Fraxinus excelsior</i>	Fresno europeo
Platanaceae	<i>Liquidambar styraciflua</i>	Liquidámbar
	<i>Platanus acerifolia</i>	Plátano
Proteaceae	<i>Grevillea robusta</i>	Roble sedoso
Rosaceae	<i>Malus sp.</i>	Manzano
	<i>Prynus persica</i>	Duranero

	<i>Prynus comunis</i>	Peral
Rutaceae	<i>Balfourodendron riedelianum</i>	Guatambú
	<i>Citrus sp.</i>	Cítricos
Salicaceae	<i>Populus alba</i>	Álamo blanco
	<i>Populus deltoides</i>	Álamo
	<i>Salix babylonica</i>	Sauce americano
Simarubaceae	<i>Ailanthus altissima</i>	Árbol del cielo
Ulmaceae	<i>Ulmus sp.</i>	Olmo
Taxodiaceae	<i>Taxodium distichum</i>	Ciprés calvo
Tiliaceae	<i>Tilia moltkei</i>	Tilo

Los ataques del taladrillo grande de los forestales se evidencian en árboles en pie, sanos, preferentemente en troncos con diámetro mayor a los 20 centímetros y un contenido de humedad mayor al 50%, aunque en condiciones de ataques severos, árboles de menor diámetro son igualmente susceptibles (Cichon 2004).

La susceptibilidad de las especies forestales al ataque de *Megaplatypus mutatus* se explica, dentro de la teoría vigente, por la “hipótesis del vigor de la planta” (“plant vigor hipótesis”), según la cual los árboles vigorosos son más susceptibles al ataque por herbívoros que las plantas viejas o estresadas (Price 1991). Los individuos adultos de la plaga atacan activamente sectores en crecimiento de los árboles más vigorosos, y de este modo garantizan una mejor supervivencia de sus larvas (Casabuon *et al.* 2004).

1.3.4. Extensión geográfica de *M. mutatus*

M. mutatus es nativo de Sudamérica y como tal se lo puede encontrar en Argentina, Bolivia, Perú, Brasil, Uruguay, Paraguay, Venezuela y Guayana Francesa (EPPO 2004). Dentro de nuestro país, se puede observar una fuerte concentración en la zona del Delta del Paraná, aunque su distribución es amplia por todo el territorio (Giménez and Ettienot 2003).

Fue introducido en Italia, posiblemente en 1998 debido al transporte de madera infestada (Fig. 1.10). En el año 2000, su presencia fue detectada en plantaciones comerciales de álamos en la provincia de Caserta, región de la Campania. Los ataques también fueron reportados en nogales y avellanos (Tremblay *et al.*, 2000; Allegro y Della Beffa 2001), y posteriormente en manzanos, perales, castaños, durazneros, robles y en eucalipto (Carella y Spigno 2002). Sin embargo estos últimos reportes no indican si el ciclo se completa o sólo se observa

el ataque inicial del macho y luego el ciclo de vida normal es interrumpido o bien por las secreciones defensivas del árbol o bien por no ser un hospedero apto para su desarrollo.



Figura 1.10. Distribución mundial de *M. mutatus* (EPP0 <http://www.eppo.int/>)

Desde principios de siglo, el “taladrillo grande de los forestales” ha sido citado como responsable de provocar daños en álamos y otras especies forestales y frutales de la Argentina (Debandi, 1995). En nuestro país se ha indicado que la dispersión de *M. mutatus* se vio incrementada con el aumento de las regiones forestadas con Salicáceas y eucaliptos. La falta de un método de control eficaz y económico se presenta como un factor limitante de la forestación.

Megalplatypus mutatus puede ser encontrado con otras sinonimias dentro de la literatura publicada; el antiguo nombre que más se encuentra es *Platypus sulcatus* (Chapuis), aunque también se lo suele encontrar como *Platypus mutatus* (Chapuis) y *Platypus plicatus* (Brethes).

1.4 Ecología química

1.4.1. Generalidades

La ecología química es la ciencia que promueve la comprensión de los fundamentos ecológicos del origen, la función y el significado de los compuestos químicos que median las interacciones intra e interespecíficas (Anon 2001).

Estos compuestos son llamados semioquímicos y la emisión de los mismos puede tener efecto sobre individuos de la misma especie (en este caso serán llamados feromonas) o puede tener efecto en individuos de otra especie (en cuyo caso serán denominados como kairomonas cuando el receptor se beneficia con la señal emitida o alomonas cuando el emisor es quién se beneficia con la señal determinada).

El término feromona fue empleado por primera vez en el año 1959 por los investigadores P. Karlson y M. Lüschen para definir un tipo de sustancia que utilizaban los individuos de una misma especie para comunicarse entre sí.

El nuevo término provino de la unión de dos palabras griegas *pherein* (transferir) y *hormón* (excitar) y fue definida como sustancias que son secretadas por un individuo al ambiente y son recibidas por un segundo individuo de la misma especie en el cual se desencadena una respuesta específica, como un comportamiento definitivo o un proceso de desarrollo intrínseco (Karlson and Lüschen 1959).

Las feromonas consisten en un rango amplio de moléculas orgánicas y en su gran mayoría son compuestos volátiles de entre 5 y 20 átomos de carbono, con pesos moleculares entre los 80 y 300.

Las feromonas pueden ser clasificadas de acuerdo al tipo de respuesta que intenta provocar el emisor, de esta manera se pueden encontrar las siguientes variantes de feromonas: sexuales, de agregación, trazadoras, de alarma, disuasivas o feromonas que inducen cambios fisiológicamente permanentes (Wilson and Bossert 1963; Howse 1998).

Particularmente las feromonas de tipo sexual son las que poseen un interés particular ya que pueden ser utilizadas para modificar el comportamiento de reproducción entre individuos de una especie problema.

Hasta el momento, se han aislado e identificado más de 1000 compuestos con actividad de feromona sexual para más de 60 familias de insectos (El Sayed *et al.* 2011).

1.4.2 El uso de feromonas en el manejo de plagas

En las últimas seis décadas el control de insectos plaga se ha basado fundamentalmente en el uso de insecticidas sintéticos, con un consumo creciente

de estas sustancias a nivel mundial. El valor de este tipo de control para la producción de los cultivos es innegable y ha sido una herramienta necesaria para la agricultura durante ese período. Sin embargo, el uso y abuso de los plaguicidas químicos convencionales ha dado lugar a graves consecuencias como residuos tóxicos, desarrollo de resistencias, explosiones de plagas secundarias y en general problemas de toxicidad. En respuesta a estos problemas surge la necesidad, tanto de cambiar las estrategias de aplicación de plaguicidas, como de buscar nuevos métodos de control de plagas más respetuosos con el ambiente.

Como alternativa, se comenzaron a desarrollar investigaciones sobre los llamados “métodos biorracionales”, cuya estrategia de acción se basa en el conocimiento de los procesos fisiológicos y bioquímicos muy específicos, la patología de los insectos y los sistemas de comunicación intra e interespecífica, con el objetivo de obtener agentes capaces de interferir en cualquiera de estos procesos. Es así que surge la necesidad cada vez más imperiosa de alternativas ecológicamente más aceptables para el control de insectos plaga (Primo-Yúfera 1991; Khan *et al.*, 2008).

En este sentido los semioquímicos y en particular las feromonas brindan una amplia perspectiva que viene siendo explotada con alentadores resultados, ofreciendo una solución al control de plagas amigable con el entorno (Wyatt 2009).

Por su especificidad, son los candidatos ideales para lograr un control de plaga concreto y definido; la técnica consiste en perturbar el comportamiento reproductor de la especie problema, consiguiendo de esta manera una reducción de las poblaciones de la generación siguiente.

Esta técnica tiene claras ventajas frente al uso de pesticidas, a la ya mencionada especificidad se le deben agregar: seguridad laboral para el trabajador rural, alta efectividad, obtención de productos libres de residuos tóxicos (en el caso de producciones agrícolas), y conservación de tierras, aire y aguas cercanas libres de tóxicos.

La utilización de feromonas en el control de plagas ha sido ya demostrada y probada con éxito en muchas especies de insectos (Bartell R.J. 1982; Lopez *et al.* 1991; Deland *et al.*, 1994; Cardé y Minks, 1995; Redy y Guerrero, 2004; Pickett *et al.*, 2006; Khan *et al.*, 2008; Heuskin *et al.* 2011; Pascual-Villalobos *et al.* 2013) y tales compuestos pueden ser utilizados bajo diferentes métodos de trabajo como

son: monitoreo de poblaciones problema, trampeo en masa y confusión sexual (Mitchell *et al.* 1986).

Aunque los objetivos de las técnicas nombradas previamente son diferentes, las tres utilizan dispositivos de liberación de feromonas.

En el caso de monitoreo de poblaciones problema, los formulados de liberación se colocan junto a algún tipo de trampa que permita la detección y captura del insecto de interés. El número de individuos capturados es el indicio para conocer si la población se encuentra bajo el umbral de daño económico o si por lo contrario, es necesario algún tipo de decisión para la eliminación de tales individuos perjudiciales.

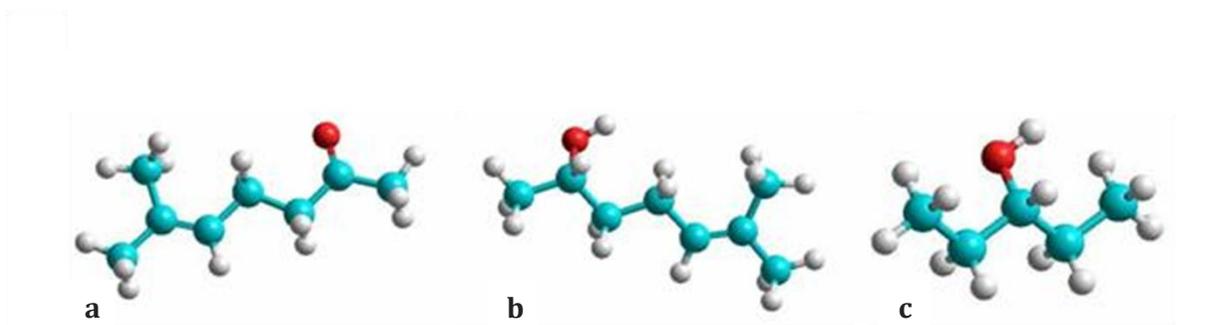
El trampeo se utiliza en situaciones donde es necesario eliminar individuos problema, para esto, los dispositivos de liberación se colocan como en el caso anterior, junto a trampas que capturarán los individuos que se acerquen atraídos por el cebo. Las trampas no permitirán la posterior salida de los individuos.

Finalmente la técnica de confusión sexual es la más usada en el control de insectos problema. La misma consiste en la colocación de dispositivos de liberación de feromonas en el sitio infestado con el fin de inundar el ambiente con los volátiles adecuados, y lograr así una interrupción de la comunicación química entre individuos que se hallan en el lugar. Al ser imposible el encuentro entre machos y hembras, no se produce la cópula necesaria para la formación de la siguiente generación (Barnes *et al.* 1992; Hegazi *et al.*, 2007).

1.4.3 *Megaplatypus mutatus*: Identificación de los volátiles emitidos por la especie

Megaplatypus mutatus utiliza para su comunicación intraespecífica un blend de tres compuestos químicos: 6-metil-5-hepten-2-ol (sulcatol), 6-metil-5-hepten-2-ona (sulcatona) (Gonzalez Audino *et al.* 2005) y 3-pentanol (Gatti Liguori *et al.* 2008). (Esq. 1.1).

Los ensayos comportamentales realizados con olfatómetro demostraron que las hembras de la especie se sienten atraídas de una manera significativamente mayor que la que otorgan los machos ante estas sustancias, por lo que se deduce que tal mezcla de componentes se trataría de un llamado de tipo sexual (González Audino *et al.* 2005).



Esquema 1.1. Representación gráfica de las moléculas que forman el blend feromonal de *M. mutatus*. a) sulcatona b) sulcatol c) 3-pentanol

A partir de la identificación de las feromonas sexuales que *M. mutatus* utiliza para su comunicación intraespecífica, fueron realizados tanto dentro como fuera de Argentina, diversos estudios a fin de comprobar la efectividad de tales componentes para la captura de insectos en trampas cebadas con dispositivos de liberación controlada de las feromonas.

1.4.4 Dispositivos de liberación controlada de feromonas y antecedentes en el uso de estos compuestos en el control de *M. mutatus*.

Los compuestos identificados como feromonas y con actividad biológica demostrada en laboratorio deben ser evaluados en el campo. Para esto, las feromonas son formuladas con el fin de obtener a campo una liberación controlada de las mismas. Los dispositivos poseen permeabilidad controlada a fin de lograr diversos perfiles de liberación en campo de dichas sustancias y adecuarlos al lugar geográfico y a las condiciones meteorológicas donde deberán actuar.

Las feromonas se utilizan formuladas en dispositivos de liberación controlada que se colocan en bosques naturales o plantaciones. En este tipo de sistemas, la feromona que actúa como permeante está incluida en una matriz polimérica, que actuará como carrier ó vehículo. En el caso general, el permeante es un compuesto hidrofóbico que difundirá en el material polimérico que tendrá propiedades de barrera específicas. Los procesos de transporte y por lo tanto de liberación de la feromona, dependen de las propiedades físico-químicas del sistema (Cork *et al.*, 2001).

La dificultad en el diseño de dispositivos y formulaciones adecuadas que permitan una liberación de la feromona de manera controlada y extendida en el tiempo durante el período de acción particular de cada especie, es un factor limitante (Atterholt *et al.*, 1999; Cork *et al.*, 2008).

Los formulados de liberación controlada necesitan liberar la correcta cantidad de feromonas, en una óptima proporción y durante un período de tiempo adecuado. Esto es esencial para el correcto funcionamiento de los dispositivos ya que la mayoría de las feromonas poseen más de un componente dentro del *blend* feromonal.

Por esto, existen diferentes técnicas en el diseño y armado de dispositivos de liberación de feromonas que permiten regular la cantidad emitida al ambiente. Los fenómenos de difusión influyen directamente sobre la velocidad de liberación y podemos clasificar a estos dispositivos (o formulados) en tres grupos:

- Sistemas monolíticos o matrices: Son matrices de polímeros en las cuales el agente activo está homogéneamente disperso y/o disuelto. La liberación del principio activo está controlada por los fenómenos de difusión.

- Sistemas de reservorio: Existen zonas de almacenamiento del agente activo, que están separadas del medio externo por una membrana polimérica que regula la liberación (Liu, 1985). La liberación del principio activo está controlada por los fenómenos de difusión y partición.

- Formulados líquidos para su uso en *sprays*: Son emulsiones que contienen feromonas y pueden aplicarse por medio de técnicas de *spray*.

Diferentes tipos de dispositivos de liberación de feromonas de *M. mutatus* han sido desarrollados y estudiados en este sentido. Los dispositivos tipo reservorio están formados por un envase de vidrio o de polímero que contiene el compuesto de interés y éste al atravesar membranas semipermeables de diferentes espesores difunde al ambiente (Funes *et al.* 2009; Funes *et al.* 2011), mientras que en los dispositivos de tipo matricial, el compuesto de interés se encuentra inmerso en el material polimérico que forma el dispositivo *per se* y el mismo difunde al ambiente luego de atravesar tal matriz (Gonzalez Audino 2012).

1.4.4.1 Dispositivos tipo reservorio

El uso de este tipo de dispositivos en trampas cebadas para captura de insectos a campo se implementó en plantaciones de álamos infestadas con *M. mutatus* en Argentina e Italia y los estudios realizados por el CIPEIN en ambos países demostraron su efectividad. (Funes *et al.* 2009; Funes *et al.* 2011, Gonzalez Audino 2012).

Este tipo de dispositivos fue utilizado tanto en experimentos de monitoreo poblacional como de confusión sexual y si bien el tipo de dispositivo utilizado en uno u otro tipo de experimento es similar, las tasas de liberación son diferentes en aras de lograr el efecto deseado: atracción y captura de hembras en el caso del trampeo o desorientación espacial e impedimento del encuentro entre los sexos en el caso de confusión sexual.

1.4.4.1.1 Monitoreo poblacional

En el CIPEIN se desarrollaron y fabricaron en cantidad dispositivos de tipo reservorio para cada una de las feromonas con distintos materiales, diversas capas permeables, semipermeables, o impermeables de polietilenos de diferentes grosores y sitios de origen y distintas geometrías y por lo tanto con distintas velocidades de liberación. Las performances de liberación se evaluaron en túnel de viento y se seleccionaron los mejores materiales para evaluar a campo su efecto de captura de insectos.

Para el monitoreo de poblaciones, las trampas fueron cebadas con los dispositivos de liberación lenta de feromonas y se colocaron a campo comparándose la efectividad de captura de cada una de ellas (González Audino *et al.* 2011 y 2013, Funes *et al.* 2013).

Se encontraron como resultados los dispositivos, el blend de feromonas y la geometría de las trampas óptimos para obtener la mayor captura de insectos (Funes *et al.* 2009 y 2013, González Audino *et al.* 2011 y 2012) (Fig. 1.11). En este sentido, se seleccionaron dispositivos tipo sachet de polietileno de baja densidad (PEBD) de 40 μm de espesor como membrana reguladora de la tasa de liberación y PEBD de 80 μm de espesor como membrana impermeable y viales de vidrio con tapa semipermeable de PEBD de 40 μm . En cuanto a la proporción de las feromonas liberadas se determinó que aquellas que tuvieron velocidades de

liberación (medidas en túnel de viento en laboratorio a 28 °C y velocidad lineal del aire 0.5 m/s) de 10 ± 1 mg, 7 ± 1 mg y 30 ± 2 mg por día para sulcatol, sulcatona y 3-pentanol respectivamente fueron las más efectivas en la captura de insectos. En cuanto al diseño de las trampas las que registraron mejores resultados fueron aquellas que tenían las secciones de choque con el insecto de color transparente.



Figura 1.11. Dispositivos tipo reservorio utilizados para la captura de individuos de *M. mutatus* en plantaciones de álamo de Alberti (Buenos Aires).

1.4.4.1.2 Confusión sexual o Interrupción de Apareamiento

Los experimentos de confusión sexual se realizaron con sulcatona, 3-pentanol y sulcatol.

Se construyeron los dispositivos de liberación controlada necesarios. Las velocidades de liberación se seleccionaron aumentando las utilizadas para monitoreo: para sulcatol y sulcatona se multiplicó por 10, y para 3-pentanol que ya tenía una velocidad alta, se multiplicó por 3. Para el 3-pentanol se seleccionó el mismo PEBD que para el sulcatol puesto que ambos son alcoholes con volatilidades parecidas. Los lotes que se seleccionaron para los tratamientos y los lotes control no presentaron diferencias significativas al inicio del experimento.

Previamente al tratamiento con feromonas, el nivel de ataque medido como promedio de galerías activas por árbol es similar en los lotes tratados y control.

Como resultado del tratamiento se observó en todas las locaciones que el nivel de ataque de las áreas control luego del tratamiento es similar o menor al anterior al tratamiento pero en cambio, el nivel de ataque en los lotes tratados siempre es significativamente menor después del tratamiento.

1.4.4.2 Dispositivos de tipo matricial

Este tipo de dispositivos fueron construidos como medias esferas de 3 cm de diámetro aproximadamente y están formados por diferentes ceras y poli etilenglicoles biodegradables. Fueron utilizados para experimentos de confusión sexual o de interrupción de apareamiento.

Se colocaron en las zonas destinadas al tratamiento los dispositivos liberadores de sulcatol, sulcatona y 3-pentanol, confeccionados con polietilenglicol, parafina y caolin como inerte y 20 % de feromona. Previamente al tratamiento con feromonas, el nivel de ataque en las plantaciones de álamos de Buenos Aires, medido como promedio de galerías activas por árbol, era similar en los lotes tratados y control. Sin embargo, luego del tratamiento con feromonas formuladas en matrices monolíticas, se observó que el nivel de ataque fue significativamente menor en las tratadas que en las control (Funes 2013, Tesis Doctoral).



Figura 1.12. Dispositivos tipo matricial utilizados para experimentos de confusión sexual de individuos de *M. mutatus* en plantaciones de álamo de Junín (Buenos Aires).

Esta morfología de dispositivos también está siendo estudiado con otras formulaciones de ceras biodegradables, pero tal desarrollo se encuentra aún en

períodos de investigación de laboratorio, y los mismos no han sido evaluados en campo.

El control de *Megaplatypus mutatus* por medio del uso de feromonas es una técnica reciente de manejo de la plaga. Los estudios de ecología química de este insecto comenzaron en el CIPEIN en el año 2005 y desde ese momento al presente se han logrado avances promisorios de control de este insecto; los diferentes dispositivos desarrollados y evaluados han cumplido con creces las expectativas esperadas.

El desafío al comienzo de esta Tesis fue continuar con el desarrollo de nuevos dispositivos que actúen efectivamente como *carriers* de los compuestos feromonales y que puedan degradarse naturalmente en las plantaciones forestales, independizándose de esta manera del retiro de los mismos una vez hecha efectiva la intervención de control.

La posibilidad que ofrecen los polímeros de origen natural es en este sentido muy valiosa ya que permite, por un lado, el uso de elementos biodegradables para la elaboración de los dispositivos, y por otro, la variación de determinadas condiciones de síntesis a los fines de lograr una relación estructura/propiedad apropiada para la obtención de una cinética de liberación efectiva

1.5 Bibliografía

- Achinelli F., Denegri G. and Marlats R. 2004. Evolución y perspectivas del cultivo de Salicáceas en la pampa húmeda argentina. SAGPyA Forestal 32: 14-23.
- Albajes R., Konstantopoulou M., Etchepare O., Eizaguirre M., Frérot B., Sans A., Krokos F., Améline A and Mazomenos B. 2002. Mating disruption of the corn borer *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae) using sprayable formulations of pheromone. Crop Protection 21: 217-225.
- Alfaro R. 2003. El "taladrillo grande de los forestales", *Platypus mutatus* (= *sulcatus*): importante plaga de la populicultura argentina: Una plan de acción. SAGPyA Forestal 28: 10-18.
- Alonzo A. 1987. Estado actual del mejoramiento de Salicáceas en la Argentina. Actas del Simposio sobre Silvicultura y Mejoramiento Genético de especies forestales. CIEF Tomo I: 157-171.

- Alvarez Moreno 2009. Mercados para la madera de álamo de calidad y clones para ese destino. Actas de las Jornadas de Salicáceas pp 1-14.
- Allegro G. I parasitti del pioppo e del salice in Argentina Estr. Cellul Carta 4: 19-21.
- Allegro G. and Della Beffa G. 2001. Un nuovo problema entomologico per la pioppicoltura italiana: *Platypus mutatus* Chapuis (Coleoptera, Platypodidae). Sherwood. Foreste ed alberi oggi 66:31-34.
- Anon J. Journal of Chemical Ecology 2001, 27 preface.
- Barnes M.M., Millar J.G., Kirsch P.A., Hawks D.C. 1992. Codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) control by dissemination of synthetic female sex pheromone. Journal of Economic Entomology 85 (4): 1274-1277.
- Bartell R.J. 1982. Mechanisms of communication disruption by pheromone in the control of Lepidoptera: A review. Physiological Entomology 7: 353-364.
- Brethes J. 1918. Dos nuevo *Platypus* (Col.) argentinos. Anales Museo Nacional de Historia Nacional. Buenos Aires. Argentina 17: 225-227.
- Borodowski E. 2012. Estado de situación del cultivo de sauces en el Delta del Paraná. Jornada Técnica sobre el Sauce en el Delta Entrerriano. Villa Paranacito.
- Cardé R.T. and Minks A.K. 1995. Control of moth pests by mating disruption: successes and constraints. Annual Review of Entomology 40: 559-585.
- Carella D. and Spigno P. (2002) Lo xilofago *Platypus mutatus* (Coleoptera: Platypodidae) dal pioppo passa ai fruttiferi. Bollettino del Laboratorio di Entomologia Agraria, Filippo Silvestri, 58, 139-141.
- Casaubon E., Cueto K., Hodara A., and Gonzalez H. 2004. Influencia de la calidad de sitio en el ataque de *Megaplatypus mutatus* Chapuis (Coleoptera, Platypodidae) a una plantación de sauces (*Salix babylonica* x *Salix alba* cv 131/27). Ecologia Austral 14 (1): 113-120.
- Casaubon E., Cueto G. and Sparagino C. 2006. Diferente comportamiento de *Megaplatypus mutatus* (= *Platypus sulcatus*) (Chapuis, 1865) en un ensayo comparativo de rendimiento de 30 clones de *Populus deltoides* Batr. En el Bajo Delta Bonaerense del Río Paraná. RIA 35 (2): 103-115.
- Cerrillo T. 1996. Revisión bibliográfica sobre *Platypus sulcatus* (Chapuis) y otros coleópteros del género. Revista de la Asociación Forestal Argentina 1 (5): 59-70.
- Comisión Nacional del Álamo 2012. Informe Nacional. Período 2008-2011.

- Cork A., De Souza K., Hall, D.R., Jones O.T., Casagrande E., Krishnaiah K., Syed, Z. 2008. Development of PVC-resin-controlled release formulation for pheromones and use in mating disruption of yellow rice stem borer, *Scirpophaga incertulas*. *Crop Protection* 27: 248-255.
- Cork, A., Alam S.N., Das A., Das C.S., Ghosh G.C., Phythian S., Farman D.I., Hall D.R., Maslen N.R., Vedham K., Rouf F.M.A., Srinivasan K. 2001. Female sex pheromone of brinjal fruit and shoot borer, *Leucides orbonalis* (Lepidoptera: Pyralidae): blend optimization. *Journal of Chemical Ecology* 27: 1867-1877.
- Cross J.V.D.R., Innocenzi P.J., Hesketh H., Jay C.N. and Burgess C.M. 2006. Exploiting the aggregation pheromone of strawberry blossom weevil *Anthonomus rubi* (Coleoptera: Curculionidae): part 2. Pest monitoring and control. *Crop Protection* 25: 155-166.
- Deland J.P., Judd G.J.R., Roltberg, B.D. 1994. Disruption of pheromone communication in three sympatric leafroller (Lepidoptera: Tortricidae) pests of apple in British Columbia. *Environmental Entomology* 23: 1084-1090.
- Dickmann D.I. 2006. Silviculture and biology of short-rotation woody crops in temperate regions: Then and now. *Biomass & Bioenergy* 30: 696-705.
- Dillen S.Y., Rood S.B. and Ceulemans R. 2010. Growth and Physiology. Ed: S. Jansson et al. *Genetics and Genomics of Populus: Plant Genetics and Genomics: Crops and Models* 8. Springer Science: 39-63.
- EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization) 2004. Informe 166
- El Sayed A.M. 2011. The pherobase. Database of insect chemicals and semiochemicals. (<http://www.pherobase.com>).
- Funes H., Zerba E. and Gonzalez Audino P. 2009. Comparison of three types of traps baited with sexual pheromones for Ambrosia beetle *Megaplatypus mutatus* in poplar plantations. *Journal of Economic Entomology* 102: 1546-1550.
- Funes H., Griffo R., Zerba E. and Gonzalez Audino P. 2011. Mating disruption of the ambrosia beetle *Megaplatypus mutatus* (Coleoptera: Platypipodidae) in poplar and hazelnut plantations using reservoir systems for pheromones. Field trials in Argentina and Italy. *Entomologia experimentalis et applicata* 139: 226-234.
- Funes H., Zerba E. and González-Audino P. 2013. Effect of release rate and enantiomeric composition on response to pheromones of *Megaplatypus mutatus*

(Chapuis) in poplar plantations of Argentina and Italy. *Bulletin of Entomological Research*.

- Gallardo A., M. I. Picollo, P. González-Audino, G. Mougabure Cueto. Insecticidal Activity of Individual and Mixed Monoterpenoids of Geranium Essential Oil against *Pediculus humanus capitis* (Head Lice). *Journal of Medical Entomology*. 2012. Volume 49, Issue 2, Pages 332-335.

- Gatti Liguori P., Zerba E., Alzogaray R., and Gonzalez Audino P. 2008. 3-Pentanol: a new attractant present in volatile emission from the Ambrosia Beetle, *Megaplatypus mutatus*. *Journal of Chemical Ecology* 34: 1446-1451.

- Gatti P., Funes H., Zerba E. and Gonzalez Audino 2008. Bivoltinismo: La amenaza duplicada de *Megaplatypus mutatus*. VII Congreso Argentino de Entomología.

- Gatti P., Zerba E. and Gonzalez Audino P. 2011. Anatomical site of pheromone accumulation and temporal pattern of pheromone emission in *Megaplatypus mutatus*. *Physiological Entomology* 36 (3): 201-207.

- Giménez R.A. and Etienneot A.E. 2003. Host range of *Platypus mutatus* (Chapuis, 1865) (Coleoptera: Platypodidae). *Entomotropica* 18 (2): 89-94.

- Gonzalez Audino P., Villaverde R., Alfaro R., and Zerba E. 2005. Identification of volatile emissions from *Platypus mutatus* (= *sulcatus*) (Coleoptera: Platypodidae) and their behavioral activity. *Journal of Chemical Ecology* 25: 805-816.

González Audino P., Gatti P. and Zerba E. 2011. Traslucent pheromone traps increase trapping efficiency of ambrosia beetle *Megaplatypus mutatus*. *Crop Protection*. 30: 745-747.

- Gonzalez Audino P., Griffo R., Gatti P., Allegro G., Zerba E. 2012. Pheromone detection of the introduced forest pest *Megaplatypus mutatus* (= *Platypus mutatus*) (Chapuis) Platypodinae, Curculionidae) in Italy. *Agroforestry Systems*. ISSN 0167-4366 DOI 10.1007/s 10457-012-9527-3.

- Gonzalez Audino P., Funes H., Slodowicz M. and Zerba E. 2012. Identification and formulation of pheromones of the ambrosia beetle *Megaplatypus mutatus* and field management using reservoir and monolithic delivery systems. *International Symposium of Chemical Ecology*.

- Guerrero R.T. 1966. Una nueva especie de hongo imperfecto asociado con el *Platypus sulcatus* Chapuis. *Revista de Investigaciones Agropecuarias* 5 III (8):97-103. INTA, Buenos Aires. Argentina.

- Hegazi, E.M., Konstantopoulou, M.A., Milonas, P., Herz, A., Mazomenos, B.E., Khafagi, W.E., Zaitun, A., Abdel-Rahman, S.M., Helal, I., El-Kemmy, S. 2007. Mating disruption of the jazmines moth *Palpita unionalis* (Lepidoptera: Pyralidae) using a two pheromone component blend: A case of study over three consecutive olive growing seasons in Egypt. *Crop Protection* 26: 837-844.
- Hodges R.J., Addo S., Farman D.I. and Hall D.R. 2004. Optimising pheromone lures and trapping methodology for *Prostephanus truncates* (Horn) (Coleoptera: Bostrichidae). *Journal of Stored Products Research* 40: 439-449.
- Howse P.E. 1998. Pheromones and behavior 1-130. In Howse P.E., Stevens I. and Jones O. *Insect pheromones and their use in pest management*. Chapman and Hall. London.
- Jadhav S.R., Chiou B., Wood D., DeGrande-Hoffman G., Glenn G.M. and John G. 2011. Molecular gels-based controlled release devices for pheromones. *Soft Matter* 7:864-867.
- Karlson P. and Lüschen. 1959. Pheromones: A new term for a class of biologically active substances. *Nature* 183: 55-56.
- Khan Z.R., James D.G., Midega C.A.O. and Pickett J.A. 2008. Chemical Ecology and conservation biological control. *Biological control* 45:210-224.
- Liu J.C., Tan E.L., Chiang C.C., Tojo K. and Chien W. 1985 Mecnistical analysis of release kinetics for lipophilic drug from matrix-type drug delivery devices. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 11: 1373-1390.
- Lu Q., Wang X., Lu S., Li M., Kaplan D. and Zhu H. 2011 *Biomaterials* 32: 1059-1067.
- Lopez J.D., Leonhardt B.A. and Shaver T.N. 1991. Performance criteria and specifications for laminated plastic sex pheromone dispenser for *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Chemical Ecology* 17 (11): 2293-2305.
- Mitchell E.R. 1986 Pheromones: as the glamour and glitter fade the real work begins. *Florida entomologist* 69:132-139.
- Ñuñez Cresto M., Marquina J., Marlats R. 2001. Taladrillo de los forestales en *Populus deltoides Marsh* cv Catfish 2. *Revista de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional de Cuyo*. Tomo XXXIII (2): 31-40.
- Pascual-Villalobos M.J and López M.D. 2013. New application of guayule resin in controlled released formulations. *Industrial Crops and Products* 43:44-49.

- Pincemin J.M., Monlezun S.J., Zunino H., Cornaglia P.S. and Borodowski E. 2007. Sistemas Silvopastoriles en el Delta del Río Paraná: Producción de materia seca y estructura de gramíneas templadas bajo álamos APPA ALPA-Cusco Perú.
http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_y_manejo_pasturas/manejo%20silvopastoril/82-Pincemin-silvopastoril.pdf
- Price P.W. 1991. The plant vigor hypothesis and herbivore attack. *Oikos* 62: 244-251.
- Primo-Yúfera E. 1991. Ecología química. Nuevos métodos de lucha contra insectos. Mundi-Prensa Libros, Madrid 191 pp.
- Redy G.V.P. y Guerrero A. 2004. Interactions of insecto pheromones and plant semiochemicals. A Review. *Trends in Plant Science* 9: 253-261.
- Santoro H.F. 1963. Biología de *Platypus sulcatus*. *Revista de Investigaciones Forestales* 4 (1) 75-79.
- Santoro H.F. 1962. Fundamentos para el control manual de *Platypus sulcatus*. *Revista de Investigaciones Forestales* 3 (1):17-23.
- Scarpa J. 2008. II Jornadas Forestales de Córdoba. Villa General Belgrano.
- Steenackers V. 2000. Poplars and willows in the 21st century. What can research do to meet the needs of society? *Proceedings of the 21st Session of the International Poplar Commission. Poplar and Willow Culture: Meeting the Needs of Society and Environment.*
- Thomas E. 2005. Monitoreo de *Megaplatypus mutatus* (Taladrillo de los forestales" en los Departamentos de Confluencia y Añelo en la Provincia de Neuquén. Reporte 2004/5. Ministerio de Producción y Turismo, Subsecretaría de Producción, Delegación Forestal Neuquén, Argentina.
- Tremblay E., Espinisa B., Mancini D. and Caprio G. 2000. Un coleottero proveniente dal Sudamerica minaccia i pioppi. *L'Informatore Agrario* 48:89-90.
- Wilson E.O. and Bossert W.H. 1963. Chemical communication among animals. *Recent Progress in Hormone Research* 19: 673-716.
- Wood S.L. 1993 Revision of the Genera Platypodidae (Coleoptera). *Gt Basin Nat.* 53: 259-281.
- Wood S.L. and Bright D.E. 1993. A catalog of Scolytidae (Coleptera) Part II *Taxonomy Index.* 13:1-1553.

- Wyatt T.C. 2009. 50 years of pheromones. *Nature* 457: 262-263.
- Youm O., Maliki Y., Hall D.R., Farman D.I. and Foster J.E. 2012 Pheromone-mediated mating disruption in the millet stem borer, *Coniesta ignefusalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Crop Protection* 31: 50-57.
- Zsuffa L. Giordano E. Pryor L.D. Stettler R.F. 1996. Trends in poplar cultura: some global and regional perspectives. *Biology of Populus and its implications for management and conservation*. NRC Research Press. 515-539.

Capítulo 2

Antecedentes

2.1 Liberación controlada de compuestos

Se denomina liberación controlada al fenómeno de transferencia de un material activo desde algún tipo de reservorio hacia una superficie blanco específica, con el fin de mantener una concentración predeterminada o un nivel de emisión específico para un particular período (Mastromatteo *et al.* 2010).

En los últimos tiempos, ante el progresivo entendimiento de que sustancias tanto de tipo farmacológicas como de uso agronómico provocaban efectos tóxicos por sobreexposición o se volvían inefectivas cuando la administración o aplicación se resolvía por términos convencionales, hubo un creciente interés en la tecnología de la liberación controlada de compuestos.

La aplicación convencional de sustancias químicas de uso farmacológico se produce en las formas de cápsulas, pastillas, cremas tópicas o inyectables en formas de pulsos que a menudo provocan grandes fluctuaciones de la concentración de la droga en el torrente sanguíneo o en el tejido con los consecuentes efectos de patrones no deseados de eficacia y toxicidad.

En cuanto al uso de este tipo de aplicaciones convencionales en el área de la agricultura, las mismas provocan una concentración inicial en exceso que promueve la presencia del compuesto activo un período práctico de actividad. No obstante, esta sobredosis provoca pérdidas de material innecesario y ocasiona problemas de toxicidad hacia especies no blanco.

Es por esto que se comenzaron a usar los procesos de difusión de compuestos de interés a través de polímeros y membranas sintéticas, como una forma efectiva y segura en términos de alcanzar concentraciones adecuadas no solamente de drogas y agentes farmacológicamente activos, sino también de fertilizantes, pesticidas y herbicidas.

Las formulaciones de liberación controlada también alcanzaron el área de la ecología química, donde desde formulaciones poliméricas se pueden obtener

concentraciones adecuadas de feromonas en aire, en aras de producir efectos específicos en una especie de insecto de interés.

El uso de trampas cebadas con feromonas se basó por un período prolongado de tiempo en formulaciones realizadas con septa de caucho (o silicona) o con difusores pasivos del compuesto activo. Si bien por un lado estos eran dispositivos prácticos y de bajo costo, por otro lado las tasas de liberación de muchos compuestos activos no podían ser realmente controladas y la cinética de los mismos se modificaba con el tiempo y con las temperaturas de exposición. En un intento de mejorar la *performance* de liberación de este tipo de formulados, es que se comenzaron a usar las múltiples posibilidades que otorgan los polímeros para el diseño de dispositivos más eficientes (Suckling 2000).

2.2 El uso de polímeros en la formulación de dispositivos de liberación controlada de feromonas.

Los polímeros, por su gran versatilidad, son los candidatos ideales para producir una liberación controlada de feromonas en determinada área de aplicación y se han desarrollado tres tipos de dispositivos de tipo polimérico:

- Sistemas tipo reservorio: Constan de dos partes, un área de reserva del compuesto activo y un área de difusión. La parte de reserva puede estar formada por un material impermeable como el vidrio, aluminio o polietileno de alta densidad y la parte de difusión puede ser láminas de polietileno de baja densidad o silicona. También existen emisores de aerosol que consisten en reservorios programados electrónicamente para liberar feromonas en términos de aerosol presurizado.

El transporte del compuesto en los sistemas tipo reservorio, se da por la disolución del mismo en la interfase soluto/polímero y su posterior difusión hacia el exterior a través de los segmentos macromoleculares, bajo la influencia de un gradiente de concentración que sigue la primera ley de Fick. Teóricamente, estos sistemas pueden ser capaces de liberar el agente activo a velocidad constante. No obstante, en la práctica existen factores que pueden dar lugar a desviaciones importantes de este comportamiento. Esto puede controlarse ajustando la geometría del artefacto empleado, el espesor de la membrana, la

diferencia de concentración a través de ella, las características termodinámicas del sistema y la estructura del polímero (Langer & Peppas 1983; Atterholt *et al.* 1999).

- Sistemas tipo *spray* que están compuestos por una matriz líquida biodegradable donde el semioquímico se encuentra disuelto. Es común en este tipo de dispositivos que se añadan compuestos para proteger el agente activo como estabilizantes de rayos UV, antioxidantes y surfactantes. A menudo, este tipo de formulaciones consisten en microesferas (formadas a partir de una microemulsión) que contienen los semioquímicos dispersados en una matriz líquida (de Vlieger *et al.* 2001). El tiempo de eficacia de este tipo de formulaciones varía entre días y semanas y tal comportamiento depende principalmente de los factores ambientales, el tamaño de las microesferas y las propiedades químicas de las feromonas incluidas. La principal ventaja en el uso de este tipo de sistema es que se puede tratar campos enteros (Welter *et al.* 2005).

- Sistemas de tipo matricial: En estos sistemas el compuesto activo se encuentra uniformemente distribuido en un soporte de polímero sólido. El compuesto puede encontrarse disuelto en la matriz polimérica o disperso si su contenido es mayor que el límite de solubilidad. Existe una amplia variedad de materiales poliméricos que pueden constituir la matriz sólida y es por ese motivo las tasas de liberación pueden variar ampliamente según se trate de uno u otro material.

Las matrices más comunes usadas como dispositivos de liberación de feromonas son tubos de polietileno tipo *twist tie* (Isomate ®), sachets de polietileno, viales de polietileno, películas (CheckMate CM-XL ®), espirales (NoMate CM ®), septums de caucho, formulaciones en cera y dispositivos tipo gel (Fig. 2.1) (Torr *et al.* 1997; Atterholt *et al.* 1999; Johansson *et al.* 2001; Tomaszewska *et al.* 2005; Zhang *et al.* 2008; Heuskin *et al.* 2011).

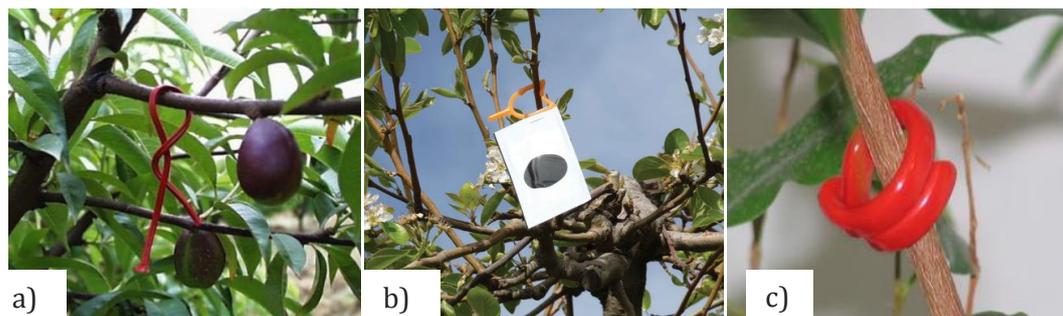


Figura 2.1: Dispositivos poliméricos tipo matriciales. a) tubo de polietileno tipo *twist tie*, b) películas y c) espirales.

Las dificultades menores encontradas en este tipo de dispositivos incluyen la dificultad de mantener una tasa de liberación constante en el tiempo durante un período prolongado y la disminución de la concentración en aire de la feromona a medida que aumenta la distancia del dispositivo; como consecuencia de este último inconveniente es necesaria la aplicación de dispositivos en suficientes sitios del campo a tratar. Sin embargo, la mayor dificultad en el uso de este tipo de dispositivos es la no biodegradabilidad de las formulaciones. Son escasos los antecedentes encontrados en el uso de polímeros biodegradables como *carriers* de feromonas, a pesar de que las nuevas tendencias se orientan hacia el uso de matrices de orígenes naturales o biodegradables para independizarse del retiro de los dispositivos una vez utilizado (Stipanovic *et al.* 2004). Esto es especialmente importante en bosques y plantaciones de cientos de hectáreas.

Los tipos de mecanismos que gobiernan la liberación de principios activos en sistemas matriciales pueden ser cuatro:

-Tipo I o *Fickniano*: Se presenta en las matrices inertes en las que un compuesto hidrosoluble está disperso en una matriz insoluble. La velocidad de liberación disminuye en función del tiempo, debido a que la longitud del trayecto de difusión para las moléculas de principio activo aumenta a medida que el frente del disolvente avanza hacia el centro de la matriz. La cantidad de agente activo disuelto es proporcional a la raíz cuadrada del tiempo transcurrido hasta alcanzar una liberación de aproximadamente el 60% de la dosis vehiculizada.

-Tipo II: Este mecanismo se presenta cuando la liberación del principio activo es controlada por el hinchamiento de la matriz o comprimido matricial.

- Difusión anómala o *no Fickniana*: En este caso la liberación del principio activo depende simultáneamente de los fenómenos de hinchamiento y de difusión de la matriz.

-Tipo *supra II*: El dispositivo de liberación presenta una capa superficial totalmente hidratada que sufre erosión continua durante el proceso de liberación. En algunos casos, la liberación del compuesto se acerca a orden cero si la velocidad de avance del frente del medio de disolución hacia el interior del comprimido y la velocidad de erosión (o de disolución, si el polímero es hidrosoluble) se compensan.

2.3 Estudios de cinética de liberación de feromonas

Los estudios de liberación de semioquímicos desde los dispositivos poliméricos, si bien no aseguran la eficiencia biológica de los mismos en cuanto a la respuesta que otorgue el insecto de interés, brindan información acerca de la cinética de liberación alcanzada por determinado período de tiempo. Aunque muchos dispositivos no garantizan una tasa de liberación controlada, es importante conocer el momento en que la cantidad de feromona liberada es insuficiente para influir en el comportamiento del insecto y de esta manera tomar la decisión de renovar el dispositivo.

2.3.1 Técnicas para estimar las tasas de liberación

La dificultad de medir tasas de liberación en campo provoca que tales medidas deban ser registradas en laboratorio en condiciones semi-controladas. En este sentido, se desarrollaron tres técnicas de medición que fueron superándose en el tiempo en cuanto a la cuantificación del compuesto liberado, éstas son: métodos gravimétricos, extracción total del compuesto activo y la colección dinámica de volátiles.

El primer procedimiento y menos usado en la actualidad consiste en el pesado de los dispositivos a intervalos diarios para así determinar la pérdida de masa en el tiempo. El mayor inconveniente que presenta esta técnica es la falta de precisión ya que factores como la humedad ambiente y posibles partículas depositadas en los dispositivos puede alterar el peso registrado.

La segunda técnica consiste en la extracción total de los semioquímicos desde los dispositivos que fueron utilizados. De esta manera se puede registrar la concentración residual en los mismos y conocer así la cantidad de feromona liberada. Para obtener una extracción óptima de la feromona es necesario que ésta haya sido completamente disuelta en el dispositivo (Möttus *et al.* 1997). Esta técnica tiene el beneficio que permite medidas cualitativas y cuantitativas ya que al analizarse por cromatografía gaseosa los compuestos extraídos, es posible determinar los posibles productos de degradación de las feromonas utilizadas. Sin embargo, posee la desventaja que no permite la detección de productos de degradación no volátiles (Tomaszewska *et al.* 2005).

Por último, el tercer método utilizado para medir tasas de liberación consiste en muestreos dinámicos que coleccionan los volátiles liberados en adsorbentes afines. En este caso es esencial para obtener valores análogos en el tiempo, que los valores de liberación sean tomados en las mismas condiciones de presión atmosférica, temperatura, humedad relativa y flujo de aire. Los semioquímicos son capturados en cartuchos con un adsorbente, seguido de una extracción del solvente o desorción térmica y luego analizados por cromatografía gaseosa. Una alternativa a esta técnica es la captación de volátiles en fibras utilizadas para la Microextracción en Fase Sólida (SPME), las que actúan como adsorbentes de los volátiles liberados.

Al considerar los ventajas y desventajas de las tres opciones, se considera que la última es la más apropiada y segura en términos de estimar la tasa de liberación de feromonas desde los dispositivos poliméricos (Heuskin *et al.* 2011).

2.3.2 Factores que afectan la tasa de liberación

La liberación de volátiles en la atmósfera depende principalmente de dos factores, por un lado de la velocidad de difusión del compuesto a través del dispositivo y por otro de la velocidad de evaporación de la molécula en el aire. El

primer parámetro depende de las características del dispositivo (tipo de matriz, tamaño, forma, espesor y distribución del semioquímico en la matriz), mientras que la velocidad de evaporación deriva de parámetros ambientales como la temperatura, la velocidad del viento, la humedad relativa y de las propiedades físicas del compuesto en sí (Krüger *et al.* 2002, Stipanovic *et al.* 2004, Alfaro-Cid *et al.* 2009). En los casos donde los procesos de evaporación de la feromona desde la superficie del dispositivo son más lentos que el proceso de difusión, la velocidad de evaporación es un factor limitante y se considera que la liberación sigue una cinética de primer orden (Esq. 2.1)

$$C_0 = C_t e^{-kt}$$

donde C_0 es la cantidad del compuesto en el dispositivo al comienzo de la evaporación, C_t es la cantidad de compuesto en el tiempo t y k es la tasa de evaporación constante. En el caso de cinéticas de primer orden, la mitad del compuesto activo se evaporará luego de un tiempo $t_{1/2}$, llamado así el tiempo de vida media del compuesto (Möttus *et al.* 2001).

Se realizaron numerosos estudios para determinar las cinéticas de liberación alcanzadas por variados dispositivos, tales estudios concluyeron que en su mayoría las liberaciones siguen cinéticas de primer orden y que la cantidad de compuesto liberado es dependiente de la cantidad que queda en el dispositivo (Mc Dounough *et al.* 1992; Zhang *et al.* 2008; Cork *et al.* 2008).

La versatilidad de los polímeros en cuanto a la síntesis de variados sistemas de liberación controlada permite controlar desde la síntesis de los mismos, diferentes variables de reacción en vías de lograr las propiedades intrínsecas adecuadas, para lograr la cinética de liberación deseada.

Dichas variables tienen influencia directa en los resultados de liberación de determinado compuesto ya que determinan la porosidad, capacidad de hinchamiento, de compresión, etcétera, de los sistemas de liberación y por ende de sus capacidades tanto de retener como de liberar un compuesto de interés en tiempo y forma.

Asimismo, siendo los estudios de los atributos propios de los dispositivos tan importantes como los de la liberación obtenida, es fundamental en el caso de tratarse compuestos bioactivos, los ensayos biológicos pertinentes a los fines de conocer la efectividad de la concentración liberada.

2.4 Bibliografía

- Alfaro-Cid E., Esparcia-Alcázar A.I., Moya P., Femenia-Ferrer B. Sharman K. and Merelo J.J. 2009. Modeling pheromone dispensers using genetic programming. *Applications of Evolutionary Computing* 5484:635-644.
- Allegro G & Della Beffa G. 2001. Un nuovo problema entomologico per la pioppicoltura Italiana: *Platypus mutatus* Chapuis (Coleoptera, Platypodidae). *Sherwood Foreste ed alberi oggi* 66: 31-34. (In Italian)
- Atterholt, C.A., Delwiche, M.J., Rice, R.E., Krochta, J.M. 1999. Controlled release of insect sex pheromone from paraffin wax and emulsions. *Journal of Controlled Release* 57: 233-247.
- Cork A. 2008. Development of a PVC-resin-controlled release formulation for pheromones and use in mating disruption of yellow rice stem borer *Scirpophaga incertulas*. *Crop Protection* 27:248-255.
- de Vlieger J.J. 2001. Development of a sprayable slow-release formulation for the sex pheromone of the Mediterranean corn borer *Sesamia nonagroides*. *IOBC Bulletin* 24 (2):101-106.
- Heuskin S., Verheggen F.J., Haubruge E., Wathelet J.P. and Lognay G. 2011. The use of semiochemical slow-release devices in integrated pest management strategies. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment* 15(3):459-470.
- Hofmeyr H. and Burger B.V. 1995. Controlled-release pheromone dispenser for use in traps to monitor flight activity of false moth. *Journal of Chemical Ecology* 21 (3): 355-363.
- Johansson B.G., Anderbrant O., Simandl J., Avtzis N.D., Salvadori C., Hedenström E., Edlund H. and Högberg H.E. 2001. Release rates for pine sawfly pheromones from two types of dispensers and phenology of *Neodiprion sertifer*. *Journal of Chemical Ecology* 27 (4) 733-745.

- Krüger A.J. and Tolmay A.T. 2002. Prediction of the release characteristics of alcohols from EVA using a model based on Fick's second law of diffusion. *Journal of Applied Polymer Science* 84:806-813.
- Langer, R.S. y Peppas, N. A. 1983. Chemical and physical structure of polymers as carriers for controlled release of bioactive agents: a review. *Journal of Macromolecular Science- Reviews in Macromolecular Chemistry and Physics* 23, 61-126.
- Mastromatteo M., Mastromatteo M., Conte A., and Del Nobile M.A. 2010. Advances in controlled release devices for food packaging applications. *Trends in Food Science and Technology* 21 (12) 591-598.
- McDonough L.M. Aller W.C. and Knight A.L. 1992. Performance characteristics of a commercial controlled-release dispenser of sex pheromones for control of codling moth (*Cydia pomonella*) by mating disruption. *Journal of Chemical Ecology* 18 (12):2177-2189.
- Möttus E., Nomm V., Williams I.H. and Liblikas I. 1997. Optimization of pheromone dispensers for diamondback moth *Plutella xylostella*. *Journal of Chemical Ecology* 23(9):2145-2159.
- Stipanovic A.J. Hennessy P.J. Webster F.X. and Takahashi Y. 2004. Microparticle dispensers for the controlled release of insect pheromones. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52:2301-2308.
- Suckling D.M. 2000. Issues affecting the use of pheromones and other semiochemicals in orchards. *Crop Protection* 19: 766-683.
- Tomaszewska E. 2005. Evaluation of pheromone release from commercial mating disruption dispensers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53:2399-2405.
- Torr S.J., Hall D.R., Phelps R.J. and Vale G.A. 1997. Methods for dispensing odour attractants for tsetse flies (Diptera: Glossinidae) *Bulletin of Entomological Research* 87:299-311.
- Zhang A. 2008. Activity evaluation of cocoa pod borer sex pheromone in cacao fields. *Environmental Entomology* 37 (3): 719-724.

Capítulo 3

Objetivos

El presente trabajo doctoral se encuadra dentro de un proyecto de investigación cuyo objetivo principal fue el estudio teórico empírico de especies maderables no convencionales para su aplicación en la construcción de vivienda. Dentro de este proyecto se trabajó con una especie forestal denominada álamo (*Populus deltoides*), afectada por un insecto llamado *Megaplatypus mutatus* que ha sido clasificado como su plaga principal. En numerosos polos productivos del país este insecto ocasiona pérdidas económicas y disminuye la calidad de la madera, dejándola inutilizable para su uso como material de construcción. Es por ello que este proyecto surgió en sus comienzos como un objetivo de trabajo del Centro Experimental para la Vivienda Económica (CEVE).

Finalmente en el Laboratorio de Polímeros de la Facultad de Ciencias Químicas de la UNC es que se llevó a cabo la experimentación pertinente a los fines de alcanzar los objetivos propuestos en la presente tesis doctoral.

3.1 Objetivo general

Desarrollo de sistemas poliméricos biodegradables de liberación controlada de feromonas sexuales, como método alternativo de bajo impacto ambiental para el control de la plaga denominada comúnmente como “taladrillo grande de los forestales” (*Megaplatypus mutatus*) y que afecta la calidad de la madera de álamo.

3.2 Objetivos específicos

Para el cumplimiento del objetivo general previamente citado, es que se propusieron los siguientes objetivos específicos. Los mismos fueron separados según el perfil disciplinario en químicos y entomológicos.

Objetivos químicos:

- Diseñar dispositivos usando polímeros de origen natural y biodegradables que permitan una liberación sostenida de feromonas sexuales.
- Caracterizar las propiedades físico-químicas de los diferentes dispositivos preparados.
- Optimizar el sistema de liberación por medio de estudios de cinética de liberación.

Objetivos entomológicos:

- Evaluar la efectividad de los dispositivos poliméricos por medio de experimentos de laboratorio y/o campo con el insecto de interés.

Capítulo 4

Experimental

A lo largo del presente capítulo se detallan las diferentes metodologías, técnicas y equipamientos empleados para la síntesis y caracterización de los diferentes sistemas poliméricos preparados. También se presentan las metodologías utilizadas para la liberación, la detección y la cuantificación de los compuestos incorporados.

Por último, se explican los detalles experimentales de los bioensayos comportamentales de atracción que se hicieron con los dispositivos elegidos.

4.1 Materiales

Los reactivos empleados en la síntesis de diferentes productos de reacción fueron los siguientes: quitosano (QS) 50-190 kDa, con un grado de desacetilación de 85 %, SIGMA-ALDRICH; alginato de sodio (AL) LF 120 M, fG 35-45%, viscosidad de 70-150 mPa s, PROTANAL FMC Biopolymers; ácido acético glacial grado analítico ANEDRA; ácido clorhídrico CICARELLI; Rojo Congo (SIGMA-ALDRICH); hidróxido de sodio perlas pro análisis CICARELLI; Beta Caroteno Type I SIGMA-ALDRICH; 6-metil-5-hepten-2-ol (sulcatol: STOL) SIGMA-ALDRICH; 6-metil-5-hepten-1-ona (sulcatona: SLONA) SIGMA-ALDRICH; 3-pentanol (3-PEN) SIGMA-ALDRICH; cloruro de calcio CICARELLI; genipina 98% WAKO.

Los solventes empleados fueron de grado analítico y no se realizaron purificaciones en los mismos. Se utilizó alcohol etílico anhidro absoluto; diclorometano; cloroformo; tetrahidrofurano (ANEDRA) y agua destilada.

4.2 Preparación de los diferentes sistemas poliméricos ensayados como transportadores

Se prepararon y estudiaron diferentes tipos de dispositivos poliméricos de liberación controlada tipo matriciales analizando para cada caso en particular, su capacidad de incorporación, tiempo de liberación y porcentaje de retención de los compuestos de interés.

Las diferentes formas estudiadas fueron películas, geles, esferas simples y compuestas de alginato y/o quitosano. Se estudió la incorporación de las feromonas sulcatol, sulcatona y 3-pentanol y de los colorantes Rojo Congo y Beta Caroteno.

4.2.1 Películas poliméricas usadas como sistemas de liberación

Las películas se realizaron por la técnica de *casting*. Para tal fin, se preparó una solución de quitosano al 1,5 % p/v en ácido acético 1,5 % v/v y se dejó en agitación durante 24 horas, obteniéndose de esta manera una solución viscosa. Luego se incorporó sulcatol al 60% p/p con respecto a quitosano y 0,1 mL de una solución de genipina (compuesto entrecruzante del quitosano) disuelta en agua destilada al 0,1% p/p en relación al polímero. Se dejó en agitación durante 1 hora, hasta lograr una solución homogénea y se traspasó a cápsulas de Petri. Las mismas se taparon con un papel poroso y se dejaron secar por 24 horas (Aldana *et al.* 2012). Una vez que las películas estuvieron secas, se despegaron de las cápsulas y se procedió a realizar los experimentos de liberación.

Para el caso de las películas de alginato, se preparó una solución al 2% p/v en agua destilada previamente calentada a 70°C, luego la solución fue mezclada con 1% v/v de glicerol a 600 rpm por cinco minutos y desgasificada bajo vacío para evitar la formación de burbujas. Se incorporó sulcatol al 60% p/p con respecto al polímero hasta obtener una solución homogénea. Luego se traspasó a cápsulas de Petri y fueron secadas a temperatura ambiente por 24 horas (Rosales-Oballos *et al.* 2012).

4.2.2 Geles poliméricos usados como sistemas de liberación

Se usaron quitosano y alginato como polímeros bases para preparar los geles. Para el caso del quitosano, los dispositivos se prepararon de la siguiente manera: se utilizó el polímero en una relación de 14% p/v en relación al solvente usado (ácido acético 5% v/v), se mezcló por 30 minutos y se incorporó sulcatol disuelto en etanol en una proporción de 3,5 % v/v, en una relación de 60% p/p con respecto al polímero. Dicha preparación fue realizada en tubos de penicilina donde luego se realizarían los experimentos de liberación.

Para la preparación del gel de alginato se utilizó el polímero en una proporción de 20% p/v en relación al agua destilada, se mezcló por 30 minutos y se incorporó sulcatol (disuelto en etanol en una proporción de 3,5 % v/v), en una relación de 70% p/p en relación al polímero. En este caso, la preparación del dispositivo también se realizó en tubo de penicilina donde de efectuarían los experimentos de liberación.

4.2.3 Esferas poliméricas simples usadas como sistemas de liberación

En este caso, también se usaron quitosano y alginato como polímeros base para preparar los dispositivos.

Para la realización de las esferas de quitosano se preparó una solución de polímero de 3% p/v en ácido acético 5% v/v y se mantuvo en agitación por tres horas.

Transcurrido ese tiempo, se incorporó el compuesto a liberar a las distintas soluciones poliméricas: sulcatol en una relación de 100 % p/p con respecto al quitosano, y Beta Caroteno y Rojo Congo disueltos en etanol en una relación de 0,012% p/p con respecto al polímero. Se mantuvieron las soluciones en agitación por 3 horas, y luego fueron goteadas con una jeringa de 2 mm de diámetro sobre soluciones de NaOH 0,5 M (Agnihotri *et al.* 2004). Las esferas así obtenidas fueron mantenidas en las respectivas soluciones gelificantes por 20 minutos en agitación y luego filtradas.

En el caso de las esferas de alginato, se preparó una solución de 4% p/v en agua destilada, se mantuvo en agitación por dos horas y se incorporó sulcatol en una relación de 100 % p/v con respecto al quitosano, Beta Caroteno y Rojo Congo

disueltos en etanol en una relación de 0,012% p/p con respecto al polímero. . Se mantuvieron las soluciones en agitación por dos horas, y luego fueron goteadas con una jeringa de 2 mm de diámetro sobre soluciones de CaCl_2 2% p/v, pH 9 (Yosha *et al.* 2008).

Las esferas así obtenidas fueron mantenidas en las respectivas soluciones gelificantes por 20 minutos en agitación y luego filtradas.

4.2.4 Esferas poliméricas combinadas usadas como sistemas de liberación

Para realizar las esferas combinadas con corazón de quitosano y cubierta de alginato (ESF♥QUI) se preparó una solución de quitosano de 1,5 % p/v en ácido acético 0,5 % v/v y se mantuvo en agitación por dos horas. Transcurrido ese tiempo, la solución fue goteada con una jeringa de diámetro de 2 mm sobre una solución de alginato que contenía genipina en una relación de 3% p/p en relación a este último polímero (Mi *et al.* 2002).

Se variaron las siguientes condiciones experimentales de la solución de alginato a los fines de estudiar el efecto sobre el dispositivo formado. Así se prepararon soluciones de alginato de 0,25; 0,5; 0,75 y 1 % p/v y a pHs de 3, 6 y 8. Las esferas así formadas fueron mantenidas en la solución gelificante de alginato por 20 horas y filtradas (Tabla 4.1).

Tabla 4.1: Condiciones experimentales en la formación de esferas combinadas de corazón quitosano (ESF♥QUI).

Esfera	Quitosano (% p/v)	Alginato (% p/v)	pH solución gelificante	Tiempo de curado (horas)
ESF♥QUI(A):0,25-pH3	1,5	0,25	3	20
ESF♥QUI(A):0,25-pH6	1,5	0,25	6	20
ESF♥QUI(A):0,25-pH8	1,5	0,25	8	20
ESF♥QUI(A):0,5-pH3	1,5	0,5	3	20
ESF♥QUI(A):0,5-pH6	1,5	0,5	6	20
ESF♥QUI(A):0,5-pH8	1,5	0,5	8	20
ESF♥QUI(A):0,75-pH3	1,5	0,75	3	20
ESF♥QUI(A):0,75-pH6	1,5	0,75	6	20
ESF♥QUI(A):0,75-pH8	1,5	0,75	8	20
ESF♥QUI(A):1-pH3	1,5	1	3	20
ESF♥QUI(A):1-pH6	1,5	1	6	20
ESF♥QUI(A):1-pH8	1,5	1	8	20

(A) corresponde a la concentración de alginato utilizada como la solución gelificante

Para la preparación de las esferas combinadas con corazón de alginato y cubierta de quitosano (ESF♥AL), se preparó una solución de alginato al 4% p/v, se mantuvo en agitación por dos horas y luego se incorporó Beta Caroteno en una proporción de 0,012 % p/p. Para la incorporación de sulcatol, sulcatona y 3-pentanol, la misma se hizo en una proporción de 100% p/p. Se mantuvo la solución en agitación por dos horas y luego la misma fue goteada sobre una solución de CaCl₂ 2% p/v. Con el fin de estudiar el efecto del pH de dicha solución sobre el comportamiento físico-químico de las esferas formadas, esta variable fue modificada con HCl pH 1,2 hasta lograr pHs de 3 y 6. El pH propio de la solución de CaCl₂ era de 9, por lo que se obtuvieron, tres condiciones de síntesis.

Las esferas formadas en la solución gelificante de CaCl₂ fueron dejadas en solución por 10 minutos o por 21 horas. Una vez transcurrido este tiempo, las

esferas fueron colectadas y colocadas en una solución de quitosano 1 % p/v (disuelto en HCl 0,1 M) por 10 minutos, y finalmente las esferas fueron puestas en una solución de CaCl₂ 1% p/v por 10 minutos más.

Tanto las soluciones de quitosano como las de CaCl₂ utilizadas en esta experimentación fueron mantenidas en agitación durante el tiempo en que las esferas se encontraban en ese ambiente. Luego las mismas fueron lavadas en agua destilada por seis minutos (Peniche *et al.* 2004).

Con el fin de estudiar el efecto que provocaban determinadas modificaciones en la síntesis de los dispositivos, se variaron las condiciones experimentales que se detallarán a continuación:

- Se modificó la relación Ca²⁺/COO⁻ para variar la capacidad de interacción de los grupos COO⁻ propios del alginato con los grupos Ca²⁺ del CaCl₂, de esta manera se lograron relaciones molares de Ca²⁺/COO⁻ de: 1,5; 3,5 y 5,4 (Tabla 4.2). Tal modificación se realizó con el fin de estudiar el efecto del entrecruzamiento de las esferas en los análisis de texturometría.

En todos los casos, las soluciones que estuvieron en contacto con las esferas conteniendo algún tipo de compuesto, fueron preservadas para un posterior análisis. Dicho estudio consistió en una extracción líquido-líquido. La misma se realizó en una ampolla de decantación donde se extrajo la cantidad del compuesto no incorporado con un solvente adecuado.

En el caso de Beta Caroteno, la extracción se realizó con etanol y en el caso de los compuestos feromonales, la misma se hizo con diclorometano.

Posteriormente, se calculó la cantidad de compuesto que no fue incorporado en las esferas mediante el análisis de las soluciones extraídas. En el caso del Beta Caroteno se realizó el estudio mediante lectura al UV-visible y en el caso de los compuestos feromonales mediante cromatografía gaseosa.

Se realizaron las curvas de calibración para cada caso en particular.

Tabla 4.2: Condiciones experimentales en la formación de esferas combinadas (Corazón alginato).

	Esfera	Relación molar (Ca ²⁺)/(COO ⁻)	Alginato (% P/V)	Tiempo de curado	pH solución gelificante	Beta Caroteno (% p/p)	Sulcatol (% p/p)	Sulcaton a (% p/p)	3-Pentanol (% p/p)
Estudios de relación estructura/propiedad	1,5ESF ♥AL 4% 10min-pH6	1,5	4	10 min	6	-	-	-	-
	1,5ESF ♥AL 4% 10min-pH9	1,5	4	10 min	9	-	-	-	-
	1,5ESF ♥AL 4% 21hs-pH6	1,5	4	21 hs	6	-	-	-	-
	1,5ESF ♥AL 4% 21hs-pH9	1,5	4	21 hs	9	-	-	-	-
	3,5ESF ♥AL 4% 10min-pH3	3,5	4	10 min	3	-	-	-	-
	3,5ESF ♥AL 4% 10min-pH6	3,5	4	10 min	6	-	-	-	-
	3,5ESF ♥AL 4% 10min-pH9	3,5	4	10 min	9	-	-	-	-
	3,5ESF ♥AL 4% 21hs-pH6	3,5	4	21 hs	6	-	-	-	-
	3,5ESF ♥AL 4% 21hs-pH9	3,5	4	21 hs	9	-	-	-	-
	3,5ESF ♥AL 6% 10min-pH3	3,5	6	10 min	3	-	-	-	-
	3,5ESF ♥AL 6% 10min-pH6	3,5	6	10 min	6	-	-	-	-
	3,5ESF ♥AL 6% 10min-pH9	3,5	6	10 min	9	-	-	-	-
	5,4ESF ♥AL 4% 10min-pH6	5,4	4	10 min	6	-	-	-	-
	5,4ESF ♥AL 4% 10min-pH9	5,4	4	10 min	9	-	-	-	-
	5,4ESF ♥AL 4% 21hs-pH6	5,4	4	21 hs	6	-	-	-	-
	5,4ESF ♥AL 4% 21hs-pH9	5,4	4	21 hs	9	-	-	-	-
Estudios de liberación de compuestos	3,5ESF ♥AL 4% 10 min-pH3	3,5	4	10 min	3	0,012	-	-	-
	3,5ESF ♥AL 4% 10 min-pH6	3,5	4	10 min	6	0,012	-	-	-
	3,5ESF ♥AL 4% 10 min-pH9	3,5	4	10 min	9	0,012	-	-	-
	3,5ESF ♥AL 6% 10 min-pH3	3,5	6	10 min	3	0,012	-	-	-
	3,5ESF ♥AL 6% 10 min-pH6	3,5	6	10 min	6	0,012	-	-	-
	3,5ESF ♥AL 6% 10 min-pH9	3,5	6	10 min	9	0,012	-	-	-
	3,5ESF ♥AL 4% 10 min-pH3	3,5	4	10 min	3	-	100	-	-
	3,5ESF ♥AL 4% 10 min-pH6	3,5	4	10 min	6	-	100	-	-
	3,5ESF ♥AL 4% 10 min-pH9	3,5	4	10 min	9	-	100	-	-
	3,5ESF ♥AL 4% 21 hs-pH9	3,5	4	21 hs	9	-	100	-	-
	3,5ESF ♥AL 4% 10 min-pH9	3,5	4	10 min	9	-	-	100	-
	3,5ESF ♥AL 4% 21 hs-pH9	3,5	4	21 hs	9	-	-	100	-
	3,5ESF ♥AL 4% 10 min-pH9	3,5	4	10 min	9	-	-	-	100
	3,5ESF ♥AL 4% 21 hs-pH9	3,5	4	21 hs	9	-	-	-	100

4.3 Equipos y técnicas de caracterización

La determinación de masas de los reactivos y productos fue realizada con una balanza analítica Mettler H54Ar (USA). Las mediciones de pH fueron realizadas con un medidor de pH digital Altronix, TPXI 1584 (Argentina).

Las muestras caracterizadas mediante espectroscopia FTIR fueron analizadas a con un espectrofotómetro Nicolet 5-SXC (USA). Las mismas fueron secadas en

estufa a 60° C hasta perder el 80% de humedad, una vez alcanzado este punto fueron mortereadas hasta lograr un material homogéneo que llevado nuevamente a la estufa hasta deshidratación completa. Con este material se hizo una pastilla con KBr, a partir de la cual se tomaron los espectros Infrarrojo.

El análisis de las muestras mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) se realizó en un calorímetro METTLER TOLEDO DSC 823E (Facultad de Agronomía-UNC), empleando un programa de temperatura determinado a dos cápsulas de aluminio. Mientras que una de ellas contenía la muestra a analizar, la otra permaneció vacía y sirvió de referencia. Se graficó el calor suministrado en función de la temperatura sufrida o del tiempo transcurrido. Las diferentes transiciones térmicas se observaron mediante la aparición de picos (transiciones endotérmicas), valles (transiciones exotérmicas) o quiebres de la línea (transiciones vítreas).

En este caso, las muestras fueron pesadas, obteniéndose una masa de 7 mg aproximadamente por cada ensayo y colocadas en cápsulas de aluminio de 100 µL. Luego se cerraron con presión y se seleccionó un programa de calentamiento de 10°C min por minuto y una rampa de temperatura desde 25 a 260 °C.

Para la obtención de las micrografías de tipo SEM se utilizó un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM 6060 de resolución 3,0 nm y la preparación de las muestras se realizó mediante la aplicación del siguiente protocolo: las esferas fueron colocadas sucesivamente por 20 minutos en 10 mL de las siguientes soluciones proporcionales de agua-acetona: 70-30, 50-50, 10-90, 0-100. Finalizado el último tiempo de inmersión, algunas esferas fueron inmediatamente cortadas por la mitad con un bisturí con la ayuda de un microscopio óptico. Luego las muestras fueron deshidratadas por “punto crítico” y metalizadas con oro en un porta muestra adecuado para SEM, teniendo la precaución de colocar las esferas cortadas con el lado de interés hacia arriba.

Los análisis de microscopía óptica (*Watershed transformation*) se realizaron con un microscopio digital CMOS, en este caso tanto las ESF ♥AL como las ESF ♥QUI, fueron analizadas en su capacidad de reflejar la luz emitida por el microscopio. En este sentido se analizaron esferas realizadas bajo diferentes condiciones experimentales. Para las ESF ♥AL se analizaron dispositivos hechos con una concentración de alginato de 4% p/v y de 6% p/v con respecto al

polímero y también bajo diferentes pHs de la solución gelificante de CaCl₂ 2% p/v, obteniendo así pHs de 3, 6 y 9. Para el caso de las ESF♥QUI, sólo fue posible tomar fotografías de aquellos dispositivos realizados con una concentración de quitosano de 1,5% p/v, con una concentración de alginato de 1% p/v y con pH 9.

Las esferas fueron cortadas por la mitad y colocadas con el borde plano hacia arriba en un molde del mismo diámetro de la esfera, a fin de lograr un adecuado relieve horizontal y uniforme para la toma de las fotografías.

Se utilizó el microscopio para tomar las fotografías con una ampliación de 20X y luego se usó el programa "*Watershed transformation*" para transformar la imagen en una superficie de relieve, de esta manera zonas de mayor brillo se presentaron como relieves "altos", mientras que las de menor brillo como "bajos".

Los estudios de liberación de colorantes se hicieron por lectura UV-visible de los solventes que estuvieron en contacto con las esferas en los viales de liberación, mediante el uso de un espectrofotómetro SHIMADZU UV-2101PC. Se midió diariamente la liberación de los colorantes a las siguientes longitudes de onda: Rojo Congo a 504 nm y Beta Caroteno a 455 nm.

También se realizaron estudios de hinchamiento y de texturometría de las esferas combinadas (ESF♥AL) como medida de las propiedades de las mismas.

Para los estudios de hinchamiento, se colocó una masa de esferas de aproximadamente 200 mg en frascos de penicilina y se introdujo un volumen de 5 mL de agua destilada. Los viales se mantuvieron tapados y expuestos a temperatura ambiente.

Se analizaron muestras realizadas bajo diferentes variables de síntesis como concentración de alginato de 4% p/v y de 6% p/v, así también como a diferentes pHs de la concentración gelificante: 3, 6 y 9.

Diariamente las esferas fueron removidas del vial, secadas con papel de filtro y pesadas. Por medio de la siguiente ecuación (Ec. 4.1), se obtuvo el porcentaje de hinchamiento del correspondiente tratamiento.

$$\% \text{ Hinchamiento} = \frac{\text{Peso final} - \text{Peso inicial}}{\text{Peso inicial}} \times 100$$

Ecuación 4.1. Porcentaje de hinchamiento

Los estudios de texturometría se realizaron con un texturómetro Instron Universal Testing Machine (modelo 3342, Norwood, MA, USA) equipado con una celda de capacidad de 500 N. Se midió la capacidad de compresión (g/f) que podía sufrir cada esfera al deformarse un 50% de su volumen original. En este sentido se analizaron esferas sintetizadas bajo diferentes variables de síntesis como: relación molar de 1,5; 3,5 y 5,4, tiempo de curado de las esferas de 10 minutos y 21 horas y pH de la solución gelificante de 6 y 9.

Cada esfera era medida con un calibre a los fines de establecer la distancia que debía comprimir un cilindro móvil del equipo para producir una deformación del 50%. Ese valor era introducido en el programa de compresión de cada esfera a muestrear previamente a efectuar la medición correspondiente.

De esta manera, cada esfera analizada se colocó en un cilindro fijo del texturómetro, se colocó el cilindro móvil por encima de la misma y en esta situación se inició el programa de compresión. Se registró la capacidad de compresión sufrida por el material al deformarse 50% de su volumen original.

Tanto para los análisis de liberación de compuestos (colorantes y feromonales), como para los estudios de propiedades de los dispositivos (hinchamiento y texturometría) se realizaron muestras por triplicado y se evaluaron las diferencias significativas de los resultados mediante pruebas de Kruskal Wallis.

4.4 Metodología usada para la cuantificación o semicuantificación de compuestos liberados.

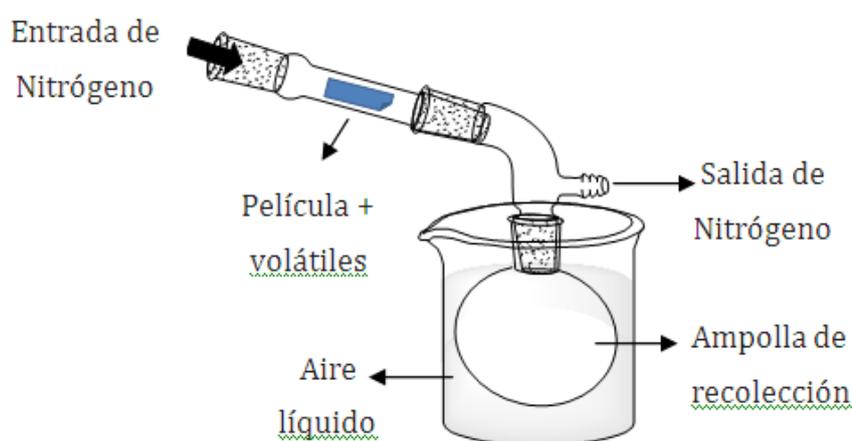
La liberación de los compuestos desde los diferentes dispositivos fue estudiada en solución y en estado gaseoso, ésta última es de mayor importancia ya que es en este estado como las feromonas se transportan hasta el individuo receptor.

4.4.1 Métodos de liberación

De acuerdo al dispositivo estudiado, se utilizaron diferentes técnicas para inducir la salida del compuesto de interés desde la matriz polimérica.

4.4.1.1 Venteo de Nitrógeno

Esta técnica fue de tipo cualitativa y se utilizó tanto en la película de quitosano como en los geles de alginato y de quitosano para la comprobación de la incorporación y posterior salida de sulcatol. El dispositivo fue colocado en un tubo de vidrio cuyos extremos esmerilados se conectaban, por un lado a una corriente de Nitrógeno, y por otro a una ampolla de recolección sumergida en aire líquido, y además había una salida de escape de Nitrógeno. Los volátiles liberados del dispositivo eran así capturados y recuperados por extracción con diclorometano (Esq. 4.1)



Esquema 4.1. Método de liberación: Venteo de Nitrógeno

4.4.1.2 Extracción por solvente

Se introdujeron en frascos de penicilina los dispositivos a analizar (los cuales actuaron en todos los casos analizados como viales de liberación). Luego se introdujo en el mismo una cantidad conocida de solvente de extracción y se dejó en contacto con el dispositivo por 24 horas. Diariamente el solvente de los viales fue extraído y utilizado para el análisis relativo de las concentraciones por cromatografía o UV para cada caso particular. El mismo volumen eliminado era reemplazado por el solvente puro a los fines de continuar diariamente la cinética de liberación de los compuestos. Los experimentos de extracción y reposición de solvente continuaron hasta que no se encontró señal de compuesto liberado por los métodos de detección utilizados para tal fin.

Esta técnica fue de tipo cuantitativa y se utilizó con el gel de quitosano y el gel de alginato para estudiar la liberación de sulcatol; con las esferas simples de

alginato y de quitosano se analizó la liberación de sulcatol, Rojo Congo y Beta Caroteno y por último, con las esferas combinadas de corazón de alginato se estudió la liberación de Beta Caroteno y sulcatol.

En la tabla 4.3 se detalla el procedimiento utilizado para cada dispositivo.

Tabla 4.3: Procedimiento de extracción de los compuestos activos desde diferentes dispositivos poliméricos.

Dispositivo	Peso dispositivo (mg)	Compuesto extraído	Solvente de extracción	Volumen de solvente de extracción (mL)
Gel quitosano	50	Sulcatol	etanol	5
Gel alginato	20	Sulcatol	etanol	5
Esferas quitosano	50	Sulcatol	etanol	5
Esferas quitosano	420	Rojo Congo	cloroformo	3
Esferas quitosano	420	Rojo Congo	tetrahidrofurano	3
Esferas quitosano	420	Rojo Congo	etanol	3
Esferas quitosano	420	Rojo Congo	agua destilada	3
Esferas quitosano	420	Rojo Congo	Buffer pH 2,5	3
Esferas quitosano	420	Rojo Congo	Buffer pH 7,4	3
Esferas quitosano	420	Rojo Congo	Buffer pH 12	3
Esferas quitosano	320	Beta Caroteno	cloroformo	3
Esferas quitosano	320	Beta Caroteno	tetrahidrofurano	3
Esferas quitosano	320	Beta Caroteno	etanol	3
Esferas alginato	50	Sulcatol	etanol	5
Esferas alginato	220	Rojo Congo	cloroformo	3
Esferas alginato	220	Rojo Congo	etanol	3
Esferas alginato	220	Rojo Congo	agua	3
Esferas alginato	220	Beta Caroteno	cloroformo	3
Esferas alginato	330	Beta Caroteno	tetrahidrofurano	3
Esferas alginato	300	Beta Caroteno	etanol	2
Esferas combinadas	470	Sulcatol	etanol	5
Esferas combinadas	250	Beta Caroteno	tetrahidrofurano	2

4.4.1.3 Microextracción en fase sólida (SPME)

Se colocó una masa específica de esferas combinadas o de película de quitosano en frascos de vidrio adecuados para la extracción de volátiles por SPME. Se utilizó una fibra de polidimetilsiloxano de 100 micrones (Supelco).

Para la película de quitosano se expuso la fibra por 30 minutos y para las esferas combinadas durante dos minutos. Luego se desorbió la fibra en el inyector de un cromatógrafo acoplado a un espectrómetro de masas Shimadzu 14B durante 1 minuto.

Se estudió con esta técnica la liberación de sulcatol, sulcatona y 3-pentanol desde las esferas combinadas corazón de alginato y de sulcatol desde la película de quitosano.

En el caso de las esferas combinadas, se prepararon para cada compuesto muestras por triplicado.

4.4.2 Métodos de detección

4.4.2.1 Cromatografía en placa delgada

Se utilizó esta técnica de detección para los volátiles extraídos por medio de venteo de Nitrógeno. El diclorometano utilizado para extraer los volátiles de la ampolla fue sembrado junto al testigo en una placa cromatográfica correspondiente.

El mismo grado de afinidad por la fase móvil entre la siembra de un testigo de sulcatol, frente a la siembra de lo colectado en la ampolla, fue indicativo de la presencia de compuesto de interés en el dispositivo estudiado.

4.4.2.2 Cromatografía gaseosa-Espectrometría de masas

Esta técnica de detección fue utilizada cuando se estudió la liberación de volátiles de sulcatol desde la película de quitosano por medio de la técnica de liberación de SPME.

Se utilizó el siguiente programa de temperatura para la obtención de los cromatogramas correspondientes: Inyector: 120 °C, Detector: 200 °C. Y el siguiente programa de temperatura para la columna: Temperatura inicial: 40 °C, tiempo inicial: 6 minutos, rampa de temperatura: 20 grados por minuto, temperatura final:

280 °C durante 20 minutos. Se utilizó una columna no polar UF-5ms (5% fenil-95% dimetilpolisiloxano)

4.4.2.3 Cromatografía gaseosa

Esta técnica fue utilizada para analizar la cantidad de sulcatol liberado desde las esferas simples de alginato y de quitosano y desde las esferas combinadas de corazón de alginato.

El solvente extraído diariamente de los viales de liberación, fue analizado por cromatografía gaseosa. Se inyectó 1 μ L del mismo en el cromatógrafo y se utilizó el siguiente programa de temperatura para la obtención de los cromatogramas correspondientes: inyector: 120 °C, detector: 200 °C., un programa de calentamiento para la columna con una temperatura inicial de 90 °C y tiempo inicial de 3 minutos; la rampa de temperatura fue de 15 grados por minuto, con una temperatura final de 200 °C y tiempo final de esa temperatura de 40 minutos. Se utilizó una columna β DEX-120.

Se determinó la concentración de sulcatol liberado diariamente por medio de curvas de calibración elaboradas para tal fin.

Las medidas fueron tomadas hasta que no se detectó la señal correspondiente por un período de dos días.

Esta técnica de detección fue utilizada para analizar la liberación de los colorantes Rojo Congo desde las esferas simples de quitosano y de alginato y Beta Caroteno desde las esferas simples y desde las esferas combinadas.

4.4.3 Métodos de cuantificación

4.4.3.1 Curvas de calibración

Los compuestos liberados de los dispositivos gel, esferas simples y esferas combinadas corazón alginato, que fueron captados por solventes determinados fueron cuantificados por medio de curvas de calibración elaboradas para tal fin. En el caso de los colorantes la medida se realizó por UV-visible y en el caso de los compuestos feromonales por cromatografía gaseosa.

En este sentido, fueron preparadas soluciones de diferentes concentraciones de sulcatol y de Rojo Congo en etanol (Fig. 4.1 y 4.2) y soluciones de Beta Caroteno en tetrahidrofurano (Fig. 4.3)

Además se realizaron las curvas de calibración para sulcatol, sulcatona y 3-pentanol en diclorometano (Fig. 4.4, 4.5 y 4.6).

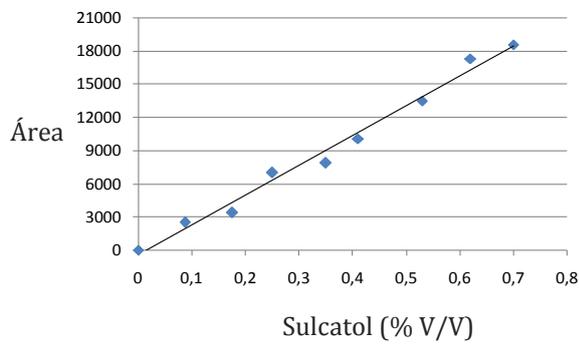


Fig. 4.1: Curva de calibración de Sulcatol en etanol

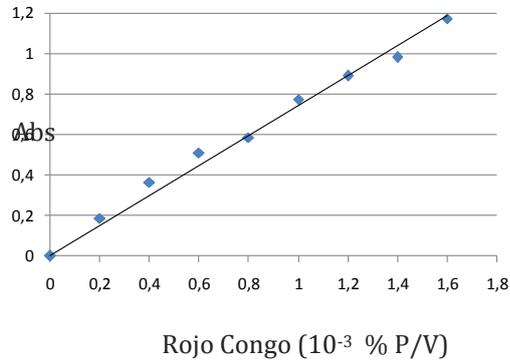


Fig. 4.2: Curva de calibración de Rojo Congo en etanol a 504 nm

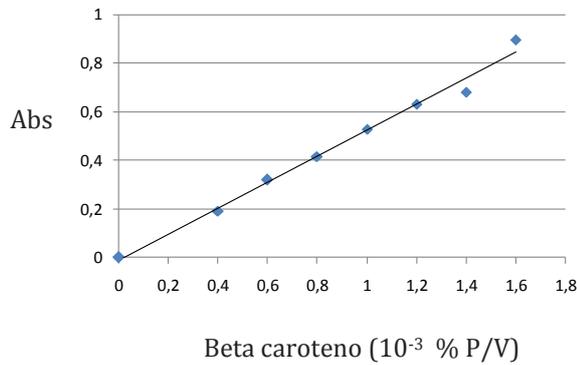


Fig. 4.3: Curva de calibración de Beta Caroteno en tetrahidrofurano a 455 nm

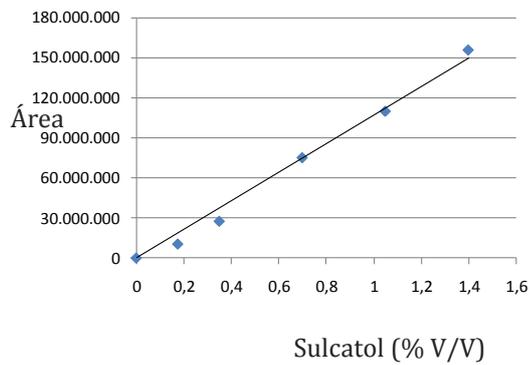


Fig. 4.4: Curva de calibración de Sulcatol en diclorometano

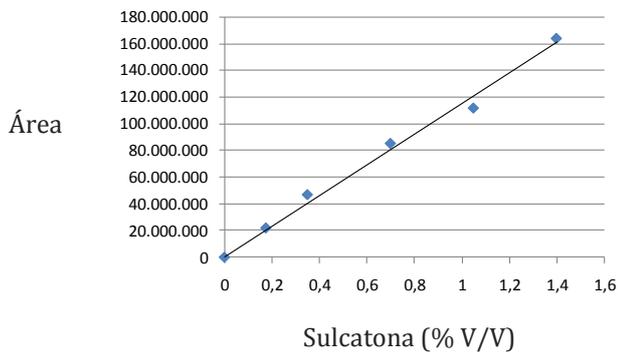


Fig. 4.5: Curva de calibración de Sulcatona en diclorometano

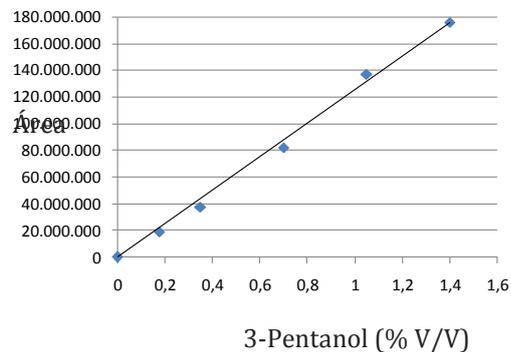


Fig. 4.6: Curva de calibración de 3-Pentanol en diclorometano

4.4.4 Método de semicuantificación

Se colocó 500 mg de esferas combinadas corazón alginato que contenían sulcatol, sulcatona o 3-pentanol en recipientes de vidrios individuales y adecuados para la extracción por SPME. Cada frasco contenía esferas con un compuesto en particular.

Diariamente se expuso la fibra de polidimetilsiloxano a los volátiles capturados en el recipiente correspondiente por un período de dos minutos, luego se inyectó la fibra en un cromatógrafo de gases. Así una vez tomada la medición, el vial con las esferas fue abierto, limpiado con una corriente de Nitrógeno por dos minutos y cerrado nuevamente para la toma de muestras del día siguiente.

Se hicieron las mediciones de volátiles hasta que se no se observó señal alguna en las corridas cromatográficas.

Se utilizó el siguiente programa de temperatura para la obtención de los cromatogramas correspondientes: inyector a 120 °C, detector a 200 °C: un programa de calentamiento para la columna con una temperatura inicial de 60 °C, un tiempo inicial de 3 minutos, una rampa de temperatura de 10 grados por minuto, temperatura final de 120 °C y tiempo final de esa temperatura de 20 minutos. Se utilizó una columna β DEX 120.

Luego, las esferas fueron colocadas en respectivos viales de liberación con 3 mL de diclorometano a los fines de extraer la cantidad de compuesto que no fue liberado en estado gaseoso.

Se cuantificó la misma por medio de curvas de calibración elaboradas para tal fin, de esta manera el cálculo de la concentración permitió conocer el volumen correspondiente a cada extracción en estado líquido.

Así, se restó al volumen inicial del compuesto que se colocó en la solución de alginato, los volúmenes de los compuestos de interés encontrados tanto en las soluciones de síntesis (solución de CaCl₂ 2% p/v y de 1 % p/v, solución de quitosano y agua de lavados), como los encontrados en los experimentos de liberación en estado líquido que se hicieron una vez que las esferas no liberaron más compuesto en estado gaseoso. El cálculo de

El resultado de esa diferencia fue considerado como la cantidad de compuesto que fue efectivamente liberado como volátil. A posterior, se sumaron

las áreas cromatográficas obtenidas por SPME y se asoció este valor con el volumen total liberado en estado gaseoso.

De esta manera se propuso un volumen liberado correspondiente, a cada área cromatográfica particular encontrada en los días de experimentación (Esq. 4.2)

$$\text{Volumen liberado como volátil} = \text{Volumen total incorporado en la síntesis de las esferas} - \left(\text{Volumen encontrado en soluciones de síntesis} + \text{Volumen liberado en estado líquido post experimentos SPME} \right)$$

Esquema 4.2: Fórmulas utilizadas en la cuantificación de los volátiles detectados por SPME

4.5 Bioensayos. Ecología química.

Los estudios de ecología química que se detallan en esta sección proponen la vinculación interdisciplinaria buscada desde el comienzo de la presente tesis doctoral.

4.5.1 Colecta de individuos de *Megaplatypus mutatus*

La búsqueda y recolección de insectos se realizó durante la segunda quincena del mes de marzo de 2013 en la plantación de álamos denominada San José, perteneciente a los aserraderos Euskadi. Dicho campo forestado se encuentra en la localidad de Morse, partido de Junín, provincia de Buenos Aires (34° 43' 56.3'' S, 60° 51' 11.5'' O), a 59 msnm.

Al comienzo del muestreo se colocaron trampas de emergencia (o trampas colectoras) en los lotes que presentaban una alta infestación por parte del insecto. Las trampas fueron colocadas en los lugares del árbol que indicaban una próxima salida de adultos (Fig. 4.8, 4.9 y 4.10). La misma puede ser anticipada por la presencia de actividad larval, demostrada por el característico aserrín de este estadio o por la chorreadura característica que presenta el árbol debido a la perforación sufrida en el mismo.

Así, en los lotes infestados, quedaron debidamente marcados e individualizados los lugares de ataque por *M. mutatus*.

Diariamente, se recorrieron los lotes correspondientes y se procedió a la examinación de las trampas colectoras; si bien las mismas funcionaron como tales,

también se encontraron nuevos ataques en árboles en los días sucesivos a la colocación de las trampas y fue posible encontrar individuos adultos iniciando nuevas galerías (Fig. 4.11). Dichos insectos fueron apartados del árbol con pinzas y colectados también para los experimentos posteriores.

Los insectos recolectados fueron mantenidos en cápsulas de Petri con algodón que contenía agua para proveer una humedad apropiada para evitar su desecación.



Figura 4.8: Plantaciones de álamos (*Populus deltoides*). Ataque de *M. mutatus*



Figura 4.9: Trampa colectora ubicada en árbol atacado



Figura 4.10: Adulto de *M. mutatus* en trampa colectora



Figura 4.11: Adulto de *M. mutatus* en cono llamador

4.5.2 El uso de olfatómetro en ensayos comportamentales de elección

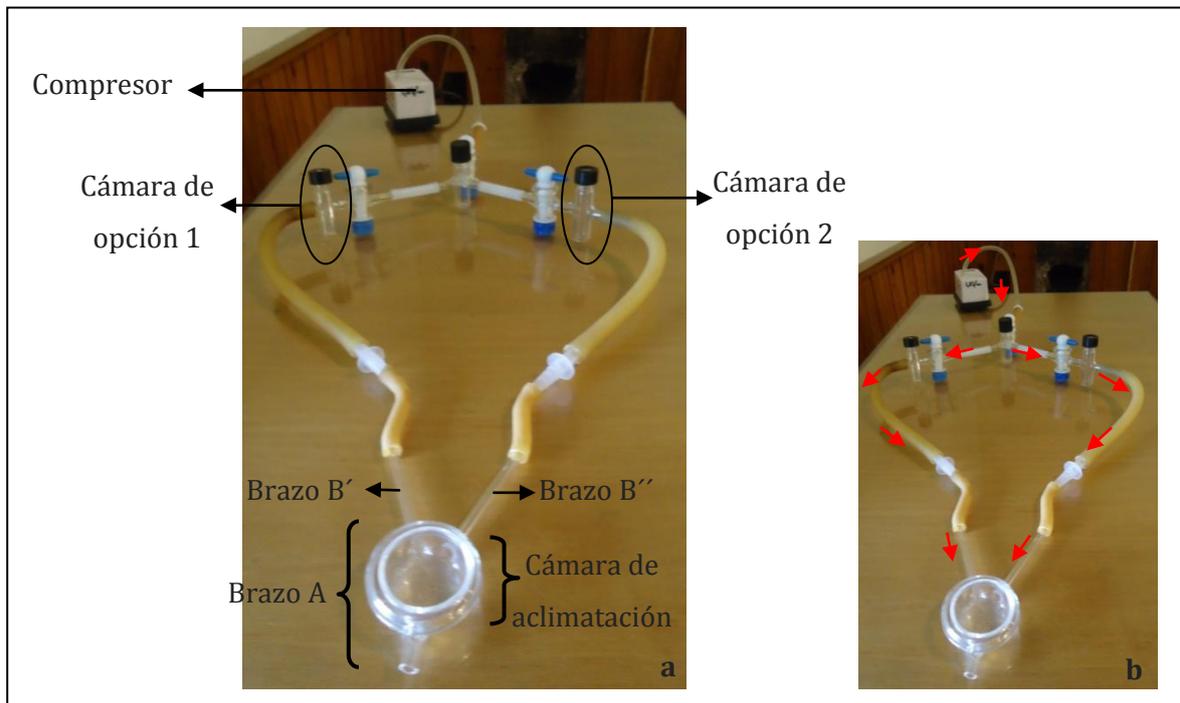
El olfatómetro es un equipo utilizado en ecología química que permite estudiar la elección de un insecto frente a estímulos químicos que se pretenden investigar. El equipo consiste en un tubo de vidrio pyrex en forma de "Y". Se denominó A al brazo impar y primario de la Y, y B' y B'' a los brazos pares y secundarios de la misma (Esq. 4.3).

El diámetro interno de los brazos del olfatómetro fue de 4 mm, similar al diámetro de una galería natural, de manera que el insecto pudiera caminar con facilidad contra la corriente que circulara en el tubo.

Los extremos de los brazos B se conectaron por medio de mangueras a las correspondientes cámaras de opción. Una de las cámaras contenía las esferas a analizar (con alguno de los componentes del *blend* feromonal incorporado en la misma) y la otra cámara funcionó como un control ya que dentro de la misma se colocaron esferas denominadas blanco, sin feromonas.

Las cámaras de opción se encontraban a su vez, conectadas a un compresor que impulsaba aire de manera constante, produciendo un flujo de corriente uniforme hacia la cámara de aclimatación ubicada en el brazo A del olfatómetro. La corriente de aire fue de 15 mL/min.

Los ensayos en el olfatómetro se realizaron entre las 12 y las 16 horas del día y tanto la luz como la temperatura se mantuvieron constantes en los días de experimentación.



Esquema 4.3: Olfatómetro utilizado en los experimentos de atracción. a) Partes del equipo b) Diagrama del flujo de aire dentro del olfatómetro: Las flechas rojas señalan la dirección del mismo.

La determinación de efecto atrayente se realizó con las esferas combinadas de tipo $3,5ESF \heartsuit AL 4\%_{10min-pH9}$. Al inicio de cada experimento se enjuagó el olfatómetro con alcohol etílico a fin de eliminar posibles volátiles de ensayos previos. Se dejó secar y se procedió a la experimentación correspondiente.

Se introdujeron de a una por vez, hembras de *M. mutatus* en la cámara de aclimatación y se dejaron aclimatar por tres minutos dentro de la misma. A continuación se encendió la corriente de aire.

Los insectos eligieron alguna de las dos ramas de elección entre los siete y los veinte minutos de exposición a la corriente de aire.

Se evaluó la capacidad de atracción de los diferentes compuestos del *blend* feromonal por separado. Se realizaron 10 réplicas para esferas con sulcatol, 9 para esferas con sulcatona y 8 para esferas con 3-pentanol. Es importante destacar que las esferas que contenían los volátiles de interés fueron colocadas alternadamente en una u otra cámara de opción para evitar efectos de asimetría en los brazos del olfatómetro. Los resultados de elección del olfatómetro fueron analizados estadísticamente por medio del programa Infostat. Se realizaron los test de Normalidad pertinentes y luego el análisis de Chi-Cuadrado para determinar si había diferencias significativas entre las hembras que habían elegido uno u otro brazo del olfatómetro.

4.6 Bibliografía

- Agnihotri S.A., Mallikajuna N.N. Aminabhavi T.M. 2004. Recent advances on Chitosan based micro and nanoparticles in drug delivery. *Journal of Control Release* 100: 5-28.
- Aldana A.A., González A. Strumia M.C. and Martinelli M. 2012. Preparation and characterization of Chitosan/genipin/poly (N-vinyl-2-pyrrolidone) films for controlled release drugs. *Materials Chemistry and Physics* 134:317-324.
- Mi F., Sung H. and Shyu S. 2002. Drug release form Chitosan-alginate complex beads reinforced by a naturally occurring cross-linking agent. *Carbohydrate Polymers* 48: 61-72.
- Peniche C., Howland I., Carrillo O., Zaldívar C. and Argüelles-Monal W. 2004. Formation and stability of shark liver oil loaded chitosan/calcium alginate capsules. *Food Hydrocolloids* 18:865-871

- Rosales-Oballos Y., Raybaudi-Massilia R., Mosqueda-Melgar J., Tapia D., Tome-Boschian E. 2012. Propiedades mecánicas, de barrera y antimicrobianas de películas de quitosano y de alginato de sodio con aceites esenciales y nisina. Revista de la Facultad de Farmacia de Mérida. Universidad de Los Andes. 54(2):7-16.
- Yosha I., Shani A. and Magdassi S. 2008. Slow release of pheromones to the atmosphere from gelatin/alginate beads. Journal of Agricultural and Food Chemistry 56 (17):8045-8049.

Capítulo 5. Resultados

Preparación, caracterización y liberación de compuestos desde dispositivos poliméricos

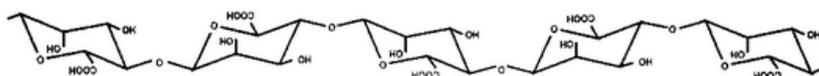
5.1 Introducción

La liberación de compuestos de acción determinada en un sitio de interés requiere la salida del compuesto desde el dispositivo elegido de manera controlada y sostenida en el tiempo, intentando lograr una adecuada concentración del mismo en el sitio de acción. En el diseño de dispositivos se busca un alto porcentaje de droga incorporada, baja concentración de droga residual, una aplicación rápida y sencilla, así como economía en el proceso de elaboración.

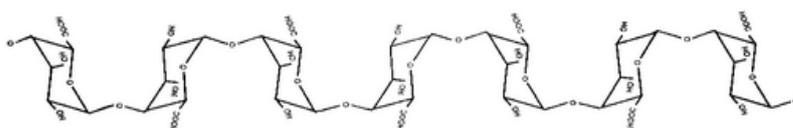
La elección de los polímeros para realizar tales dispositivos es fundamental ya que de acuerdo a las propiedades buscadas se puede seleccionar el tipo y naturaleza de polímeros. Asimismo, ya sea que el sitio de acción de los compuestos liberados sea el interior de un organismo vivo o el espacio abierto de un sitio con determinado inconveniente a abordar, es importante en términos de eliminación del polímero que los dispositivos de liberación sean biodegradables. En este sentido, se trabajó con el alginato y el quitosano ya que es conocida la capacidad de ambos polímeros en la formación de diversos sistemas de liberación controlada (Chang *et al.* 2003, Vasiliu *et al.* 2005, Chen *et al.* 2007, Mladenovska K. *et al.* 2007; Coppi G. *et al.* 2009., Jadhav *et al.* 2011, Heuskin *et al.* 2010, de Oliveira *et al.* 2014).

El alginato es un polisacárido aniónico, no tóxico y biodegradable que se extrae de las algas pardas comunes (Feófitas). El alginato de sodio está compuesto por unidades de ácido gulurónico (G) y unidades de ácido manurónico (M) en proporciones variables. Así, es posible encontrar tanto regiones homopoliméricas compuestas por bloques M (MM), como por bloques G (GG), y regiones heteropoliméricas formadas por ambas unidades (MG). Estos bloques adoptan configuraciones espaciales distintas de acuerdo a los diferentes enlaces

glucosídicos entre los carbonos C-1 y C-4 de las unidades monoméricas. Las cadenas de bloques M corresponden a cadenas lineales (Esq. 5.1), mientras que los bloques G presentan una estructura en forma de bucle (Esq. 5.2).

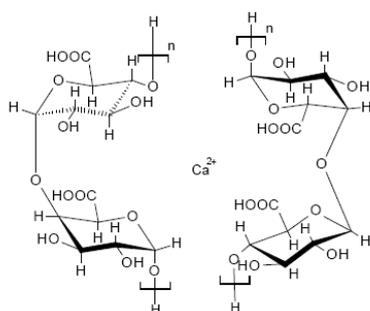


Esquema 5.1. Bloques MM de la molécula de alginato.



Esquema 5.2: Bloques GG de la molécula de alginato.

Cuando dos cadenas de bloques G se alinean lado a lado se forma un espacio en forma de diamante, el cual tiene la dimensión ideal para acomodar en su interior un ión calcio, formándose una estructura dimérica entre los iones calcio y las cadenas del polímero en forma de bucle. Este modelo fue propuesto por Grant en 1973 y es conocido como “modelo de caja de huevos” (*egg-box model*) para explicar las propiedades gelificantes de los alginatos al reaccionar con sales cálcicas. La estructura tridimensional de las cadenas ricas en ácidos gulurónicos genera distancias entre los grupos carboxilos e hidroxilos que permiten un alto grado de coordinación de iones calcio (Esq. 5.3).



Esquema 5.3: “Egg box model”. Conformación que adopta el ácido gulurónico del alginato frente a iones Calcio.

Este tipo de reacción es conocida como gelificación iónica (Vorlop y Klein, 1981) y explica la forma de interacción que se produce al poner en contacto una emulsión o solución polímero-fármaco, frente a los contra-iones elegidos de forma de hacer precipitar el polímero.

En el caso que la dispersión de un polímero contenga un compuesto determinado de interés a encapsular, el contacto de ésta con la solución gelificante permitirá el secuestro de tal compuesto dentro de la matriz polimérica.

La sensibilidad del sistema frente a variables de síntesis como el peso molecular del alginato, la concentración del polímero o de la solución de CaCl_2 y el pH de la solución gelificante, permiten la modificación de esas variables para obtener la cinética de liberación requerida.

Asimismo, tanto las propiedades mecánicas como la porosidad del sistema logrado, pueden mejorarse por la formación de un complejo polianión-policación. En este caso, y por un mecanismo electrostático se produce una neutralización de cargas e interacciones de diferentes tipo (puente hidrógeno, fuerzas de van der Waals, etc) que inducen a una atracción entre segmentos separados de los polielectrolitos.

Por otro lado, el quitosano es un polisacárido lineal y está compuesto por cadenas distribuidas aleatoriamente de β - (1-4) D-glucosamina (unidades desacetiladas) y N-acetil-D-glucosamina (unidades acetiladas). Se obtiene por desacetilación de la quitina, el segundo polímero más abundante luego de la celulosa (Ga°serød *et al.* 1999).

Se eligió el quitosano como polímero de interacción con el alginato ya que es un polímero natural, posee una amplia variedad de aplicaciones debido a su biocompatibilidad, biodegradabilidad y es conocido su uso como transportador en diferentes dispositivos de liberación de controlada, siendo uno de los materiales más estudiados en cuanto a su capacidad en la liberación. Además, posee características filmogénicas, no es tóxico y es fisiológicamente inactivo (Krajewska *et al.* 2004; Odaci *etal.* 2008; Qian *et al.* 2006).

En contraste con todos los polímeros biodegradables de origen natural más conocidos hasta el momento en la administración de fármacos, el quitosano es el único que posee carga positiva. Esta característica está dada por sus grupos amino

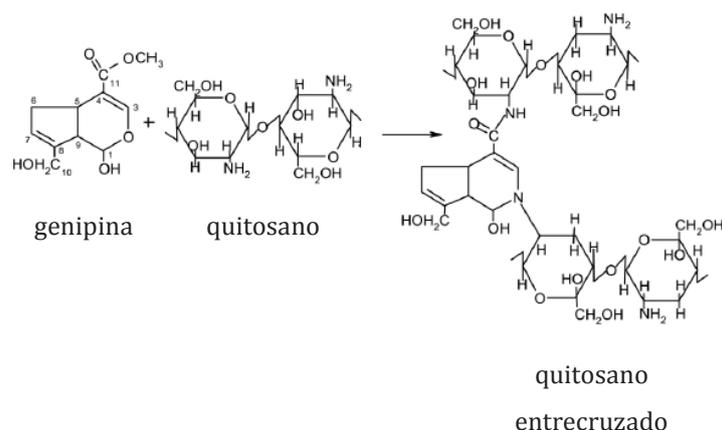
y esta carga es la responsable de muchas de las propiedades finales de los sistemas elaborados con dicho polímero (Bernkop-Schnürch et al. 2012).

La principal interacción que lleva a la formación un complejo polielectrolítico entre el alginato y el quitosano es la atracción electrostática entre los grupos amino catiónicos del quitosano y los grupos carboxilos aniónicos del alginato. Esta interacción es dependiente del pH y puede mejorar por ejemplo la capacidad de retención/liberación de determinado compuesto que se encuentre en el interior de la matriz de liberación.

Por otro lado, los polímeros en general se encuentran sometidos a diferentes estados de carga en sus distintas aplicaciones, por lo que la selección del material adecuado para cada una de ellas se basa entre otras consideraciones en sus propiedades mecánicas. En nuestro caso la liberación de compuestos desde dispositivos poliméricos podría tener una estrecha relación con las propiedades mecánicas de los mismos y es por este motivo que fueron especialmente tenidas en cuenta al momento de analizar la elección del polímero y por ende, el comportamiento final del dispositivo desarrollado.

Las propiedades mecánicas dependen fundamentalmente de la composición y estructura de los polímeros y así como la mayoría de los polímeros sintéticos poseen buenas propiedades mecánicas, los polímeros de origen natural como los utilizados en este trabajo no las tienen.

No obstante, una forma de mejorar tales propiedades es por la unión de polímeros de distinta carga (como se describió previamente), o por el uso de entrecruzantes. En este sentido y en el caso del quitosano se utilizó la genipina que es un entrecruzante de origen natural y no tóxico, obtenido del genipósido que se extrae de los frutos de *Gardenia jasminoides Ellis* (Esq. 5.4). Este compuesto reacciona con los grupos amino del quitosano, formando redes entrecruzadas (Fujikawa et al. 1987).



Esquema 5.4: Reacción entre el quitosano y la genipina

Se cree que el proceso de entrecruzamiento de la genipina con el quitosano comienza con el ataque nucleofílico del grupo amino al carbono oleofínico (C3) del anillo que contiene el oxígeno, seguido por la apertura del anillo de hidropirano y el ataque del amino secundario sobre el aldehído del intermediano. Posteriormente, el grupo carboximetil de la genipina reacciona con otro grupo amino del quitosano y conduce a la formación de una amida secundaria.

En este capítulo, se presenta el estudio sobre el diseño, caracterización y liberación de compuestos desde diferentes dispositivos realizados con alginato y/o quitosano. La presentación de los resultados obtenidos se expone de manera secuencial y de complejidad creciente en el sistema a diseñar, ya que el objetivo que guió esta parte de la tesis doctoral fue la búsqueda del dispositivo polimérico que cumpliera con los requisitos de:

- Diseño de un sistema ecológico
- Alta proporción de compuesto incorporado
- Baja concentración residual
- Liberación de manera lenta y sostenida
- Rápida y simple aplicación
- Economía en el proceso de elaboración.

Para cumplir con estos objetivos, en una primera etapa de estudio se prepararon sistemas con los polímeros seleccionados (alginato y quitosano) en forma individual y se estudiaron dos vías diferentes, seca (películas) y húmeda (geles). De esta forma, se conocerá la interacción de la droga a incorporar en cada uno de los sistemas y la afinidad de la misma con cada uno de los polímeros. Sin lugar a dudas, esto repercute directamente en los resultados a obtener en la liberación del compuesto.

Para tal fin se prepararon películas, geles y esferas de quitosano y alginato separadamente, y en una segunda etapa se prepararon esferas combinadas. Así se presentan a continuación los resultados obtenidos con películas, geles, esferas simples y esferas combinadas utilizadas como dispositivos de liberación de diversos compuestos de interés.

5.2 Dispositivos de liberación

5.2.1 Películas

El uso de películas como sistema de liberación de fármacos cobró importancia en los últimos años ya que a partir de este tipo de dispositivos se pueden alcanzar adecuadas concentraciones del compuesto liberado, son de rápida preparación y fácil aplicación. Estas ventajas las convierten en dispositivos ideales para liberaciones tópicas y su uso también es conocido para liberaciones en aire (Fuisz *et al.* 2004).

La efectividad de las películas está determinada por la tasa de liberación de los compuestos ya sea a alimentos (en el caso de envases activos), afecciones de tipo sanitarias o liberaciones en estado gaseoso. Las condiciones experimentales de síntesis influyen en la estructura final de la película y en su comportamiento. Dentro de ellas, las propiedades mecánicas otorgadas por el polímero y por entrecruzantes, emulsificantes o polímeros de carga opuesta, así como los procesos de secado, son los factores críticos. Otro factor importante es el área o superficie expuesta en función de la cantidad y velocidad de liberación.

La retención durante el proceso de secado está afectada por la naturaleza de la matriz, la concentración y naturaleza de los volátiles a incorporar y por las

condiciones experimentales (tasa de secado, espesor de la muestra y humedad (Flink and Labuza, 1972).

Por su parte, tanto el quitosano como el alginato son polímeros que poseen excelentes propiedades filmogénicas y buenas capacidades de retención de variados compuestos (Sezer *et al.* 2007, Bhatnager *et al.* 2009, Devanga-Chinta *et al.* 2010, Efentakis *et al.* 2011, Guo *et al.* 2011, Kurek *et al.* 2012; Rosales-Oballos *et al.* 2012). Fue por tales motivos que se eligieron tales polímeros para la realización los primeros dispositivos de liberación estudiados, cuyos resultados se presentan a continuación.

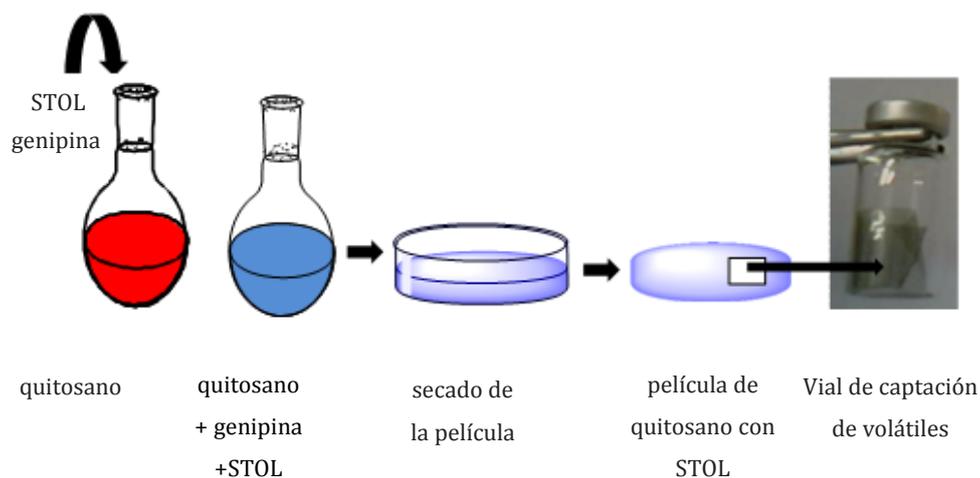
5.2.I.1 Preparación de películas de alginato

Se preparó una solución de alginato al 2% p/v en agua destilada a 70°C, luego fue mezclada con 1% v/v de glicerol a 600 rpm por cinco minutos y desgasificada bajo vacío. Se incorporó sulcatol al 60% p/p con respecto al polímero hasta obtener una solución homogénea. Luego tal solución se traspasó a cápsulas de Petri y fueron secadas a temperatura ambiente por 24 horas.

Las películas de alginato no resultaron estables cuando se le incorporó sulcatol. La presencia de este compuesto actuó como plastificante del polímero por lo que resultaron dispositivos muy flexibles con baja estabilidad de forma y por lo tanto se deshicieron una vez secos.

5.2.I.2 Preparación de películas de quitosano

Las películas de quitosano se realizaron por la técnica de *casting*. Para tal fin, se preparó una solución de quitosano al 1,5 % p/v en ácido acético 1,5 % v/v y se dejó en agitación durante 24 horas, obteniéndose una solución viscosa. Luego se incorporó sulcatol al 60% p/p con respecto a quitosano y una solución de genipina disuelta en agua destilada al 0,1% p/p en relación al polímero. Se dejó en agitación durante 1 hora, hasta lograr una solución homogénea y se traspasó a cápsulas de Petri. Las mismas se taparon con un papel poroso y se dejaron secar por 24 horas, una vez que las películas estuvieron secas, se despegaron de las cápsulas y se procedió a realizar los experimentos de liberación.



Esquema 5.5: Obtención de películas de quitosano y disposición del mismo en vial de liberación para el análisis de SPME.

5.2.1.2.2 Caracterización

La composición química de las películas sintetizadas fue analizada mediante espectroscopía FT-IR. La figura 5.1 muestra los espectros de la película entrecruzada (a), y el de la genipina (b). Las bandas más importantes de la genipina son las de 1680 cm^{-1} que se asigna a la vibración del grupo carboximetilo y una aguda banda intensa a 1104 cm^{-1} que corresponde al enlace C-O-C. Además se puede observar el estiramiento O-H a los 3416 cm^{-1} . Al analizar el espectro de las películas (Fig. 5.1 a), se puede observar la desaparición de la banda a los 1680 cm^{-1} y la aparición a los 1646 cm^{-1} de la banda correspondiente al estiramiento del doble enlace C=O de la unión amida. Esta nueva banda confirma el entrecruzamiento entre los grupos carbonilo de la genipina con los grupos amino del quitosano. También se observa en el espectro de la película el estiramiento del enlace C-O antisimétrico a los 1080 cm^{-1} y el estiramiento a los 3400 cm^{-1} correspondiente al enlace O-H.

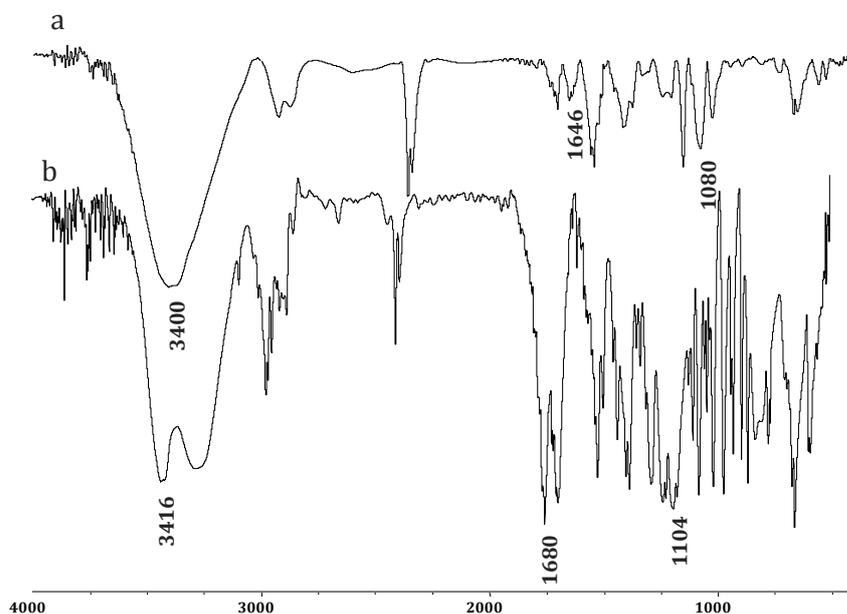


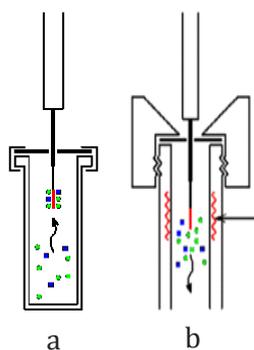
Figura 5.1: Espectros FT-IR. a) Película de quitosano entrecruzada
b) genipina.

5.2.I.2.3 Estudios de liberación

Para estos estudios, se colocó una porción de la película de 2 cm², en un vial apto para la captación de volátiles por SPME (Esq. 5.5).

El análisis de la liberación de STOL se realizó por la técnica de Microextracción en Fase Sólida (SPME). Para esto se introdujo una fibra de polidimetilsiloxano en el vial de liberación y la misma se mantuvo en contacto con los posibles volátiles liberados de la película, por un período de 30 minutos, transcurrido ese tiempo los volátiles fueron desorbidos en un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrofotómetro de masas.

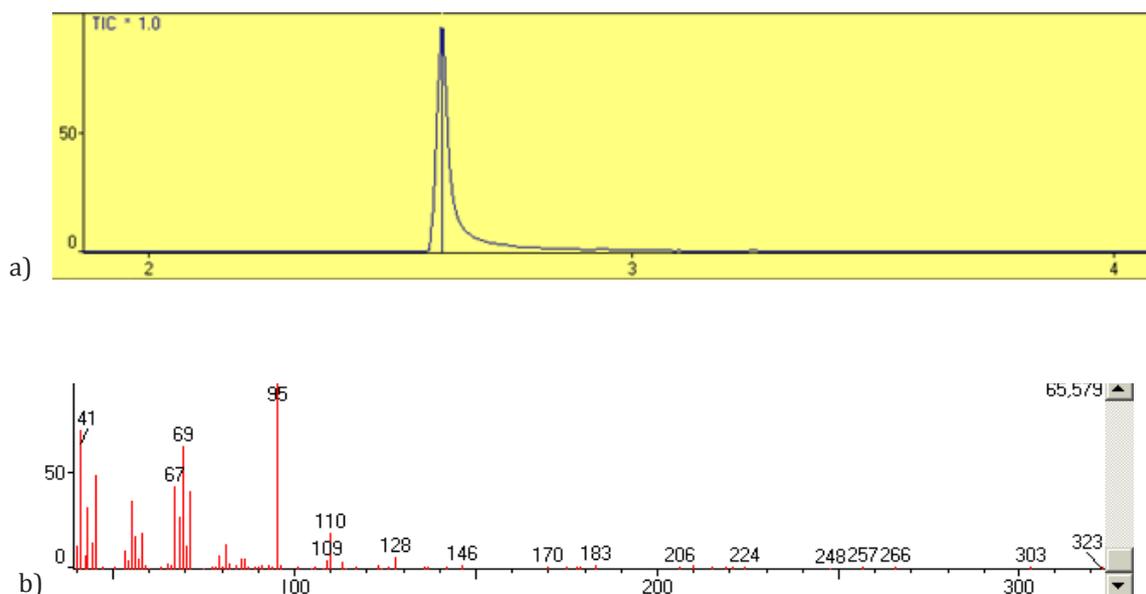
Esta técnica de detección utilizada se basa en dos procesos: Por un lado en la adsorción del volátil en la fibra elegida y en segunda instancia en la desorción del compuesto en un cromatógrafo de gases (Esq. 5.6). La ventaja que otorga este tipo de análisis es que permite la independencia de solventes para la captación del compuesto de interés.



Esquema 5.6: Procesos involucrados en la microextracción en fase sólida. a) adsorción de volátiles en fibra, b) desorción de volátiles en cromatógrafo de gases.

El cromatógrafo de gases utilizado se encontraba acoplado a un espectrofotómetro de masas y fue posible la identificación del compuesto liberado por su EM (Esq. 5.7).

Este tipo de análisis fue de tipo cualitativo y se utilizó para conocer el proceso de liberación de la droga, para adquirir práctica en la analítica de liberación y para conocer la capacidad del quitosano de retener el compuesto de interés. De esta manera, se comprobó liberación de STOL hasta día 13 de la experiencia. Si bien los polisacáridos en general son conocidos por su retención de volátiles debido a interacciones moleculares con moléculas específicas o por un aumento en la viscosidad de la matriz (Guichard *et al.* 2002); en este caso en particular la presencia de genipina permitió la formación de un retículo entrecruzado con características necesarias para una correcta formación de la película y de esta manera lograr una adecuada relación retención/liberación de STOL.



Esquema 5.7: a) Cromatograma correspondiente a STOL obtenido a partir de los volátiles de la película de quitosano. b) EM de STOL.

Los estudios de caracterización y de liberación de STOL mostraron que el quitosano efectivamente reaccionó con la genipina, formando redes entrecruzadas y permitiendo la retención y posterior liberación del compuesto de interés por un período de tiempo adecuado. Si bien estos sistemas “secos” tipo películas son prácticos en su colocación, es conocido que la liberación del compuesto es dependiente de la humedad ambiente, la cual condiciona la difusión de la droga a través de la película. Otro factor importante a tener en cuenta son las propiedades de las películas (espesor, estabilidad, propiedades mecánicas) y su relación área expuesta versus velocidad de liberación, ya que en cuando se necesitan dosis elevadas de liberación en tiempos largos, se deben usar películas con un alto valor de área expuesta.

5.2.II Geles

Un hidrogel es una red tridimensional conformada de cadenas flexibles de polímeros que absorben cantidades considerables de agua (Hamidi *et al.* 2008). Estos polímeros son hidrófilos, blandos, elásticos e insolubles en agua además que se hinchan en presencia de ella, aumentando apreciablemente su volumen mientras mantienen la forma hasta alcanzar el equilibrio físico químico (Katime *et*

al. 2004). Adicionalmente pueden tener gran resistencia mecánica según el método con el que se obtengan.

Los geles se pueden clasificar en dos tipos, en función de la naturaleza de las uniones de la red tridimensional que los constituyen: Los geles físicos presentan una red tridimensional formada por uniones que no son completamente estables, sino que están asociadas a una reacción de enlace-no enlace, que se puede dar en los dos sentidos. Generalmente, las uniones son del tipo de van der Waals, muchos más débiles que las uniones de tipo covalentes (DeGennes 1979). Por otro lado están los geles químicos, que son aquellos en los que la red está formada a través de enlaces covalentes. Este tipo de enlace es muy fuerte y su ruptura conduce a la degradación del gel. Por este motivo, los geles químicos no son reversibles con la temperatura, es decir una vez rotos los enlaces, no se pueden volver a formar. Este tipo de enlaces da lugar a un proceso de gelificación fuerte. En el caso de los geles químicos, el entramado molecular está fijado por los nudos covalentes de la malla, en los geles físicos existe un entramado de origen físico (no permanente) puesto que las cadenas se interpenetran unas con otras en una red tridimensional que puede albergar y retener moléculas de líquido. Por lo que respecta al hinchamiento, la diferencia fundamental entre geles de origen químico o físico reside en que, en los primeros, la entrada de líquido no puede separar las cadenas por estar covalentemente unidas mientras que en los segundos, la entrada de líquido puede desenredar las cadenas, separándolas, debido a que las fuerzas que las mantienen unidas son de origen físico. La estructura entrecruzada es indisoluble mientras que las de origen físico pueden disolverse en determinadas condiciones. La entrada de líquido en el interior de un gel químico alcanza un límite o grado máximo de hinchamiento, ya que la estructura covalente no puede deformarse indefinidamente (Saez *et al.* 2003).

La conformación tridimensional en los geles ocurre en soluciones acuosas concentradas, cuando el polímero inicial es capaz de gelificar con la consecuente formación de redes espaciales covalentes o no covalentes. El carácter hidrófilo se debe a la presencia de grupos funcionales hidrófilos como son: OH, COOH, CONH entre otros (Escobar *et al.* 2003). En la aplicación como liberadores de medicamentos los hidrogeles han sido ampliamente usados como portadores

inteligentes de sustancias activas y sus características físico-químicas y grado de entrecruzamiento definen propiedades tales como la capacidad de hinchamiento, cinética de liberación, respuesta al ambiente o biodegradabilidad (Peppas *et al.* 2000). Estas variables son herramientas fundamentales que han sido usadas por la química, la biología y la ingeniería en aras de lograr su optimización en diferentes aplicaciones.

La cinética de liberación de un fármaco, incluida la velocidad de difusión, depende de las propiedades físicas del mismo, especialmente de su peso molecular y de su solubilidad en agua y en el hidrogel, además del área superficial, la geometría y la densidad de la membrana del hidrogel (Reihnart *et al.* 1981).

Como es de esperarse en el proceso de liberación de fármacos disueltos o encapsulados en un polímero hacia el medio externo, éstos deben atravesar la barrera que supone la superficie del hidrogel, por lo cual las condiciones de estructura y forma de la superficie son un factor importante en la liberación. Este factor también se puede controlar desde la síntesis de la red polimérica e incluye el control del tamaño del poro (Matsuyama *et al.* 1997). La formación de poros depende tanto de la metodología de síntesis como del grado de entrecruzamiento (relación grupo funcional/agente entrecruzante).

A continuación se presentan los resultados obtenidos en geles de quitosano y de alginato. Los mismos fueron caracterizados y fue estudiada su capacidad de liberación de STOL.

5.2.II.1 Preparación de gel de quitosano

Se realizó una solución de quitosano al 14 % p/v en relación al solvente (ácido acético 5% v/v), se mezcló por 15 minutos, se agregó una solución de genipina al 0,5% p/p en relación al polímero, se mezcló por 15 minutos más y luego se incorporó STOL (3,5 % v/v en etanol), en una relación de 60% p/p con respecto al polímero. Se mezcló por 30 minutos y una vez incorporado el compuesto de interés se procedió a preparar el material para los experimentos de liberación.

5.2.II.1.1 Caracterización

La composición química de las películas sintetizadas fue analizada mediante espectroscopía FT-IR. La figura 5.2 muestra los espectros del gel (a), y el de la genipina (b).

Como se puede observar, se presentan las bandas características tanto del quitosano, como de la genipina nombrados en el punto 5.2.I.2.2 y que describen el entrecruzamiento propio del polímero con su entrecruzante.

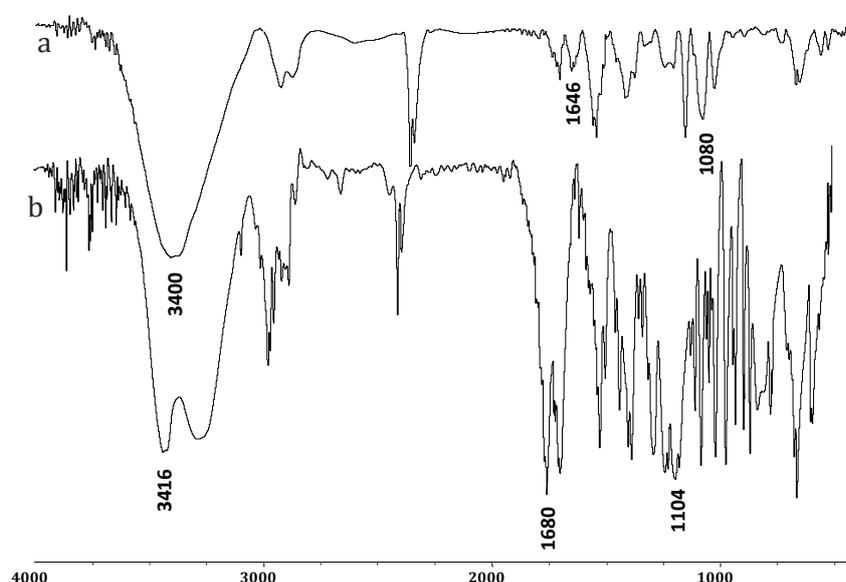


Figura 5.2. Espectro FT-IR. a) gel quitosano entrecruzado b) genipina

5.2.II.1.2 Liberación de sulcatol

Los ensayos de liberación se realizaron introduciendo el gel formado en un frasco de penicilina que actuó como vial de liberación. Luego se introdujo en el mismo 5 mL de etanol y se dejó en contacto con el gel por 24 horas. Diariamente todo el solvente de los viales fue extraído y utilizado para el análisis relativo de las concentraciones por cromatografía gaseosa. El mismo volumen eliminado era reemplazado por el solvente puro a los fines de continuar diariamente la cinética de liberación de los compuestos. Los experimentos de extracción y reposición de solvente continuaron hasta que no se encontró señal de compuesto liberado por los métodos de detección utilizados para tal fin. Tal experiencia se realizó por triplicado. En la figura 5.3 se grafica el porcentaje acumulado de STOL liberado.

Los resultados de liberación de STOL realizados con el gel de quitosano demuestran que se comportó como un buen agente de retención del compuesto ya que se registró una liberación sostenida y controlada hasta el día 10, alcanzando en este punto una liberación del 85 % del compuesto (Fig.5.3).

El porcentaje del 15% residual quedó retenido por el dispositivo.

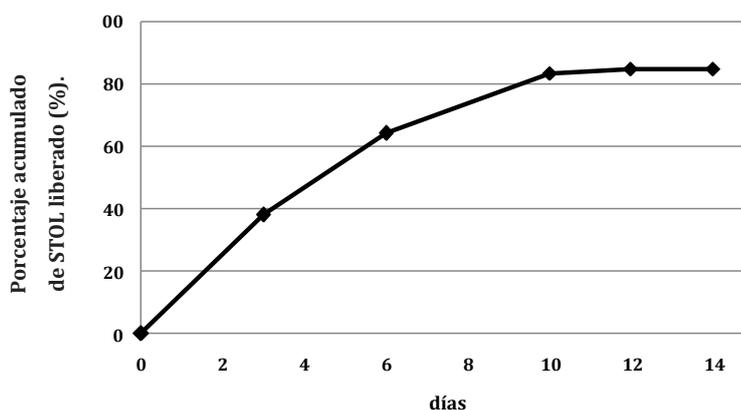


Figura 5.3: Liberación de STOL desde gel de quitosano

5.2.II.2 Preparación de gel de alginato

Se realizó una solución de alginato al 20% p/v en agua destilada, dicho solvente fue incorporado lentamente al polímero y se mantuvo en agitación vigorosa por 30 minutos. Transcurrido ese tiempo y habiendo logrado una textura de gel, se incorporó STOL (3,5 % v/v en etanol), en una relación de 70% p/p en relación al polímero.

5.2.II.2.1 Caracterización

Por medio de espectroscopía FT-IR se analizó la composición química del gel de alginato. En la Figura 5.4 se pueden observar los picos característicos del polímero. La banda ancha a los 3447 cm^{-1} corresponde a la tensión de los grupos OH, a los 2920 cm^{-1} se observa el estiramiento del enlace C-H, mientras que a los 1617 cm^{-1} y 1416 cm^{-1} se observan los picos correspondientes a las vibraciones asimétrica y simétrica del enlace COO-, por último a los 1299 cm^{-1} se observa el pico del estiramiento asimétrico C-O-C (Li *et al.* 2008) a los 1024 cm^{-1} estiramiento del enlace C-O-C.

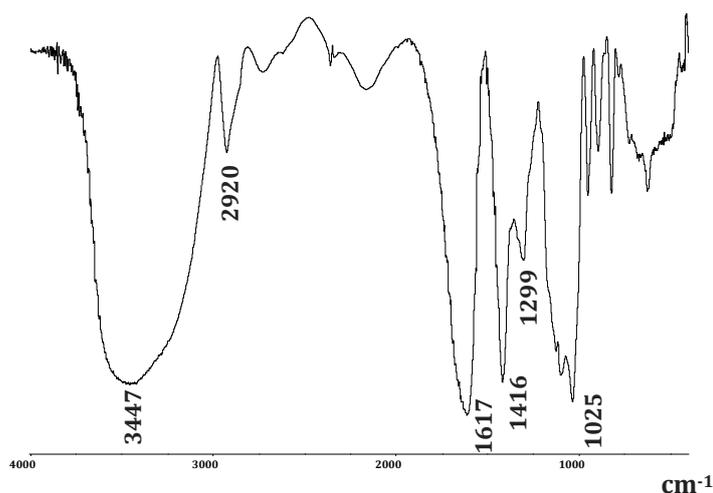


Figura 5.4: Espectro FT-IR del gel de alginato

5.2.II.2.2 Liberación de sulcatol

Los experimentos de liberación de sulcatol se realizaron de la misma manera que con el gel de quitosano. En la figura 5.5 se grafica el porcentaje acumulado de STOL liberado.

El análisis de liberación demostró que el 94% de dicho compuesto fue liberado al día tres de la experiencia (Fig. 5.5).

El alginato es conocido como formador de dispositivos de liberación en variadas formulaciones químicas, sin embargo su uso se apunta generalmente a ciclos de liberación de minutos u horas, y siendo necesario a los fines del objetivo del presente trabajo de investigación, alcanzar liberaciones sostenidas por períodos de días, se considera poco efectiva la liberación alcanzada con esta matriz.

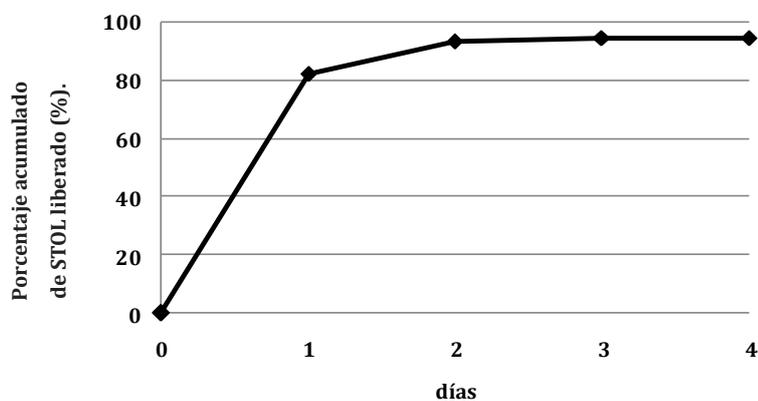


Figura 5.5: Liberación de STOL desde gel de alginato

5.2.II.3 Conclusiones parciales

La forma de síntesis de los geles supone una clara ventaja en cuanto a la incorporación de un compuesto de interés, ya que al ser un proceso sencillo, que no posee medios o pasos intermedios de reacción, no supone la pérdida del compuesto en etapas intermedias de síntesis.

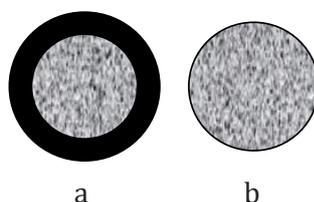
La preparación de los dispositivos usando geles (vía “húmeda”) permitió regular la velocidad de difusión y la de liberación, aumentando en el tiempo. En cuanto al comportamiento de incorporación/liberación de STOL, los dos polímeros utilizados mostraron diferencias importantes; mientras que el quitosano mantuvo una liberación controlada por una cantidad considerable de días con un bajo porcentaje de retención de la droga, el alginato lo hizo por un período de tiempo muy reducido. Así, con el fin de aumentar la superficie expuesta al ambiente y de obtener dispositivos más fáciles de transportar y de ubicar en forestaciones, es que se condujo la experimentación hacia el desarrollo de esferas. Las esferas poseen una alta relación volumen/superficie, lo cual es muy beneficioso para la preparación de dispositivos de liberación controlada y prolongada en el tiempo.

5.2.III Esferas

La encapsulación es el recubrimiento de materiales sólidos, líquidos o gaseosos con una película de material polimérico o graso que origina partículas de flujo libre. El producto de este proceso tecnológico puede tener un rango de tamaño de micras a milímetros; cuando las cápsulas poseen tamaño inferior a 1 μm el proceso de encapsulación recibe el nombre de nanocápsulas.

Al encapsular o recubrir un material sólido se obtienen partículas que generalmente presentan una forma irregular, debido a que el material de cubierta se deposita en la superficie de las partículas que se encapsularán y adopta su forma original. Al encapsular gases se obtienen partículas compuestas de un núcleo gaseoso, rodeado de una película del material de cubierta que se denominan microcápsulas. Si la sustancia que se encapsulará es un líquido, una solución, una emulsión o una dispersión se pueden obtener estructuras capsulares (cápsulas) o matriciales (esferas) (Esq. 5.8). El tipo de estructura depende en gran medida del

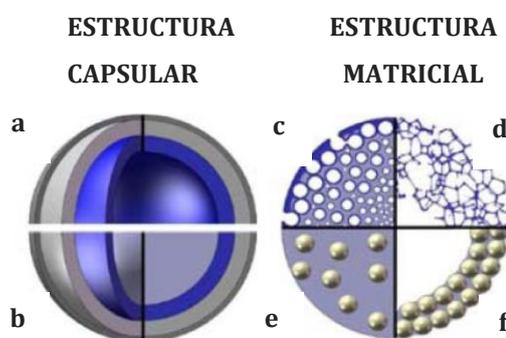
procedimiento de la encapsulación empleado, así como de las propiedades de la sustancia que se encapsulará y del material de cubierta.



Esquema 5.8: Tipos de estructura que presenta la partícula resultante del proceso de encapsulación de un material líquido.
a) Estructura capsular b) Estructura matricial

En el sistema capsular, el material activo se encuentra incluido en una especie de reservorio, que puede ser de naturaleza líquida o sólida, el cual se haya envuelto por una fina película de material de recubrimiento. En el esquema 5.9 a se observa el caso de una cápsula con el interior lleno, mientras que en el esquema 5.9 b se observa el interior parcialmente vacío.

En el sistema matricial el material activo se encuentra altamente disperso en la matriz polimérica. Se pueden obtener así una estructura en forma de espuma en donde el material activo se encuentre repartido por toda la microcápsula y la cubierta permanece intacta (Esq 5.9 c) o bien forma una estructura abierta en forma de red (Esq. 5.9 d). También es posible la síntesis de sistemas matriciales donde el material activo está disperso en la matriz que sirve como cubierta, tanto como esfera llena (Esq. 5.9 e), como en la periferia (Esq. 5.9 f).



Esquema 5.9: Diferentes morfologías en estructuras encapsulares.

Se han desarrollado diferentes métodos para la encapsulación de compuestos de naturaleza muy diversa, los mismos se dividen en mecánicos, químicos y fisicoquímicos: Los de tipo mecánico son los más usados industrialmente por lo factible de su ejecución y la obtención de los dispositivos puede realizarse por: extracción/evaporación del solvente, secado por atomización o recubrimiento en lecho fluido. En cuanto a los de tipo químico han sido más empleados a escala de laboratorio que a escala industrial y los procesos de elaboración puede ser por polimerización interfacial o por polimerización heterogénea. Por su parte, los métodos fisicoquímicos son los de relevante interés en este trabajo de tesis ya que fueron los utilizados para la realización de las esferas que se presentan en este capítulo.

Este tipo de métodos se basa en el concepto de coacervación. Éste es un fenómeno de separación de fases producido por una desolvatación parcial de una solución polimérica homogénea, en una fase rica en polímero (coacervado) y una fase pobre en polímero (medio de coacervación).

Además, de acuerdo al proceso de separación de fases, los métodos se dividen en coacervación simple y compleja. En las de tipo simple, la separación de fases puede ser inducida por adición de un no-solvente, cambio de temperatura, cambio de pH, adición de una sal o de un polímero incompatible y en las de tipo compleja, la separación de fases ocurre de forma espontánea, cuando en un medio acuoso se mezclan dos o más polímeros que presentan carga opuesta (policación y polianión), como consecuencia de la atracción electrostática entre ellos (Saez *et al.* 2007, Gosh S. 2006).

La morfología de una esfera permite aumentar la relación volumen/superficie y de esta manera aumentar la superficie expuesta del material para lograr una mayor liberación del compuesto incorporado.

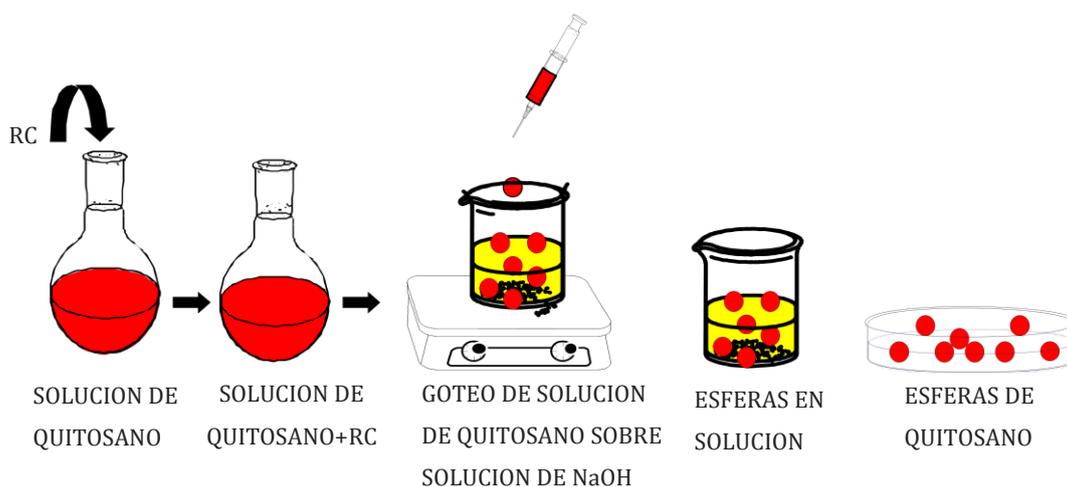
En esta parte del estudio, se comenzó con la preparación de esferas simples de quitosano o de alginato, para luego poder realizar un estudio comparativo frente a sistemas más complejos como son las esferas combinadas.

5.2.III.1 Preparación esferas simples de quitosano

Se realizaron esferas de quitosano por el método de coacervación simple. En todos los casos de síntesis, la separación de fases que condujo a la formación de las esferas, se realizó por el contacto del quitosano que es soluble en pHs ácidos, con una solución de NaOH.

Para la realización de las esferas se preparó una solución de quitosano de 3% p/v en ácido acético 5% v/v. Luego se prepararon tres tipos de esferas diferentes, conteniendo STOL, Beta-Caroteno (BC) o Rojo Congo (RC) respectivamente. El STOL se incorporó a la solución de quitosano en una proporción de 100 % p/p, mientras que el BC y el RC en una relación de 0,012 % p/p.

Cada una de las soluciones de polímero conteniendo los compuestos fue goteada sobre respectivas soluciones alcalinas; en el momento en que ambas soluciones se ponían en contacto, la esfera quedaba formada (Esq. 5.10). Las esferas fueron mantenidas en la solución por 20 minutos, luego fueron filtradas, lavadas y colocadas en viales para los correspondientes estudios de liberación (Fig. 5.6).



Esquema 5.10: Formación de esferas de quitosano con incorporación de RC.



Figura 5.6: Fotografía de esferas quitosano con RC

5.2.III.1.1 Caracterización

Por medio de estudios de espectroscopía FT-IR se analizó la composición de las esferas de quitosano y en la Fig. 5.7 se detallan los picos característicos de la estructura de este polisacárido. La banda ancha a los 3451 cm^{-1} corresponde al estiramiento del enlace O-H, el pico a los 2875 cm^{-1} demuestra el estiramiento C-H, a 1652 cm^{-1} se ve el pico correspondiente a la frecuencia de torsión NH_2 , mientras que la banda a los 1080 cm^{-1} se debe al estiramiento antisimétrico del enlace C-O.

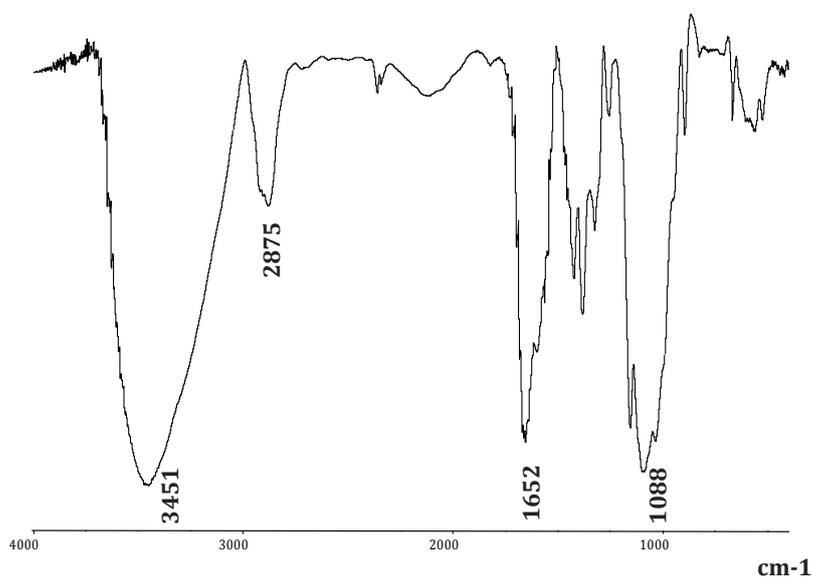


Figura 5.7: Espectro FT-IR de las esferas de quitosano

5.2.III.1.2 Estudios de liberación

Antes de comenzar con los estudios de liberación del compuesto de interés entomológico (STOL) desde las esferas simples de quitosano, se realizaron pruebas de liberación con dos compuestos de distinta hidrofobicidad para entender el comportamiento de este polímero frente a variables hidrofóbicas-hidrofílicas.

En este sentido, se realizaron esferas conteniendo Rojo Congo (RC) de naturaleza hidrofílica o Beta Caroteno (BC) de naturaleza hidrofóbica.

El Rojo Congo es un colorante diazo aniónico secundario con estructura plana (Fig. 5.8), soluble en solventes polares como la acetona (alta solubilidad) y etanol (soluble); en agua a 25 °C presenta una solubilidad de 1 g/30 mL, mientras que ésta se ve incrementada en agua a menor temperatura. El RC disuelto en soluciones acuosas da lugar a la formación de soluciones coloidales mediado por un mecanismo de agregación. El mecanismo postulado para la agregación de RC es por interacción hidrofóbica mediante interacciones electrónicas de tipo Π - Π pertenecientes a los anillos aromáticos, las que conducen a constituir agregación de moléculas de RC con características de apilamiento (Bosio *et al.* 2012).

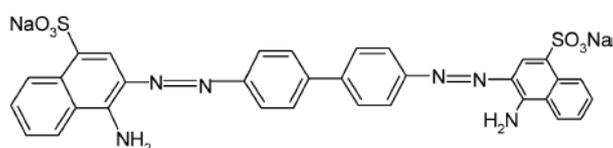


Fig. 5.8: Estructura química del Rojo Congo

Recientemente, el RC fue empleado en estudios histológicos para detectar la presencia de proteínas fibrilares enriquecidas en conformación de lámina plegada (estructuras tipo β). Estos estudios sirvieron para evidenciar algunas patologías neurodegenerativas como Alzheimer, Huntington y Parkinson (Frid *et al.* 2007). Asimismo el RC fue usado para marcar y detectar algunos tipos de hidrolasas como mananasas, xilanasas deshidrogenasas, celulasas y otras cuyos mecanismos

probablemente estén relacionados a la presencia de conformaciones de tipo lámina- β plegada en la estructura de estas proteínas (Breccia *et al.* 1995).

Por su parte, el BC es un carotenoide hidrofóbico que consiste en una cadena poliénica formada por once dobles enlaces conjugados y un anillo β al final de cada cadena (Fig. 5.9) La zona de la molécula que presenta alternancia entre enlaces C-C simples y dobles recibe el nombre de cromóforo y es la responsable de la capacidad de los carotenos de absorber luz en la región visible y en consecuencia de su gran capacidad de coloración (Knockaert *et al.* 2012).

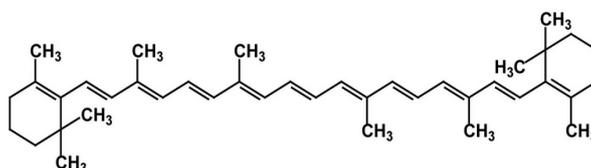


Fig. 5.9: Estructura química del Beta Caroteno

Este compuesto es de particular interés, ya que además de ser uno de los más efectivos precursores de vitamina A en el organismo, posee beneficios en la salud tales como agente preventivo del cáncer, inhibidor de úlceras y de ataques al corazón (Colditz *et al.* 1985; von Lintig *et al.* 2010).

Sin embargo, su uso es limitado debido a su baja solubilidad en agua y a su inestabilidad química, su propiedad lipofílica determina que debe ser disuelto en aceites o dispersado en matrices adecuadas antes de ser utilizado en productos alimenticios (Soares & Craft 1992). Es por este motivo que numerosos proyectos de investigación en la actualidad, tienen como objetivo estudiar las formas de vehiculización de este compuesto.

Las esferas conteniendo los colorantes RC o BC, o STOL fueron colocadas en viales de liberación con 5 mL de solvente de extracción. Diariamente el volumen total de los viales fue extraído y reemplazado por el mismo volumen de solvente limpio para el registro de liberación del día siguiente. En las figuras de liberación de BC (Fig. 5.10) y de RC (Fig. 5.13) se grafica el porcentaje acumulado total de los días de experimentación.

Los colorantes RC y BC fueron analizados por espectrofotometría UV-visible y el STOL fue estudiado por cromatografía gaseosa. Se emplearon varios solventes de extracción (Tabla 5.1). Se probó con solventes de polaridad creciente desde cloroformo hasta agua, en un intento de agotar las posibilidades de solubilidad y extracción del RC liberado desde las esferas.

En el caso del BC, la liberación se analizó en una primera instancia con etanol, pero no se detectó liberación con tal solvente, por este motivo se analizó luego la liberación con tetrahidrofurano y fue con este solvente con el que finalmente se realizó el análisis.

En el caso del STOL la extracción se realizó con etanol ya que la solubilidad ya había sido aprobada.

Tabla 5.1: Solventes de extracción utilizados para la cuantificación de BC, RC y STOL desde las esferas de quitosano

		Solventes de extracción						
		CHCl ₃	THF	Etanol	H ₂ O	Buffer pH 2,5	Buffer pH 7,5	Buffer pH 12
Esferas quitosano	RC	X	X	X	X	X	X	X
	BC		X	X				
	STOL			X				

Para estudiar el porcentaje real de los compuestos de interés incorporados a las esferas, se analizaron las soluciones de síntesis después de que estuvieron en contacto con las mismas en el proceso de la elaboración. En cuanto al RC se registró un porcentaje de 12% no incorporado a las esferas, para el STOL un porcentaje de 15% no fue incorporado y el BC fue encapsulado totalmente por los dispositivos.

En cuanto a la liberación de los compuestos, sólo se registró liberación de BC desde las esferas de quitosano, alcanzando al día cuatro un 24% de compuesto liberado (Fig. 5.10).

En cuanto al RC no se registró liberación con ninguno de los solventes que estuvieron en contacto con las esferas. Asimismo la cantidad de STOL detectado por cromatografía gaseosa no fue suficiente para establecer un área cromatográfica adecuada de ser cuantificada; sólo fue detectado como trazas.

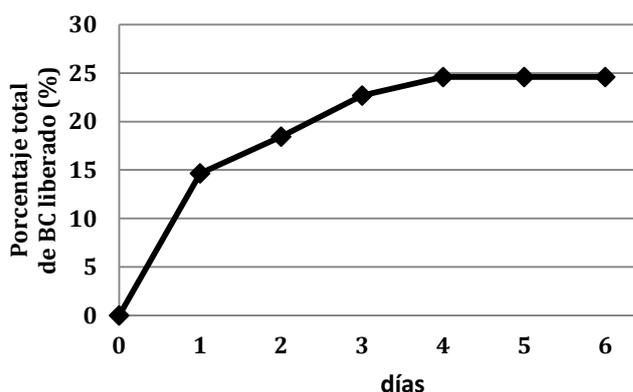


Figura 5.10: Porcentaje de BC liberado desde esferas de quitosano

Los resultados obtenidos con las esferas de quitosano se presentan en la tabla 5.2 y los mismos sugieren por un lado, que dicho polímero funciona como un agente de retención muy importante del compuesto hidrofílico, ya que habiendo quedado en las soluciones de síntesis sólo un 12% de RC, no se registró liberación del mismo durante los días de experimentación.

Por otro lado, en cuanto al compuesto hidrofóbico BC, el total del compuesto fue incorporado a las esferas y se registró una liberación al día cuatro de la experiencia de 24%, demostrando el gran porcentaje de compuesto retenido por este tipo de dispositivos.

Por último, en cuanto al porcentaje de STOL incorporado, el total del mismo fue retenido por los dispositivos, ya que no se registró liberación suficiente para ser cuantificada.

Tabla 5.2: Porcentajes de incorporación y de liberación de RC, BC y STOL desde esferas simples de quitosano.

		Porcentaje de incorporación de compuestos en esferas de quitosano		Porcentaje de liberación de compuestos desde esferas quitosano en sus respectivos solventes	
		No incorporado (%)	Incorporado (%)	Retenido (%)	Liberado (%)
Compuesto	RC	12	88	100	0
	BC	0	100	76	24
	STOL	15	85	≈100	Trazas cromatográficas

Podemos concluir que el quitosano incorpora en un buen porcentaje todos los compuestos orgánicos muestreados ya que se encontraron porcentajes

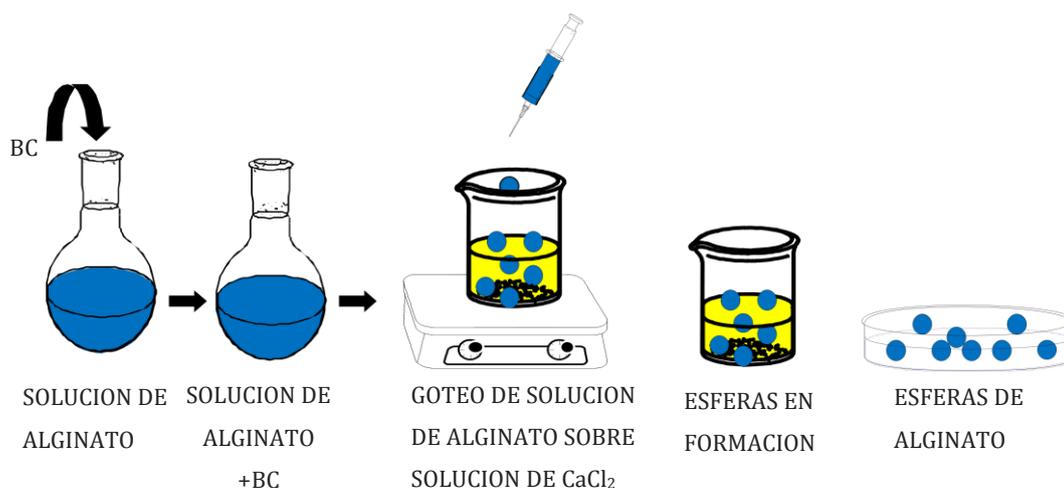
incorporados a partir de un 85%. En cuanto a la liberación de los mismos, no se observó una buena liberación ya que el único compuesto posible de cuantificar fue el BC, encontrándose sólo un 24% del mismo en el solvente de extracción utilizado.

5.2.III.2 Preparación esferas simples de alginato

Se realizaron esferas de alginato y al igual que en las detalladas previamente, se hicieron por el método de coacervación simple. En este caso, la separación de fases se produjo por la adición de una sal. Así, se utilizó una solución de CaCl_2 como solución gelificante. Para la realización de las esferas se preparó una solución de alginato de 4% p/v en agua destilada. Luego se prepararon tres tipos de esferas diferentes, conteniendo STOL, Beta-Caroteno (BC) o Rojo Congo (RC) respectivamente. El STOL se incorporó a la solución de alginato en una proporción de 100 % p/p, mientras que el BC y el RC en una relación de 0,012 % p/p.

Sobre la solución de CaCl_2 2% p/v se goteó el alginato que contenía el compuesto de interés, ya que permite la reacción de los grupos COO^- disponibles del polímero con el Ca^{2+} de la sal para formar estructuras tridimensionales en la conocida conformación en “caja de huevo” (Esq. 5.11). Al formarse tal conformación, se promueve la incorporación del compuesto disuelto en la solución polimérica, al interior de la esfera (Fig. 5.11).

Se analizó la incorporación y posterior liberación de STOL, BC y RC.



Esquema 5.11: Formación de esferas de alginato con incorporación de BC.



Figura 5.11: a) Fotografía de esferas de alginato con BC incorporado. B) Solvente de extracción

5.2.III.2.1 Caracterización

Se analizó por espectroscopía FT-IR la composición de las esferas de alginato. En la Fig. 5.12 se puede observar los picos característicos del espectro. Las bandas de 1619 cm^{-1} y 1415 cm^{-1} corresponden al estiramiento asimétrico y simétrico de los grupos COO^- , el pico a los 1034 cm^{-1} corresponden al estiramiento C-O-C propio de una estructura de sacárido, mientras que la banda ancha a los 3448 cm^{-1} corresponden a la tensión de los grupos OH- y el pico a los 2923 cm^{-1} corresponde a la tensión C-H (Li *et al.* 2008).

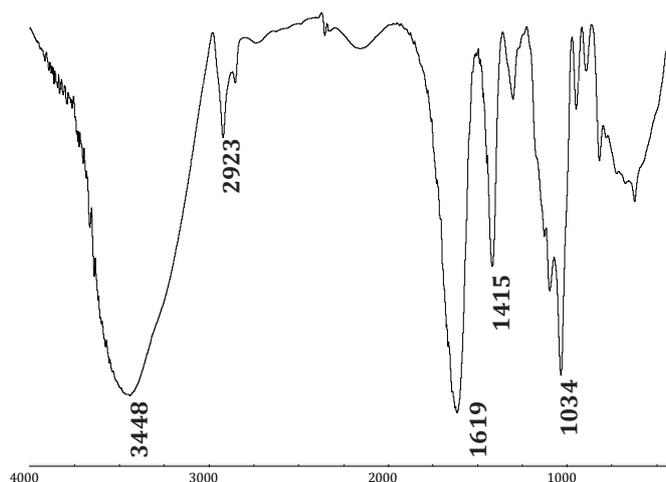


Figura 5. 12: Espectro FT-IR de las esferas simple de alginato

5.2.III.2.2 Estudios de liberación

Las esferas de alginato fueron estudiadas en cuanto a su capacidad de incorporar y liberar tres compuestos de distintas características. Se analizó la incorporación y liberación de los colorantes RC y BC, así como del compuesto del blend feromonal, STOL. Se utilizaron variados solventes de extracción para las cuantificaciones correspondientes, así se utilizó THF para el BC y etanol para el RC y el STOL.

En la tabla 5.3 se pueden observar los porcentajes de incorporación y de liberación de los compuestos en las esferas de alginato.

Tabla 5.3: Porcentajes de incorporación y de liberación de RC, BC y STOL desde esferas de alginato.

		Porcentaje de incorporación de compuestos en esferas de alginato			Porcentaje de liberación de compuestos desde esferas de alginato	
		No incorporado (%)		Incorporado (%)	Retenido(%)	Liberado(%)
		Por pérdida en CaCl ₂	Por pérdida en agua de lavados			
Compuestos de interés	RC	0	0	100	82	18
	BC	7	15	78	65	35
	STOL	5	27	68	85	15

En cuanto al porcentaje de incorporación, se registró una excelente encapsulación de RC, ya que no se encontró tal compuesto en las soluciones de síntesis analizadas posteriormente a la elaboración de los dispositivos. Sin embargo, la encapsulación no fue exitosa cuando se experimentó con los compuestos de características hidrofóbicas como el BC y el STOL. En las soluciones de CaCl₂ donde se formaron las esferas se encontraron porcentajes de BC de 7% y de STOL de 5%. No obstante, en el agua donde se lavaron los dispositivos luego de su formación se encontraron porcentajes más altos, siendo el porcentaje de BC de 15% y el del STOL de 27%.

En cuanto a la liberación de estos compuestos, se registró una liberación total de 18% para el RC, de 35% para el BC y de 15% para el STOL (Fig. 5.13).

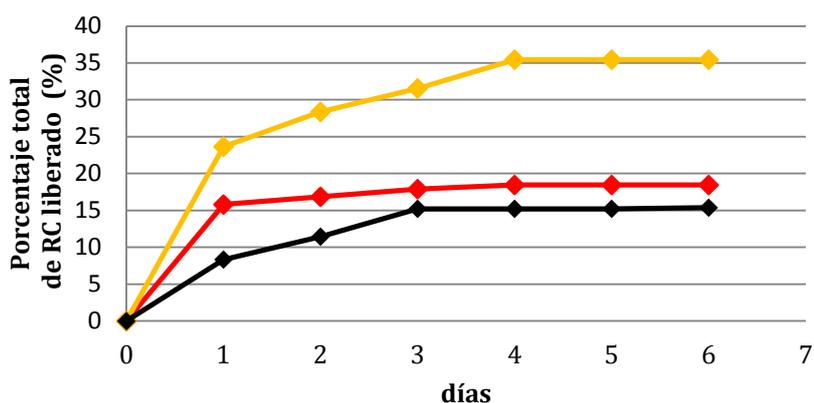


Figura 5.13: Liberación de RC, BC y STOL desde esferas simples de alginato.

(—◆— BC, —◆— RC, —◆— STOL).

Los resultados obtenidos en cuanto a la incorporación de los compuestos en las esferas de alginato pueden separarse, a los fines de un mejor entendimiento del proceso de encapsulación y composición del sistema, en dos partes: por un lado podemos afirmar que el polímero resultó un buen agente de incorporación de RC, BC y STOL, ya que no se encontraron altos porcentajes de compuestos en las soluciones de CaCl_2 , pero por otro lado es importante destacar para el BC y el STOL (en el RC no se observó este comportamiento) que se encontraron valores altos de pérdida de compuesto en el agua de los lavados. Este hecho puede deberse a la alta porosidad que presenta este polímero y que puede ocasionar la salida del mismo en el momento post-elaboración (Huguet *et al.* 1996). En este sentido y teniendo en cuenta también el rápido alcance de la meseta de liberación, creemos que una forma de cubierta de las superficies porosas de las esferas podría mejorar a la retención del compuesto en el momento de la elaboración, así también como a un control en la etapa de liberación del compuesto incorporado.

5.2.III.3 Conclusiones parciales

Podemos por un lado concluir que el quitosano es un buen formador de esferas y que incorpora un buen porcentaje de los compuestos orgánicos muestreados ya que se encontraron porcentajes incorporados a partir de un 85%. En cuanto a la liberación, podemos concluir que este polímero funciona como un

excesivo agente de retención ya que el único compuesto posible de cuantificar fue el BC, liberando un 24% del compuesto.

Por otro lado, las fortalezas encontradas en las esferas de alginato son que mantienen la forma esférica adecuada y que incorporan un alto porcentaje de los compuestos de interés. Sin embargo, poseen también ciertas debilidades, tales como la salida rápida del compuesto incorporado ya sea por lavados de las esferas o por sus propiedades de retención intrínsecas.

Estas debilidades pueden ser superadas en la síntesis, por la suma de compuestos que recubran la esfera y que colaboren a disminuir la porosidad del mismo.

La propiedad de carga negativa del alginato otorgada por sus grupos COO-, le confiere posibilidad de interacción con otros polímeros de carga opuesta y de esta manera amplias posibilidades de mejorar las condiciones desfavorables detectadas. Así, la experimentación de la presente tesis doctoral se condujo al desarrollo de esferas combinadas, intentando de esta manera asociar polímeros en pos de alcanzar los objetivos propuestos.

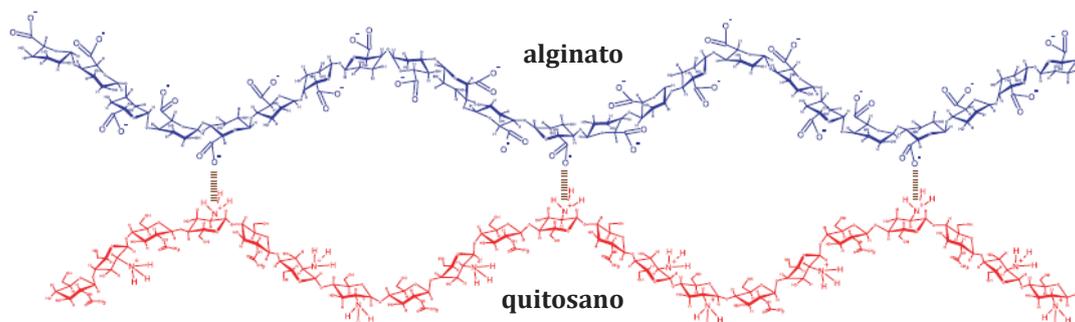
5.2.III.4 Esferas combinadas

De acuerdo con el análisis de los resultados, y continuando con la búsqueda de un dispositivo óptimo que cumpla con los requisitos necesarios, se comenzaron con los estudios de preparación de esferas combinadas. Esto llevaba como objetivo principal rescatar las fortalezas que cada polímero demostró en los dispositivos ensayados y mejorar los inconvenientes observados.

En los últimos años, hubo un notable interés en los estudios de combinación del alginato con el quitosano y sus posibles aplicaciones como: bioingeniería de tejidos, matrices para la encapsulación de células de cultivo y como sistemas múltiples de liberación de drogas (Deladino *et al.* 2008; Drush *et al.* 2009; Vidhyalashmi *et al.* 2009; Santagapita *et al.* 2011). Si bien el alginato en presencia de ciertos cationes divalentes como el calcio tiene propiedades gelificantes adecuadas, la suma de ciertos polímeros como el quitosano puede mejorar ciertas condiciones mecánicas de los dispositivos ayudando a optimizar tanto la

encapsulación de compuestos de interés, como la cinética de liberación de los mismos.

La interacción que se produce entre el alginato y el quitosano conduce a un complejo polielectrolítico como se muestra en el esquema 5.12.



Esquema 5.12. Complejo polielectrolítico formado entre el alginato (azul) y el quitosano (rojo).

La principal interacción que lleva a la formación de este complejo es la atracción electrostática que se produce entre los grupos amino catiónicos del quitosano y los grupos carboxilo aniónicos del alginato. Las demás fuerzas de unión de enlaces actúan como uniones de tipo secundarias sin la relevancia de las mencionadas anteriormente (Sankalia *et al.* 2007).

Así, al ser el pKa del quitosano de 6,3/6,5 y el del alginato de 3,38/3,65 la máxima atracción se produciría cuando los polímeros se encuentran en una condición de pH de 6 o 4 respectivamente: de esta manera la variación del pH tanto de las soluciones poliméricas como gelificantes, afecta la posible unión entre ambos polímeros dando como resultado dispositivos con diferente rigidez final de material. Esta propiedad está íntima e indirectamente relacionada con la liberación de compuestos (Lee *et al.* 1999).

Además, la sensibilidad del sistema frente a variables de síntesis como la concentración de los polímeros, el pH de las soluciones gelificantes y el tiempo de curado permiten el estudio y análisis de dichas variables en vías de la obtención de la cinética de liberación requerida.

El alginato y quitosano pueden entonces combinarse por dos alternativas posibles, por un lado pueden sintetizarse esferas con un corazón de quitosano y

una cubierta de alginato, o bien los dispositivos de liberación pueden estar formados por un corazón de alginato y una cubierta de quitosano.

El uso de alginato y quitosano en la elaboración de películas, geles y esferas simples demostró que ambos polímeros poseen ventajas y desventajas para el desarrollo de dispositivos de liberación.

Los resultados obtenidos con alginato demostraron que este polímero forma matrices demasiado porosas que en el caso del gel ocasionaron la liberación rápida del STOL y, en el caso de las esferas hubo pérdida importante de este compuesto en las etapas de síntesis. Sin embargo, el quitosano resultó un buen formador de películas y podría colaborar en la disminución de la porosidad de una esfera de alginato, cubriendo al dispositivo. De esta manera, la rápida difusión experimentada por las esferas de alginato podría verse retardada por la aplicación de una película de quitosano en su exterior.

En cuanto al comportamiento del quitosano en los estudios de liberación realizados con las esferas simples, los resultados mostraron que el quitosano posee mayor capacidad de retención de compuestos de naturaleza hidrofóbica, aunque se observó una alta retención residual y que el alginato, por su alta porosidad, aumenta la velocidad de liberación.

Además, se conoce que la preparación de esferas combinadas entre polielectrolitos, mejoran las propiedades mecánicas debido a la formación de fuertes interacciones electrostáticas y en este sentido se propuso el desarrollo de esferas con un corazón de alginato y una cubierta de quitosano.

Si bien el quitosano demostró con el gel que su liberación de STOL es muy buena, la morfología y el grado de entrecruzamiento logrado en las esferas no permitió que el compuesto se liberara de manera adecuada. Por este motivo, se consideró la interacción con un polímero que le otorgue porosidad al sistema, para mejorar las propiedades de liberación. Así se planteó el desarrollo de esferas con un corazón de quitosano y una cubierta de alginato.

A continuación se detallan los resultados obtenidos con los dispositivos elaborados. En primera instancia se analizarán los resultados conseguidos con

las esferas de corazón de quitosano y cubierta de alginato y luego, los de las esferas de corazón de alginato y cubierta de quitosano.

5.2.III.5 Preparación de esferas combinadas: Corazón quitosano-Cubierta alginato.

Este tipo de esferas se realizó por un proceso de coacervación compleja, en el cual se forma un complejo polielectrolítico al mezclar en un medio acuoso dos o más polímeros que presentan carga opuesta (policación y polianión). La atracción electrostática entre ellos provoca una separación de fases que lleva a una encapsulación de un compuesto que se encuentre disperso en una de las dos soluciones poliméricas de partida (Saez *et al.* 2007, Gosh S. 2006).

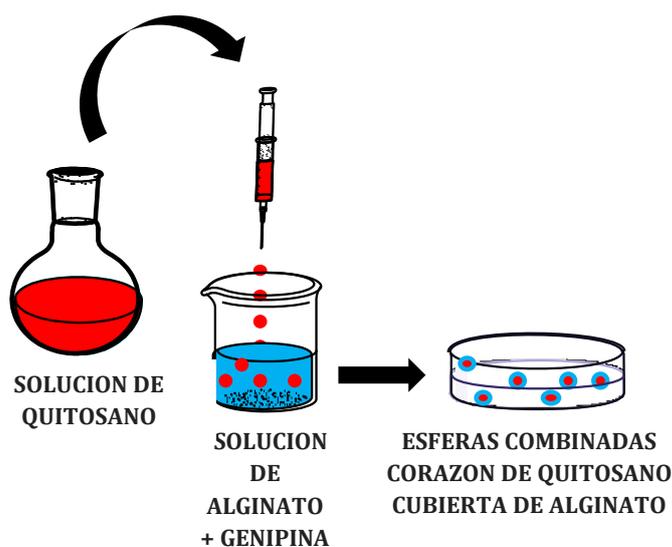
Estos complejos son una clase particular de macromoléculas cargadas electrostáticamente con grupos ionizables complementarios. Este tipo de materiales cobran relevante importancia en el desarrollo de biomateriales poliméricos, en la inmovilización de varias especies activas y en procesos biológicos. Las propiedades y posibilidades de obtención de redes de diversas formas y tamaños hacen que los hidrogeles y especialmente los complejos polielectrolíticos sean muy útiles en diversos campos, encontrándose el mayor desarrollo en el campo biomédico, donde la ingeniería de tejido y el diseño de sistemas de liberación sostenida alcanzan los máximos niveles a escala mundial (Pong *et al.* 2003).

Las esferas combinadas con un corazón de quitosano y cubierta de alginato (ESF ♥ QUI) fueron realizadas de la siguiente manera: Se preparó una solución de quitosano de 1,5 % p/v en ácido acético 0,5 % v/v pH 5 y se mantuvo en agitación por dos horas. Transcurrido ese tiempo, dicha solución fue goteada con una jeringa de diámetro de 2 mm sobre una solución de alginato que contenía genipina. Las esferas así formadas fueron mantenidas en la solución gelificante de alginato por 20 horas y fueron filtradas.

El pKa del alginato es de 3,3/3,6 y el del quitosano de 6,3/6,5, es decir que en tales condiciones, los polímeros poseen la mitad de sus grupos ionizables y por lo tanto, en situación óptima para interactuar con grupos de carga opuesta. Por

ese motivo y con la intención de estudiar el efecto de la variación del pH de la solución de alginato, en la interacción con el quitosano, se modificó el pH de la solución del primer polímero, obteniendo valores de 3,6 y 8. Además, también se estudió el efecto de la concentración del alginato en la formación del complejo polielectrolítico preparando soluciones de 0,25; 0,5; 0,75 y 1 % p/v. En el esquema 5.13 se muestra un esquema de la formación de las esferas y en la figura 5.14 fotografías de las esferas formadas.

La gelación de las gotas de quitosano en la solución de alginato + genipina depende de dos factores: por un lado de la formación del complejo polielectrolítico y por otro del entrecruzamiento del quitosano con la genipina. En este sentido, la tasa de reacción entre el quitosano y el alginato por interacción electrostática es muy rápida, mientras que el curado del quitosano por la genipina es un proceso más lento. Por su parte y considerando los procesos de difusión, las moléculas de alginato están limitadas a penetrar a través de la delgada capa exterior hacia el interior de la gota de quitosano, mientras que la genipina, al ser una molécula más pequeña puede penetrar más fácilmente las gotas de quitosano y reaccionar con los grupos disponibles. Debido a esta razón el complejo alginato-quitosano controla la formación de la capa exterior de la esfera, mientras que el entrecruzamiento del quitosano por la genipina domina el curado del corazón de la esfera (Mi *et al.* 2002).



Esquema 5.13: Formación de ESF♥QUI. * Las condiciones de la solución de alginato estudiadas fueron: Concentración de dicha solución: 0,25; 0,5; 0,75 y 1 % p/v y pH de la misma: 3,6 y 8. Se analizaron las doce combinaciones posibles de concentración y pH del alginato.



Figura 5.14: Fotografía de ESF ♥ QUI.

5.2.III.5.1 Caracterización

5.2.III.5.1.1 Espectroscopía infrarroja (FT-IR)

Los estudios de caracterización estructural se realizaron por espectroscopía FT-IR. En la figura 5.15 se puede ver las bandas que demuestran la interacción polielectrostática establecida en las ESF ♥ QUI.

En el espectro del quitosano se puede observar la banda ancha a los 3451 cm^{-1} correspondiente al estiramiento del enlace O-H, el pico a los 2875 cm^{-1} demuestra el estiramiento C-H, a 1652 cm^{-1} se ve el pico correspondiente a la frecuencia de torsión NH_2 , mientras que las bandas a los 1080 cm^{-1} y a los 1030 cm^{-1} se debe al estiramiento antisimétrico y simétrico del enlace C-O.

En el espectro de las ESF ♥ QUI se puede observar la aparición de una banda a los 1646 cm^{-1} , correspondiente al doble enlace C=O de la unión amida. Esta nueva banda confirma el entrecruzamiento entre los grupos carbonilo de la genipina con los grupos amino del quitosano. También se observa en el espectro de las esferas el estiramiento del enlace C-O antisimétrico a los 1080 cm^{-1} y el estiramiento a los 3400 cm^{-1} correspondiente al enlace O-H.

Al comparar el espectro de las ESF ♥ QUI con sus blancos correspondientes, se puede observar que hay una diferencia en la relación entre las bandas de los 3400 cm^{-1} , y los picos característicos del alginato (1616 cm^{-1}), del quitosano (1652 cm^{-1}) y el de las ESF ♥ QUI (1646 cm^{-1}). En este último espectro se observa la diferencia de interés particular ya que la relación entre las bandas nombradas previamente, no mantiene la misma relación que en los otros dos casos blanco.

Esta característica del espectro de las ESF ♥ QUI es indicadora de la interacción polielectrolítica sufrida en las esferas.

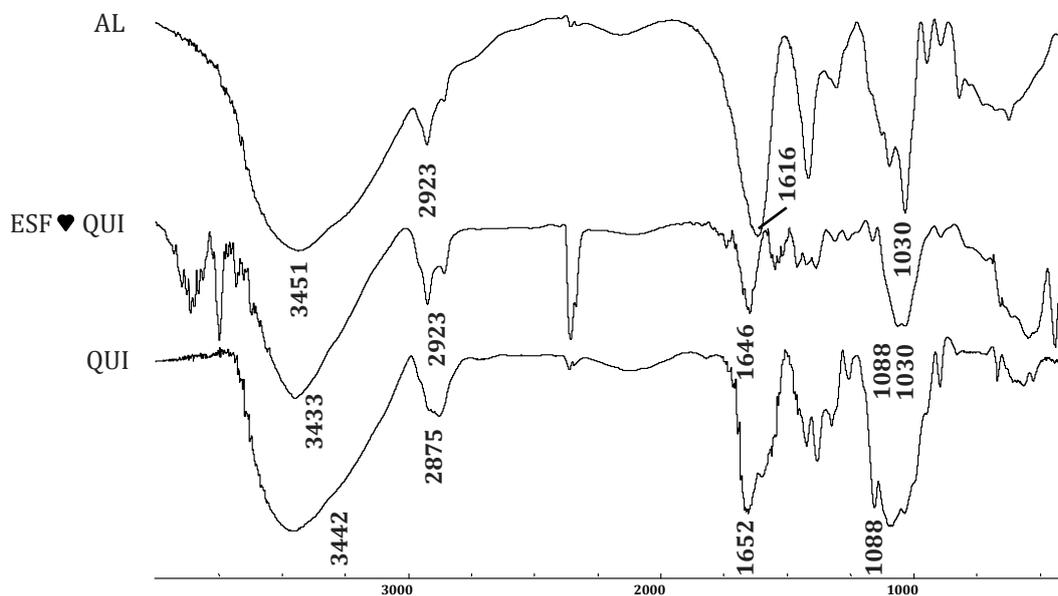


Figura 5.15: Espectros FT-IR de las esferas combinadas ESF ♥ QUI y sus correspondientes controles de quitosano y alginato.

5.2.III.5.1.2 Microscopía óptica (*Watershed transformation*)

La capacidad del programa de “*Watershed transformation*” de diferenciar zonas de una fotografía con distintos brillos, permite distinguir dentro de la misma muestra, regiones “altas” (de mayor brillo) y regiones “bajas” (de menor brillo).

Con el objetivo de conocer la composición de las distintas partes de las esferas en estudio, esto es, corazón y cubierta se fotografiaron las esferas combinadas y se analizó la composición de las distintas secciones de la esfera.

El corte producido en la mitad de la esfera y la oportunidad de observar y fotografiar el lado interno de la misma, otorga la oportunidad de comprender los diferentes índices de reflexión de la luz de acuerdo se trate de la zona interior (o corazón) o la zona exterior (o cubierta) (Fig. 5.16).

En este sentido, fue posible fotografiar las esferas con corazón de quitosano y cubierta de alginato preparadas a una concentración de quitosano de 1,5% p/v y

con una solución gelificante de alginato de concentración igual a 1% p/v y a un pH de 9.

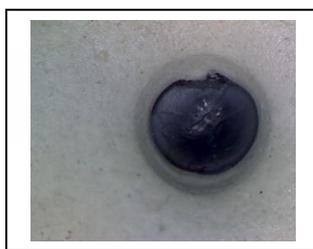


Figura 5.16: ESF ♥ QUI cortadas por la mitad. Estas fotografías **no** presentan aún la caracterización producida por el programa "Watershed transformation".

En la figura 5.17 se muestran las fotografías transformadas de las ESF ♥ QUI, que aunque no mantuvieron la forma esférica una vez secas, también fue posible fotografiarlas con el microscopio óptico en el estado húmedo y obtener información del índice de reflexión emitido por las posibles zonas de la misma.

Al ser la reflexión de la luz dependiente de la topografía y de la composición química de la muestra, en la fotografía transformada se puede corroborar la presencia de una zona de mayor brillo en el interior de la esfera, correspondiente a la presencia de un polímero de características cristalinas como el quitosano y una zona externa de menor brillo que corresponde a la cubierta de alginato.

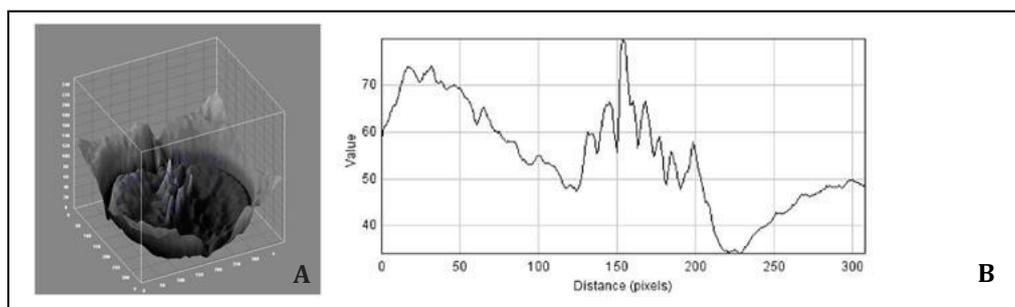


Figura 5.17. Fotografías obtenidas con microscopio óptico y posterior transformación de las mismas a través del programa *Watershed transformation* de las ESF ♥ QUI.

Fotografía transformada (A) y perfil del índice de reflexión (B).

Las cadenas poliméricas que componen el quitosano se encuentran dispuestas de manera ordenada, y al tener un orden establecido la luz puede pasar a través de esa zona provocando grandes índices de reflexión ya que su carácter cristalino le confiere una cierta opacidad y por lo tanto una alta reflexión de la luz.

No obstante, en la cubierta del material en estudio se da otra situación: el alginato es un material de características amorfas, las moléculas que forman las cadenas de este polímero se encuentran mayormente ubicadas de manera desordenada, confiriéndole de esta manera la propiedad de zonas bajas o de bajo índice de reflexión de la luz.

Las zonas altas o “brillantes” de la figura 5.17 corresponden entonces a un material de características cristalinas que permite un alto índice de reflexión de la luz.

5.2.III.5.2 Estudios de propiedades: Hinchamiento

Se determinaron los índices de hinchamiento como una forma de conocer la influencia de las diferentes variables de síntesis. Como se detalla en la tabla 5.4, las esferas realizadas a menores concentraciones de alginato (0,25 y 0,5 % p/v), no mantuvieron su forma esférica en contacto con el agua. Si bien con aquellas sintetizadas a una concentración de alginato de 0,5 % p/v y a un pH de 8 se pudo alcanzar un valor concreto de hinchamiento (1423), luego de alcanzado el mismo, las esferas se desarmaron al igual que las esferas realizadas en las condiciones de menor concentración de alginato y menores pH. Las esferas que mantuvieron la forma esférica en las condiciones experimentales y a las que fue posible medir su índice de hinchamiento, fueron las de concentración de alginato de 0,75 y 1 % p/v y realizadas a pHs de 6 y 8.

Tabla 5.4 Índice de hinchamiento de las ESF♥QUI

pH de solución de alginato	Concentración de alginato (% p/v)			
	0,25	0,5	0,75	1
3	Esferas se desarman	Esferas se desarman	Esferas se desarman	Esferas se desarman
6	Esferas se desarman	Esferas se desarman	806	230
8	Esferas se desarman	1423 *	2158	954

* Luego de alcanzado este valor de hinchamiento, las esferas se desarmaron.

El índice de hinchamiento de las esferas disminuye con el aumento de la concentración del alginato de la solución gelificante.

Con respecto al pH de la solución de alginato, se observa que a mayores pHs aumenta el índice de hinchamiento de las esferas combinadas, ya que al aumentar el pH de la solución de alginato, los grupos COO^- del alginato tienen carga negativa y por lo tanto aumentan su hinchamiento por la repulsión de esos grupos.

A pesar de que las esferas realizadas a concentraciones de alginato de 0,75 y 1 % p/v y a pHs de 6 y 8 lograron mantener su forma durante los experimentos de hinchamiento, una vez que fueron removidas de la solución y puestas a secar a temperatura ambiente no la mantuvieron y al secarse adquirieron la forma de película. La misma tenía un color azulado característico de la reacción de la genipina con los grupos amino del quitosano, pero tal reacción no fue suficiente para proveer a los dispositivos de la estructura adecuada para mantener la forma esférica.

La caracterización de las esferas y los estudios de hinchamiento llevados a cabo bajo diferentes variables de síntesis permitieron por un lado comprobar que las esferas estaban conformadas por el complejo polielectrolítico deseado y por otro, que la concentración de la solución de alginato y el pH de la misma influyen sobre la capacidad de hinchamiento de las esferas y por ende sobre el grado de entrecruzamiento logrado por las mismas. Sin embargo, los dispositivos no mantuvieron las morfologías requeridas para estudios de liberación de compuestos de interés pertinentes. Lo cual pone en evidencia que en esta forma de combinación, no se logra una optimización efectiva del grado de entrecruzamiento, ya sea electrostático o covalente, para mantener una forma estable de la esfera. La interacción de los grupos amino del quitosano con genipina bloquea a los mismos para una interacción posterior con los grupos carboxilatos del alginato, dándose para estos casos, una baja interacción electrostática en la interfase corazón/capa externa.

Por otro lado, la membrana formada en la interfase por el complejo electrostático entre el quitosano y el alginato puede probablemente impedir el ingreso de moléculas de genipina que intensifiquen el entrecruzamiento en el

corazón Y estas moléculas pueden difundir hacia el exterior en lugar de hacerlo hacia el interior.

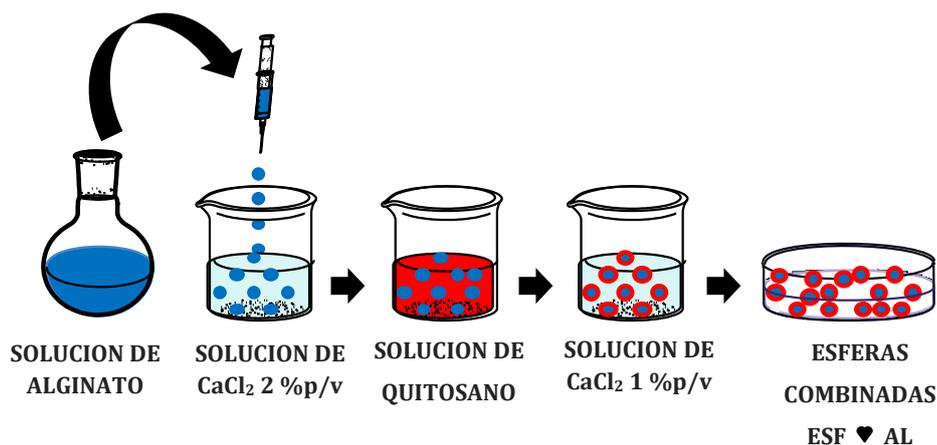
Por lo tanto, la etapa siguiente de trabajo fue el desarrollo de otro tipo de esferas combinadas, las de corazón de alginato y cubierta de quitosano.

5.2.III.6 Preparación de esferas combinadas: Corazón alginato-Cubierta quitosano

Las propiedades mecánicas y de permeabilidad de las esferas simples de alginato pueden ser mejoradas por la suma de un polímero como el quitosano, ya que al presentar las esferas de alginato grupos carboxilatos, los mismos pueden unirse químicamente con el quitosano que presenta grupos amino libres. A continuación se detallan los resultados obtenidos en cuanto a la preparación, caracterización y estudios de liberación de compuestos desde esferas combinadas de corazón de alginato y cubierta de quitosano (ESF ♥AL).

En este caso, el alginato formando parte del corazón de la esfera podría funcionar como un buen reservorio de la droga y el quitosano, en la capa externa, regularía la velocidad de liberación, además de ser también un transportador de droga. Esta combinación podría permitir una alta concentración de droga incorporada con un tiempo mayor de liberación, manteniendo una dosis efectiva por un lapso prolongado de aplicación del dispositivo.

Las esferas se realizaron de la siguiente manera: se preparó una solución de alginato al 4% p/v, se mantuvo en agitación por dos horas y luego se goteó con una jeringa de 2 mm de diámetro sobre una solución de CaCl_2 2% p/v. Las esferas formadas en la solución gelificante de CaCl_2 fueron dejadas en la misma por 10 minutos o por 21 horas. Una vez transcurrido este tiempo, fueron colectadas y colocadas en una solución de quitosano 1 % p/v (disuelto en HCl 0,1 M) por 10 minutos, y finalmente fueron puestas en una solución de CaCl_2 1% p/v por 10 minutos más (Esq. 5.14 y Fig. 5.18). Se estudiaron diferentes variables en la síntesis de estos dispositivos, dichos experimentos serán oportunamente explicados al comienzo de la sección donde se muestren tales resultados.



Esquema 5.14: Formación de esferas combinadas ESF ♥ AL.



Figura 5.18: Fotografía de ESF ♥ AL.

5.2.III.6.1 Caracterización

5.2.III.6.1.1 Espectroscopía infrarroja (FT-IR)

La composición química de las esferas combinadas fue analizada mediante espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier. En la figura 5.19 se observan los picos característicos de los espectros control de alginato y quitosano y el del complejo polielectrolítico formado.

En el espectro del quitosano se puede observar la banda ancha a los 3451 cm^{-1} correspondiente al estiramiento del enlace O-H, el pico a los 2875 cm^{-1} demuestra el estiramiento C-H, a 1652 cm^{-1} se ve el pico correspondiente a la frecuencia de torsión NH_2 , mientras que las bandas a los 1080 cm^{-1} y a los 1030 cm^{-1} se debe al estiramiento antisimétrico y simétrico del enlace C-O.

En el espectro del alginato se puede observar que la banda de los 1030 cm^{-1} (estiramiento C-O-C) corresponde a su estructura de sacárido, y los picos de 1616 cm^{-1} y 1415 cm^{-1} se adjudican a los estiramientos simétricos y asimétricos de los grupos carboxilatos de la sal.

La banda a los 3400 cm^{-1} se adjudica al estiramiento de los grupos OH.

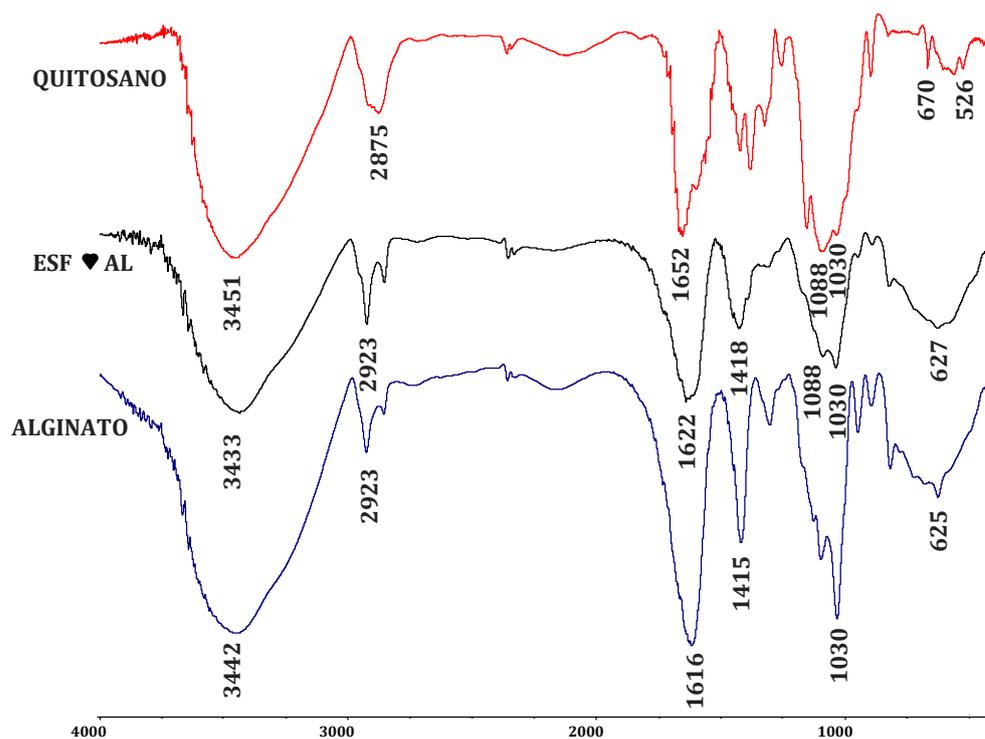


Fig. 5.19: Espectro FT-IR de quitosano (rojo), alginato (azul) y ESF♥AL (negro).

Del análisis de los espectros mostrados en la figura 5.19 se puede observar que el espectro correspondiente a la esfera de corazón de alginato se corresponde exactamente a la suma de los espectros de cada polímero por separado. Se observa claramente el ensanchamiento de la banda a 1622 cm^{-1} que incluye las bandas de 1616 cm^{-1} del alginato y de 1652 cm^{-1} del quitosano. El mismo comportamiento es observado en la zona a $2923\text{-}2875\text{ cm}^{-1}$ y a 620 cm^{-1} . El hecho de que no se observe la banda correspondiente al carbonilo del ácido del alginato, y si la del carboxilato, corrobora la formación de una interacción electrostática entre el alginato y el quitosano.

5.2.III.6.1.2 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

En la figura 5.20 se observan los termogramas correspondientes a esferas de alginato, de quitosano y a las ESF ♥ AL. En el análisis del termograma del alginato (Fig. 5.20 a), se puede observar un pico ancho endotérmico alrededor de los 170 °C que corresponde a la interacción de los grupos COO⁻ del alginato con los iones Ca²⁺ en la conocida conformación de “caja de huevo” (Fernandez-Hervas *et al.* 1998; Gonzalez-Rodriguez *et al.* 2002), mientras que en el termograma del quitosano se puede observar un pico angosto endotérmico alrededor de los 130°C correspondiente a la evaporación del agua (Fig. 5.20 b),

En el termograma correspondiente a las esferas combinadas (Fig. 5.20 c), se pueden ver los dos picos endotérmicos respectivos al alginato (171°C) y al quitosano (143°C). Esta característica del termograma revela que si bien ambos polímeros se encuentran en los dispositivos, cada cual conserva sus propiedades térmicas, lo que indicaría que tanto el alginato como el quitosano ocupan en el dispositivo secciones de ubicación particulares y definidas.

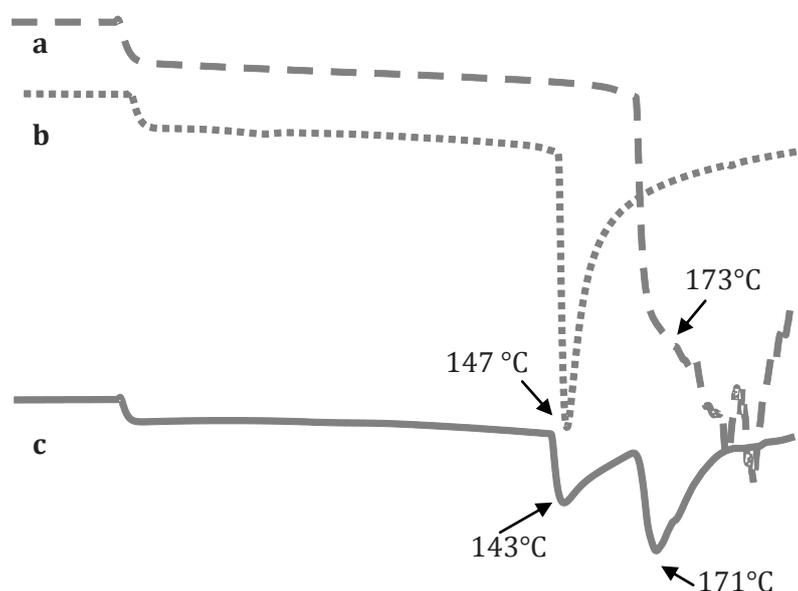


Fig. 5.20: Termogramas correspondientes a esferas de alginato (a), esferas de quitosano (b) y ESF ♥ AL (c).

5.2.III.6.1.3 Microscopia diferencial de barrido (SEM)

La caracterización morfológica tanto de la superficie de las esferas, como del interior de las mismas fue realizada mediante SEM. A partir de este estudio se pudo corroborar la existencia de una marcada diferencia entre la superficie de la esfera de alginato sin cubierta de quitosano y aquella que tenía tal recubrimiento (ESF ♥AL). La Figura 5.21 muestra que la esfera no recubierta presenta una superficie lisa y homogénea, mientras que la esfera modificada con la cubierta de quitosano dispone la formación de gránulos derivados del arreglo entre las cadenas del polímero cuando estos productos reaccionaron.

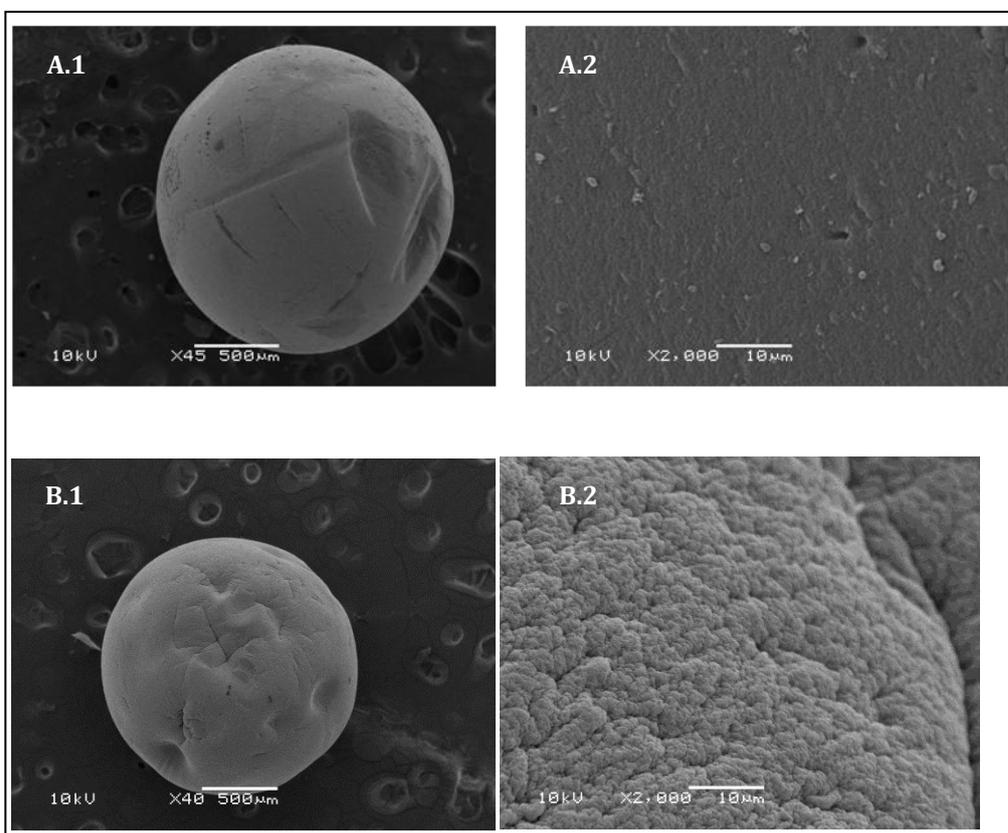


Figura 5.21: Micrografías SEM de esferas de alginato (A) y esferas de alginato con cobertura de quitosano (ESF ♥AL) (B).

También se estudiaron mediante SEM las morfologías de las esferas a partir de la modificación del pH de la solución de CaCl_2 gelificante. Se prepararon

soluciones a pH de 3, 6 y 9 por la adición de HCl a la solución de alginato. Los pasos posteriores a la síntesis se mantuvieron iguales.

Se puede observar en la Fig. 5.22 que tanto las esferas realizadas a pH de 3 y 6 muestran surcos en la superficie. Esta morfología se atribuye al menor entrecruzamiento experimentado en este tipo de esferas que el observado en la esfera realizada a un pH de 9.

La deshidratación necesaria realizada en estas esferas para la toma de micrografías SEM pudo contraer en una mayor medida a aquellas esferas que habían experimentado un menor entrecruzamiento; así, determinadas zonas laxas de este tipo de dispositivos pueden formar los surcos observados en las fotografías al deshidratarse completamente.

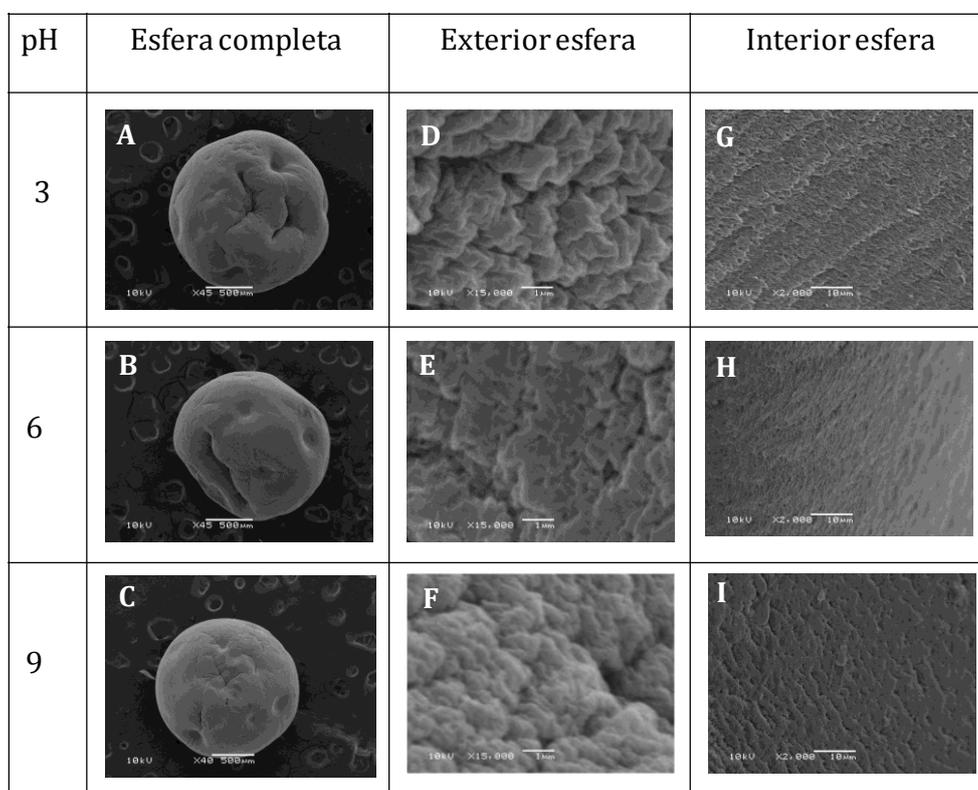


Figura 5.22: Micrografías SEM de las ESF♥AL realizadas bajo diferentes condiciones de pH. Las micrografías fueron obtenidas con una magnitud de 45 x (A, B), 40 x (C), 15000 x (D, E, F) y 2000 x (G, H, I).

En todos los casos, se observan en la superficie los gránulos propios de la interacción entre el alginato y el quitosano. En cuanto al aspecto obtenido en el interior de las esferas, se puede observar que a menores pH se produce un

deslizamiento del material en el momento de la preparación de la muestra que conduce a una apariencia “escalonada” (Fig. 5.22 G, H). A un pH mayor (Fig. 5.22 I), esta apariencia no se nota ya que el material posee el entrecruzamiento y por lo tanto rigidez necesaria para que este fenómeno no ocurra.

5.2.III.6.1.4 Microscopía óptica (*Watershed transformation*)

Con el objetivo de conocer la composición de las distintas partes de las esferas, esto es, corazón y cubierta, se prepararon diferentes esferas combinadas. En este sentido, se prepararon esferas de corazón de alginato y cubierta de quitosano con concentraciones de alginato de 4 y de 6 % p/v y a diferentes pH de la solución gelificante, (3, 6 y 9). Así, la comparación entre los diferentes índices de reflexión sufridos por una u otra sección de la esfera permitió la verificación de las ubicaciones de los polímeros en la misma.

El corte producido en la mitad de la esfera y la oportunidad de observar y fotografiar el lado interno de la misma, otorga la oportunidad de comprender los diferentes índices de reflexión de la luz de acuerdo se trate de la zona interior (o corazón) o la zona exterior (o cubierta) (Fig. 5.23).



Figura 5.23:ESF ♥ AL cortadas por la mitad. Estas fotografías **no** presentan aún la caracterización producida por el programa “*Watershed transformation*”.

La reflexión de la luz dependerá de la topografía y de la composición química de la muestra, de este modo en la Figura 5.24 se puede por un lado, comprobar que las ESF ♥AL efectivamente están formadas por un corazón compuesto de un material amorfo (alginato), mientras que la cubierta de la misma se compone de un material de características cristalinas (quitosano). Y por otro lado permite demostrar que el aumento en el pH de la solución gelificante otorga a la capa externa de las esferas, un mayor espesor en su cobertura.

Las cadenas poliméricas que componen el alginato se encuentran dispuestas de manera desordenada, al no tener un orden establecido, la luz puede pasar a través de esa zona sin provocar grandes índices de reflexión ya que su carácter amorfo le confiere una cierta transparencia y por lo tanto una baja reflexión de la luz (Esq. 5.15).

No obstante, en la cubierta del material en estudio se da otra situación: el quitosano es un material de características cristalinas, las moléculas que forman las cadenas de este polímero se encuentran mayormente ubicadas de manera ordenada y dispuestas de forma compacta una al lado de la otra, confiriéndole de esta manera la propiedad de opacidad

Las zonas altas o “brillantes” de la Figura 5.20 corresponden entonces a un material de características cristalinas que permite un alto índice de reflexión de la luz.

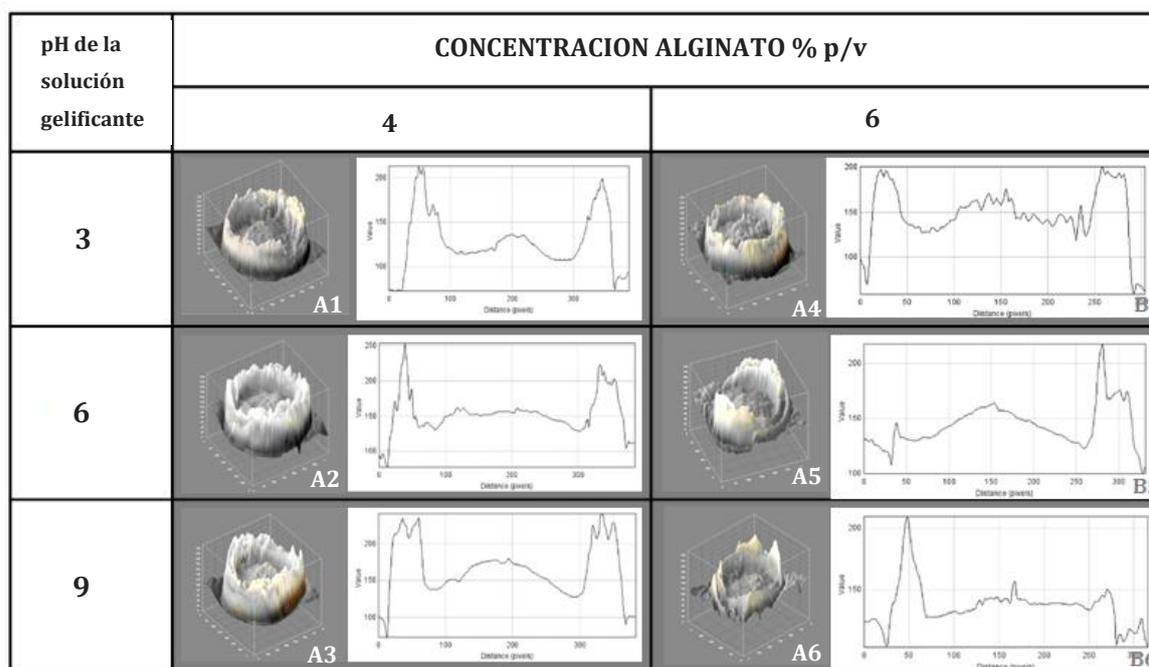
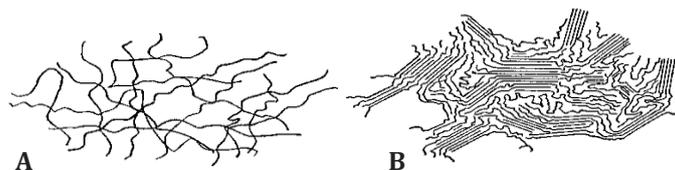


Figura 5.24. Fotografías obtenidas con microscopio óptico y posterior transformación de las mismas a través del programa *Watershed transformation* de las ESF ♥ AL. Fotografías transformadas (A) y perfil del índice de reflexión (B).



Esquema 5.15. Disposición de las cadenas poliméricas en polímeros tipo amorfo (A) y cristalino (B).

En cuanto a la concentración de alginato utilizada para realizar las esferas, se pudo comprobar por esta técnica que aquellas sintetizadas con una concentración de 6 % P/V y a pHs de 6 y 9 no mostraron una homogeneidad en la cubierta de quitosano ya que tanto en las “fotografías”, como en los perfiles del corte se pueden observar zonas de bajo índice de reflexión de la luz.

Los resultados obtenidos con este tipo de fotografías permitieron comprobar también la ubicación de los polímeros en este tipo de esferas combinadas. Los relieves altos en las fotografías obtenidas fueron indicadores de la presencia de un material de características cristalinas como el quitosano, mientras que los relieves bajos demostraron la presencia de un material amorfo como el alginato. Se pudo demostrar la conformación en cuanto a secciones amorfas/cristalinas por esta técnica.

Además, se comprobó que el aumento en el pH de la solución gelificante aumenta el grado de reacción entre los grupos COO^- del alginato y los Ca^{2+} de la solución de CaCl_2 . El pKa del alginato es de 3,6 por lo tanto en ambientes crecientes de basicidad sus grupos reaccionantes se encuentran en condiciones óptimas de interacción y entrecruzamiento, dando de esta manera áreas más sólidas y de mayor espesor a medida que aumenta el pH de la solución gelificante.

5.2.III.6.2 Estudios de propiedades

5.2.III.6.2.1 Hinchamiento

Como se realizó en la experiencia anterior, en este caso se estudió el hinchamiento como propiedad para poder conocer la influencia de las diferentes variables de síntesis en el empaquetamiento y comportamiento del retículo polimérico.

El análisis de hinchamiento de las esferas combinadas se realizó modificando variables de síntesis como:

- concentración de alginato (4 y 6 % P/V),
- pH de la solución gelificante (3, 6 y 9),
- relación molar ($\text{Ca}^{2+}/\text{COO}^-$) (1,5, 3,5 y 5,4)
- tiempo de curado (10 minutos y 21 horas).

Los experimentos de hinchamiento se dividieron en dos etapas: en una primera instancia se estudió el efecto de la concentración de alginato y del pH de la solución gelificante sobre la posibilidad de hinchamiento de las esferas. En una segunda parte se analizó el efecto de la relación molar ($\text{Ca}^{2+}/\text{COO}^-$), el tiempo de curado y una vez más se incorporó la variante pH de la solución gelificante para los análisis de hinchamiento correspondientes (Tablas 5.5 y 5.6).

Tabla 5.5: Primera etapa de análisis del hinchamiento de ESF ♥ AL. Variables estudiadas: pH de solución gelificante y concentración de alginato. La relación molar ($\text{Ca}^{2+}/\text{COO}^-$) fue de 3,5 y el tiempo de curado de 10 minutos.

pH solución gelificante	Concentración alginato (% p/v)
3	4
	6
6	4
	6
9	4
	6

Tabla 5.6: Segunda etapa de análisis del hinchamiento de ESF ♥AL. Variables estudiadas: Relación molar ($\text{Ca}^{2+}/\text{COO}^-$), tiempo de curado y pH de solución gelificante. La concentración de alginato fue de 4 % p/v.

Relación molar ($\text{Ca}^{2+}/\text{COO}^-$)	Tiempo de curado	pH solución gelificante
1,5	10 min	6
		9
	21 horas	6
3,5	10 min	9
		6
	21 horas	6
5,4	10 min	9
		6
	21 horas	6
		9

A continuación se detallan los resultados obtenidos. Analizando las variables de concentración de alginato y pH de la solución gelificante (y dejando fijas las otras variables como relación molar en un valor de 3,5 y el tiempo de curado en 10 minutos), se comprobó que a medida que aumenta el pH de la solución gelificante, se obtienen menores índices de hinchamiento. Este comportamiento es también debido al mayor entrecruzamiento del alginato con iones calcio, ya que en condiciones alcalinas (pH9) y a pH 6 el grupo COO^- del alginato se encuentra como tal y por lo tanto está en condiciones óptimas de interaccionar con los grupos Ca^{2+} del CaCl_2 y formar estructuras tridimensionales más rígidas.

Con respecto a la concentración de alginato utilizada para sintetizar las esferas, se comprobó que una mayor concentración del polímero conduce a esferas menos entrecruzadas ya que se lograron en esta condición esferas más hinchables (Fig. 5.25).

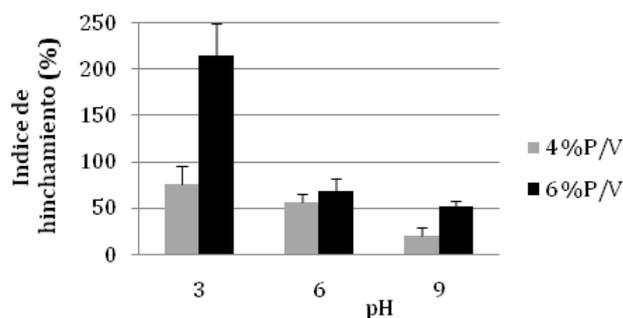


Figura 5.25: Índice de hinchamiento de las ESF \blackheartsuit AL sintetizadas con diferentes concentraciones de alginato (4, 6) y a diferentes pH de la solución gelificante (3, 6 y 9).

Probablemente, una mayor concentración de alginato no alcanza a interaccionar electrostáticamente con todos los centros activos del quitosano. El alginato que sobra y que no participa del entrecruzamiento, al ser más hidrofílico, aumenta el índice de hinchamiento.

Este comportamiento se observa claramente a pH 3, cuando el quitosano está con carga positiva y el alginato con carga neutra y por este motivo no hay fuertes interacciones electrostáticas entre los polímeros y el quitosano se hincha en mayor medida. Por su parte, cuando se aumenta la concentración de alginato a 6% p/v por ser más hidrofílico, aumenta también el hinchamiento que alcanza

valores mayores que a una concentración de 4 % p/v. A este pH no se favorece el entrecruzamiento de alginato con calcio.

A pH 6 se favorecen las interacciones electrostáticas, porque el quitosano posee algunas cargas positivas y el alginato se encuentra con carga negativa, esto favorece tanto el entrecruzamiento electrostático entre los polímeros, como el del alginato con calcio y disminuye el hinchamiento. No obstante, cuando el pH aumenta a 9, el quitosano tiene carga neutra, pero el alginato posee cargas negativas, esto favorece aún más el entrecruzamiento con el calcio, las esferas se vuelven más entrecruzadas y por ende se obtienen los menores valores de hinchamiento.

En segundo lugar, analizando la Figura 5.26 (A) y considerando cada relación molar independientemente, se observa que los mayores índices de hinchamiento se lograron a menores pH. El aumento en la relación $\text{Ca}^{2+}/\text{COO}^-$ a pH 6 tiene una influencia negativa en el índice de hinchamiento solamente cuando se trabaja con la relación mayor (5,4), en la cual ya hay una reacción de entrecruzamiento efectiva con el alginato, alcanzándose en este caso la mayor densidad o compactación del retículo polimérico. Cabe señalar que a este pH siguen siendo importantes las interacciones electrostáticas por lo tanto a relaciones menores de 1,5 y 3,5, se favorecen más las interacciones electrostáticas entre los dos polímeros que las del alginato con calcio. A pH 9 la carga negativa del COO^- del alginato favorece notablemente las reacciones de entrecruzamiento conduciendo a menores hinchamientos, esta tendencia se ve aún más marcada al aumentar la relación $\text{Ca}^{2+}/\text{COO}^-$.

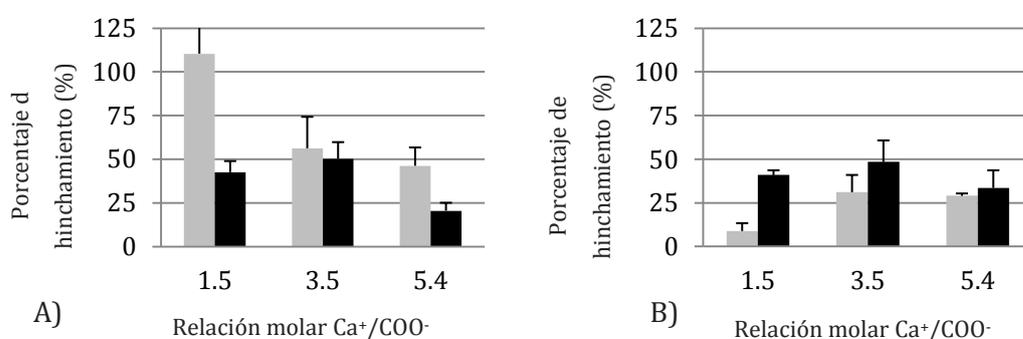


Figura 5.26. Porcentaje de hinchamiento de ESF♥AL realizadas con relaciones de $\text{Ca}^{2+}/\text{COO}^-$: 1,5; 3,5 y 5,4 y con pHs de la solución gelificante: 6 (■) y 9 (■).

Tiempo de curado: 10 minutos (A) y 21 horas (B).

En el caso de las esferas realizadas con un tiempo de entrecruzamiento de 21 horas (Figura 5.26 B), se puede observar que esta mayor exposición a la solución gelificante provocó para todos los casos, esferas más entrecruzadas y menores índices de hinchamiento.

Por último, es interesante destacar que la tendencia observada a bajos tiempos de entrecruzamiento, donde los mayores hinchamientos se lograron a bajos pH, se invirtió cuando el tiempo de entrecruzamiento fue mayor, observándose en este caso los mayores índices de hinchamiento a mayores pH de la solución entrecruzante. Esto significa que la interacción del Ca^{2+} con COO^- va desplazando a las interacciones electrostáticas entre los grupos amino del quitosano y los COO^- del alginato, dando lugar con el tiempo a estructuras de entrecruzamiento más estables.

5.2.III.6.2.2 Texturometría

El análisis de las propiedades mecánicas de las ESF ♥AL se realizó modificando variables de síntesis como: pH de la solución gelificante (3, 6 y 9), relación molar (Ca^{2+}/COO^-) (1,5, 3,5 y 5,4) y tiempo de curado (10 minutos y 21 horas).

La capacidad de compresión de un material depende principalmente de la flexibilidad o rigidez del material, lo cual está estrechamente relacionado con el grado de entrecruzamiento, ya sea físico o covalente. El análisis de estos parámetros en las diferentes condiciones de reacción se muestra en la figura 5.27.

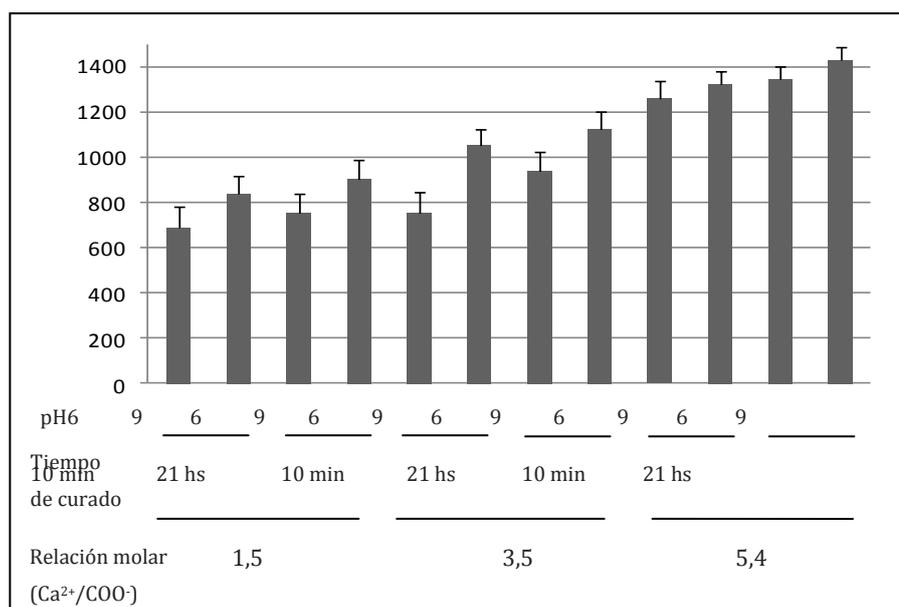


Figura 5.27: Carga de compresión (g/f) soportada por las ESF ♥AL realizadas con diferentes variables de síntesis: pH, tiempo de curado y relación molar (Ca^{2+}/COO^-).

Como se puede observar, el efecto de la relación $\text{Ca}^{2+}/\text{COO}^-$ es la variación que marcó las mayores diferencias en las propiedades mecánicas de las esferas. A medida que aumenta la relación molar desde 1,5 a 5,4, aumenta la carga, es decir el material se hace más resistente y más rígido. La mayor relación molar permite una mayor concentración de Ca^{2+} disponible para interactuar con los grupos $-\text{COO}^-$, de esta manera se logra una mayor rigidez en el material y es por eso que las esferas sintetizadas con esta relación molar son las que registran la mayor carga de compresión (g/f). De esta manera, las esferas sintetizadas con una relación molar de 5,4, con un tiempo de curado de 21 horas y a pH de 9 fueron las que soportaron mayores cargas de compresión para lograr una deformación del 50%.

También se estudió el efecto del pH de la solución gelificante sobre la carga de compresión que pudieron soportar las esferas bajo la presión del texturómetro. A medida que aumentaba el pH de la solución gelificante aumentó la carga resistida por el material. Aquellas esferas que fueron sintetizadas a un pH de 9 soportaron mayores cargas para deformarse a un 50%. La explicación de este comportamiento, se relaciona también con un mayor grado de entrecruzamiento favorecido por las interacciones electrostáticas del alginato con calcio.

Por último se estudió también si el tiempo en que las esferas eran mantenidas en la solución de CaCl_2 afectaba la rigidez del material, en este sentido se observó que a una relación molar de $\text{Ca}^{2+}/\text{COO}^-$ de 1,5 no se observan diferencias significativas entre las esferas realizadas a diferentes tiempos de entrecruzamiento y a iguales pH, pero a partir de la relación molar de 3,5 sí se observan diferencias en cuanto a las esferas realizadas con distintos tiempo de curado, siendo las que estuvieron más tiempo de entrecruzamiento (21 hs), diferentes significativamente de las que estuvieron 10 minutos.

5.2.III.6.3 Conclusiones parciales

En esta sección del capítulo se estudió la obtención de esferas combinando el alginato y el quitosano y se realizó su posterior caracterización con el objeto de

obtener un material con las mejores condiciones como dispositivo de liberación controlada de diferentes compuestos.

Para ello, se realizaron en una primera instancia esferas de tipo ESF♥QUI, pero las pobres propiedades mecánicas observadas en estos dispositivos, adjudicada principalmente a una baja eficiencia de las interacciones, electrostáticas o covalentes para dar origen a un retículo estable, condujeron la experimentación hacia la elaboración de otro tipo de esferas, las ESF ♥AL.

Con estos dispositivos, se pudo demostrar por medio de ensayos de caracterización que tanto el quitosano como el alginato estaban presentes en las esferas y además se pudo definir la ubicación de los mismos dentro del dispositivo. Se conoció el efecto de la concentración del alginato y del pH sobre la morfología y el entrecruzamiento logrado en las esferas.

Por su parte, los estudios de hinchamiento y texturometría demostraron que tanto el pH como la relación molar y el tiempo de entrecruzamiento influyen en las propiedades finales del material obtenido, siendo la combinación de la relación molar con el pH de la solución gelificante las variables que poseen una mayor influencia en la estructura final obtenida.

Los resultados encontrados por los estudios de hinchamiento y de propiedades mecánicas nos permiten concluir que mayores tiempos de curado, mayores pHs y alta relación de $\text{Ca}^{2+}/\text{COO}^-$ conducen a esferas más entrecruzadas y por lo tanto más rígidas o de mayor resistencia mecánica. Esto se debe a que esas condiciones son las que favorecen la formación de “caja de huevo”, otorgándole al retículo polimérico de alginato una mayor densidad de entrecruzamiento y por ende una mayor estabilidad.

5.2.III.4 Estudios de liberación

Habiendo analizado la estructura química, morfológica y las propiedades mecánicas de las ESF ♥AL se procedió a estudiar la incorporación y liberación de diferentes compuestos desde tales dispositivos.

Se analizó la incorporación y liberación de Beta-Caroteno (BC), el colorante más hidrofóbico, por técnicas de Espectrofotometría UV-visible y los compuestos

feromonales fueron analizados por extracción en solvente-cromatografía gaseosa en el caso de STOL y por SPME- cromatografía gaseosa para los casos de sulcatona (STONA), 3-pentanol (3 PEN) y STOL.

5.2.III.4.1 Liberación de Beta Caroteno

Para la realización de las esferas con BC, el mismo se incorporó a la solución de alginato en una proporción de 0,012 % p/p en relación al polímero (disuelto en etanol). Se mantuvo en agitación por dos horas y luego se goteó con una jeringa de 2 mm de diámetro sobre una solución de CaCl_2 2% p/v. La relación molar $\text{Ca}^{2+}/\text{COO}^-$ utilizada para estos experimentos fue de 3,5. El pH de dicha solución fue modificado a los fines de estudiar el efecto de dicha variación sobre la liberación lograda, obteniendo valores de 3, 6 y 9. Las esferas formadas en dicha solución se mantuvieron en agitación por 10 minutos y se incorporaron a una solución de quitosano de 1% p/v por 10 minutos, finalmente las esferas fueron colectadas y puestas en una solución de CaCl_2 1% p/v por 10 minutos más.

Para realizar los experimentos de liberación, las esferas fueron colocadas en viales de liberación con 2 mL de tetrahidrofurano como solvente de extracción.

Diariamente el solvente fue extraído y analizado por UV a una longitud de onda de 455 nm. El mismo volumen extraído fue repuesto hasta que no se observó señal.

Tanto en los estudios con BC como con los de STOL, STONA y 3 PEN las soluciones que estuvieron en contacto con las esferas conteniendo algún tipo de compuesto, fueron preservadas para un posterior análisis. Dicho estudio consistió en una extracción líquido-líquido. La misma se realizó en una ampolla de decantación donde se extrajo la cantidad del compuesto no incorporado con un solvente adecuado, luego el mismo fue analizado por medio de curvas de calibración realizadas para tal fin.

En la figura 5.28 se puede observar que el aumento en el pH de la solución gelificante provocó un aumento en la liberación de BC, alcanzando con un pH de 9 un porcentaje de liberación de 50%.

Como se explicó en la sección anterior, el desarrollo de esferas simples de alginato había arrojado porcentajes de liberación de este compuesto de 35%,

mientras que se había encontrado valores de pérdida del compuesto en las etapas de síntesis de un 22%.

En este sentido, las ESF ♥ AL, mejoraron tales resultados ya que en condiciones iguales de concentración de alginato (4% p/v), relación molar $\text{Ca}^{2+}/\text{COO}^-$ (3,5), pH de la solución gelificante (9) y tiempo de curado (10 minutos), pero con la suma de una película de quitosano se pudo disminuir la pérdida del compuesto en el momento de la síntesis a un 14% y alcanzar mayores porcentajes de liberación (50%).

En el caso de las ESF ♥ AL realizadas a pHs de 3 y 6 se encontraron valores de 38% y de 35% de BC liberado.

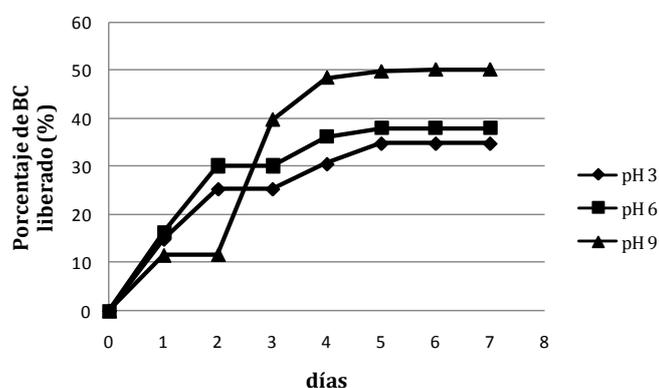


Figura 5.28: Liberación de BC desde ESF ♥ AL realizadas con distintos pH de la solución gelificante: 3, 6 y 9

En este sentido, el complejo polielectrolítico formado entre el alginato y el quitosano y las propiedades mecánicas logradas por tal interacción, permitieron la cobertura de la esfera necesaria para disminuir la porosidad de la misma y contribuir al mayor grado de retención del BC (Sen Gupta *et al.* 2012). Una vez más se confirma que en condiciones alcalinas (pH 9) de la solución gelificante se producen las condiciones óptimas de entrecruzamiento entre los grupos COO^- del alginato y Ca^{2+} del CaCl_2 , para un entrecruzamiento eficaz y asimismo, una interacción adecuada con el quitosano.

El mayor porcentaje de liberación alcanzado por las esferas hechas a un pH de 9 también se relaciona a los resultados de hinchamiento y texturometría

realizados previamente, donde se había concluido que aquellas esferas realizadas a mayores pH eran esferas más entrecruzadas, más rígidas y poseían menores índices de hinchamiento. Estas propiedades pueden haber provocado un retardo en la liberación de los compuestos que había en su interior.

5.2.III.4.2 Liberación de sulcatol. Análisis por Cromatografía gaseosa

Para este tipo de ensayo, se incorporó STOL a una solución de alginato de 4% p/v en una proporción de 100% p/p. Se mantuvo la solución en agitación por dos horas y luego la misma fue goteada sobre una solución de CaCl_2 2% p/v. La relación molar de $\text{Ca}^{2+}/\text{COO}^-$ utilizada para estos experimentos fue de 3,5 y el pH de la solución gelificante de 9. Se utilizó tal pH ya que los ensayos previos realizados con BC habían demostrado que era a este valor con el que se lograban la mejor relación de retención/liberación del compuesto.

Las esferas formadas en dicha solución se mantuvieron en agitación por 10 minutos y se incorporaron a una solución de quitosano de 1% p/v por 10 minutos, finalmente las esferas fueron colectadas y puestas en una solución de CaCl_2 1% p/v por 10 minutos más.

Para realizar los experimentos de liberación, las esferas fueron colocadas en viales de liberación con 5 mL de etanol como solvente de extracción.

Diariamente el solvente fue extraído, analizado por cromatografía gaseosa y cuantificado por medio de curvas de calibración. El mismo volumen extraído fue repuesto en el vial durante los días en que se observó señal cromatográfica.

En la figura 5.29 se observa la liberación acumulada de STOL alcanzada por estas esferas, donde se puede ver que al día nueve de la experiencia se liberó un 70% del total de droga incorporada.

Tanto los resultados de la incorporación efectiva del STOL como del porcentaje de liberación alcanzado, sugieren que la cubierta de quitosano permitió disminuir la porosidad del alginato y lograr por un lado una mayor cantidad de compuesto incorporado y por otro, una liberación más sostenida del compuesto.

En este caso también se analizó el porcentaje de droga no incorporada por el análisis de las soluciones de síntesis, así se registró un 11 % de STOL no

incorporado en las esferas combinadas (Tabla 5.7). Este valor es significativamente menor que el encontrado en las soluciones de síntesis de las esferas simples de alginato y de quitosano, donde se habían encontrado valores de no incorporación de 32% y 15% respectivamente.

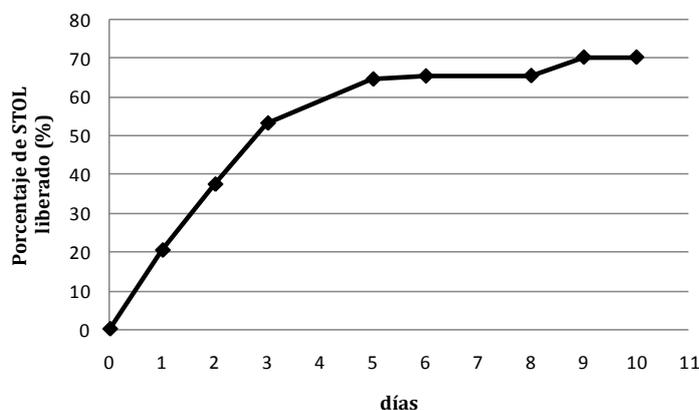


Figura 5.29: Liberación de sulcatol desde ESF ♥ AL. Liberación en medio líquido. Detección por cromatografía gaseosa. Condiciones de preparación: Concentración alginato: 4% p/v; pH de la solución gelificante: 9; relación molar Ca²⁺/COO⁻: 3,5 y tiempo de curado de 10 minutos.

Tabla 5.7: Porcentaje de STOL incorporado, liberado y retenido desde las ESF ♥ AL

Porcentaje de STOL (%)		
Incorporado	Liberado	Retenido
81	70	30

5.2.III.4.3 Liberación de sulcatol, sulcatona y 3-pentanol. Análisis por Microextracción en Fase Sólida (SPME).

Habiendo estudiado el perfil de liberación del STOL en medios líquidos por cromatografía gaseosa, fue necesario conocer entonces la liberación en estado gaseoso tanto de ese compuesto, como de los otros dos volátiles que integran el blend feromonal. La detección por parte del insecto es a través del aire y por esta razón era de fundamental interés conocer la liberación en estado gaseoso. En este

sentido se prepararon esferas combinadas que contenían independientemente STOL, STONA o 3-PEN.

Para el primer ensayo de liberación en aire, se prepararon esferas con STOL. Se utilizó una solución de alginato de 4% p/v, se incorporó a la misma el compuesto en una proporción de 100% p/v, se mantuvo en agitación por dos horas y se goteó sobre una solución de CaCl_2 2% p/v. La relación molar de $\text{Ca}^{2+}/\text{COO}^-$ fue de 3,5.

Se analizó el efecto de dos variables de la síntesis en la liberación de este compuesto, así se modificó el pH de la solución gelificante, obteniendo valores de 3, 6 y 9 y además se varió el tiempo de entrecruzamiento dejando las esferas sintetizadas a pH de 9 en la solución gelificante 10 minutos o 21 horas. Luego las esferas fueron colocadas en una solución de quitosano 1% p/v, fueron dejadas en la misma por 10 minutos y luego se colocaron en una solución de CaCl_2 1% p/v por 10 minutos más.

500 mg de esferas fueron colocadas en un vial cerrado. Se mantuvieron en esa condición por 24 horas, pasado este tiempo se colocó una fibra de polidimetilsiloxano por tres minutos en contacto con los volátiles del vial y se inyectó la fibra en un cromatógrafo gaseoso. Una vez colectada la muestra, los volátiles contenidos en el vial fueron arrastrados con una corriente de N_2 . Luego el vial fue cerrado nuevamente y a las 24 horas se volvió a proceder de la misma manera. Se tomaron muestras hasta que no se observó señal en el cromatógrafo. Las medidas se hicieron con tres réplicas.

Las soluciones de síntesis fueron analizadas para examinar la cantidad del compuesto que no había sido efectivamente incorporado en los dispositivos. Tal análisis se realizó por una extracción líquido-líquido y fue cuantificado por cromatografía gaseosa.

En la figura 5.30 se muestran los perfiles de liberación alcanzados con las esferas realizadas a diferentes pHs. En la sección (a) de la figura se observa la cantidad de STOL liberada expresada en miligramos y se puede ver que las esferas sintetizadas a pH de 3 y 6 alcanzan al día cinco de la experiencia la meseta de liberación del compuesto, mientras que aquellas sintetizadas a pH de 9 la alcanzan al día siete. Se encontraron diferencias significativas entre la cantidad liberada a

pH 3 y 9, siendo la liberación alcanzada a pH 6 no significativa al compararla con los otros pH.

La cantidad de miligramos liberados por día supone valores adecuados para su detección por parte del insecto de interés.

En la sección (b) de la figura 5.30 se observa el porcentaje de liberación de STOL, en este sentido se puede ver que tanto las esferas realizadas a pH 3 y 6 liberaron el total del compuesto incorporado, mientras que aquellas hechas a pH 9 lo hicieron en un 95%.

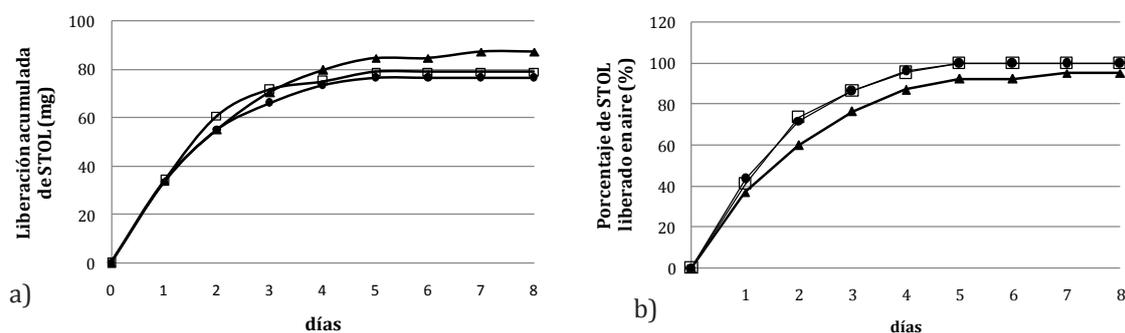


Figura 5.30: Liberación de STOL desde ESF ♥ AL. Liberación en medio gaseoso. Detección por SPME.

a) Cantidad de STOL liberado en mg. b) Porcentaje de STOL liberado (%). ● pH3, □ pH6, ▲ pH9.

Con el objetivo de estudiar si los compuestos incorporados se habían liberado en su totalidad desde las esferas, se analizaron las mismas una vez que habían dejado liberar en aire. Las mismas se colocaron en viales de liberación y se extrajo lo que pudo haber quedado dentro de las mismas con solventes adecuados. El análisis y la cuantificación de tales volúmenes se realizó por cromatografía gaseosa utilizando curvas de calibración.

Si bien no se encontraron diferencias notorias en cuanto al porcentaje de liberación por los tres tipos de esferas ensayadas, sí hubo diferencias en los porcentajes que no fueron incorporados y que quedaron en las soluciones de síntesis. En este sentido, se encontraron porcentajes de 19, 15 y 11 % de STOL para las esferas hechas a pHs 3, 6 y 9, respectivamente (Tabla 5.8).

Tabla 5.8: Porcentaje de STOL incorporado, liberado y retenido desde las ESF ♥AL preparadas bajo distintos pHs de la solución gelificante*

Porcentaje de STOL (%)			
pH	Incorporado	Liberado	Retenido
3	81	100	0
6	85	100	0
9	89	95	5

*Condiciones de síntesis: concentración de alginato: 4% p/v; relación molar: 3,5 y tiempo de curado: 10 minutos y pH de la solución gelificante: 3,6 y 9.

Los resultados de caracterización y de propiedades mecánicas de las esferas permitieron conocer las propiedades de los dispositivos obtenidos en diferentes condiciones de síntesis. De esta manera se pudo elegir aquellas condiciones que se relacionaran con una adecuada *performance* de liberación.

Así también, la liberación de STOL desde las ESF ♥AL demostró que esferas realizadas a una concentración de 4% p/v, con una relación molar de $\text{Ca}^{2+}/\text{COO}^-$ de 3,5 y a un pH de 9 de la solución gelificante son adecuadas para su uso como dispositivos de liberación de ese compuesto. En este sentido y habiendo tomado como efectivo el pH de 9 para la elaboración de las esferas, se procedió a ensayar las esferas con los otros dos compuestos del blend feromonal.

A continuación se detallan los resultados en cuanto a la liberación de STOL, STONA y 3-PEN desde tales dispositivos.

Las ESF ♥AL conteniendo tales compuestos se prepararon de la siguiente manera: se incorporaron los compuestos de manera independiente a soluciones de alginato 4 % p/v en una proporción 100% p/p en relación al polímero. Se dejó homogeneizar por dos horas y se goteó sobre soluciones de CaCl_2 2 % p/v, de pH 9 y con una relación molar de $\text{Ca}^{2+}/\text{COO}^-$ de 3,5. Las esferas formadas en tal solución fueron mantenidas por períodos de 10 minutos o de 21 horas para estudiar el efecto de dicha variable en la liberación de los compuestos.

En la tabla 5.9 se observan los análisis de la efectiva incorporación de los compuestos en las esferas, así también como los porcentajes liberados y retenidos de las ESF ♥ AL. Al analizar tales porcentajes se comprende que el tiempo de entrecruzamiento es fundamental para la adecuada incorporación de los compuestos dentro de los dispositivos: para las esferas realizadas con tiempos de 10 minutos de curado se encontraron porcentajes de incorporación de STOL, STONA y 3-PEN de 89, 90 y 85% respectivamente, mientras que en aquellas realizadas a 21 hs se encontraron porcentajes de incorporación de 61, 57 y 63% para los mismos compuestos.

Tabla 5.9: Porcentajes de STOL, STONA y 3-PEN incorporado, liberado y retenido desde las ESF♥AL preparadas bajo distintos tiempos de curado.

		Compuestos	Incorporado	Liberado(Retenido
			(%)	%)	(%)
Tiempo de curado	10min	STOL	89	95	5
		STONA	90	100	0
		3-PEN	85	95	0
	21 horas	STOL	61	100	0
		STONA	57	100	0
		3-PEN	63	100	0

En esta experiencia quedó demostrado que limitar el contacto de las esferas de alginato que contienen el compuesto con la solución gelificante, evita la pérdida del mismo por difusión hacia la solución de CaCl_2 2% circundante.

Es así entonces que tanto el tiempo de entrecruzamiento como la película de quitosano que rodea la esfera afectan el porcentaje de compuesto incorporado. Un menor tiempo de entrecruzamiento provoca una mayor retención de un compuesto y el quitosano colabora en ese proceso de mantenimiento del mismo dentro de la esfera.

En la figura 5.31 se observan las cinéticas de liberación alcanzadas con las ESF♥AL realizadas con 10 minutos o 21 horas de entrecruzamiento.

En la sección (a) de la figura, se puede ver que la cantidad de compuestos liberados es significativamente mayor en aquellas esferas realizadas a 10 minutos de entrecruzamiento, el porcentaje de pérdida que se produjo en las esferas con 21

horas de curado y el mayor entrecruzamiento logrado en esas esferas puede haber provocado tal diferencia.

Particularmente para el STOL, se puede ver que los dispositivos sintetizados a 10 minutos de curado, registraron una liberación hasta el día siete de la experiencia de 87,23 mg lo que se corresponde con un 95% del total incorporado a las esferas; mientras que los dispositivos realizados a mayor tiempo de entrecruzamiento registraron liberación al día cinco de la experiencia de 73,1 mg, siendo esta cantidad el total del compuesto incorporado (Figura 5.30 I).

Para el 3-PEN, con las esferas realizadas a 10 minutos se registró una liberación de 95,7 mg al día seis de la experiencia correspondiente al 95% del total incorporado, mientras que con las elaboradas a 21 horas se registró al día cinco una liberación de 75,33 mg correspondiente al 100 % del compuesto incorporado (Figura 5.31 II).

Por su parte, para la STONA con 10 minutos de entrecruzamiento se registró al día nueve de la experiencia 107,65 mg liberados correspondientes a un 100% del compuesto incorporado, mientras que con 21 horas de curado se registró una liberación al día cinco de 68,43 mg (Fig. 5.31 III).

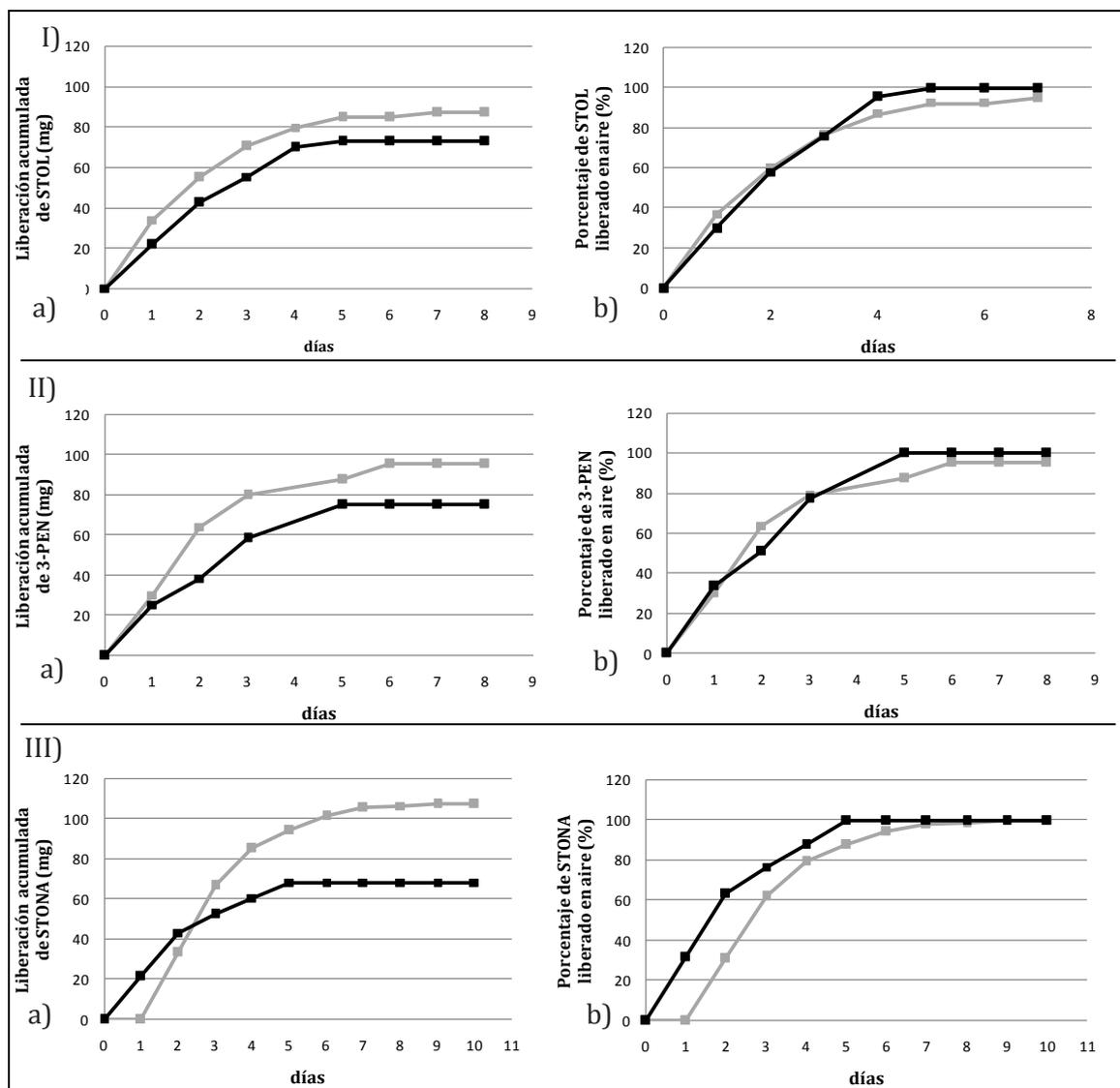


Figura 5.31: Liberación de STOL(I), 3-PEN (II) y STONA (III) desde ESF ♥ AL. Liberación en medio gaseoso. Detección por SPME. a) Cantidad de mg liberados b) Porcentaje liberado (%).

Condiciones de síntesis: Concentración alginato: 4% p/v, relación molar Ca^{2+}/COO^- : 3,5; pH solución gelificante: 9, tiempo de entrecruzamiento: (■) 10 minutos, (●) 21 horas.

Los resultados obtenidos por extracción SPME permitieron comprobar en primer lugar que los compuestos del *blend* feromonal eran efectivamente liberados desde las ESF ♥ AL en estado gaseoso, y esta propiedad cobra particular interés cuando se desea utilizar tales dispositivos como liberadores de volátiles de interés entomológico. Por otro lado, se pudo realizar una pseudo-cuantificación, que si bien no es un método directo de cuantificación, permitió conocer la cantidad de

miligramos liberados por día desde la masa de esferas muestreada. Este hallazgo permite hacer inferencias en cuanto a qué cantidad de compuesto es necesario aplicar en determinada situación, ya que para casos que se necesiten mayores o menores concentraciones de los compuestos en aire, se puede manejar dichos volúmenes desde la cantidad de esferas puestas a liberar.

Por último, habiendo estudiado el efecto de diferentes variables sobre la incorporación efectiva de los compuestos en las esferas y sobre la liberación de los mismos, se puede concluir que el aumento en el pH de la solución gelificante y el menor tiempo de curado conducen a mayores incorporaciones del compuesto en las esferas combinadas, este comportamiento repercute por ende en la cantidad de miligramos liberados por los dispositivos ya que en condiciones de pH de la solución gelificante de 9 se logró el mayor porcentaje de STOL liberado. El mismo comportamiento fue observado para STOL, STONA y 3-PEN.

Estos conceptos fueron tenidos en cuenta para la realización de los dispositivos que fueron empleados en los bioensayos comportamentales que se presentan en el capítulo siguiente.

5.3 Conclusiones

En este capítulo se presentaron los resultados obtenidos con cuatro tipos de dispositivos de liberación controlada de feromonas: películas, geles, esferas simples y esferas combinadas. Si bien hubo diferencias en los estudios realizados y por lo tanto en los resultados obtenidos con cada uno de ellos, podemos afirmar que los cuatro tipos de dispositivos incorporaron y liberaron alguno de los compuestos estudiados, BC, RC, STOL, STONA y 3-PEN.

Los dos polímeros utilizados, alginato y quitosano, resultaron adecuados para desarrollar las diferentes matrices. La secuencia de dispositivos desarrollados fue avanzando y modificándose según los resultados así lo demostraban y requerían, adquiriendo el criterio para fundamentar la preparación de un nuevo dispositivo. En este sentido y en primer lugar se estudiaron las películas de alginato y de quitosano (vía "seca") en su capacidad de captación y liberación de STOL en aire. Los resultados en cuanto a las películas de alginato demostraron que

la incorporación del compuesto afectó las propiedades mecánicas de la película ya que al incorporarlo, el dispositivo perdió estabilidad y no fue posible la formación de un dispositivo concreto. En cuanto a las películas de quitosano, si bien las mismas resultaron efectivas en la incorporación y liberación de STOL, se pudo comprobar que la vía “húmeda” permitió un mejor manejo de la cinética de liberación de la droga. La intención de obtener este tipo de sistemas condujo la experimentación hacia el segundo tipo de dispositivo desarrollado, el de geles (vía “húmeda”). En este sentido, se analizaron los dos polímeros propuestos como formadores de estas matrices y si bien, tanto el alginato como el quitosano demostraron ser buenos formadores de este tipo de dispositivos, la posibilidad de aumentar la relación volumen/superficie condujo la experimentación hacia el desarrollo de esferas simples.

Este tercer tipo de dispositivo también fue realizado con los polímeros en cuestión, pero el bajo porcentaje de compuesto liberado en el caso del quitosano y la rápida liberación de compuestos en el uso del alginato promovió el desarrollo del cuarto dispositivo estudiado en la presente tesis doctoral: el de esferas combinadas. Las mismas fueron estudiadas en las dos posibles combinaciones morfológicas alternando los polímeros en las secciones corazón o cubierta.

Las esferas de corazón de quitosano y cubierta de alginato no resultaron adecuadas debido a su baja estabilidad y eso motivó el estudio de las esferas con la combinación inversa, las de corazón de alginato y cubierta de quitosano. Este último tipo de dispositivo fue ampliamente caracterizado y se analizaron diversas condiciones de síntesis y el efecto de las mismas tanto en las propiedades mecánicas de las esferas, como en los resultados de liberación de determinados compuestos de interés. Así, se estudió la influencia de la concentración de alginato, el pH y la relación molar $\text{Ca}^{2+}/\text{COO}^-$ de la solución gelificante y el tiempo de entrecruzamiento de las esferas.

En este sentido, se pudo conocer que tanto el pH de la solución gelificante, como la relación molar $\text{Ca}^{2+}/\text{COO}^-$ fueron las variables de mayor incidencia en los resultados obtenidos. Así, el conocimiento de la adecuada combinación de tales condiciones de síntesis promovió los estudios de liberación de los compuestos feromonales en estado gaseoso. De esta manera se pudo conocer la cantidad tanto

de STOL, 3-PEN y STONA liberados en aire desde las ESF ♥ AL, condición indispensable para los ensayos biocomportamentales que se presentan en el siguiente capítulo.

Para tales ensayos se usaron las esferas que demostraron el comportamiento adecuado de liberación y las propiedades mecánicas que consideramos óptimas, así para probar la atracción de insectos de *M. mutatus* hacia los dispositivos, se usaron esferas combinadas de corazón de alginato y cubierta de quitosano con las siguientes condiciones de síntesis: concentración de alginato de 4% p/v, pH y relación molar $\text{Ca}^{2+}/\text{COO}^-$ de la solución gelificante de 9 y 3,5 respectivamente y tiempo de curado de 10 minutos. A continuación se detallan las explicaciones a esta elección:

La concentración de alginato utilizada se eligió de acuerdo con los índices de hinchamiento y a los índices de reflexión de las fotografías transformadas por *Watershed transformation*.

Se utilizó una concentración de alginato de 4% p/v porque los índices de hinchamiento a concentraciones mayores condujeron a mayores hinchamientos y al considerar que este comportamiento provocaría liberaciones más rápidas se decidió por una concentración menor (4% p/v); además las fotografías demostraron que a mayores concentraciones se obtenían esferas irregulares en cuanto a la cobertura de quitosano.

Por su parte y siguiendo con las deducciones realizadas, se eligió una relación molar de $\text{Ca}^{2+}/\text{COO}^-$ de 3,5 y un tiempo de curado de 10 minutos por varias razones: por un lado y de acuerdo con los índices de hinchamiento, se demostró que con estas condiciones de síntesis se obtienen valores de hinchamiento del 50%, adecuados para dispositivos poliméricos de liberación controlada; en segunda instancia y de acuerdo con los análisis de liberación de compuestos quedó demostrado que un mayor tiempo de contacto entre las esferas de alginato con su solución gelificante de CaCl_2 (21 horas), provoca una menor incorporación de compuesto en las esferas debido a la porosidad del alginato y como consecuencia directa de esto, un menor porcentaje de compuesto es liberado.

Por último y con respecto al pH de la solución de CaCl_2 2% p/v, se eligió un pH 9 ya que de acuerdo a los análisis de hinchamiento, este pH junto a las

condiciones de relación molar de 3,5 y al tiempo de curado de 10 minutos registraron valores de hinchamiento de un 50%. Además, los estudios de liberación demostraron que si bien no hubo diferencias entre la cantidad total de compuesto liberado, las esferas realizadas a pH 9 liberaron STOL hasta el día siete de la experiencia, mientras que las realizadas a menores pH, alcanzaron su meseta de liberación al día cinco.

También es importante aclarar que aunque los estudios de microscopía demostraron un corazón y una capa externa bien diferenciada para ambas esferas combinadas, no se descarta la posibilidad de la difusión de las cadenas poliméricas tanto de alginato como de quitosano, hacia el corazón o la capa externa, formando complejos en ambos lugares además de la interfase corazón/capa externa.

5.4 Bibliografía

- . Bernkop-Schnürch A. and Dünnhaupt S. 2012. Chitosan-based drug delivery systems. *European Journal of Pharmaceutical and Biopharmaceutics* 81:463-469.
- . Bhatnager A. And Sillanpaa, M. 2009. Applications of chitin- and chitosan-derivatives for the detoxification of water and wastewater-a short review. *Advances in Colloid and Colloid Interface Science*, 152 26-38.
- . Bossio V. Machain V. Gomez Lopez A. Perez De Berti I.O. Marchetti S.G. and Castro G.R. 2012. Binding and encapsulation of doxorubicin on smart hydrogels for oral delivery. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. DOI: 10.1007/s12010-012-9641-8.
- . Breccia J.D., Baigorí M.D., Castro G.R. and Siñeriz F. 1995. Detection of endoxylanase activities in electrophoretic gels with Congo Red staining. *Biotechnology Techniques* 9:145-148.
- . Colditz G.A. Branch L.G. Lipnick R.J. Willett W.C. Rosner B., Posner B.M. and Hennekens C.H. 1985. Increased green and yellow vegetable intake and lowered cancer deaths in an elderly population. *The American Journal of Clinical Nutrition* 41: 32-36.

- . Coppi G. and Iannuccelli V. 2009. Alginate/chitosan microparticles for tamoxifen delivery to the lymphatic system. *International Journal of Pharmaceutics* 367: 127-132.
- . Chen Z.L., Fang Y.L. and Zhang Z.N. 2007. Synthesis and assessment of attractiveness and mating disruption efficacy of sex pheromone microcapsules for the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) *Chinese Science Bulletin* 52 (10) 1365-1371.
- . Chih Pong Chang and Toshiaki Dobashi 2003. Preparation of alginate complex capsules containing eucalyptus essential oil and its controlled release. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 32: 257-262.
- . DeGennes P.G. 1979. *Scaling concepts in Polymer Physics*. Cornell University Press. Ithaca. New York.
- . Deladino L. Anbinder P.S. Navarro A.S. and Martino M.N. 2008. Encapsulation of natural antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis*. *Carbohydrate Polymers* 71: 126-134.
- de Oliveira E.F., Paula H.C.B. and de Paula R.C.M. 2014. Alginate/cashew gum nanoparticles for essential oil encapsulation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 113 (1): 146-151.
- . Devanga-Chinta D., Graves R., Pamujula S., and Mandal T. 2010. Controlled release multiple layer coatings. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 36: 200-208.
- . Drush S. and Mannino S. 2009. Patent-based review on industrial approaches for the microencapsulation of oils rich in polyunsaturated fatty acids. *Trends in Food Science and Technology* 20: 237-244.
- . Efentakis M. And Stamoylis K. 2011. *Advances in Polymer Technology* 30:110-121.
- . Escobar J.L. Zaldivar D., Agüero L. Fernandez S. and Katime I. Liberación de cefazolina sódica a partir de hidrogeles de copolímeros de poli (acrilamida-co-ácido-metacrílico). *Revista Iberoamericana de Polímeros* 1-10.
- . Fang Y., Al-Assaf S., Phillips G.O., Nishinari K., Funami T., Williams P.A., Li L. (2007) Multiple Steps and Critical Behaviors of the Binding of Calcium to Alginate. *The Journal of Physical Chemistry B* 111: 2456-2462.

- . Frid P. Anisimov S.V. and Popovic N. 2007. Congo red and protein aggregation in neurodegenerative diseases. *Brain Research Reviews*. 53:135-160.
- . Fuisz R. Myers G.L. Yang R.K. 2004. Thin film systems for volatiles decongestants. Oficina de Propiedad Intelectual de Canadá, Número de publicación: CA2508145 A1.
- . Ga°serød, O., Sannes, A., & Skja°k-Bræk, W. 1999. Microcapsules of alginate-chitosan. II. A study of capsule stability and permeability. *Biomaterials* 20: 773-783.
- . Ghosh S.K. 2006. *Functional Coatings and Microencapsulation: A general Perspective*. Wiley-Vch Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. ISBN: 3-527-31296-X.
- . Guichard E. 2002. Interactions between flavor compounds and food ingredients and their influence on flavor perception. *Food Reviews International* 18: 49-70.
- . Guo R., Xu S., Maa L., Huang A. and Gao C. 2011. Chitosan biomaterials are normally used to cover full-thickness skin defects. *Biomaterials* 32:1019-1031.
- . Hamidi M., Azadi A., Rafiei P. 2008. Nanoparticles in drug delivery. *Advanced drug delivery reviews* 60 (15):1638-1649.
- . Heuskin S., Rozet E., Lorge S., Farmakidis J., Huberut P., Verheggen F., Haybrugge E. Wathélet J. and Lognay G. 2010. Validation of a fast chromatographic method for the study of semiochemical slow release formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 53: 962-972.
- . Huguet M.L. and Dellacherie E. 1996. Calcium alginate beads coated with Chitosan: Effect of the structure of encapsulated materials on their release. *Process Biochemistry* 31(8): 745-751.
- . Jadhav S.R. Chiou B., Wood D.F., DeGrande-Hoffman G., Glenn G.M. and John G. 2011. Molecular gels-based controlled release devices for pheromones. *Soft Matter* 7 (3):793-1228.
- . Katime D., Katime O. and Katime I.A. 2004 Los materiales inteligentes de este milenio: los hidrogeles macromoleculares. Síntesis, propiedades y aplicaciones. Servicio Editorial de la Universidad del país Vasco 15-20, 121-132.
- . Knockaert G., Pulissery S.K., Lemmens L. Buggenhout S.V., Hendrickx M. and Loey A.V. 2012. Carrot β -carotene degradation and isomerization kinetics during

thermal processing in the presence of oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60:10312-10319.

. Fujikawa S., Fujuki Y. and Koga K. 1987. *Biotechnology Letters* 9: 697.

Krajewska B. 2004. Application of chitin-and Chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme and Microbial Technology* 35: 126-139.

. Flink and Labuza, 1972 Retention of 2-propanolol at low concentration by freeze drying carbohydrate solutions. *Journal of Food Science* 37 (4):617-618.

. Kurek M, Descours E., Galic K., Voilley A. and Debeaufort F. 2012. How composition and process parameters affect volatile active compounds in biopolymer films. *Carbohydrate Polymers* 88: 646-656.

. Lee J.W., Kim S.Y., Kim S.S., Lee Y.M., Lee K.M., Kim S.J. 1999. Synthesis and characteristics of interpenetrating polymer network hydrogel composed of chitosan and poly (acrylic acid). *Journal of Applied Polymer Science* 73:113–120.

. Li P., Dai Y., Zhang J., Wang A. and Wei Q. 2008. Chitosan-Alginate Nanoparticles as a Novel Drug Delivery System for Nifedipine. *International Journal of Biomedical Science* 4 (3): 221-228.

. Matsuyama H., Teramoto M. and Urano H. 1997 Analysis of solute diffusion in poly (vinyl alcohol) hydrogel membrane. *Journal of membrane science* 126 (1): 151-160.

. Mladenovska K., Raicki R.S. Janevikodov E.I. Ristoki T., Pavlova M.J., Kavrakoski Z., Dodov M.G. and Goracinova K. 2007. Colon-specific delivery of 5-aminosalicylic acid from Chitosan-Ca-alginate microparticles. *International Journal of Pharmaceutics* 342: 124-136.

. Odaci D., Timur A. and Telefoncu A. 2008. Bacterial sensors based on chitosan matrices. *Sensors and Actuators B* 134: 89-94.

. Pong C. and Dobashi T. 2003. Preparation of alginate complex capsules containing eucalyptus essential and its controlled release. *Colloids and Surfaces* 32: 257-262.

. Qian L. and Yang S. 2006. Composite film of carbon nanotubes and chitosan for preparation of amperometric hydrogen peroxide biosensor. *Talanta* 68:721-727.

. Reinhart C.T. Korsmeyer R.W. and Peppas N.A. Macromolecular network structure and its effect on drug and protein diffusion. *International Journal of Pharmaceutical Technology* 2: 9-13.

- . Sankalia MG, Mashru RC, Sankalia JM, Sutariya VB. 2007. Reversed chitosan-alginate polyelectrolyte complex for stability improvement of alpha-amylase: optimization and physicochemical characterization. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 65(2):215-32.
- . Saez V., Hernáez E. and Sanz Angulo L. 2003. Liberación controlada de fármacos. Hidrogeles. *Revista Iberoamericana de Polímeros* 4(1):21-91.
- . Saez V., Hernández J.R. and Peniche C. 2007. Las microesferas como sistemas de liberación controlada de péptidos y proteínas. *Biotecnología Aplicada* 24: 98-107.
- . Santagapita P.R. Mazzobre M.F. and Buera M.P. 2011. Invertase stability in alginate beads. Effect of trehalose and Chitosan inclusion and of drying methods. *Food Research International* 47: 321-330.
- . Sezer A., Hatipoğlu F., Cevher E., Oğurtan Z., Levent Baş A. and Akbuğa J. 2007. Chitosan films containing Fucoïdan as a Wound Dressing for dermal burn healing: Preparation and in vitro/in vivo evaluation. *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, 8 (2): E1-E8.
- . Soares J.H. & Craft N.E. 1992. Relative solubility, stability and adsorptivity of lutein in organic solvents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40: 431-434.
- . Vasiliu S., Popa M. and Rinaudo M. 2005. Polyelectrolite capsules made by two biocompatible natural polymers. *European Polymer Journal* 41: 923-932.
- . Vidhyalashmi R. Bhakayaraj R. and Subhasreey R.S. 2009. Encapsulation "The future of probiotics" A review. *Advances in Biological Research* 3: 96-103.
- . vonLinting J. 2010. Colors and functions: Elucidating the biochemical and molecular basis of carotenoid metabolism. *Annual Review of Nutrition* 30: 35-56.
- . Zhang Y., Wei W. Lv P., Wang L. and Ma G. 2011. Preparation and evaluation of alginate-chitosan microspheres for oral delivery of insulin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 77: 11-19.

Capítulo 6. Resultados

Ecología química: Respuesta de *Megaplatypus mutatus* a dispositivos poliméricos de liberación controlada de feromonas.

En este capítulo se detallan los resultados obtenidos en cuanto a la respuesta de insectos de *M. mutatus* hacia los dispositivos poliméricos preparados y ensayados como sistemas de liberación de feromonas. Dichos resultados responden a los objetivos entomológicos propuestos al comienzo de la presente tesis y proponen la conexión interdisciplinaria característica de este trabajo doctoral.

6.1. Ensayos de atracción en olfatómetro

Con el objetivo de obtener insectos para los ensayos en laboratorio, al comienzo de la temporada de vuelo se colocaron trampas de emergencia (o trampas colectoras) en lotes forestados con álamos pertenecientes al aserradero Euskadi y que presentaban una alta infestación. Los campos están ubicados en la localidad de Morse, al norte de la provincia de Buenos Aires y distante a 540 km de la ciudad de Córdoba.

Luego de realizar recorridas por la forestación, se reconocieron cuatro áreas de mayor ataque por parte de *M. mutatus* y fue en esas áreas donde se colocaron las trampas (Fig. 6.1).



Figura 6.1: Mapa de la ubicación de las cuatro áreas de infestación por *Megaplatypus mutatus* trampeadas en forestaciones de álamo de la localidad de Morse.

Las trampas se colocaron a la salida de las galerías en las que presentaba actividad larval. Dicha actividad puede ser anticipada por la presencia del característico aserrín de este estadio o por la chorreadura característica que presenta el árbol debido a la perforación sufrida en el mismo (Fig. 6.2). Así, en los lotes infestados, quedaron debidamente marcados e individualizados los lugares de ataque por *M. mutatus*.

Diariamente se recorrieron los lotes correspondientes y se procedió a la examinación de las trampas colectoras. Además de recolectar los insectos caídos en las trampas, se encontraron nuevos ataques en los días sucesivos a la colocación de las trampas y también individuos adultos iniciando nuevas galerías o cerca de las mismas. Los insectos fueron apartados del árbol con pinzas y colectados también para los experimentos posteriores.

Los insectos recolectados fueron mantenidos en cápsulas de Petri con algodón humedecido para aportar una humedad apropiada para evitar su desecación.

Los experimentos de atracción se realizaron entre las 12 y las 16 horas del día. Se colocaba en un brazo del olfatómetro el emisor de feromona que se quería evaluar, y en el otro brazo un dispositivo control, sin compuesto en su interior. Cada hembra era colocada de a una por vez en la cámara de aclimatación, se dejaba en esa situación por tres minutos y se encendía la corriente de aire.

La determinación de atracción se realizó con las esferas combinadas de tipo 3,5ESF♥AL 4% 10min-pH9. Se evaluó la atracción hacia esferas con STOL, STONA y 3-PEN (Fig.6.3). Los insectos del ensayo permanecieron entre siete y veinte minutos en la cámara de aclimatación y dentro de ese tiempo tomaban una de las dos opciones.



Figura 6.2: Trampa colectora de *M. mutatus* en álamo (*Populus deltoides*)



Figura 6.3: *M. mutatus* en brazo B del olfatómetro.

Los resultados obtenidos con los ensayos de atracción señalan que la concentración de STOL y STONA emitido/a por las esferas, fue la adecuada para provocar una respuesta de atracción sobre las hembras ensayadas (Tabla 6.1).

Tabla 6.1: Número de hembras de *Megaplatypus mutatus* que responden a diferentes sustancias liberadas desde las ESF♥AL en olfatómetro.

Sustancia testada	Número de hembras utilizadas	Número de hembras que caminan al control	Número de hembras que caminan a la sustancia testada	Número de hembras que permanecen en cámara aclimatación
Sulcatol *	10	2	8	0
Sulcatona *	9	1	8	0
3-Pentanol	8	2	5	1

El test de Chi cuadrado aplicado a las hembras que responden a sulcatol o sulcatona indicó que ambas sustancias producen una respuesta de atracción significativa (*) sobre hembras de *M. mutatus* comparada con el control. (χ^2 sulcatol= 3,26; $\alpha=0,1$; gL= 1; χ^2 sulcatona= 6,26; $\alpha=0,025$; gL= 1), mientras que el 3-PEN no demostró diferencias significativas con su control.

Si bien fue posible hacer los experimentos en el olfatómetro, los mismos se hicieron con la cantidad mínima y necesaria de insectos para comprobar el efecto

de atracción: la búsqueda de insectos y por lo tanto, los ensayos biocomportamentales se hicieron en una época no del todo favorable para el encuentro de los mismos ya que a fines de marzo junto a la disminución de la temperatura, disminuye la actividad de este insecto.

En este sentido, con respecto al tercer compuesto del *blend* feromonal, el 3-PEN, los insectos ensayados no alcanzaron a demostrar significativamente que tuviera un efecto positivo en la respuesta de atracción, ya que si bien cinco hembras demostraron una respuesta positiva hacia el compuesto, dos hembras tomaron el brazo del olfatómetro correspondiente al control y un insecto se quedó en la cámara de aclimatación.

Este resultado es atribuible al bajo número de insectos con el que se contó para realizar el ensayo. Aún así, este resultado del 3-PEN no es una limitación al momento de definir la atractabilidad del *blend* completo. Se conoce que si bien los tres compuestos feromonales emitidos por el insecto en la naturaleza, funcionan de manera sinérgica, no hay diferencias significativas entre la atracción del insecto hacia un *blend* formado por STOL y STONA que hacia uno formado por STOL, STONA y 3-PEN (Gatti Liguori *et al.* 2008).

Si bien este último compuesto posee por sí solo efectos de atracción de hembras, el rol del mismo en el *blend* no está del todo definido.

En el análisis de Chi Cuadrado se compararon las hembras que tomaron uno u otro brazo del olfatómetro. En el caso del 3-PEN, la hembra que quedó en la cámara de aclimatación no fue tomada en cuenta a la hora de analizar significativamente la elección de los brazos del olfatómetro.

En cuanto a la cantidad de compuesto liberado por día, se sabe que liberaciones diarias de 6 mg para el STOL, de 6 mg para la STONA y de 30 mg para el 3-PEN son las óptimas para lograr atracción y por lo tanto captura de hembras en forestaciones de álamo infestadas, donde el insecto puede llegar a estar a decenas de metros del cebo de atracción (Funes *et al.* 2013). En nuestro caso, el uso de un conjunto de esferas como sistema de liberación, provee al sistema del beneficio que tal grupo puede fraccionarse en aras de liberar la concentración necesaria de cada feromona al ambiente. De esta manera, el uso de tres esferas dispuestas en la cámara de opción a 20 cm de la cámara de aclimatación provocó

liberaciones aproximadas de 1,5 mg para cada compuesto de interés que provocaron las respuestas descriptas anteriormente.

Si bien estos valores de mg liberados son menores que los utilizados por Funes *et al.* 2013 para los ensayos de captura a campo, consideramos que la cercanía de la fuente de liberación al insecto en el laboratorio compensó la relación mg liberados/distancia.

Los resultados obtenidos sugieren que los dispositivos elegidos como liberadores de feromonas se comportaron de manera adecuada para provocar el efecto de atracción de hembras de *Megaplatypus mutatus*. Si bien los compuestos liberados desde las ESF ♥ AL que demostraron tal capacidad (STOL y STONA), son conocidos por su capacidad de atracción ya que han sido identificados como feromonas sexuales de la especie (González Audino *et al.* 2005), la novedad del estudio radica en que los dispositivos poliméricos utilizados como portadores y liberadores de tales compuestos, permitieron la liberación de los mismos en la cantidad adecuada para provocar la respuesta de atracción.

Las esferas combinadas con corazón de alginato y cubierta de quitosano fueron abordadas desde dos perspectivas diferentes: por un lado fueron estudiadas desde la química de los polímeros ya que se estudió su composición química, su morfología, sus propiedades mecánicas y como las diferentes variables de síntesis influían en tales características. Y por otro lado, y consecuencia directa de la primera mirada, fueron abordadas desde la ecología química, donde los ensayos comportamentales con hembras de *M. mutatus* permitieron comprobar que tales dispositivos liberaban feromonas sexuales en concentraciones adecuadas para provocar el estímulo de atracción.

De esta manera y con los resultados expuestos en este capítulo, queda demostrado el objetivo específico referido a la evaluación de la efectividad de los dispositivos poliméricos por medio de experimentos de laboratorio con el insecto de interés, así como la asociación interdisciplinaria buscada desde el comienzo del presente trabajo de tesis.

6.2 Bibliografía

- Gatti Liguori P., Zerba E., Alzogaray R., and Gonzalez Audino P. 2008. 3-Pentanol: a new attractant present in volatile emission from the Ambrosia Beetle, *Megaplatypus mutatus*. *Journal of Chemical Ecology* 34: 1446-1451.
- Funes H., Zerba E. and González-Audino P. 2013. Effect of release rate and enantiomeric composition on response to pheromones of *Megaplatypus mutatus* (Chapuis) in poplar plantations of Argentina and Italy. *Bulletin of Entomological Research*. Volume 103 / Issue 05 / October 2013 pp 564-569
- Gonzalez Audino P., Villaverde R., Alfaro R., and Zerba E. 2005. Identification of volatile emissions from *Platypus mutatus* (= *sulcatus*) (Coleoptera: Platypodidae) and their behavioral activity. *Journal of Chemical Ecology* 25: 805-816.

Capítulo 7

Conclusiones generales y proyecciones

Conclusiones generales

El tema de estudio de la presente Tesis Doctoral, consistió en el desarrollo de matrices poliméricas biodegradables a partir de quitosano o de la combinación del mismo con alginato empleando diferentes metodologías de preparación. El objetivo general fue el diseño para la obtención de estos materiales aptos para su uso en la preparación de dispositivos de liberación controlada de feromonas de un insecto llamado *Megaplatypus mutatus* y su potencial aplicación en el manejo de esta plaga. Para ello, se encaró el estudio a través de una vía “seca” y otra “húmeda”, para lo cual se estudió el comportamiento de cuatro formas diferentes en que fueron preparadas las matrices: la preparación de películas correspondieron a la vía seca y la de geles, esferas simples y combinadas a la vía húmeda. Para cada uno de los casos se analizó la capacidad de las mismas de incorporar y liberar alguno de los compuestos feromonales que usa el insecto como llamado sexual y que están identificados como sulcatol, sulcatona y 3-pentanol. En el caso de las películas, si bien estos sistemas son prácticos en su colocación, es conocido que la liberación del compuesto es dependiente de la humedad ambiente, la cual condiciona la difusión de la droga a través de la misma. Otra desventaja de este tipo de dispositivo es su relación área expuesta vs. velocidad de liberación, ya que en aquellos casos en que se necesitan dosis elevadas de liberación por tiempos prolongados se deberían usar películas con un alto valor de área expuesta.

En el caso de los geles, los dos polímeros utilizados mostraron diferencias importantes. Mientras que el quitosano mantuvo una liberación controlada por diez días alcanzando una liberación del 85% del STOL incorporado, el alginato lo hizo por un período de tiempo más reducido, alcanzando al día tres de la experiencia una liberación del 94%. En este sentido, la alta porosidad del alginato

provocó una baja retención del STOL, mientras que el entrecruzamiento logrado entre la genipina y el quitosano logró retener y liberar el compuesto de interés por una mayor y adecuada cantidad de días. Sin embargo, con el fin de aumentar la relación volumen/superficie es que se condujo la experimentación hacia el tercer tipo de dispositivos. Por lo tanto, se prepararon sistemas en donde se aumentara la capacidad de almacenar y se controlara la superficie de exposición.

Las esferas simples de alginato o quitosano fueron usadas para contener colorantes de distinta hidrofobicidad como fueron el Rojo Congo y el Beta Caroteno y para uno de los componentes del blend feromonal, el STOL.

Los resultados obtenidos sugirieron por un lado, que las esferas de alginato tienen una buena capacidad de incorporación de compuestos de distinta hidrofobicidad. Sin embargo, la porosidad que presenta este polímero puede ser la causa de los altos porcentajes de BC y STOL liberados en el agua de los lavados, así como del rápido alcance de la meseta de liberación. Otras de las fortalezas encontradas en las esferas de alginato fueron que mantuvieron su forma esférica durante todo el tiempo del estudio. En cuanto a las esferas de quitosano, las mismas presentaron una adecuada formación de las esferas y una buena incorporación de los compuestos orgánicos muestreados. En cuanto a la liberación de los mismos, podemos resultar que este polímero funciona como un excesivo agente de retención.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos con las esferas simples y conociendo las ventajas que tanto el alginato como el quitosano mostraron, se continuó con el diseño de un nuevo sistema, que fue el de las esferas combinadas.

Las esferas combinadas como sistemas de liberación, fueron sintetizadas con las dos opciones alternadas de ubicación de los polímeros, es decir se sintetizaron esferas con un corazón de quitosano y una cubierta de alginato y esferas con un corazón de alginato y una cubierta de quitosano.

Los resultados obtenidos de las esferas de corazón de quitosano y capa externa de alginato dejaron como evidencia que en esta forma de combinación, no se logra una optimización efectiva del grado de entrecruzamiento para mantener una forma estable de la esfera. La interacción de los grupos amino del quitosano con genipina, bloquea a los mismos para una interacción posterior con los grupos carboxilatos del alginato, dándose para estos casos, una baja interacción

electrostática en la interfase corazón/capa externa. Sin embargo esta membrana polielectrolítica quizás pueda también impedir el ingreso de moléculas de genipina que intensifiquen el entrecruzamiento en el corazón

Por el contrario, las esferas combinadas de corazón de alginato y cubierta de quitosano mostraron un comportamiento óptimo para la aplicación buscada. En este caso específico, se demostró que la concentración de alginato, el pH, la relación molar $\text{Ca}^{2+}/\text{COO}^-$ de la solución gelificante y el tiempo de entrecruzamiento juegan un rol importante en las propiedades de las esferas. Además, tanto el pH de la solución gelificante, como la relación molar $\text{Ca}^{2+}/\text{COO}^-$ fueron las variables de mayor incidencia en los resultados obtenidos. Se pudo comprobar que a mayores pH de la solución gelificante se obtuvieron los menores índices de hinchamiento, este comportamiento se debe a que resultaron dispositivos más entrecruzados ya que en condiciones alcalinas el grupo COO^- del alginato se encuentra como tal y por lo tanto está en condiciones óptimas de reacción con los grupos Ca^{2+} del CaCl_2 y formar estructuras más rígidas. En cuanto a la capacidad de compresión que puede soportar un material, se comprobó que a mayores relaciones molares de $\text{Ca}^{2+}/\text{COO}^-$, se lograron materiales más resistentes y rígidos que soportaron las mayores cargas de compresión para alcanzar una deformación del 50%, este comportamiento es debido a que a mayor disponibilidad de Calcio para interactuar con los grupos COO^- alcanzando una mayor rigidez en el material. Las condiciones alcalinas y de alta relación $\text{Ca}^{2+}/\text{COO}^-$ son las que favorecen la conformación “en caja de huevo” otorgándole al retículo polimérico de alginato una mayor densidad de entrecruzamiento y por ende una mayor estabilidad.

Con respecto a los estudios de liberación, ya sea de los colorantes cómo de las feromonas, se pudo concluir que el corazón de alginato de estas esferas combinadas ayudó a incrementar la concentración de compuesto incorporado y la capa externa de quitosano, ayudó a que su liberación sea controlada, ya que la porosidad del sistema pudo ser disminuida por la interacción electrostática de ambos polímeros desde el momento de la preparación de los dispositivos, que era la ocasión de pérdida del material a incorporar. Ambas ventajas originaron un dispositivo con una concentración óptima y cuya liberación fue sostenida en el tiempo alcanzando de esta manera una mayor cantidad de días de liberación. Si

bien las variables de síntesis provocaron cambios importantes en los estudios de sus propiedades, dichas variables no ocasionaron grandes cambios en los estudios de liberación controlada. En este sentido, la fortaleza de los dispositivos radicó principalmente en sus propiedades mecánicas, y por lo tanto el sistema más estable mecánicamente fue el elegido para los estudios posteriores.

Por último, habiendo obtenido el sistema optimizado, se probó la efectividad de los dispositivos tipo esferas combinadas corazón de alginato por medio de bioensayos comportamentales con hembras de *Megaplatus mutatus*. El sistema elegido fue el preparado con una concentración de alginato de 4% p/v, a pH 9, relación molar $\text{Ca}^{2+}/\text{COO}^-$ de la solución gelificante de 3,5 y tiempo de curado de 10 minutos.

Los resultados obtenidos sugieren que los dispositivos elegidos como liberadores de feromonas se comportaron de manera adecuada para provocar el efecto de atracción de hembras de *Megaplatus mutatus*. Si bien los compuestos liberados desde las ESF♥AL que demostraron tal capacidad (STOL y STONA), son conocidos por su capacidad de atracción ya que han sido identificados como feromonas sexuales de la especie, la novedad del estudio radica en que los dispositivos poliméricos utilizados como portadores y liberadores de tales compuestos, permitieron la liberación de los mismos en la cantidad adecuada para provocar la respuesta de atracción.

De esta manera, se considera como conclusión final de este trabajo de tesis que el abordaje de la química de los polímeros, con la aplicación de un criterio formado del estudio y conocimiento de la relación estructura/propiedad de los mismos, permitió el diseño de diferentes sistemas de liberación en un camino de complejidad creciente hacia el sistema que se consideró óptimo a los objetivos propuestos al comienzo de esta tesis. Los estudios de caracterización, de sus propiedades intrínsecas y de liberación de determinados compuestos desde diversos dispositivos poliméricos, permitieron la obtención del sistema que provocó la respuesta de atracción esperada en insectos de *M. mutatus*.

Si bien hay antecedentes importantes en la preparación de esferas combinadas de alginato y quitosano en áreas de la salud, de alimentos y farmacológicas, no hay precedentes del uso de este tipo de esferas para la liberación controlada de feromonas y su uso como dispositivo de liberación

controlada para el manejo de plagas. Las ventajas de estos sistemas radican por un lado en que están elaborados con polímeros de origen natural, no tóxicos y biodegradables, ambos obtenidos de recursos renovables. Y por otro lado, que se trata de un tipo de control de plaga totalmente amigable con el ambiente, ya que la especificidad de las feromonas sólo permite la eliminación de los insectos problema, sin afectar las demás especies de animales que integran el ecosistema forestal.

Proyecciones

Del estudio realizado en la presente tesis, permiten sugerir que los resultados obtenidos son prometedores (alentadores) para la aplicación de los sistemas derivados de las esferas combinadas en el control de plagas. En este sentido, y como una segunda etapa de trabajo, se planifica la realización de ensayos a campo en lotes infestados de la localidad de Morse (Buenos Aires) para comprobar la efectividad del sistema frente a condiciones ambientales reales y frente a insectos en estado de libertad.

Como etapa posterior, y en vistas de una aplicación concreta, se requiere del análisis de la obtención de esferas combinadas a escalas mayores con un serio análisis de la relación costo/beneficio.

Si bien los resultados obtenidos permitieron un avance concreto en el conocimiento científico de esta área, principalmente en el estudio de la relación estructura/propiedad de los diferentes sistemas preparados, no se descartan que los sistemas más simples como películas, geles colocados en canastas adecuadas o esferas simples, podrían ser igualmente aplicables a menores costos. Esto requiere de otro tipo de análisis con objetivos prácticos más que científicos y que sin lugar a dudas, sería una etapa interesante de abordar si hubiese interesados en tomar el desarrollo de estos sistemas a escala piloto y posteriormente, industrial.