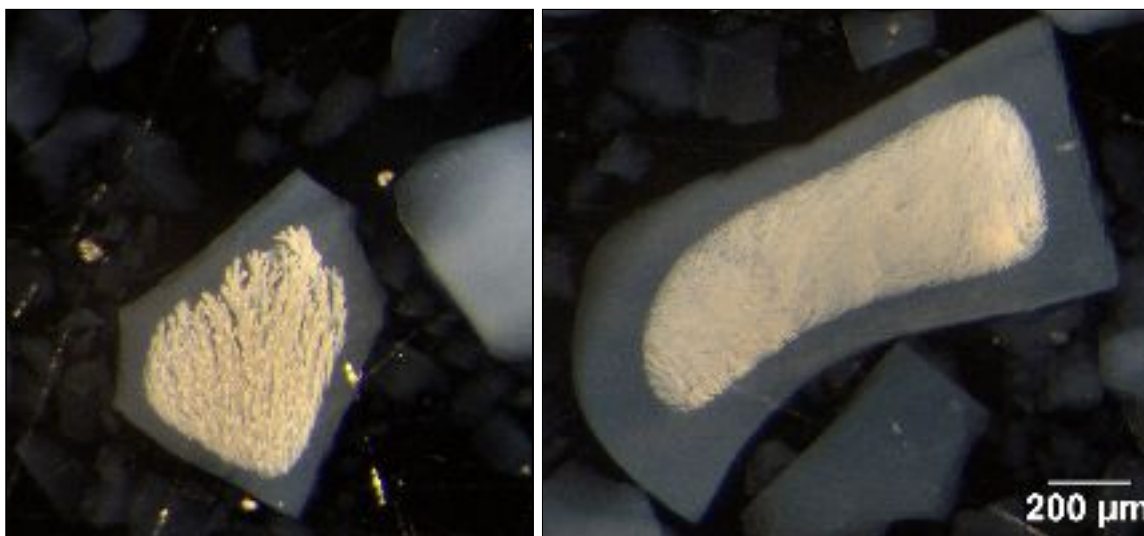


**Máster en ciencia, tecnología y aplicaciones de los
materiales cerámicos**

Escuela Superior de Tecnología y Ciencias Experimentales

Departamento de Ingeniería Química

**Preparación de nanopartículas de ácido
salicílico encapsuladas con sílice
coloidal y quitosano**



Trabajo final de máster. Proyecto de investigación (SIT043)

Autor: Iván Beltrán Marqués

Tutor: Juan Carlos Jarque Fonfría

Copartícipes: Carolina Clausell Terol, Vicente Vives Peris y
Aurelio Gómez Cadenas

Curso 2018-2019

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Molécula de ácido salicílico y su aspecto en polvo	8
Figura 2: Molécula de quitosano y su aspecto en polvo.	9
Figura 3: Aspecto del polvo de la sílice coloidal	11
Figura 4: Turbodesleidor	12
Figura 5: Liofilizador	12
Figura 6: Centrífuga	12
Figura 7: Molino planetario	12
Figura 8: MEB	12
Figura 9: Microscopio óptico	12
Figura 10: agitador magnético	13
Figura 11: Espectrofotómetro de absorción	13
Figura 12: Pulverizador	13
Figura 13: Baño de ultrasonidos	13
Figura 14: Báscula	13
Figura 15: pH-metro	13
Figura 16: Esquema representativo de la vía A	17
Figura 17: Agitación de la disolución ácido acético glacial al 1% v/v	22
Figura 18: pesaje del quitosano	20
Figura 19: Solución acuosa emulsionada	21
Figura 20: Agitación de la disolución orgánica	21
Figura 21: Izq: Mezcla W:O homogeneizada en ultrasonidos; Dcha: Mezcla W:O tras 15 minutos con agitación magnética	22

Figura 22:	<i>Izq: Mezcla W:O proporción 10:1; Dcha: disolución TPP-Na 1% w/v</i>	23
Figura 23:	<i>Pulverizador de la disolución de TPP-Na 1% w/v</i>	24
Figura 24:	<i>izq: Aspecto inicial de la disolución W:O dcha: Aspecto de la disolución W:O tras la pulverización de la disolución de TPP-Na 1% w/v</i>	24
Figura 25	<i>Representación hipotética de las interacciones del TPP-Na y el grupo amida del quitosano para la formación conjunta de nanopartículas de AS embebidas en quitosano ...</i>	24
Figura 26:	<i>(MO) sílice coloidal en medio acuoso</i>	28
Figura 27:	<i>(MO) quitosano en medio acuoso</i>	28
Figura 28:	<i>(MO) ácido salicílico en medio acuoso</i>	29
Figura 29:	<i>(MO) Muestra A1; A) tiempo 0; B) 30 segundos; C) 1 minuto; D) 2 minutos</i>	30
Figura 30:	<i>(MO) Muestra A1'; A) tiempo 0; B) 30 segundos; C) 2 minutos</i>	31
Figura 31:	<i>(MO) Muestra A2; A) tiempo 0; B) 2 minutos; C) 5 minutos; D) 20 minutos</i>	32
Figura 32:	<i>(MO) Muestra A2'; A) tiempo 0; B) 2 minutos; C) 5 minutos; D) 20 minutos</i>	33
Figura 33:	<i>(MO) Muestra A3; A) tiempo 0; B) 5 minutos; C) 15 minutos</i>	34
Figura 34:	<i>(MO) Muestra A3'; A) tiempo 0; B) 5 minutos; C) 15 minutos</i>	35
Figura 35:	<i>(MO) Muestra A4; A) tiempo 0; B) 5 minutos; C) 10 minutos; D) 20 minutos</i>	36
Figura 36:	<i>(MO) Muestra B1; A) tiempo 0; B) 10 minutos</i>	37
Figura 37:	<i>(MO) Muestra B2; A) tiempo 0; B) 10 minutos</i>	38
Figura 38:	<i>(MO) Muestra B3; A) tiempo 0; B) 10 minutos</i>	39
Figura 39:	<i>Muestra A1 a diferentes aumentos (MEB)</i>	40
Figura 40:	<i>Muestra A1' a diferentes aumentos (MEB)</i>	41

Figura 41: Muestra A2 a diferentes aumentos (MEB)	42
Figura 42: Muestra A2' a diferentes aumentos (MEB)	43
Figura 43: Muestra A3 a diferentes aumentos (MEB)	44
Figura 44: Muestra A3' a diferentes aumentos (MEB)	45
Figura 45: Muestra A4 a diferentes aumentos (MEB)	46
Figura 46: Muestra B1 a diferentes aumentos (MEB)	47
Figura 47: Muestra B2 a diferentes aumentos (MEB)	48
Figura 48: Muestra B3 a diferentes aumentos (MEB)	49
Figura 49: Extracción del AS de las muestras con HCl durante 24h	51
Figura 50: Ilustración de las muestras obtenidas tras el centrifugado	52
Figura 51: Muestras colocadas en la centrífuga	53

ÍNDICE DEL DOCUMENTO

1. Introducción	7
1.1 Ácido salicílico (AS)	7
1.2 Quitosano	8
1.3 Quitosano + ácido salicílico	10
1.4 Sílice coloidal	10
1.5 Objetivos del estudio	11
1.6 Equipos utilizados	12
1.7 Productos utilizados	14
2. Procedimiento experimental	15
2.1 Vía A - Sílice coloidal	15
2.1.1 Turbodesleición + secado	17
2.1.2 Molienda planetaria + secado	18
2.1.3 Resumen de las fórmulas de carga vía A	19
2.2 Vía B - Quitosano	19
3. Caracterización de las muestras	25
3.1 Distribución del tamaño de partícula (DTP)	25
3.2 Microscopía óptica (MO)	27
3.3 Microscopía electrónica de barrido (MEB)	40
3.4 Eficiencia de encapsulado	51
4. Análisis de los resultados	57
5. Conclusiones	61
6. Observaciones	63
7. Referencias	65

1. Introducción

Actualmente se están buscando soluciones para proteger el medio ambiente con el fin de frenar el cambio climático, preservar la biodiversidad, evitar la degradación de suelos agrícolas y forestales, etc. Muchos de los esfuerzos dentro de la ingeniería agroindustrial están centrados en la reducción del uso de agroquímicos a la vez que se consigue mantener o aumentar la productividad de los cultivos para poder abastecer a una población cuyo crecimiento no cesa.

Otro problema a tener en cuenta, es que la intensa aplicación de agroquímicos durante tiempos prolongados sumado a otros factores como el calentamiento global incita a los microorganismos patógenos a desarrollar resistencia o inmunidad a estos. Para hacer frente a dichos problemas es necesaria la búsqueda de estrategias alternativas que puedan poseer propiedades antimicrobianas y favorecer la inmunidad innata y el crecimiento de la planta. [5]

Algunas de las hormonas presentes en las plantas juegan un papel muy importante en los procesos y mecanismos de desarrollo que conducen al aumento de la aclimatación propiciado por el estrés del entorno. Un ejemplo claro de ellos es el ácido salicílico (AS) como se verá a continuación

Este proyecto ha sido el resultado de una colaboración de los departamentos de ingeniería agroindustrial y de ingeniería química cuyo objetivo principal ha sido procesar mediante diversos métodos una hormona vegetal, el AS, para obtener un producto que pueda dar una posible solución a los problemas que se han expuesto anteriormente.

1.1 Ácido salicílico (AS)

El AS es una hormona esencial en las plantas ya que actúa como una importante molécula de señalización contra los estreses bióticos (causado por virus y bacterias) y abióticos (producido por metales pesados y metaloides como el arsénico, el cromo o el mercurio entre otros). Los datos más convincentes provienen de experimentos con plantas de tabaco transgénicas que catabolizan AS a un compuesto llamado

catecol. Tales plantas, que no acumulan AS, muestran una mayor susceptibilidad a los patógenos (Delaney et al. 1994) y no establecen respuesta de resistencia tras una exposición localizada a un patógeno (Gaffney et al. 1993). [1-3].

Se ha demostrado que la incorporación de AS a la planta de forma exógena alivia la toxicidad e induce la adaptabilidad a los metales pesados y metaloides.

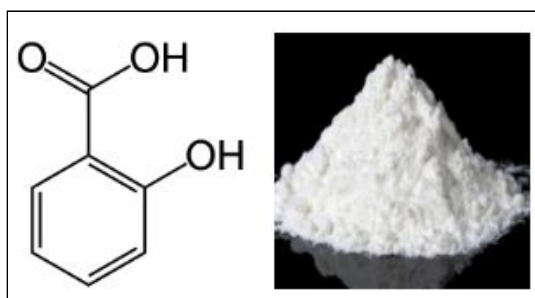


Figura 1: Molécula de ácido salicílico y su aspecto en polvo

El inconveniente fundamental de utilizar el ácido salicílico directamente es su rápida absorción por parte de la planta, y por lo tanto, su baja durabilidad.

Un remedio que puede llegar a ser muy útil es el encapsulado, ya que es capaz de ofrecer ventajas como:

- La liberación del AS es progresiva, lo cual, prolonga la duración de los efectos beneficiosos en las plantas.
- La cápsula actúa como barrera física y protege las moléculas de AS del exterior.
- El material empleado para producir el encapsulado puede ser un promotor del crecimiento de la planta y, de no ser así, existe la posibilidad de hacerlo con materiales químicamente inertes.

1.2 Quitosano

Como se comentaba anteriormente, el uso perpetuo de agroquímicos causa varios efectos adversos. Efectos como, mayor resistencia en microbios patógenos de plantas, impacto negativo en organismos que no son el objetivo y deterioro progresivo de la salud del suelo.

A nivel mundial, los cultivos se ven gravemente afectados por enfermedades que conducen a pérdidas cuantiosas en la agricultura. En consecuencia, el énfasis potencial debe concentrarse en el desarrollo de agroquímicos biodegradables a base de biomaterial para una aplicación efectiva y segura en cultivos. [4]

El quitosano, un polímero respetuoso con el medio ambiente, es obtenido a partir de un derivado de la quitina y se ha comprobado que tanto el quitosano como sus derivados, actúan como agentes promotores del crecimiento y mejoran las respuestas de defensa natural de la planta. [6]

Entre otros muchos usos, el quitosano es ampliamente utilizado en el encapsulado de fertilizantes en la agricultura, con lo cual, el encapsulado de AS mediante quitosano puede ser una buena alternativa de cara al cuidado y desarrollo de los vegetales y los suelos. [1,5]

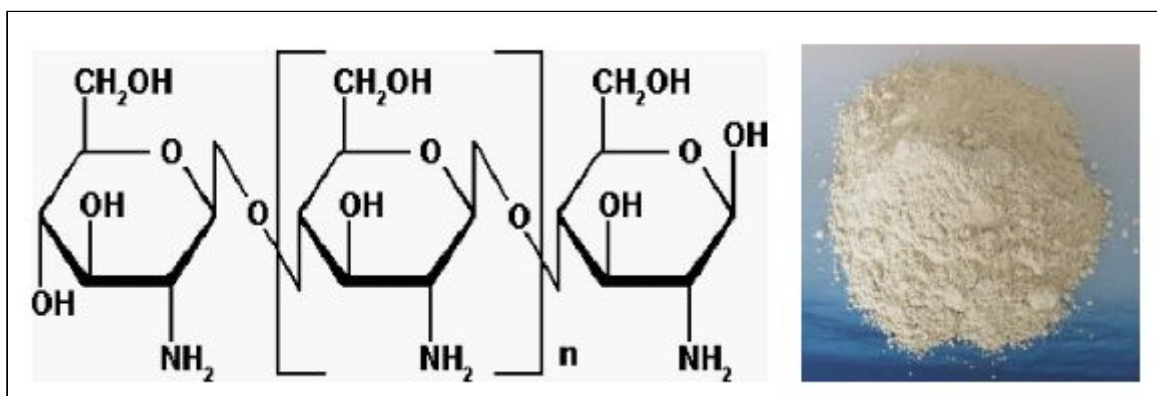


Figura 2: Molécula de quitosano y su aspecto en polvo

1.3 Quitosano + ácido salicílico

Existen algunos estudios donde se ha comparado la acción del efecto del AS con y sin quitosano en poscosechas de pepino.

Los resultados mostraron que el recubrimiento de ácido salicílico + quitosano inhibió la lesión por enfriamiento mejor que el ácido salicílico o el quitosano aplicados por separado. El ácido salicílico + quitosano también redujo la pérdida de peso, la fuga de electrolitos y mantuvo un mayor contenido de sólidos solubles totales como la clorofila y el ácido ascórbico. Además, este recubrimiento aumentó las concentraciones endógenas de otros elementos beneficiosos para el cuidado del vegetal. [9]

Con lo cual, queda patente que la acción conjunta de ambos elementos (quitosano y AS) puede potenciar los efectos protectores en las plantas.

1.4 Sílice coloidal

Si la cápsula se desea hacer con un material inorgánico y químicamente inerte la sílice ofrece muchas ventajas respecto a otros encapsulantes: [7]

- Buenas propiedades en medio acuoso.
- Elevada resistencia mecánica
- Biodegradables.
- Elevada área superficial, gran porosidad y tamaño de poro modificable. Todo esto permite a la sílice coloidal albergar una elevada carga de componentes.
- Fácilmente sintetizables y se pueden obtener de distinta forma y tamaño.

Además, estudios recientes han demostrado que las nanopartículas de sílice (NP-Si) pueden interactuar directamente con las plantas e impactar sobre su morfología y fisiología de varias maneras:

Se observó que después de la absorción, las NP-Si actúan como un material de refuerzo que puede prevenir infecciones fúngicas, bacterianas e infecciones por nematodos y, por lo tanto, pueden aumentar la resistencia a las enfermedades. [8]

También se ha visto que una capa de NP-Si puede reducir la transpiración de la planta y, por lo tanto, hacerlas más resistentes a la sequía y a altas temperaturas. [8]



Figura 3: Aspecto del polvo de la sílice coloidal

1.5 Objetivos del estudio

El objetivo principal de este proyecto consiste en el encapsulado del ácido salicílico mediante sílice coloidal (vía A) y nanopartículas de quitosano (vía B) por medio de diferentes tipos de procesado y dos vehículos distintos, orgánico e inorgánico, para posteriormente caracterizar todas las muestras obtenidas y valorar con qué procedimiento se han obtenido los mejores resultados y analizar las diferencias que se aprecian entre todas ellas.

Algunos de los procedimientos llevados a cabo y técnicas de caracterización se han inspirado en la bibliografía encontrada sobre la formación de nanocápsulas de ácido salicílico mientras que otros, como los procedimientos llevados a cabo por la vía A han sido pensados y elaborados por la acción conjunta de los departamentos de ingeniería química y agroindustrial.

1.6 Equipos utilizados



Figura 4: Turbodesleidor
Ultra-turrax T50



Figura 5: Liofilizador
Telstar, LyoAlfa 6



Figura 6: Evaporador centrifugo teflonado
Modelo: RC10.22
Casa comercial: JOVAN-IZASA



Figura 7: Molino planetario
Fritsch

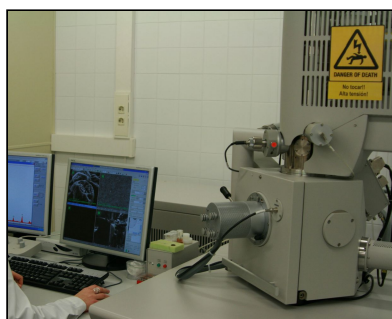


Figura 8: MEB



Figura 9: Microscopio óptico

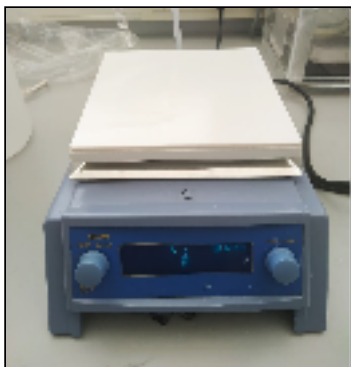


Figura 10: agitador magnético



Figura 11: Espectrofotómetro de absorción Thermo spectronics genesys 20

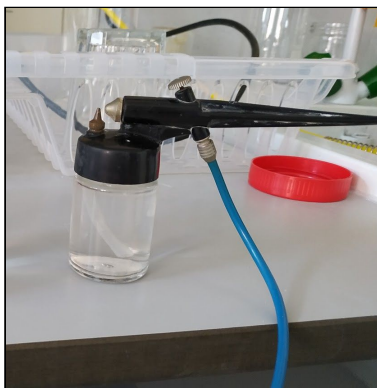


Figura 12: Pulverizador



Figura 13: Baño de ultrasonidos



Figura 14: Báscula Explorer, Ohaus



Figura 15: pH-metro

1.7 Productos utilizados

- Ácido salicílico >99% $C_7H_6O_3$
(Sigma Aldrich)
Peso molecular: 138,12 g/mol
Color: Blanco intenso
- Agua destilada
- Diclorometano 99% (DCM)
(Fisher)
- Tripolifosfato sódico (TPP-Na)
- Sílice coloidal
(Colorobia)
Pureza: 99,8%
densidad (20°C): 2,2 g/cm³
Índice de refracción a 20°C: 1,46
superficie BET : 110-140 m²/g
Color: Blanco
- Ácido acético glacial 99,8%
(Labkem)
- Acetona 99,6 %
(Labkem)
- Quitosano
- Tween 20 (polisorbato 20)
(Panreac)
- Ácido clorhídrico 37% extra
(Scharlau)

2. Procedimiento experimental

2.1 Vía A - Sílice coloidal

Como se ha comentado anteriormente, se utilizaron diferentes tipos de procesado para la elaboración de nanopartículas de AS encapsuladas con sílice coloidal.

Para obtener las cápsulas de sílice se propusieron dos métodos:

1. Turbodesleición + secado
2. Molienda planetaria + secado

El secado se realizó por liofilización si el vehículo empleado fue acuoso y secado por centrifugado si el vehículo utilizado fue orgánico.

Cada proceso se efectuó tres veces:

- a) Vehículo acuoso
- b) Predisolución del AS en acetona + vehículo acuoso
- c) Vehículo orgánico

El proceso c) se incorporó ya que el AS presenta una solubilidad limitada en agua.

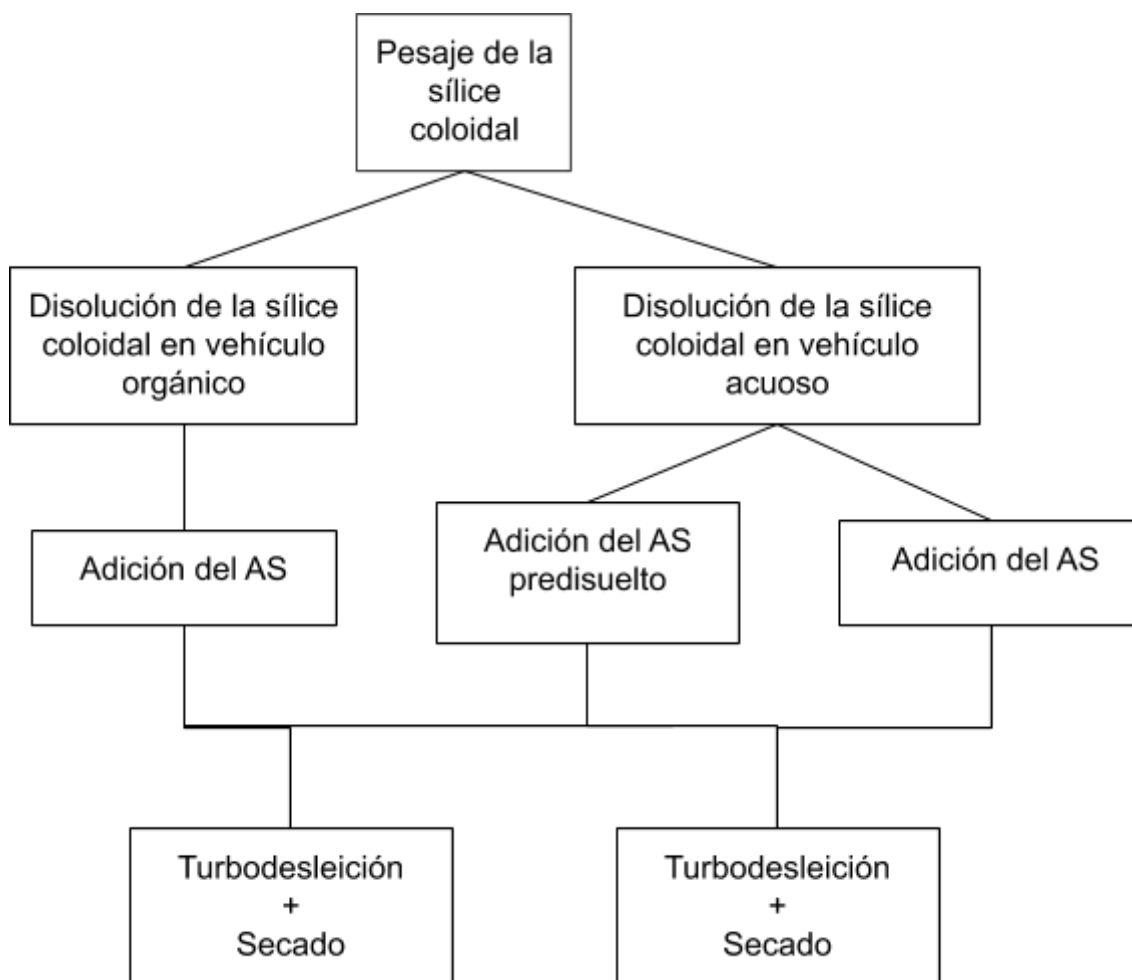


Figura 16: Esquema representativo de la vía A

En la turbodesleición + secado se añadió un experimento extra del cual se habla a continuación, por lo tanto, se realizaron un total de 7 experimentos:

- 3 Turbodesleición + 1 un experimento extra
- 3 Molienda planetaria

2.1.1 Turbodesleición + secado

Este procedimiento se llevó a cabo en dos partes. Una primera donde se desleyó la suspensión a aproximadamente 6000 rpm durante 10 minutos y una segunda donde se secó la muestra por dos vías diferentes tal y como se ha indicado en el apartado 2.1.

Muestra	SiO ₂ (g)	AS (g)	AS predisuelto	H ₂ O (g)	Acetona (g)	CS (% en peso)	Carga (% en peso)
A1	45,5	4,5	No	200	--	20,0	10,0
A2	45,5	4,5	No	--	200	20,0	10,0
A1'	45,5	4,5	Sí	200	--	20,0	10,0
A2'	45,5	4,5	No	--	400	11,1	10,0

Tabla 1 : Fórmula de carga para los ensayos de turbodesleición + secado

Como se puede observar, A2' tiene la misma fórmula de carga que A2 a excepción de la cantidad de acetona. Se aumentó la cantidad de disolvente debido a que las altas revoluciones del turbodesleidor favorecían el calentamiento de la muestra y consecuentemente la evaporación de la acetona, con lo cual, se optó por efectuar otro ensayo para garantizar que se dispersaba toda la sílice coloidal correctamente y contrastar a posteriori si había diferencia entre ambas muestras.

La muestra se preparó añadiendo primero el disolvente, posteriormente se dispersó la sílice coloidal de manera progresiva y por último se añadió el AS. Seguidamente, se turbodesleyó la muestra en las condiciones ya mencionadas y finalmente se secó la muestra por la vía correspondiente según el vehículo empleado.

2.1.2 Molienda planetaria + secado

Este procedimiento también consistió en dos partes. En la primera se hizo una dispersión de la sílice coloidal en el vehículo correspondiente con un molino de bolas, se añadió la cantidad de AS correspondiente y a continuación se introdujo durante una hora a 150 rpm en una molienda planetaria.

Una vez transcurrida la parte anterior se secaron las muestras tal y como se indica en el apartado 2.1, es decir, las muestras que contienen agua se liofilizaron mientras que las muestras con acetona se secaron mediante centrifugado.

La muestra se preparó añadiendo primero el volumen de bolas en el recipiente (aproximadamente $\frac{1}{3}$ del volumen de este), después se pesó y se añadió la cantidad de disolvente correspondiente y a continuación se fue añadiendo la sílice coloidal en etapas consecutivas. Se agregaba toda la cantidad posible, seguidamente se cerraba el recipiente y se ponía en el molino durante unos segundos para dispersar la cantidad añadida y nuevamente se volvía a añadir toda la sílice coloidal posible, así hasta conseguir dispersar toda la cantidad establecida para el ensayo.

Se tuvo que realizar de esta manera ya que la sílice coloidal, al tener una gran cantidad de superficie específica y ocupar mucho volumen, no cabía toda inicialmente en el recipiente.

Una vez toda la sílice coloidal quedó dispersada, se pesó y se añadió el AS correspondiente y se puso el molino en marcha en las condiciones indicadas anteriormente.

Muestra	SiO ₂ (g)	AS (g)	AS predisuelto	H ₂ O (g)	Acetona (g)	CS (% en peso)	Carga (% en peso)
A3	45,5	4,5	No	200	--	20,0	10,0
A4	45,5	4,5	No	--	200	20,0	10,0
A3'	45,5	4,5	Sí	200	--	20,0	10,0

Tabla 2 : Fórmula de carga para los ensayos molienda planetaria + secado

2.1.3 Resumen de las fórmulas de carga vía A

Muestra	SiO ₂ (g)	AS (g)	AS predisuelta	H ₂ O (g)	Acetona (g)	CS (% en peso)	Carga (% en peso)
A1	45,5	4,5	No	200	--	20,0	10,0
A2	45,5	4,5	No	--	200	20,0	10,0
A1'	45,5	4,5	Sí	200	--	20,0	10,0
A2'	45,5	4,5	No	--	400	11,1	10,0
A3	45,5	4,5	No	200	--	20,0	10,0
A4	45,5	4,5	No	--	200	20,0	10,0
A3'	45,5	4,5	Sí	200	--	20,0	10,0

Tabla 3 : Tabla resumen de las diferentes fórmulas de carga

2.2 Vía B - Quitosano

Para esta vía de procesado se siguió un único método que se realizó 3 veces. El pH se modificó en dos de los tres experimentos para la obtención de las nanopartículas de AS encapsuladas con quitosano. El método llevado a cabo, descrito a continuación, fue el que se propone en el artículo [1], pero con algunas modificaciones.

1. Primero se preparó una disolución de ácido acético glacial al 1% en volumen (v/v) y se dejó agitando con el agitador magnético durante 10 minutos a 650 rpm.

→ 1 ml ácido acético glacial.

→ 100 ml de agua destilada.

Nota: Como en el artículo no se especificaba las velocidades de agitación utilizadas, se escogió una a la cual la disolución quedase completamente homogénea en el intervalo de tiempo señalado.



Figura 17: Agitación de la disolución ácido acético glacial al 1% v/v

2. Una vez transcurridos los 10 minutos se preparó una disolución de quitosano al 2% de peso a volumen (w/v) con la disolución de ácido acético glacial. En este caso la agitación se realizó durante 10 minutos a 1300 rpm.

→ 2 g quitosano.

→ 100 ml de la disolución de ácido acético glacial 1% v/v.



Figura 18: pesaje del quitosano

3. Tras la agitación, la disolución de quitosano se emulsionó con 1 ml de polisorbato (tween 20) y se dejó en agitación durante 10 minutos a 850 rpm.

→ 100 ml de disolución de quitosano al 2% w/v.

→ 1 ml de tween 20.

Después de realizar estos 3 pasos se obtuvo una solución acuosa emulsionada que tiene el aspecto que se muestra a continuación.

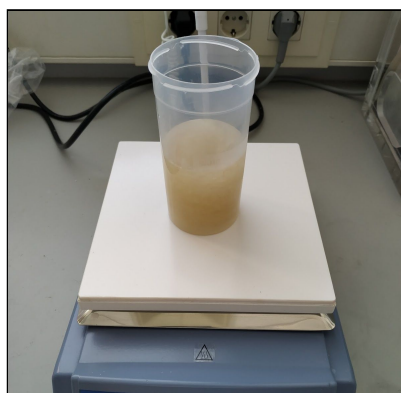


Figura 19: Solución acuosa emulsionada

4. Paralelamente se preparó una disolución orgánica en proporción 2:10 v/v de ácido salicílico y diclorometano (DCM).

→ 1,6 g de AS (densidad del AS=0,8 g/ml; 1,6 g AS → 2 ml AS).

→ 10 ml de DCM

La disolución se agitó a unas 450 rpm durante 10 minutos.

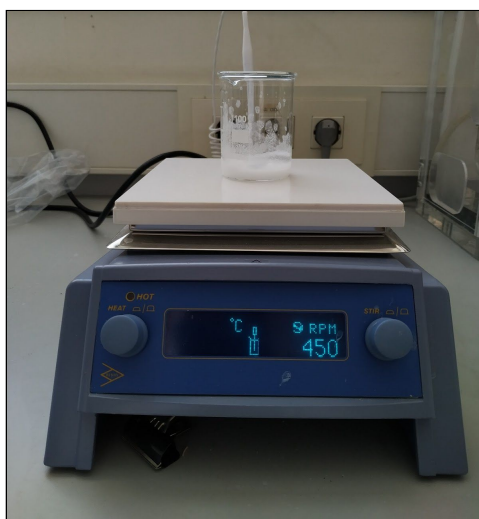


Figura 20: Agitación de la disolución orgánica

5. El quinto paso consistió en mezclar la disolución acuosa (water) y la orgánica (oil), “W:O” en proporción 10:1 v/v.

→ 100 ml de disolución acuosa.

→ 10 ml de disolución orgánica.

En cuanto a la homogenización, primero se intentó realizarlo mediante ultrasonidos como indica el artículo [1] pero el resultado no fue muy bueno, por lo tanto, se decidió realizarla con agitación magnética a una velocidad de 1200 rpm durante un intervalo de entre 10-15 minutos.



Figura 21: Izq: Mezcla W:O homogeneizada en ultrasonidos;
Dcha: Mezcla W:O tras 15 minutos con agitación magnética

El pH, único parámetro modificado en los 3 ensayos, se cambió en este paso con la ayuda de una disolución de NaOH (1M). Se fue añadiendo gota a gota de la disolución de NaOH (1M) mientras se mantenía la muestra en agitación y se miraba el cambio del pH en el pH-metro hasta que se alcanzó el pH deseado.

En el primer ensayo (B1) no se modificó el pH pero se midió para saber cuál era el pH de partida. El valor resultante fue 3,30.

En el segundo ensayo (B2) el pH se aumentó hasta llegar a 4,50.

Finalmente, en el tercer ensayo (B3) el pH se aumentó hasta llegar a 5,50.

La razón por la cual el pH fue modificado radica en el paso 7, el encapsulado, ya que al utilizar tripolifosfato sódico (TPP-Na), un cambio en el pH puede modificar el anclaje de este sobre el quitosano y mejorar o empeorar la eficiencia la eficiencia del encapsulado.

6. El penúltimo paso consistió en la preparación de una disolución de TPP-Na al 1% w/v.

→ 1 g de TPP-Na.

→ 100 ml de agua destilada.

La mezcla se dejó en agitación durante unos 10 minutos a 850 rpm.

En la figura que se muestra a continuación se presentan las dos disoluciones necesarias para realizar el último paso.



Figura 22: Izq: Mezcla W:O proporción 10:1; Dcha: disolución TPP-Na 1% w/v

7. El encapsulado de las nanopartículas se realizó pulverizando la disolución de tripolifosfato sobre la disolución W:O.

→ 100 ml de TPP-Na 1% w/v.

→ 100 ml de disolución W:O proporción 10:1.

Para ello, se utilizó un recipiente con una base amplia con el fin de aumentar la superficie de contacto a la hora de pulverizar.

Se intentó utilizar la agitación magnética a muy baja velocidad para distribuir homogéneamente el TPP-Na pero finalmente se decidió mover manualmente el recipiente cada cierto tiempo para evitar que la homogenización rompiera los posibles enlaces ya formados.

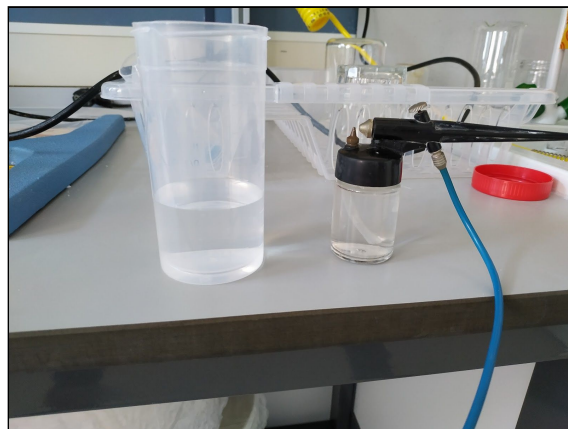


Figura 23: Pulverizador de la disolución de TPP-Na 1% w/v

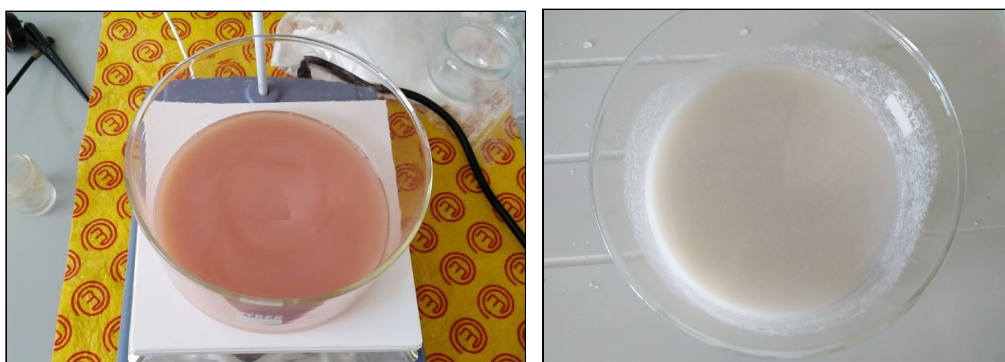


Figura 24: izq: Aspecto inicial de la disolución W:O

dcha: Aspecto de la disolución W:O tras la pulverización de la disolución de TPP-Na 1% w/v

De forma hipotética, tal y como se indica en el artículo [2], el TPP-Na actuaría como “pegamento” entre las moléculas de quitosano para cerrar la cápsula y dejar el AS embebido.

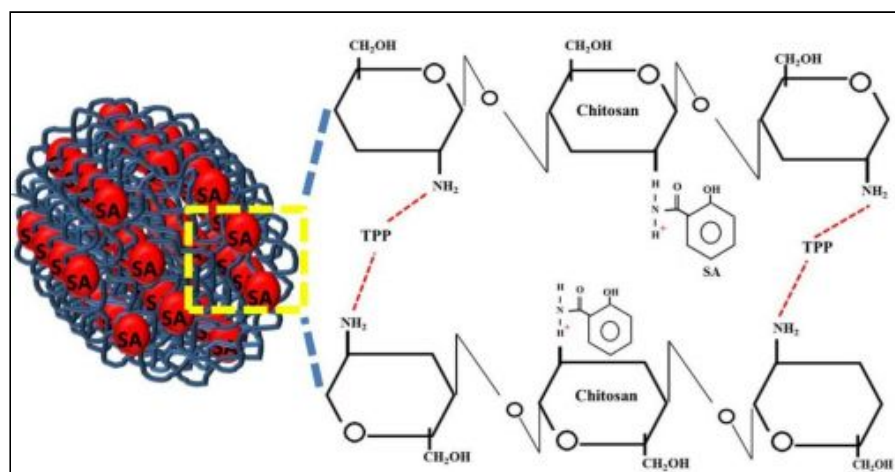


Figura 25 Representación hipotética de las interacciones del TPP-Na y el grupo amida del quitosano para la formación conjunta de nanopartículas de AS embebidas en quitosano

3. Caracterización de las muestras

Dado que la naturaleza de las muestras obtenidas por la vía A y la vía B son diferentes, no se pudo realizar exactamente las mismas pruebas de caracterización para ambos tipos de muestras.

3.1 Distribución del tamaño de partícula (DTP)

Para las muestras de la vía A se hizo un análisis de tamaño de partícula utilizando el equipo *ZETASIZER NANO* de la firma MALVERN en el Instituto Tecnológico de la Cerámica (ITC). El método utilizado se basa en la difracción dinámica de luz (Dynamic Light Scattering, DLS). Esta técnica analiza los tamaños submicrónicos basándose en el movimiento Browniano. Los resultados se muestran a continuación.

Este ensayo no se pudo realizar para las muestras obtenidas por la vía B, ya que no se consiguió dispersar dichas muestras con ninguno de los siguiente disolventes: Acetona, isopropanol, agua y diclorometano.

Muestra	d_{10} (nm)	d_{50} (nm)	d_{90} (nm)
A1	190	300	470
A1'	205	305	450
A2	160	265	425
A2'	180	270	390
A3	240	320	425
A3'	190	445	760
A4	290	330	400

Tabla 4 : Diámetros de partícula para las muestras de la vía A.

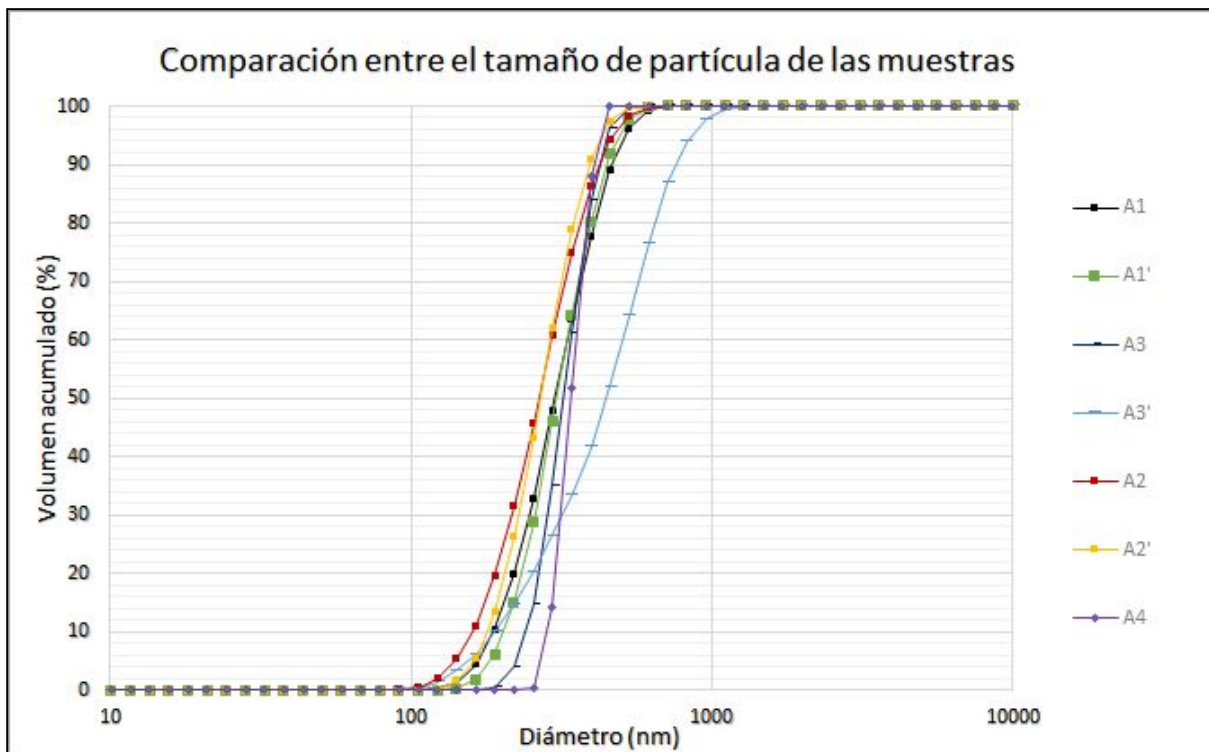


Gráfico 2: Distribución acumulada del tamaño de las partículas.

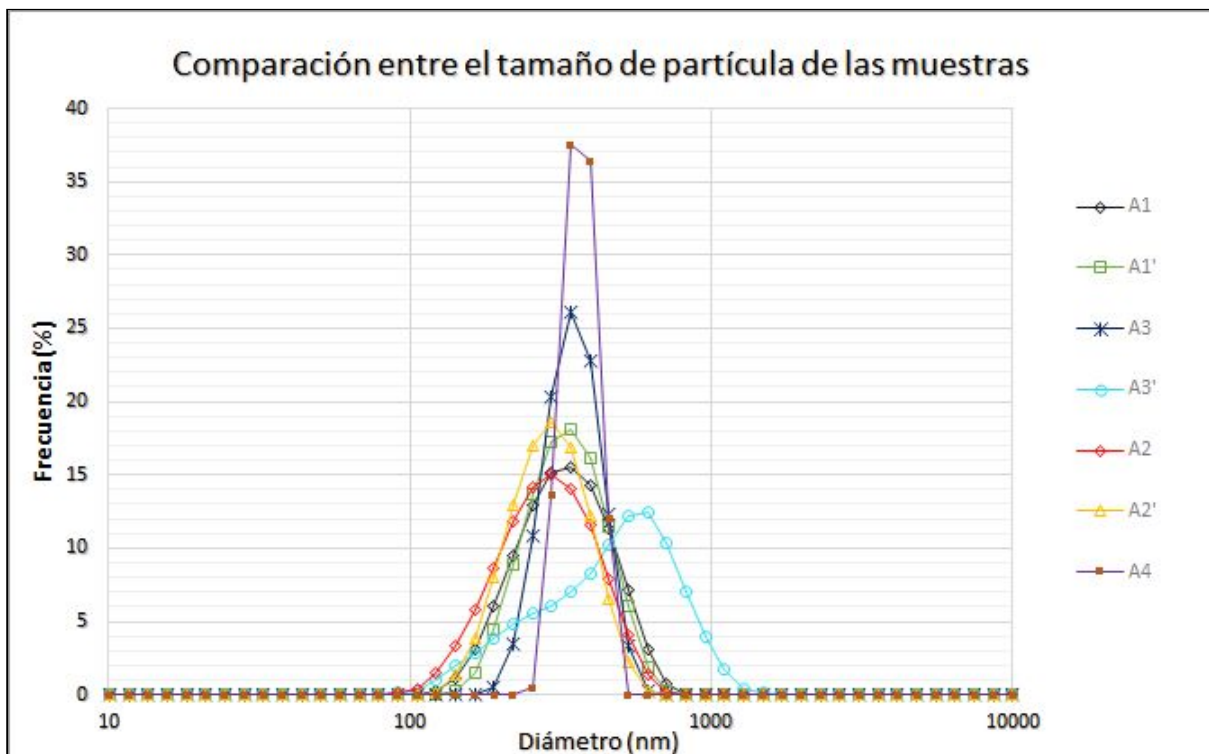


Gráfico 3: Distribución en frecuencia del tamaño de las partículas.

3.2 Microscopía óptica (MO)

Se decidió observar todas las muestras en el microscopio óptico en medio acuoso por varios motivos. Por un lado, la aplicación de las nanopartículas encapsuladas en plantas se realizaría en vía acuosa y, por otro lado, las fotografías tomadas en vía seca no tenían mucho interés ya que no se apreciaban diferencias entre la cápsula y el encapsulado.

Mientras se analizaron las muestras se apreció como el color de algunas de ellas cambiaba con el paso del tiempo, cada una a distinta velocidad. Ante esta situación se decidió tomar la misma fotografía a tiempos diferentes para ver la evolución y realizar un análisis posterior.

Lo que se aprecia en las siguientes imágenes tomadas con el microscopio óptico es la disolución progresiva del AS en el medio acuoso, a este fenómeno se le conoce como lixiviación.

Nota: Tras echar el agua a la muestra, era necesario perder algunos segundos para enfocar nuevamente el microscopio y poder ver la imagen con nitidez.

- **Sílice coloidal**

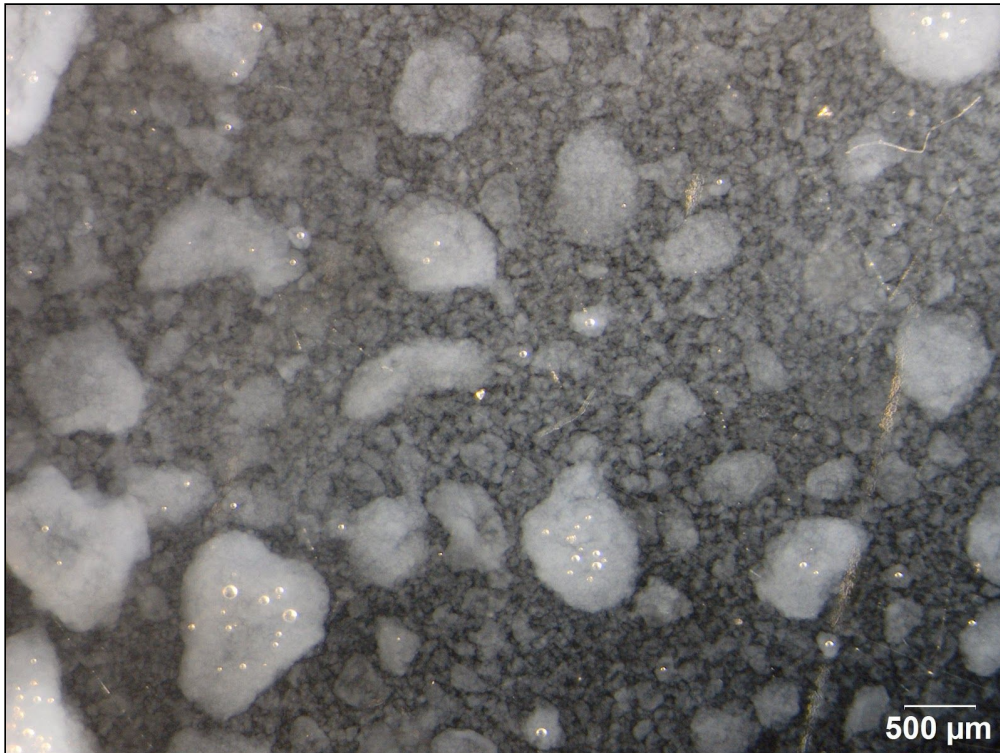


Figura 26: (MO) sílice coloidal en medio acuoso

- **Quitosano**

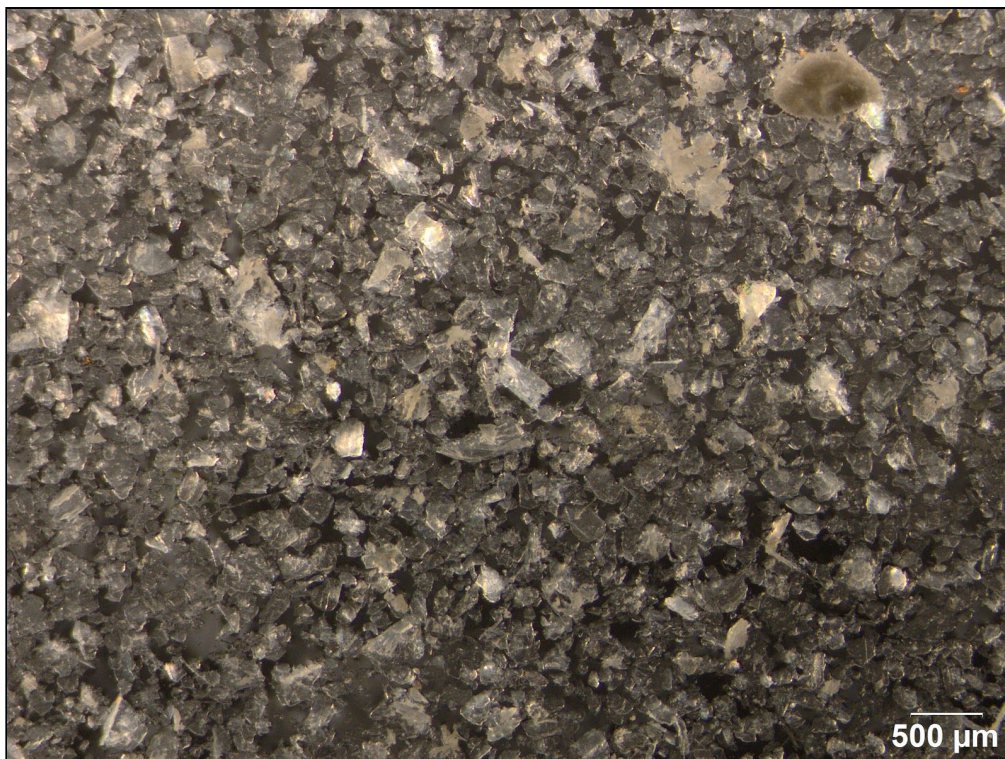


Figura 27: (MO) quitosano en medio acuoso

- **Ácido salicílico**

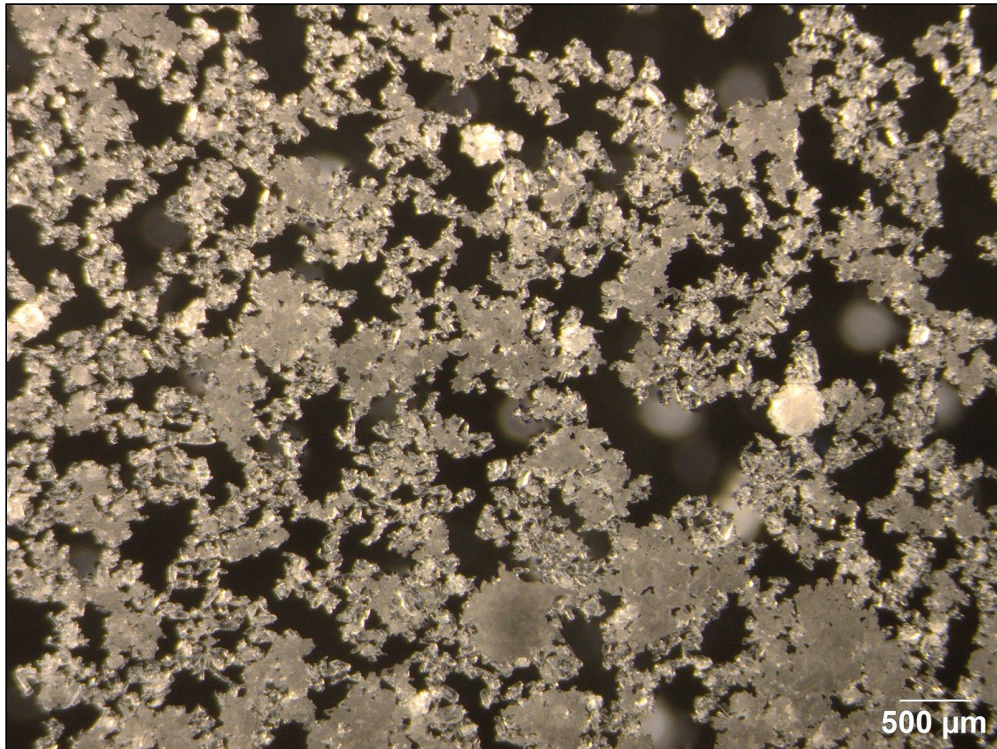


Figura 28: (MO) ácido salicílico en medio acuoso

- **Muestra A1**

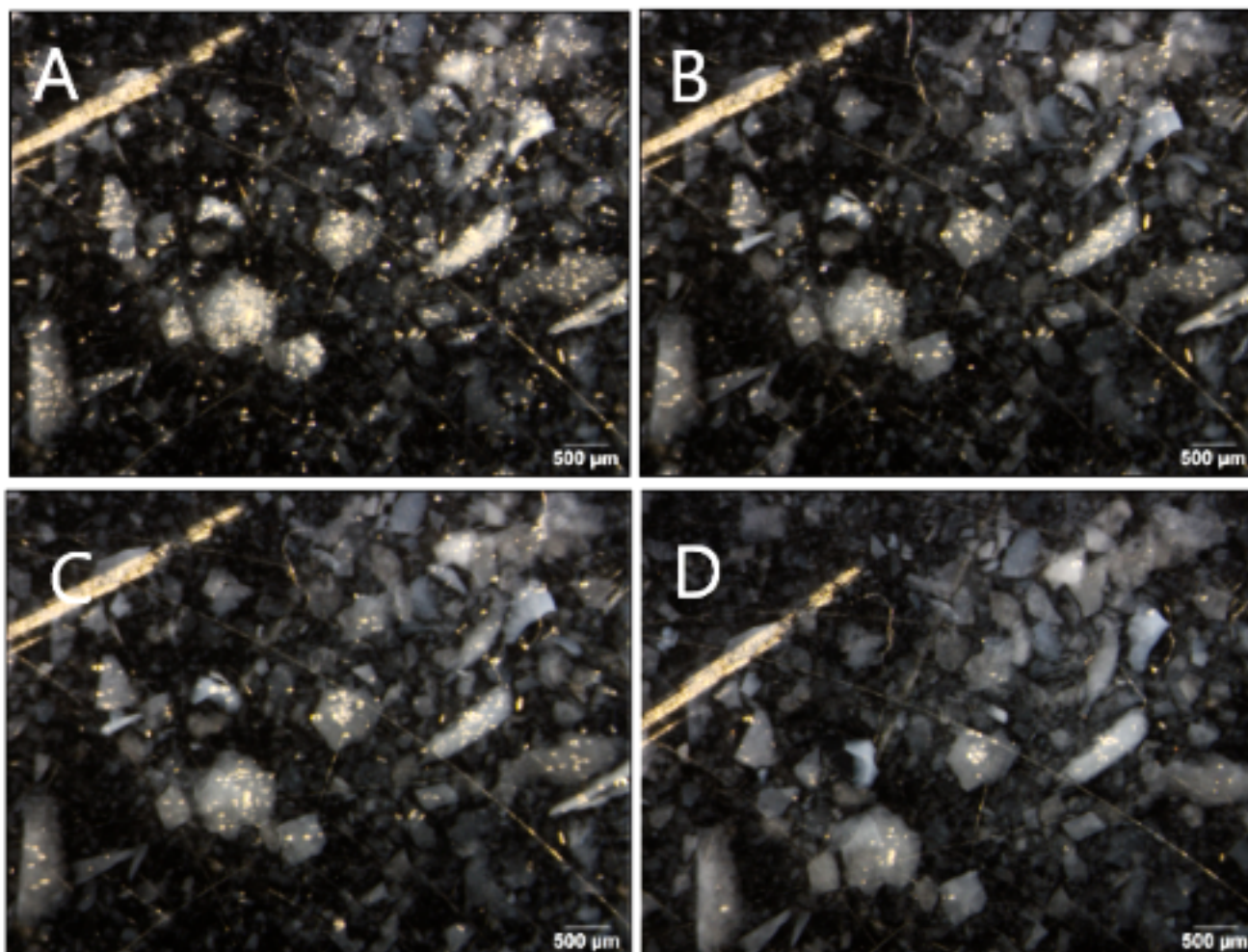


Figura 29: (MO) Muestra A1; A) tiempo 0; B) 30 segundos; C) 1 minuto; D) 2 minutos

Como puede observarse, a tiempo 0, las partículas más pequeñas ya se han lixiviado y pasados dos minutos a penas queda AS en ninguna de ellas. Cabe destacar, que las partículas más gruesas son las que más tardan en lixivarse. Este hecho tiene sentido ya que el agua iría lixiviando primero los bordes de las partículas y poco a poco, el agua, se abriría paso hacia el interior.

También existe la posibilidad que algunas partículas no hayan conseguido encapsular AS, pero como se verá en otras muestras, este hecho no parece ocurrir en cantidades significativas.

Finalmente, hay que añadir que el AS se muestra con un aspecto individualizado, formado por partículas individuales.

- **Muestra A1'**

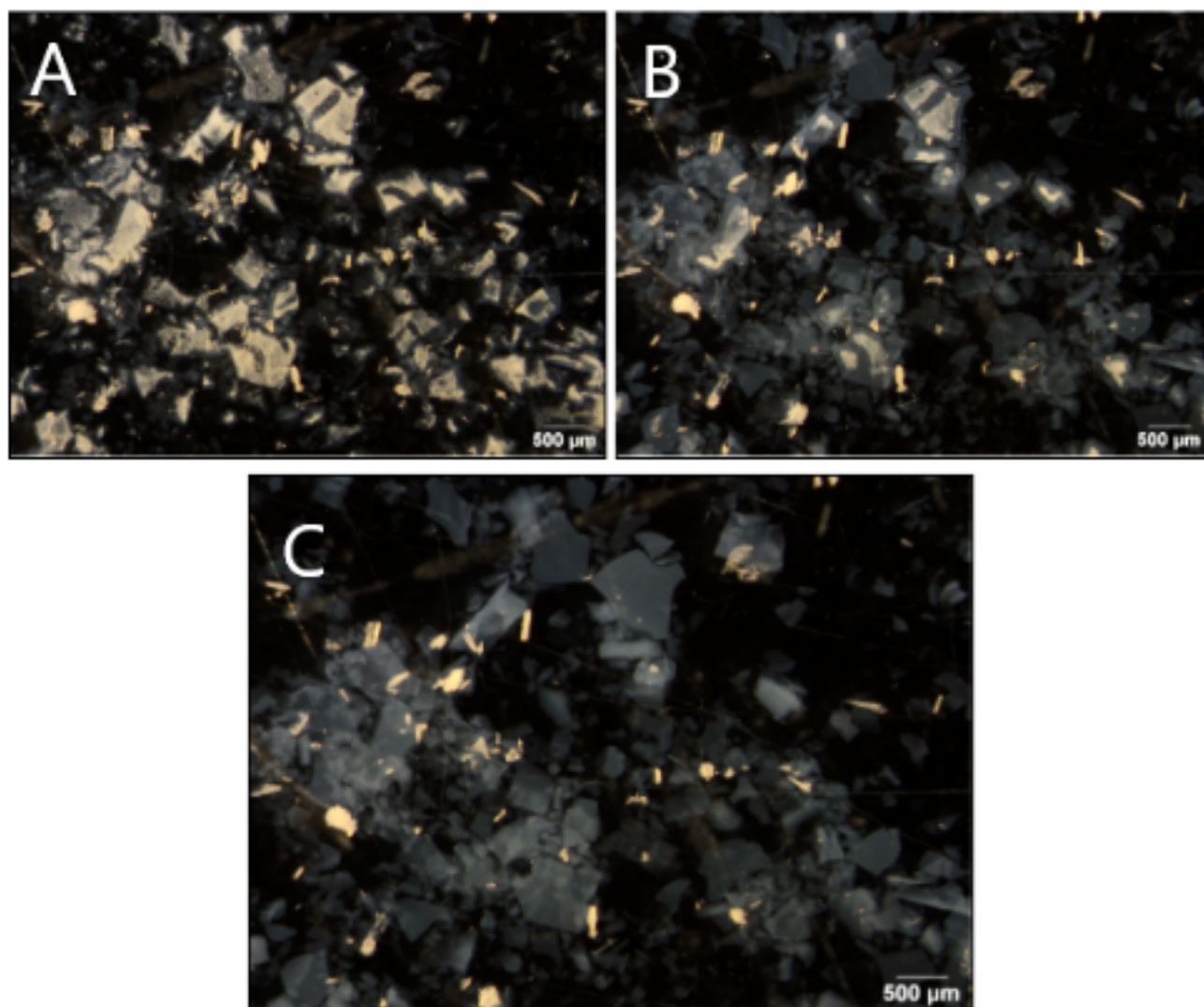


Figura 30: (MO) Muestra A1'; A) tiempo 0; B) 30 segundos; C) 2 minutos

Esta muestra tiene un ritmo de lixiviación muy parecido al que presenta A1' e inicialmente parece que el AS se encuentra repartido de forma homogénea, es decir, se aprecia que esta hormona está presente en la mayoría de las partículas tanto grandes como pequeñas.

A diferencia de A1, el AS no se muestra individualizado, más bien se muestra con un aspecto más uniforme y compacto.

- **Muestra A2**

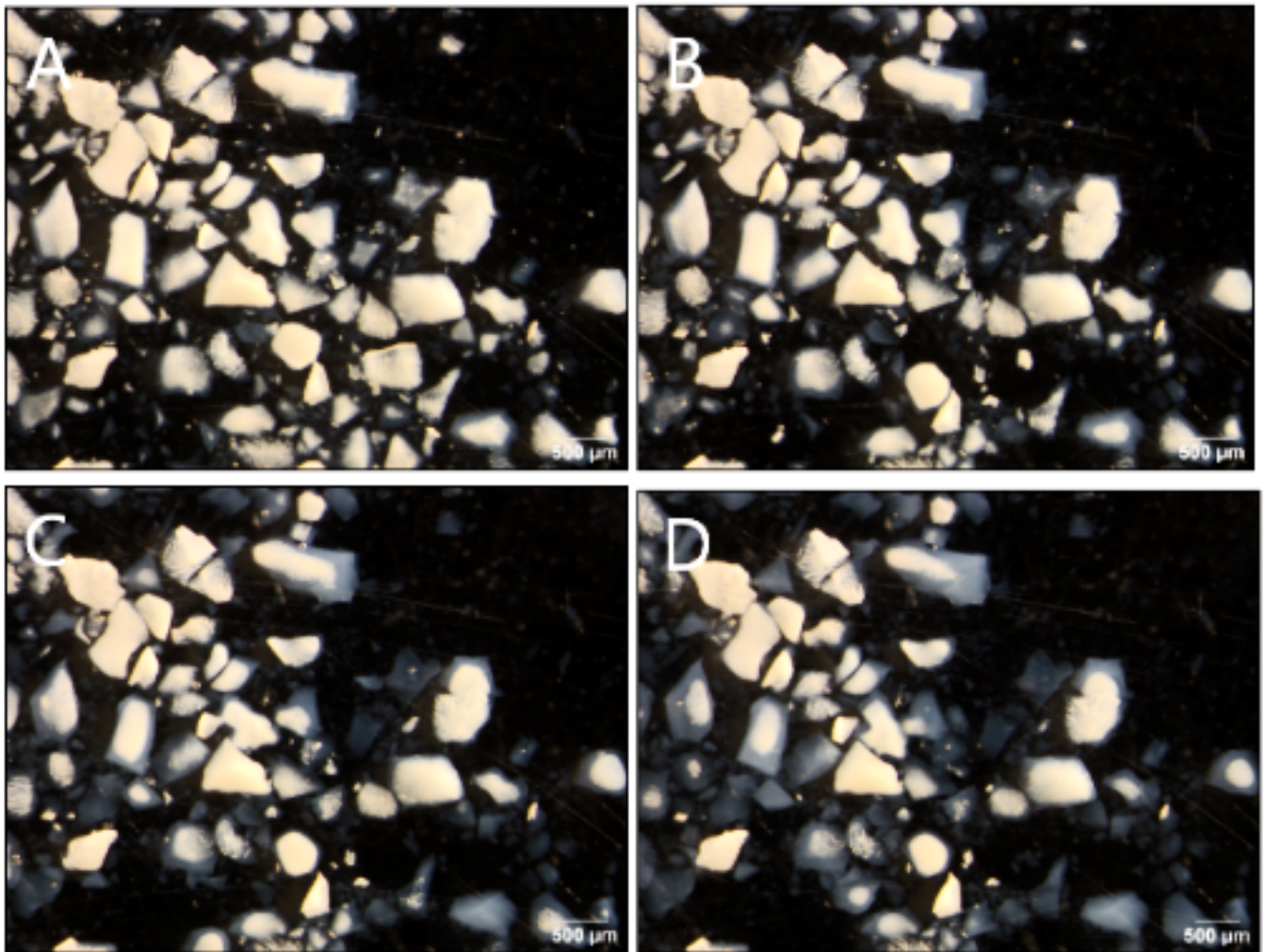


Figura 31: (MO) Muestra A2; A) tiempo 0; B) 2 minutos; C) 5 minutos; D) 20 minutos

Esta muestra presenta una velocidad de lixiviación mucho menor que A1 y A1'. Las partículas gruesas son las que más tardan en lixivarse pero también se pueden apreciar algunas partículas de menor tamaño que permanecen inalteradas durante 20 minutos. También hay algunas partículas gruesas que tampoco parecen cambiar después de los 20 minutos.

El aspecto del AS también se muestra como una masa uniforme y compacta.

- **Muestra A2'**

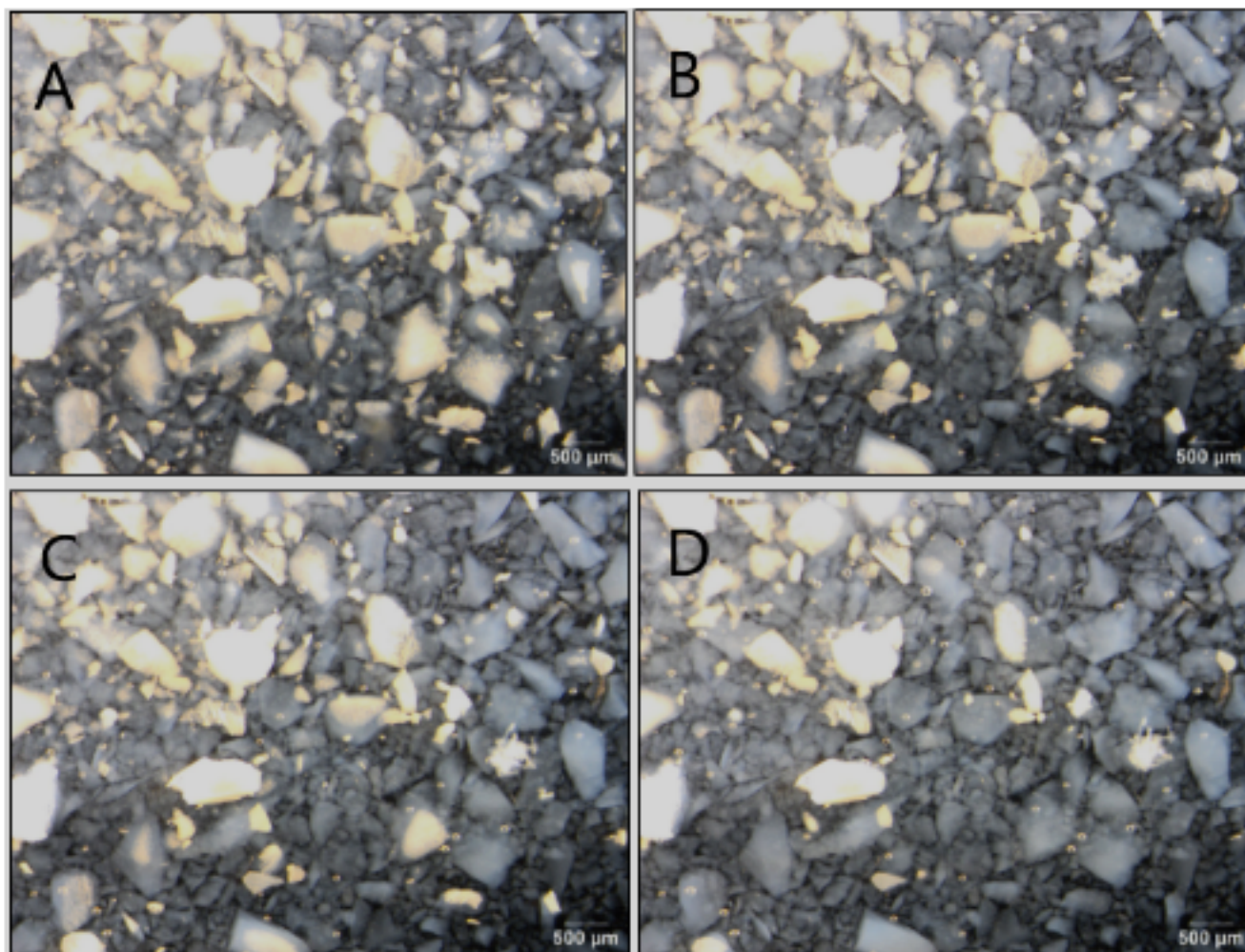


Figura 32: (MO) Muestra A2'; A) tiempo 0; B) 2 minutos; C) 5 minutos; D) 20 minutos

A2' guarda bastante similitud con A2 en cuanto a las imágenes registradas, se recuerda que tan solo se aumentó la cantidad de disolvente para facilitar la dispersión de la sílice coloidal. En ellas se aprecia como una gran parte de las partículas se ha conseguido lixiviar tras 20 minutos de contacto con agua mientras que otra parte, de magnitud considerable, permanece poco alterada o inalterada.

- **Muestra A3**

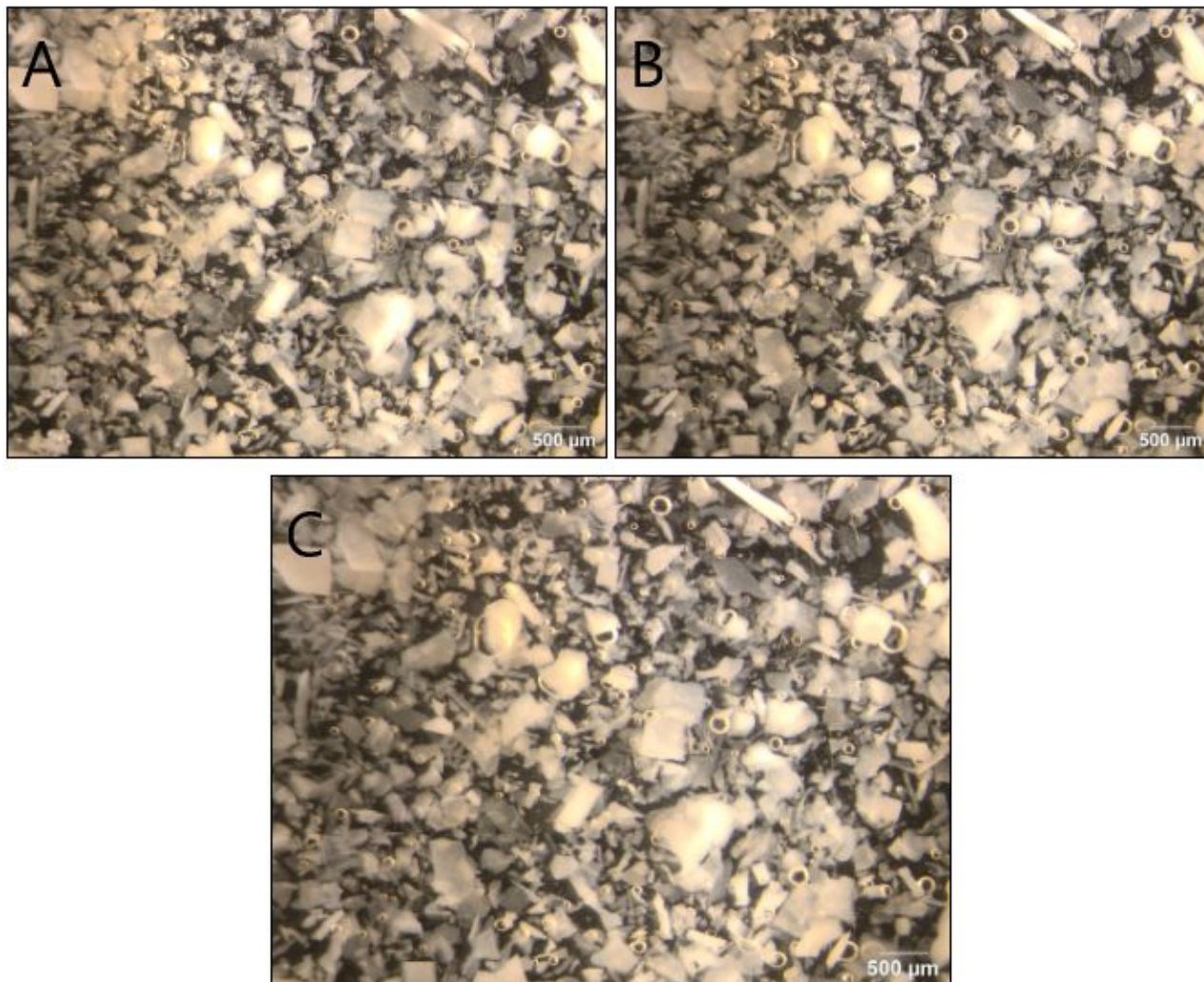


Figura 33: (MO) Muestra A3; A) tiempo 0; B) 5 minutos; C) 15 minutos

La presencia de burbujas en esta muestra se debe a que se intentó fijar la muestra en el porta utilizando celo de doble cara, pero aun así, al verter el agua una vez se habían enfocado las partículas el microscopio se desenfocó y hubo que perder tiempo para volverlo a poner en la posición correcta.

No se utilizó más esta técnica, ya que además de no cumplir con el propósito que se esperaba, la presencia de burbujas aumentó notablemente.

En cuanto a las imágenes, si se comparan con las muestras anteriores, puede apreciarse como durante 15 minutos la muestra no parece haber cambiado nada, sin embargo, la presencia del color blanco intenso indica que el AS está presente, solo que no consigue lixiviarse durante ese tiempo en las condiciones dadas.

- **Muestra A3'**

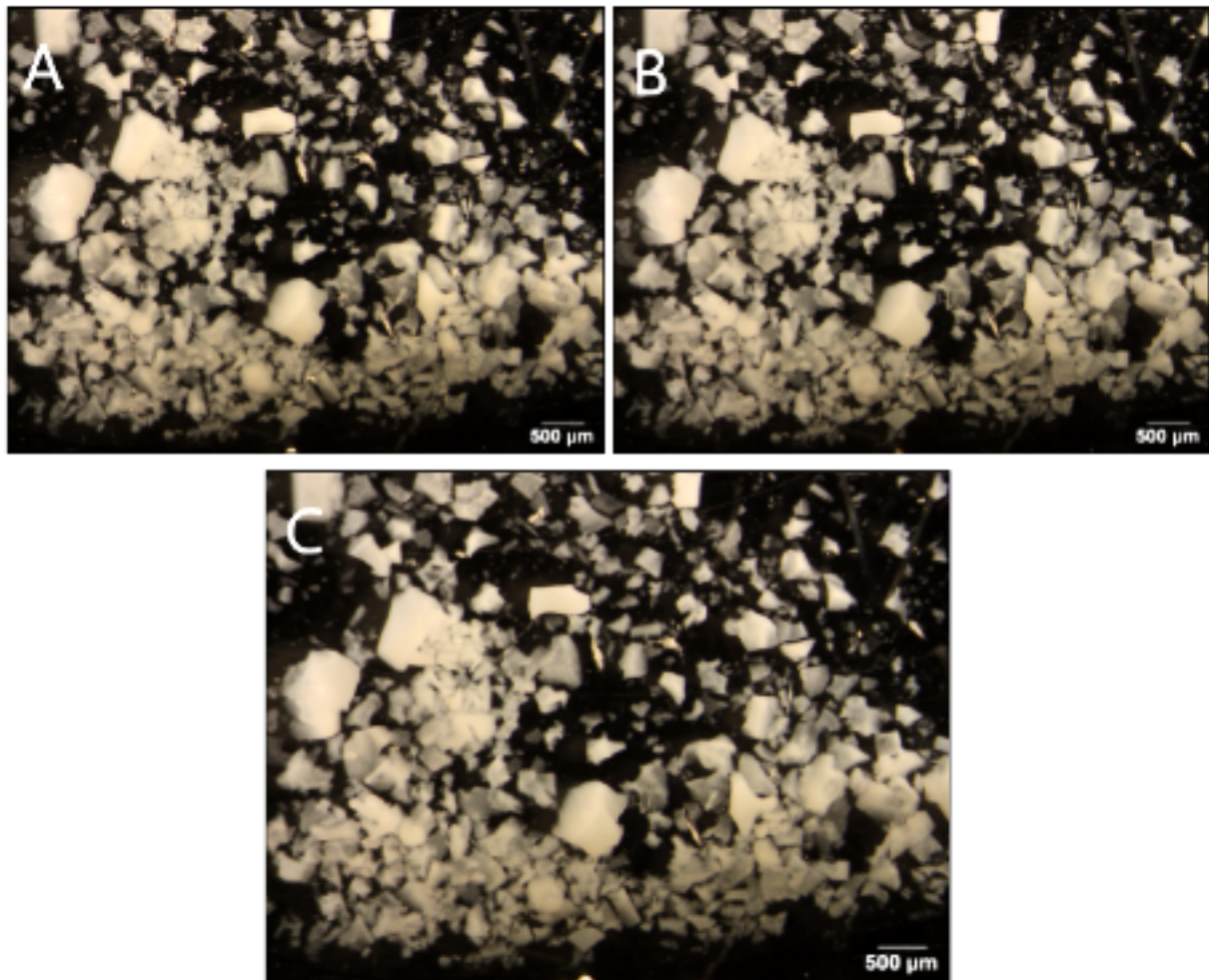


Figura 34: (MO) Muestra A3'; A) tiempo 0; B) 5 minutos; C) 15 minutos

La muestra A3' presenta un comportamiento y un aspecto muy parecido a A3. No se aprecia ningún tipo de cambio durante el tiempo transcurrido.

- **Muestra A4**

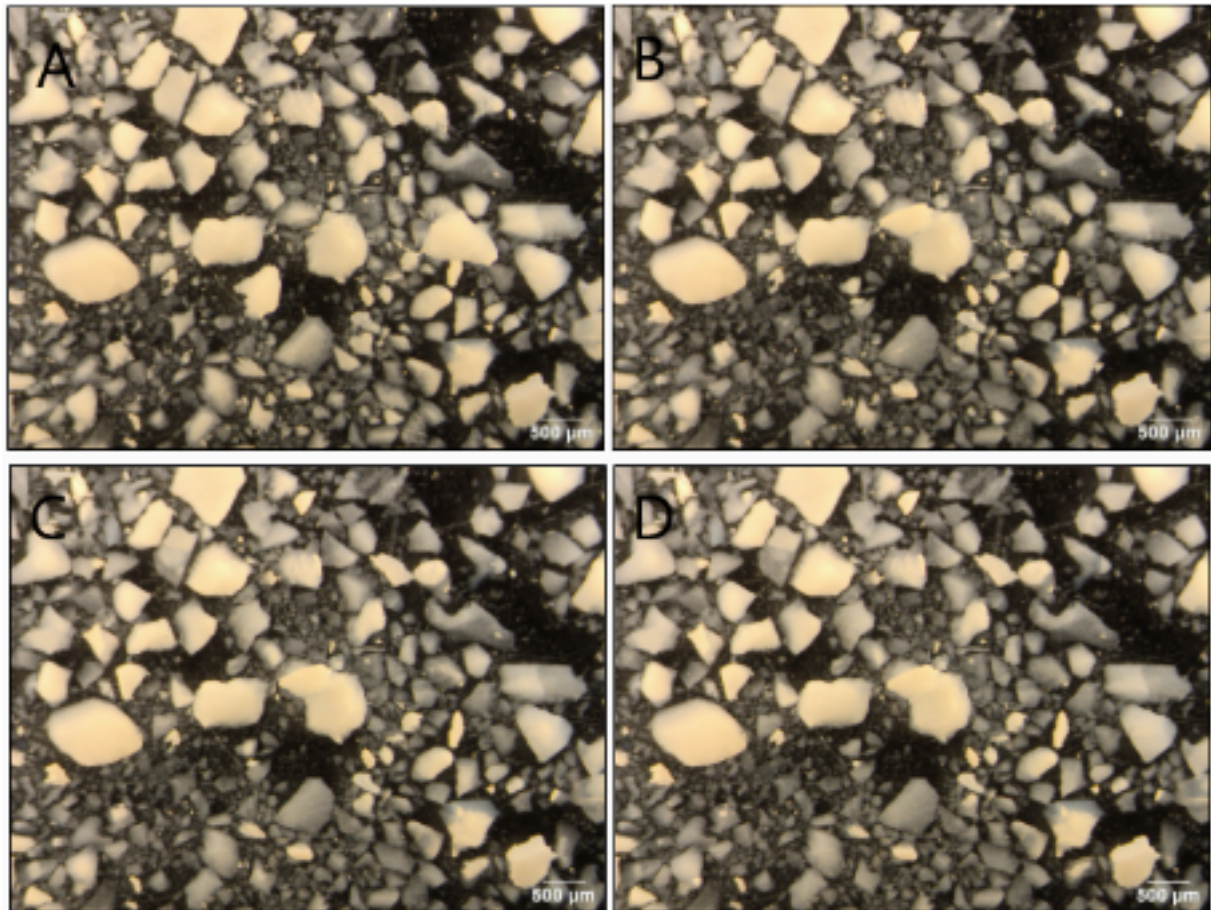


Figura 35: (MO) Muestra A4; A) tiempo 0; B) 5 minutos; C) 10 minutos; D) 20 minutos

A4, tiene cierto parecido con las muestras A2 y A2' porque una parte de las partículas presentes parece estar lixiviado mientras que otra parte no, pero con la salvedad de que en esta muestra sólo parecen haberse lixiviado las partículas más pequeñas ya que las más grandes no cambian durante 20 minutos.

- **Muestra B1**

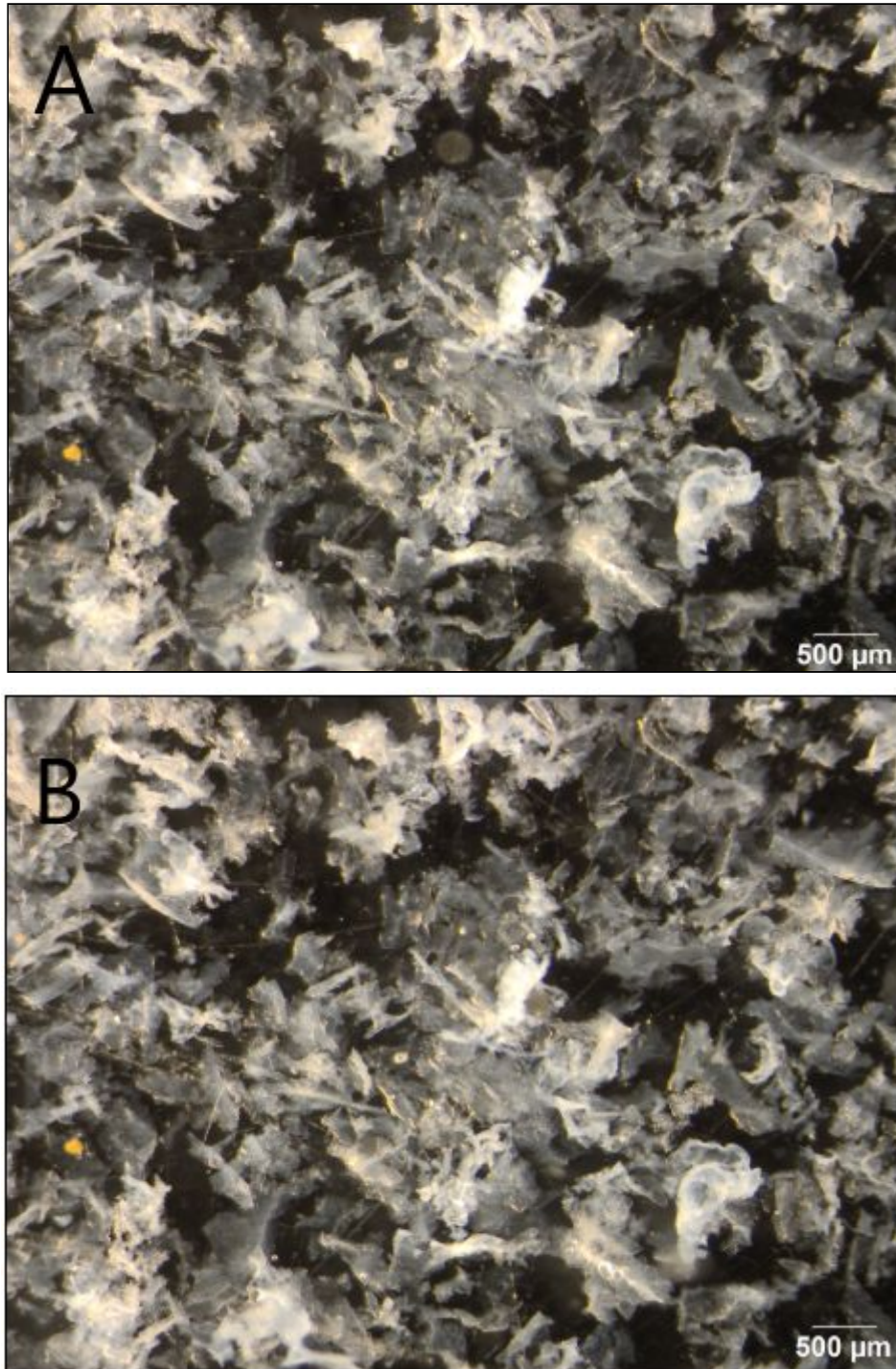


Figura 36: (MO) Muestra B1; A) tiempo 0; B) 10 minutos

- Muestra B2

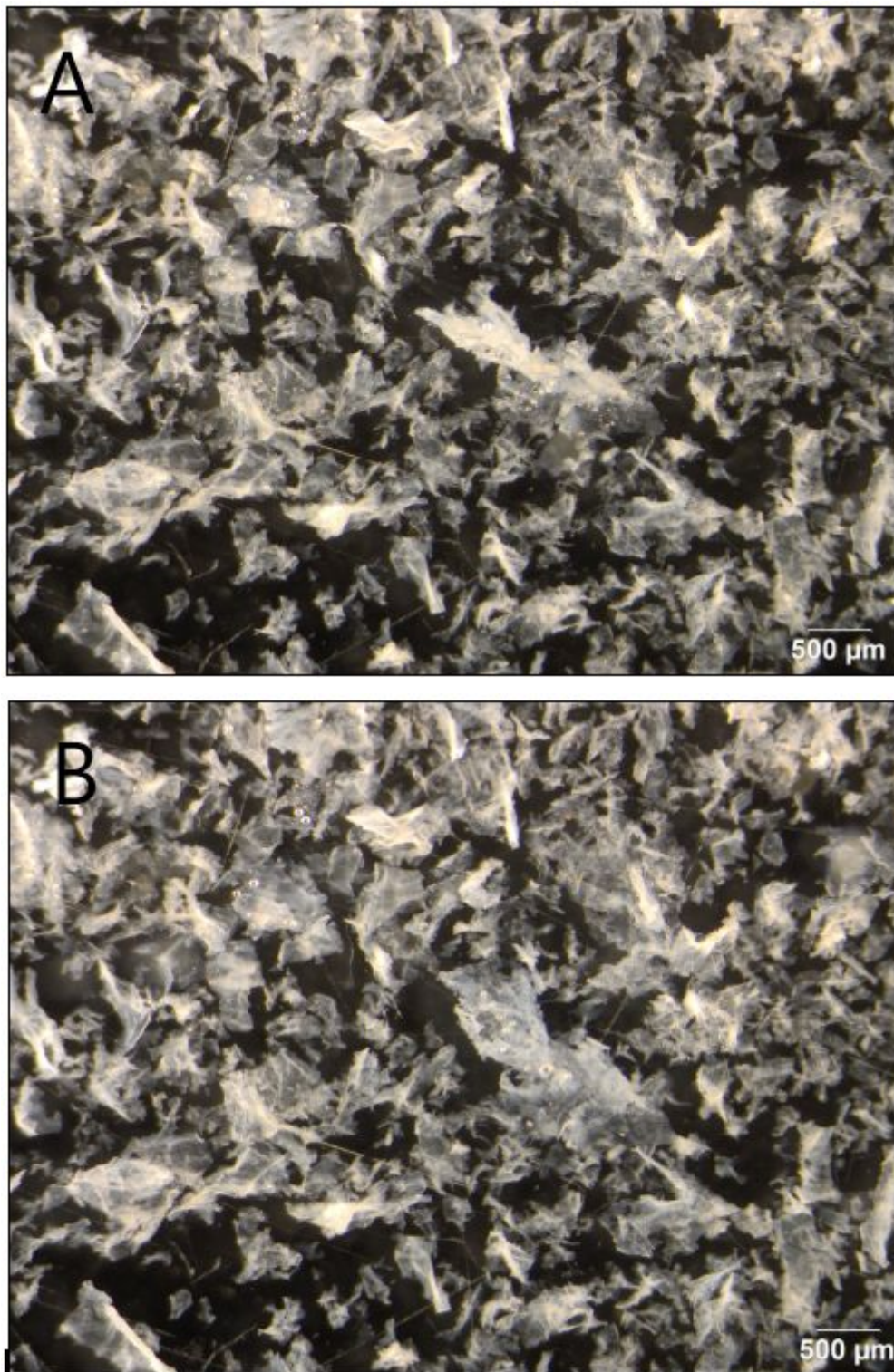


Figura 37: (MO) Muestra B2; A) tiempo 0; B) 10 minutos

- Muestra B3

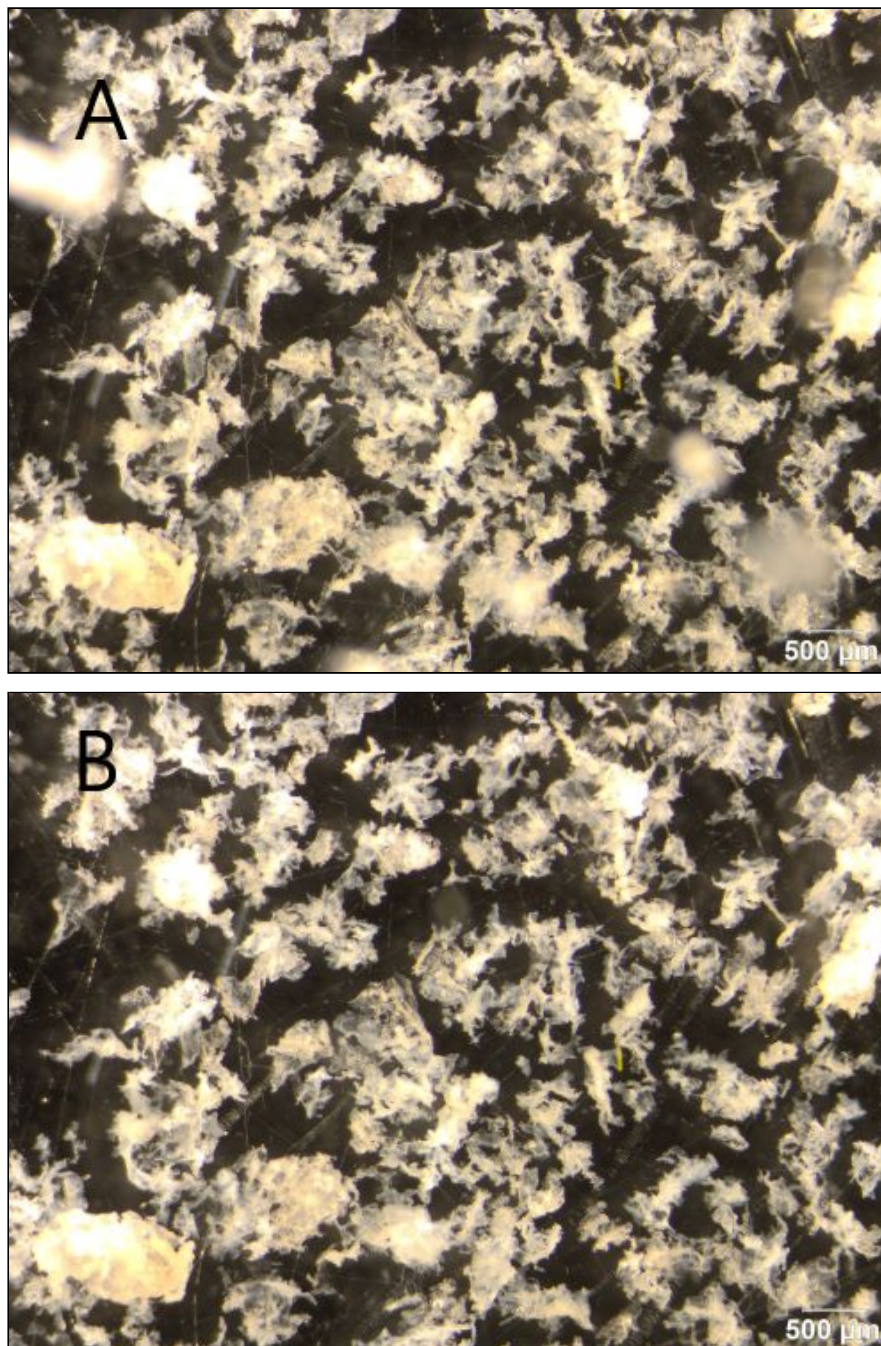


Figura 38: (MO) Muestra B3; A) tiempo 0; B) 10 minutos

Las 3 muestras de la serie B tienen en común que durante los primeros 10 minutos, al menos, no parece que el AS se consiga extraer. B1 y B2 tienen un aspecto muy pero en B3 se intuye que la cantidad de AS es mayor por la intensidad del color blanco. En el punto 4 del documento (análisis de resultados) se trata por qué puede haberse dado esta situación.

3.3 Microscopía electrónica de barrido (MEB)

El MEB se planteó utilizarlo de forma paralela con la microscopía óptica para ver conjuntamente si el encapsulado se había realizado de manera correcta. Asimismo, viendo los resultados obtenidos de la lupa, también se utilizó para intentar encontrar cuáles eran los motivos de las diferentes velocidades de lixiviación registradas.

También se pensó en utilizar el MEB para intentar ver el tamaño de las partículas de las muestras obtenidas por la vía B, ya que como se ha comentado anteriormente, no se pudo utilizar el DLS para este tipo de muestras.

Como los resultados del MEB no proporcionan tanta información como el microscopio óptico las imágenes se comentarán en el apartado 4.

- **Muestra A1**

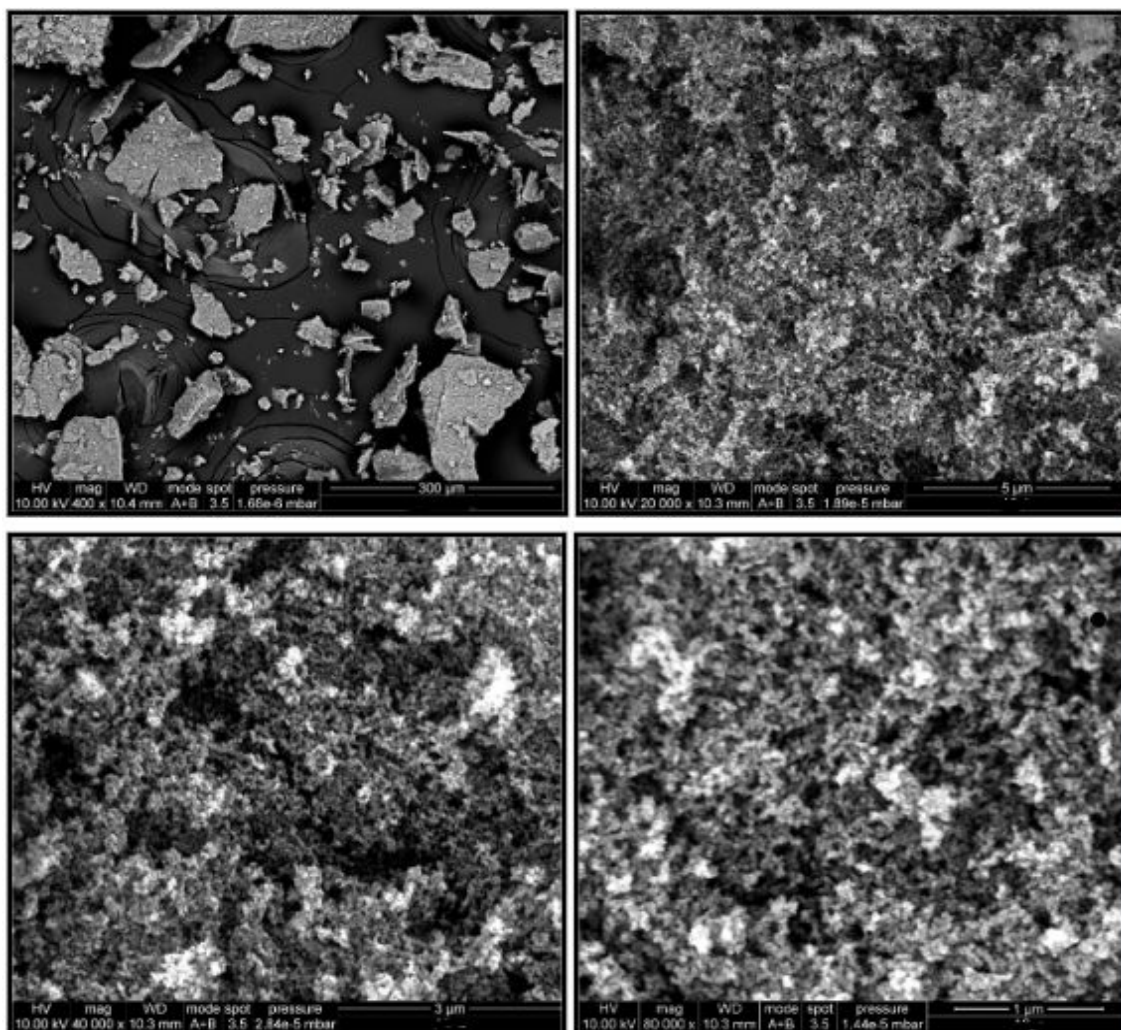


Figura 39: Muestra A1 a diferentes aumentos (MEB)

- **Muestra A1'**

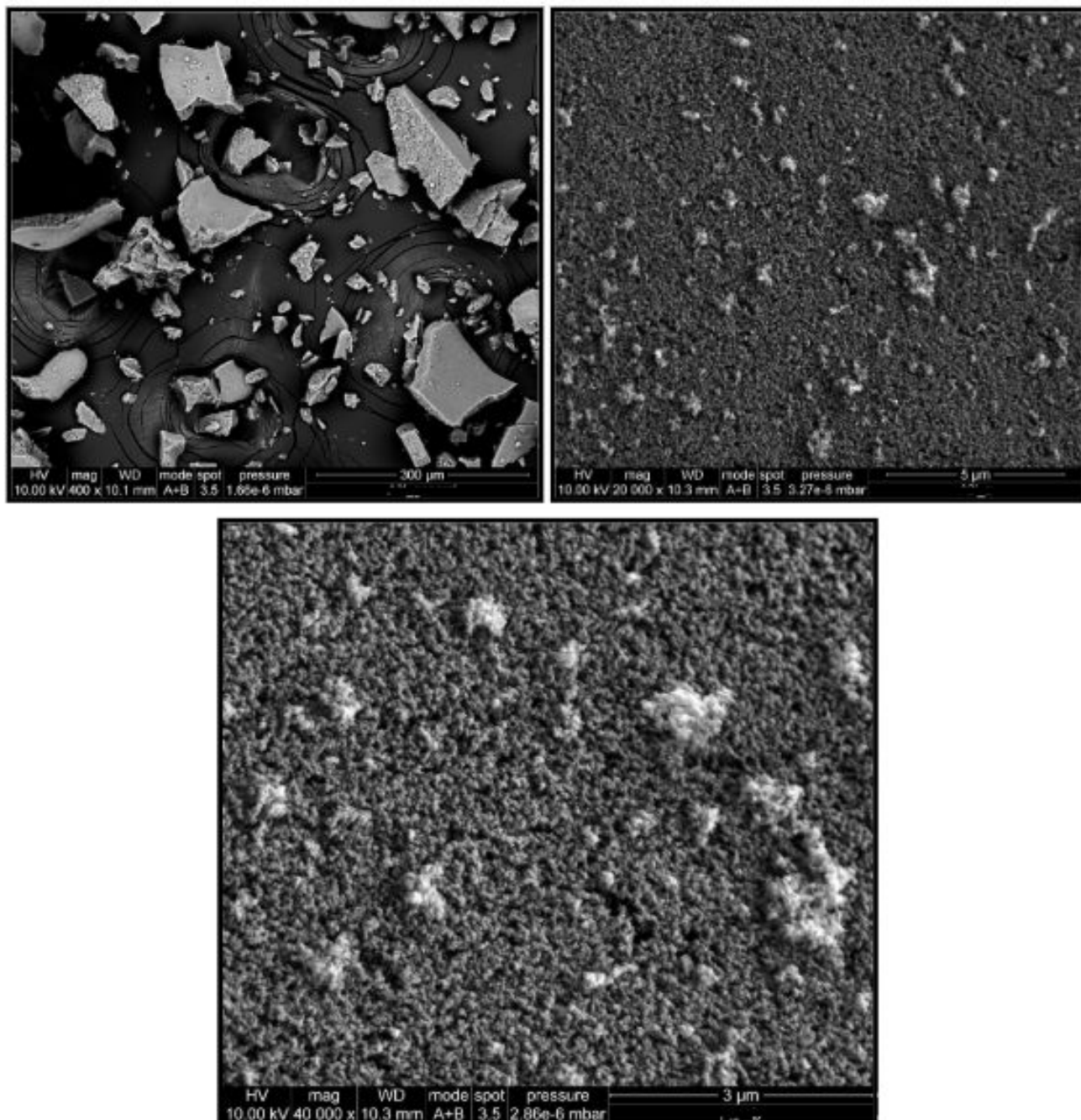


Figura 40: Muestra A1' a diferentes aumentos (MEB)

- **Muestra A2**

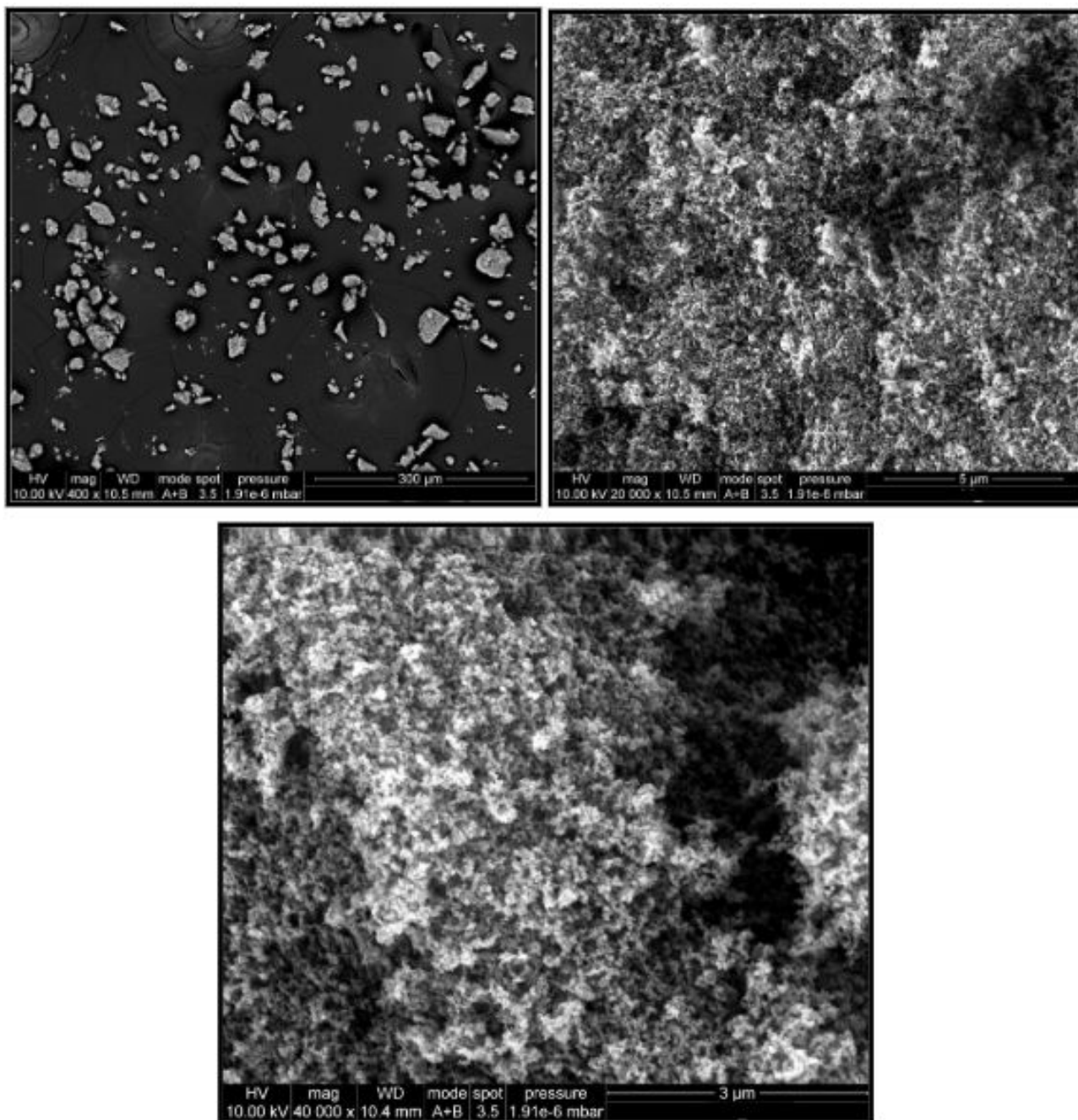


Figura 41: Muestra A2 a diferentes aumentos (MEB)

- **Muestra A2'**

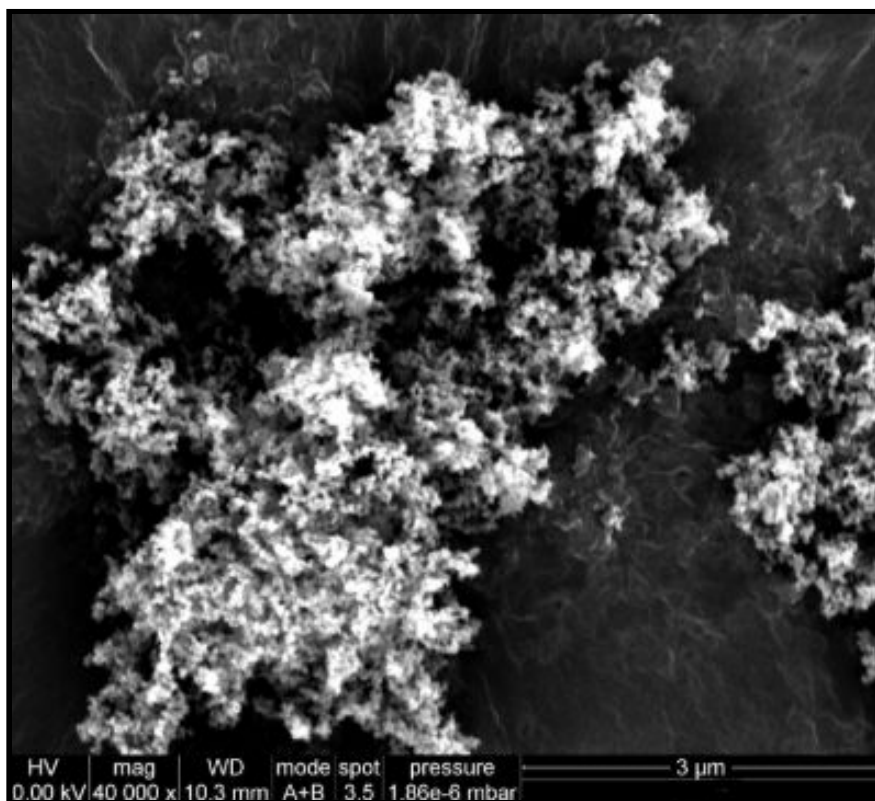
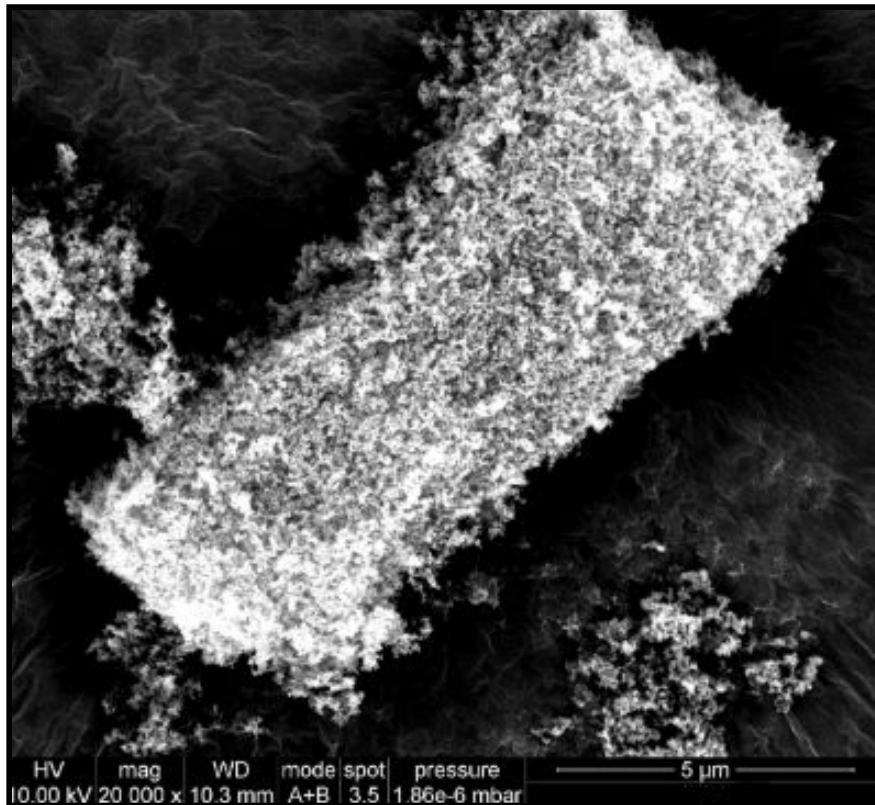


Figura 42: Muestra A2' a diferentes aumentos (MEB)

- **Muestra A3**

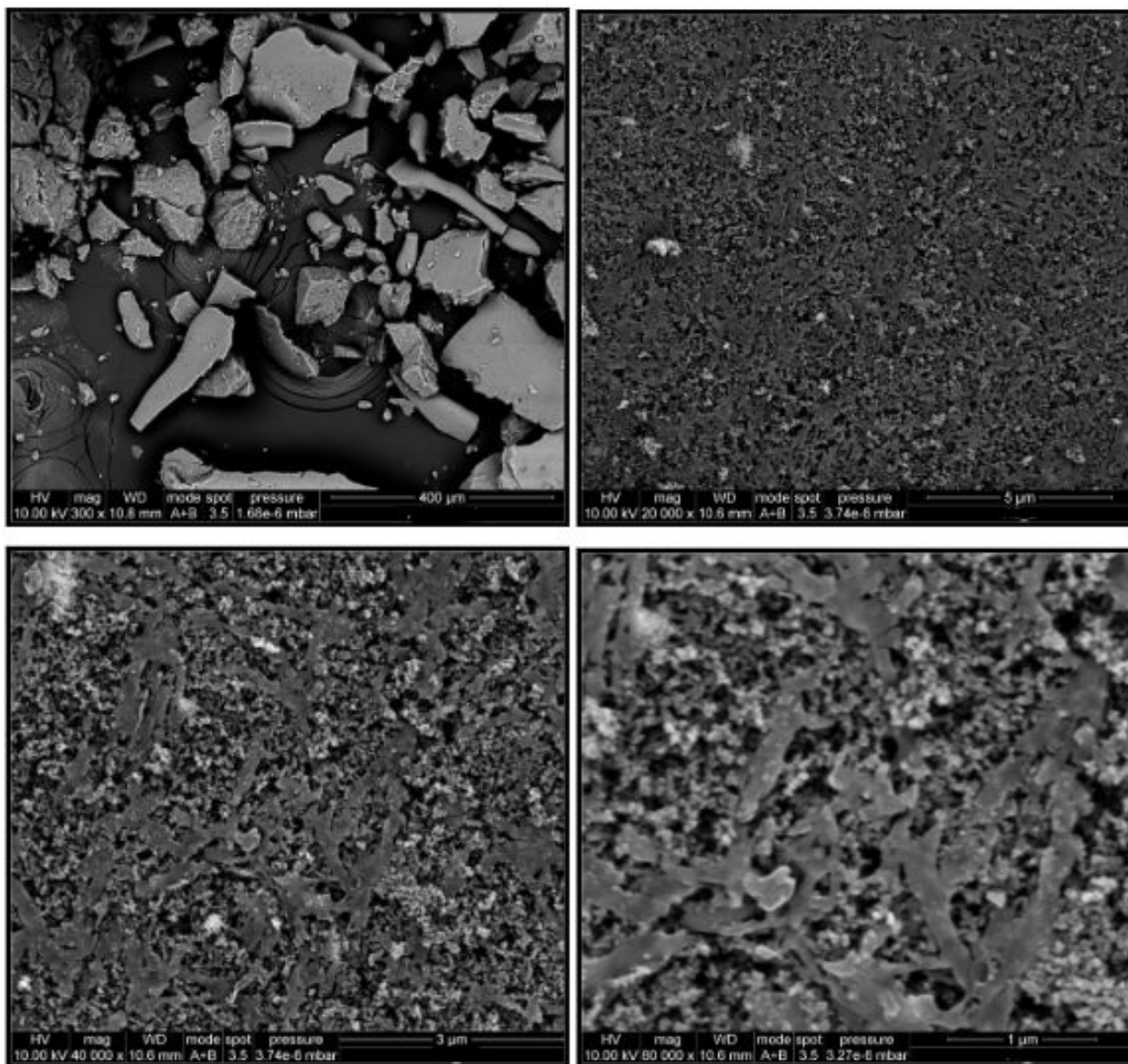


Figura 43: Muestra A3 a diferentes aumentos (MEB)

- **Muestra A3'**

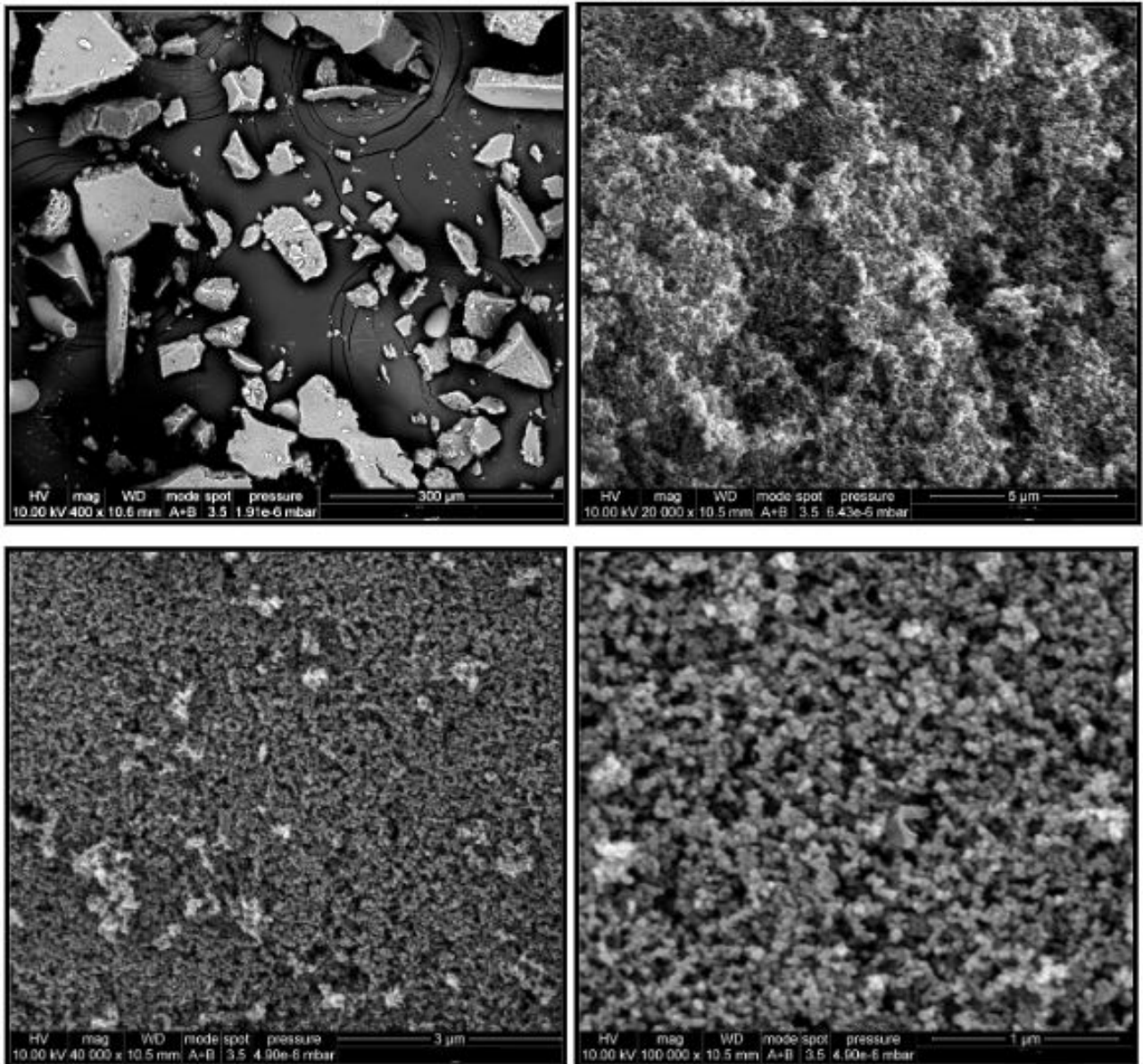


Figura 44: Muestra A3' a diferentes aumentos (MEB)

- **Muestra A4**

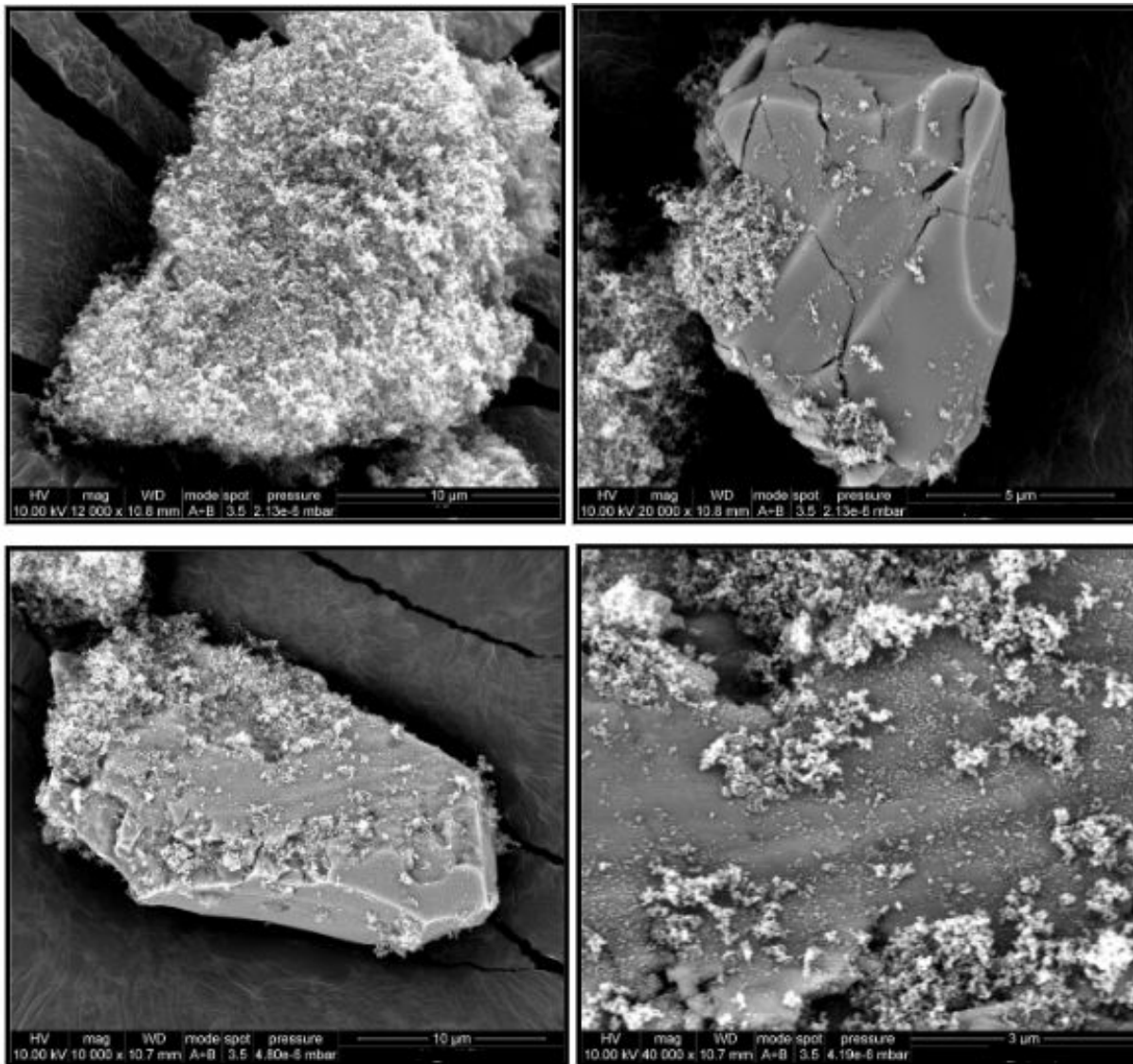


Figura 45: Muestra A4 a diferentes aumentos (MEB)

- **Muestra B1**

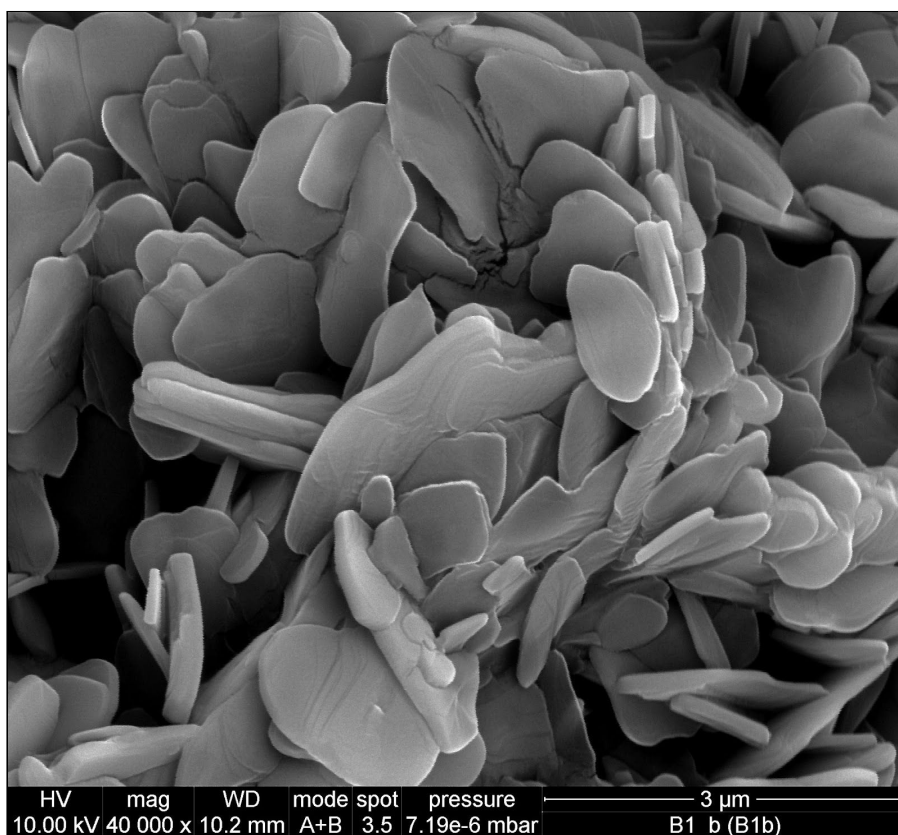
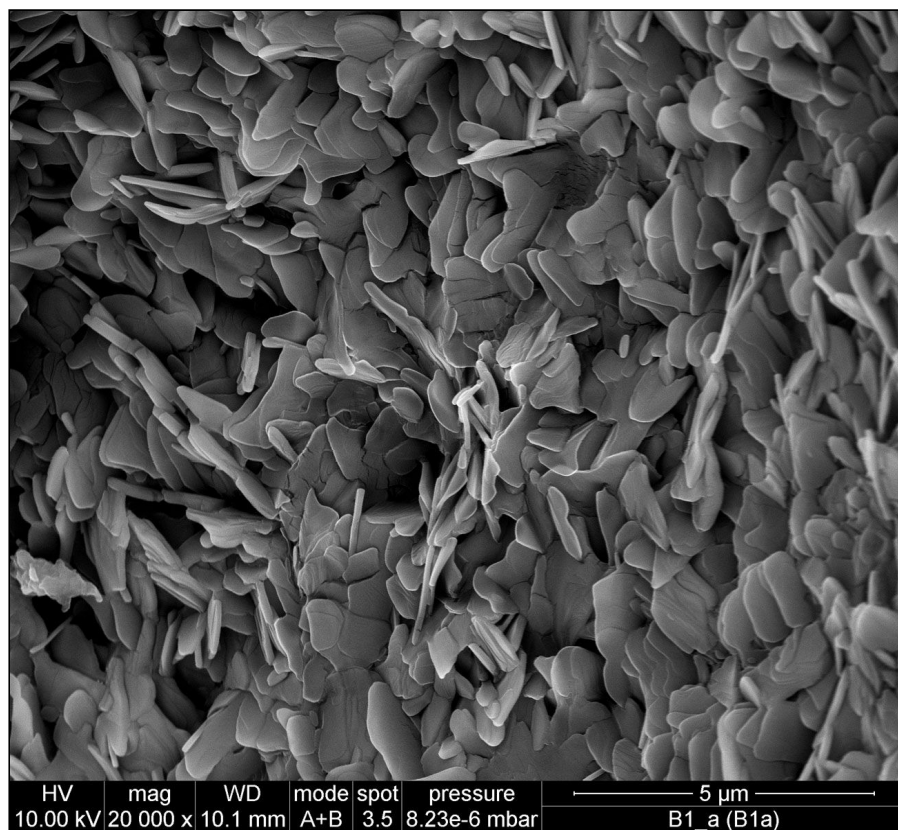


Figura 46: Muestra B1 a diferentes aumentos (MEB)

- **Muestra B2**

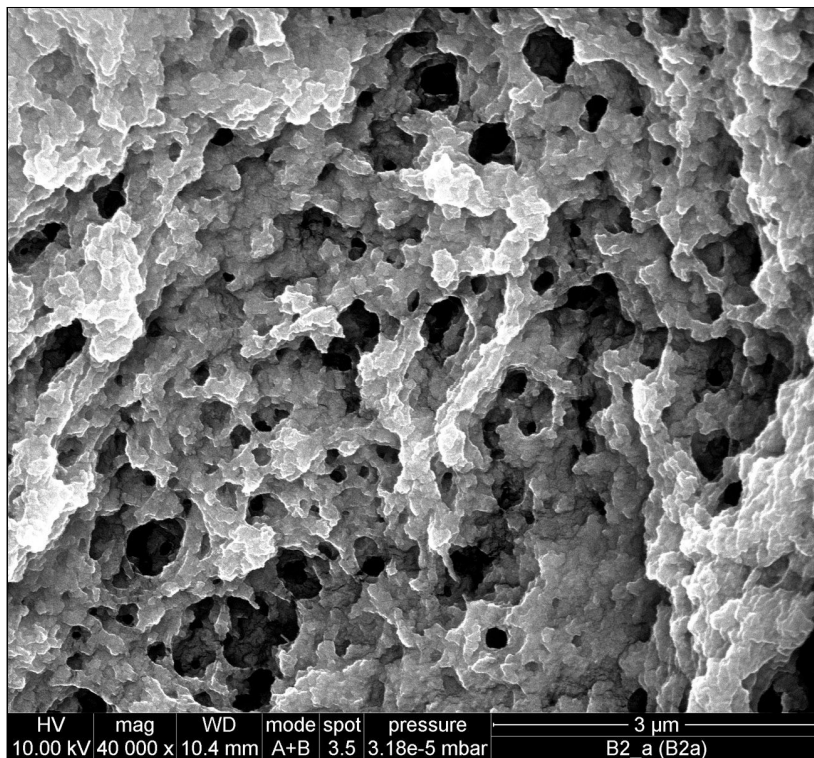
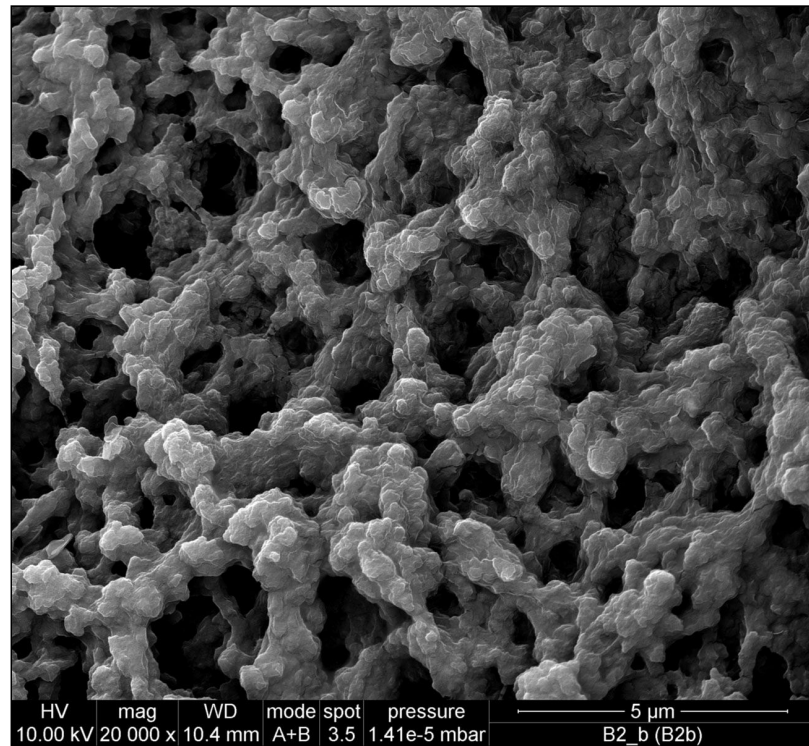


Figura 47: Muestra B2 a diferentes aumentos (MEB)

- **Muestra B3**

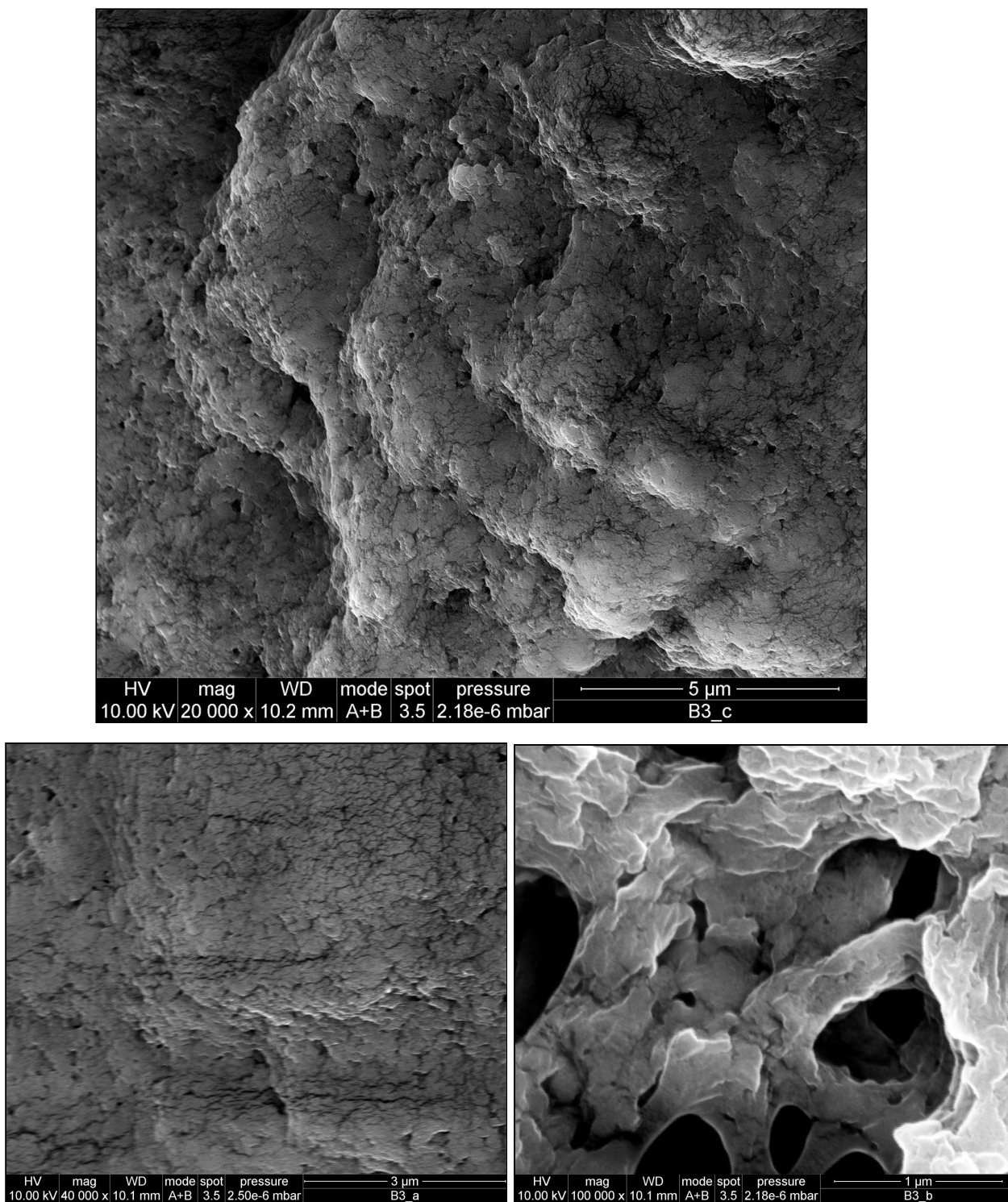


Figura 48: Muestra B3 a diferentes aumentos (MEB)

3.4 Eficiencia de encapsulado

Para medir la eficiencia de encapsulado se siguió la guía que se muestra en el artículo [5].

1. Primero se pesaron aproximadamente 30 mg de cada muestra y se puso en disolución con unos 5 ml de HCl 0,1 M durante 24h a temperatura ambiente para conseguir extraer el AS de las nanopartículas encapsuladas.

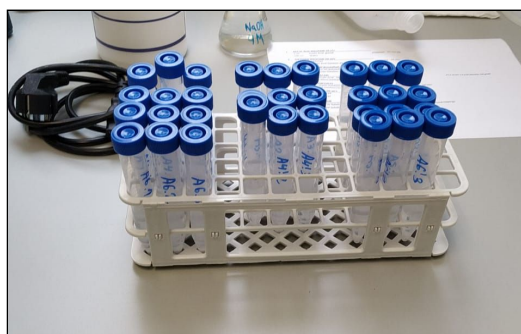


Figura 49: Extracción del AS de las muestras con HCl durante 24h

2. Se construyó una recta de calibrado para determinar la cantidad sobrenadante de AS que contenía cada muestra.

	ppm ($\frac{mg}{l}$)	λ (297 nm)
5 mg AS en 50 ml HCl 0,1M	100	2,093
1 ml (disolución 100 ppm) + 1 ml HCl 0,1 M	50	1,042
0,2 ml (disolución 100 ppm) + 1,8 ml HCl 0,1 M	10	0,211
0,2 (disolución 50 ppm) + 1,8 ml HCl 0,1 M	5	0,093
0,2 (disolución 10 ppm) + 1,8 ml HCl 0,1 M	1	0,001
0,2 (disolución 5 ppm) + 1,8 ml HCl 0,1 M	0,5	0
Blanco (2 ml HCl 0,1 M)	0	0

Tabla 5: Valores de concentración y absorbancia para la construcción de la recta de calibrado.

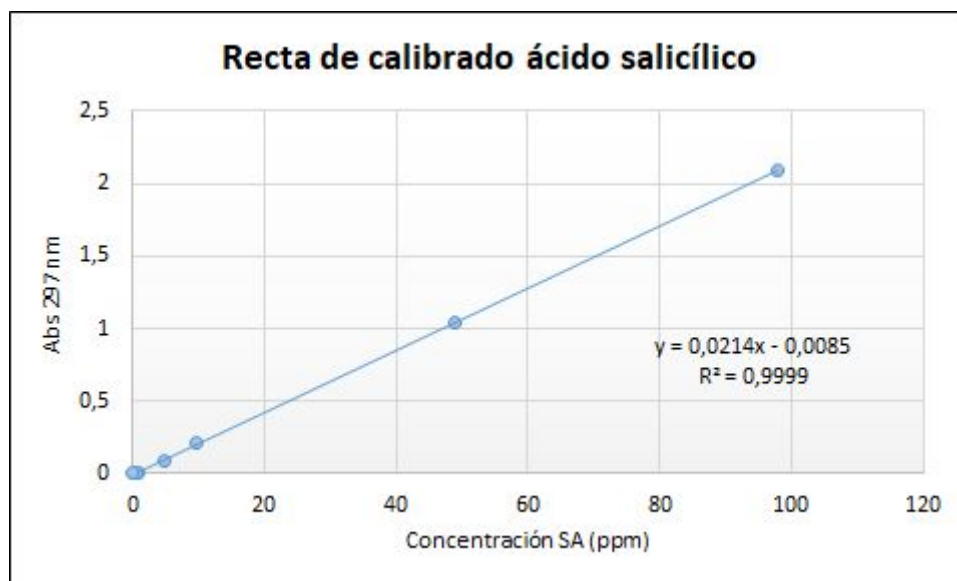


Gráfico 4: Recta de calibrado del AS (absorbancia y concentración)

Como se puede apreciar, el R^2 obtenido tras hacer la regresión fue muy cercano a uno ($R^2 = 0,9999$), lo que denota una gran linealidad.

$$\text{Abs} = 0,0214 \cdot (\text{concentración}) - 0,0085 \quad \text{ec. (1)}$$

- Las muestras se centrifugaron durante 20 minutos a 4.800 rpm a una temperatura constante de 4°C.

El ácido salicílico sobrenadante que quedó tras la centrifugación se midió por espectrofotometría a la longitud que el AS es capaz de absorber ($\lambda=297$ nm).

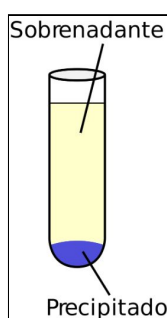


Figura 50: Ilustración de las muestras obtenidas tras el centrifugado

El máximo valor de lectura que podía registrar el espectrofotómetro era de 3,000; con lo cual, se tuvo que hacer una dilución 1:10 para que los valores de medida de cada muestra entraran en el rango de lectura del espectrofotómetro.

TFM: Preparación de nanopartículas encapsuladas de AS con sílice coloidal y quitosano

Cada muestra se preparó por triplicado para realizar el promedio entre los tres resultados y así obtener un valor de absorbancia más preciso.



Figura 51: Muestras colocadas en la centrífuga

A continuación se muestra una tabla donde se recogen los gramos que se pesaron en cada muestra (30 mg aproximadamente), los mililitros de disolvente 0,1 M de HCl utilizados (5 ml aproximadamente), la absorbancia medida con el espectrofotómetro, la concentración diluida obtenida (se tuvo que diluir para poder medir como ya se ha precisado) y la concentración real de cada muestra.

La concentración diluida se obtuvo despejando la ecuación 1.

$$\text{Concentración} = (\text{Abs} + 0.085) / 0,0214 \quad \text{ec. (1')}$$

Conociendo la concentración diluida, se deshizo el cambio multiplicando por 10 este valor (la dilución que se preparó fue 1:10) y se obtuvo la concentración real.

Muestra	Masa (g)	V. disolvente (ml)	Absorbancia ($\lambda=297$ nm)	Concentración diluida (ppm)	Concentración real (ppm)
A1	30	5,08	0,782	36,94	369,40
	33	5,20	0,896	42,27	422,70
	30	5,28	0,711	33,62	336,20
A1'	34	5,1	0,732	34,60	346,00
	31	5,12	0,983	46,33	463,30
	33	5,16	0,692	32,73	327,30

TFM: Preparación de nanopartículas encapsuladas de AS con sílice coloidal y quitosano

A2	34	5,12	1,349	63,43	634,30
	35	5,32	1,285	60,44	604,40
	33	5,35	1,037	48,86	488,60
A2'	32	5,07	1,213	57,08	570,80
	30	4,99	1,483	69,70	697,00
	33	5,09	1,178	55,44	554,40
A3	34	5,3	0,705	33,34	333,40
	34	5,15	0,731	34,56	345,60
	33	5,09	0,753	35,58	355,80
A3'	30	5,08	1,058	49,84	498,4
	33	4,98	1,095	51,57	515,7
	31	5,1	1,09	51,33	513,3
A4	30	5,31	0,713	33,71	337,10
	35	5,33	0,913	43,06	430,60
B1	31	4,92	2,89	135,44	1354,40
	32	5,12	2,686	125,91	1259,10
	31	4,94	2,865	134,28	1342,80
B2	30	4,93	2,533	118,76	1187,60
	32	4,84	2,793	130,91	1309,10
	31	5,31	2,384	111,80	1118,00
B3	35	5,15	2,259	105,96	1059,60
	33	5,21	2,072	97,22	972,20
	32	5,32	2,177	102,13	1021,30

Tabla 6: Valores de absorbancia obtenidos en el espectrofotómetro para cada muestra.

Como puede observarse, en la muestra A4, se obtuvieron dos valores en vez de tres porque hubo un problema en su preparación. En el momento de trasvasar el sobrenadante desde el tubo que contenía la muestra hasta las cubetas que se introducen en el espectrofotómetro, se levantó la fracción sedimentada. Este hecho podría haber alterado el valor de medida y se decidió descartar la muestra.

4. Una vez que se conocía la concentración real, se pudo obtener los mg totales de AS presente en cada muestra (cantidad libre de AS sobrenadante). Además sabiendo la carga añadida de AS en cada experimento se saben los mg teóricos que debería haber de esta sustancia. Conociendo estos datos, se pudo calcular la eficiencia del encapsulado.

$$(\%) EE = \frac{\text{Cantidad libre de AS sobrenadante}}{\text{mg teóricos de AS}} \times 100 \quad \text{ec. (2)}$$

La cantidad libre de AS sobrenadante se obtuvo multiplicando la concentración real por el volumen de disolvente añadido (valores de la **Tabla 6**). Por ejemplo, tomando los datos de la primera fila de la tabla anterior:

$$A3 \rightarrow 369,39 \text{ (mg/l)} * (5,08 \cdot 10^{-3} \text{ l disolvente}) = 1,876 = 1,88 \text{ mg AS}$$

Siguiendo con el mismo ejemplo, como se sabe la cantidad inicial de muestra que se pesó y la carga añadida de AS en cada experimento se pueden conocer los mg teóricos que debería haber de AS.

Vía A: carga de AS= 10% (ver tablas 1 y 2) $\rightarrow 0,1 \cdot 30 = 3 \text{ mg de AS teóricos.}$

Suponiendo para la vía B que tras el secado, los disolventes como el agua, el ácido acético, el DCM y el Tween 20 dejaron un residuo seco despreciable la carga de AS fue la siguiente:

$$\text{Carga de AS} = 2\text{g (quitosano)} + 1,6\text{g (AS)} + 1\text{g (TPP-Na)} \rightarrow 1,6 / 4,6 = 35\%$$

Vía B: $0,35 \cdot 30 \text{ mg} = 10,5 \text{ mg de AS teóricos.}$

TFM: Preparación de nanopartículas encapsuladas de AS con sílice coloidal y quitosano

Muestra	mg de AS totales	carga (%)	mg teóricos de AS	EE (%)	Promedio (%)	Desviación estándar
A1	1,88	0,10	3,00	62,55	62,78	2,15
	2,20	0,10	3,30	66,60		
	1,78	0,10	3,00	59,17		
A1'	1,76	0,10	3,40	51,90	59,87	8,33
	2,37	0,10	3,10	76,52		
	1,69	0,10	3,30	51,18		
A2	3,25	0,10	3,40	95,53	88,87	4,95
	3,22	0,10	3,50	91,87		
	2,61	0,10	3,30	79,20		
A2'	2,89	0,10	3,20	90,44	87,98	2,46
	3,48	0,10	3,00	115,93		
	2,82	0,10	3,30	85,52		
A3	1,77	0,10	3,40	51,97	53,07	0,92
	1,78	0,10	3,40	52,34		
	1,81	0,10	3,30	54,89		
A3'	2,34	0,10	3,10	75,42	82,22	2,71
	2,39	0,10	3,20	74,56		
	2,62	0,10	3,10	84,45		
A4	1,79	0,10	3,00	59,68	58,41	2,95
	2,30	0,10	3,50	65,58		
B1	6,66	0,35	10,85	61,42	60,04	1,24
	6,45	0,35	11,20	57,56		
	6,63	0,35	10,85	61,14		
B2	5,85	0,35	10,50	55,76	55,68	0,54

	6,34	0,35	11,20	56,57		
	5,94	0,35	10,85	54,71		
B3	5,46	0,35	12,25	44,55	45,64	1,45
	5,07	0,35	11,55	43,85		
	5,43	0,35	11,20	48,51		

Tabla 7: Cálculo de la eficiencia de encapsulado

Un resultado de A2' se despreció debido a que no es posible obtener una eficiencia superior al 100%.

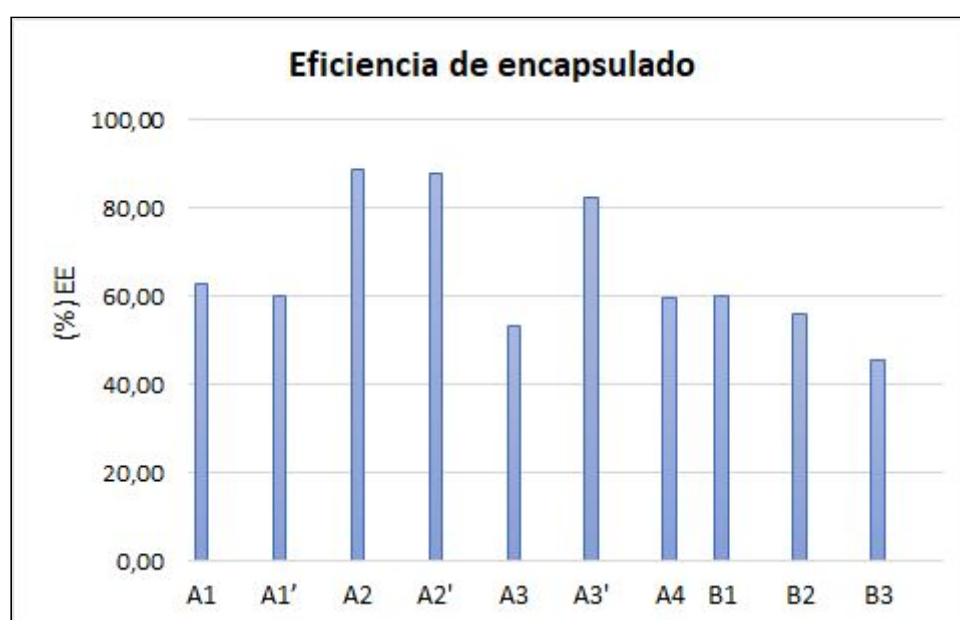


Gráfico 5: Eficiencia de encapsulado

4. Análisis de resultados

Como se ha podido comprobar a lo largo del documento, existen diferencias y similitudes significativas entre las muestras. Todas ellas se exponen a continuación.

En cuanto al tamaño de partícula de las muestras obtenidas por la vía A, como se ha podido apreciar tanto en los dos gráficos de la DTP y la **Tabla 4**, las diferencias son poco apreciables y todas las muestras analizadas mediante DLS siguen un patrón similar a excepción de las muestras A3' y A4.

La muestra A4 destaca por ser la distribución más estrecha de todas, es decir, casi todas las partículas tienen el mismo tamaño. Sin embargo, A3', tiene la distribución más ancha y una distribución casi bimodal. Esta muestra se repitió pero el resultado volvió a ser similar.

Las dos muestras con el tamaño de partícula más pequeño (A2 y A2') han sido las muestras que mejor eficiencia de encapsulado (EE) han dado. A3', que tiene partículas gruesas pero también pequeñas ha conseguido una (EE) similar, con lo cual, parece que exista una correlación entre la (EE) y el tamaño de partícula. Hay que añadir, como se ha podido comprobar en la microscopía óptica, que las partículas más pequeñas tienen una tendencia a lixiviar más rápido mientras que las grandes tardan más, por eso, habría que comprobar si las muestras con tamaños de partículas grandes se han lixiviado por completo y el resultado final ha sido el obtenido o por el contrario, tras 24h no se ha conseguido extraer todo el AS y por eso se han registrado (EE) inferiores.

Las fotos tomadas por microscopía óptica además de revelar que el AS se encuentra en el interior de la cápsula, también han servido para conocer la velocidad de lixiviación cualitativa de las muestras, un parámetro crítico a la hora de elegir el mejor candidato para la aplicación de las nanopartículas encapsuladas en campo, ya que, como se ha visto, uno de los objetivos del encapsulado era conseguir una liberación progresiva del AS.

Las muestras A1, A1', A2, y A2' presentan velocidades de lixiviación elevadas, es decir, durante los primeros minutos la muestra cambia notoriamente al estar en contacto con agua, mientras que las muestras A3 y A3' y todas las muestras de la serie B, no cambian durante los primeros 10-15 minutos en las mismas condiciones.

La muestra A4 parece ser un caso intermedio porque se aprecian algunos cambios atenuados pero en la mayoría de las partículas es difícil apreciar cambios evidentes tras 20 minutos en medio acuoso.

No obstante, si se vuelve a mirar la (EE), a excepción de A2, A2' y A3' que presentan un 20% más que el resto, las demás muestras se encuentran en rangos similares, lo cual quiere decir que se acaba extrayendo el AS de las muestras A3, A3', A4, B1, B2 y B3 pero se necesita más tiempo o un medio más agresivo para que la lixiviación se lleve a cabo.

Con la ayuda del MEB se intentó encontrar evidencia en la microestructura para justificar tales diferencias en la lixiviación pero por motivos como el difícil análisis de las muestras debido a que el haz de electrones movía la muestra y no se era capaz de conseguir resoluciones aceptables a altos aumentos o el severo astigmatismo que presentaba el equipo, la calidad y la información de las imágenes no ha sido el esperado. Sin embargo comparando todas las fotografías de las muestras A a 40.000 aumentos (escala 3 μm), se puede intuir que las muestras A1, A1', A2 y A2' parecen presentar microestructuras más abiertas mientras que el resto, A3, A3' y A4, siendo A4 la más evidente, presentan una microestructura con menos porosidad abierta.

Donde sí se consigue apreciar muchos cambios han sido en las muestras de la serie B, ya que con un simple cambio en el pH, los resultados han sido muy diferentes en cuanto a la microestructura.

En las imágenes tomadas de la muestra B1 se puede apreciar una microestructura compuesta a partir de láminas que, en un principio, no presentan orientación preferente (es posible que durante la preparación de la muestra se modificara su orientación, ya que era difícil conseguir que se quedaran adheridas en el portamuestras del MEB).

En cuanto a la porosidad de esta muestra, no se consigue apreciar ningún tipo, lo que dificulta enormemente que el disolvente actúe para lixiviar el AS de las cápsulas no expuestas. Este hecho puede ser muy positivo debido a que ralentizaría la lixiviación y aseguraría la presencia de AS encapsulado durante períodos de tiempo más largos.

El tamaño de las láminas es muy variable, en las imágenes presentadas se pueden apreciar láminas de un tamaño inferior a los 500 nm y otras superiores a las 3 μm aunque es difícil encontrar láminas aisladas ya que se encuentran intercaladas y superpuestas unas con otras.

Con un cambio en el pH de 1,2 aproximadamente se obtiene la muestra B2, que presenta una microestructura formada por esferas adheridas unas con otras creando largos puentes que a su vez se encuentran entrelazados. En esta muestra se aprecia porosidad entre los puentes que forman las partículas pero, al parecer, no afecta a la velocidad de lixiviación, porque si se compara con B1, que por el contrario no parece mostrar porosidad, los resultados en la lupa fueron parecidos, ya que, durante los primeros 15 minutos, ninguna sufrió cambios significativos en cuanto a la cantidad de AS lixiviado.

Respecto al tamaño de partícula de la muestra B2, se puede estimar si se contempla la escala que el tamaño medio oscila alrededor de los 500 nm habiendo de mayor y de menor tamaño.

Finalmente, B3, tiene una microestructura en la cual se intuyen esferas parecidas a las de B2 (donde más se aprecia es en la imagen superior de la **Figura 48**) pero más compactadas dando un aspecto de mayor densificación y consecuentemente, menor porosidad. El tamaño de las partículas es muy difícil de apreciar por el aspecto aplanado que presenta la muestra.

Como se ha podido analizar en el gráfico de la (EE), en las muestras de la serie B, a medida que se ha aumentado el pH, la eficiencia ha disminuido. Esto puede explicarse desde el punto de vista físico-químico. Los puntos isoeléctricos (IEP) del ácido salicílico [10] y del quitosano [11] son 8,1-8,2 y 4,5-5,6 respectivamente. Al trabajar con un pH por debajo de 5, tanto el AS como el quitosano se encuentran cargados negativamente (mayor número de cargas negativas que positivas) por estar por debajo de (IEP), con lo cual, el anclaje del AS sobre el quitosano no es de tipo electrostático y, por consiguiente, no es muy fuerte, mientras que si se trabaja por encima de 5, como es el caso de B3, el anclaje que se produce es más intenso debido a que la cantidad de cargas positivas del quitosano son mayores.

Este fenómeno podría haber afectado a la hora de lixiviar el material. B1, habría sido el que mayor facilidad de lixiviación habría tenido debido a que los anclajes producidos habrían sido menos intensos porque a penas habría cargas positivas en

el quitosano. La lixiviación en B2 habría tenido mayor dificultad por haber aumentado el pH (se reducen cargas negativas y aumentan las positivas, con lo cual, el anclaje de tipo electrostático habría sido mayor) y la lixiviación en B3 habría sido el que peor resultado habría obtenido por tener el mayor número de cargas positivas (mayor número de enlaces electrostáticos y mayor dificultad para que se desanclen).

Habría que comprobar, si a tiempos largos estos resultados se igualan o incluso B3 supera a B2 y B1 porque el pH utilizado para el encapsulado es el más favorable ya que es en el caso en el que el quitosano se encuentra más cargado positivamente mientras que todo el AS se encuentra cargado negativamente.

5. Conclusiones

Como se ha explicado al inicio de este trabajo, el encapsulado era el propósito esencial del mismo y las imágenes tomadas por microscopía óptica revelan que el AS se encuentra en el interior de las cápsulas formadas tanto por sílice coloidal como por quitosano, con lo cual, se puede confirmar que mediante los procesos llevados a cabo es posible alcanzar la formación de nanopartículas encapsuladas de AS.

Las muestras obtenidas por la vía A que tienen el tamaño de partícula inferior han conseguido una eficiencia de encapsulado mayor, pero la muestra con la DTP más ancha, en la cual hay partículas pequeñas pero también gruesas, ha conseguido una eficiencia de encapsulado parecida. Resulta interesante que las mayores eficiencias de encapsulado se han conseguido por medio de los dos tipos de procesamiento de la vía A, tanto en la turbodesleición como en el molienda planetaria.

Las muestras A3, A3', A4, B1, B2 y B3 presentan un encapsulado más robusto, ya que A1, A1', A2 y A2' nada más ponerse en contacto con agua, se da una lixiviación muy rápida.

Las muestras A2 y A2' no parecen variar mucho entre sí, con lo cual, la evaporación de la acetona mientras se prepara la muestra no parece afectar en el resultado final. Ambas presentan una eficiencia de encapsulado superior al resto pero las muestras con el encapsulado más robusto son preferibles debido a que la liberación del AS es más progresivo y consecuentemente, más duradero para la planta.

De las muestras de la serie B, la muestra que se ha procesado con el pH más bajo ha conseguido mayores resultados en la eficiencia de encapsulado, lo cual, la hace la opción más recomendable. Dejando al margen este aspecto, las otras muestras no presentan ningún inconveniente aparente, por lo tanto, serían igual de válidas que B1.

Finalmente, se concluye que se pueden conseguir formar cápsulas tanto de sílice como de quitosano (siendo las cápsulas de sílice un poco más eficientes) y que ambos tipos de cápsulas son potencialmente aptas para realizar ensayos con plantas para cuantificar la eficacia de estas nanopartículas.

6. Observaciones

En vista a la dificultad en la lixiviación de algunas muestras, para posibles análisis futuros, a la hora de medir la eficiencia de encapsulado, sería recomendable plantear un barrido de tiempos de extracción superior a 24h para comprobar que, pasado ese tiempo, todo el AS ha sido extraído y no queda nada en el interior de la cápsula.

Para futuros ensayos, sería recomendable realizar los mismos tipos de procesamiento variando los tamaños de partícula y comprobar de esta manera si el resultado de la eficiencia de encapsulado se ve afectado.

También sería interesante plantear ensayos en el encapsulado con quitosano a pH entre 6-7 y ver los resultados en la lixiviación para asegurarse que cuanto mayor es el número de enlaces electrostáticos, mayor es la dificultad de lixiviación.

7. REFERENCIAS

[1]: Zahra Souri, Naser Karimi, Marzeyh Sarmadi, Elham Rostami. Salicylic acid nanoparticles (SANPs) improve growth and phytoremediation efficiency of *Isatis cappadocica* Dewv., under As stress. IET Journals, The Institution of Engineering and Technology, 2017.

[2]: J.D. Jones, J.L. Dangl. The plant immune system. *Nature*, 444 (7117) (2006), p. 323.

[3]: Dorey, S., Baillieul, F., Pierrel, M.-A., Saindrenan, P., Fritig, B., & Kauffmann, S. (1997). Spatial and Temporal Induction of Cell Death, Defense Genes, and Accumulation of Salicylic Acid in Tobacco Leaves Reacting Hypersensitively to a Fungal Glycoprotein Elicitor. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 10(5), 646–655. [doi:10.1094/mpmi.1997.10.5.646](https://doi.org/10.1094/mpmi.1997.10.5.646)

[4]: Ram Chandra Choudhary, R. V. Kumaraswamy, Sarita Kumari, S.S. Sharma, Ajay Pal, Ramesh Raliya , Pratim Biswas & Vinod Saharan. Cu-chitosan nanoparticle boost defense responses and plant growth in maize (*Zea mays* L.). *Scientific Reports*. DOI: [10.1038/s41598-017-08571-0](https://doi.org/10.1038/s41598-017-08571-0)

[5]: R.V.Kumaraswamy, SaritaKumaria, Ram Chandra Choud harya, S.S.Sharma, Ajay Pal, Ramesh Raliya, Pratim Biswas, VinodSahara. Salicylic acid functionalized chitosan nanoparticle: A sustainable biostimulant for plant, 2019.

[6]: S. Chandra, N. Chakraborty, A. Dasgupta, J. Sarkar, K. Panda, K. Acharya Chitosan nanoparticles: a positive modulator of innate immune responses in plants. *Sci. Rep.*, 5 (2015)

[7]: Maria C. Llinàs, David Sánchez-García. Nanopartículas de sílice: preparación y aplicaciones en biomedicina. Grup d'Enginyeria Molecular, Institut Químic de Sarrià, Universitat Ramon Llull, Via Augusta 390, E-08017 Barcelona (Spain).

[8]: Anshu Rastogi, Durgesh Kumar Tripathi, Saurabh Yadav, Devendra Kumar Chauhan, Marek Živčák, Mansour Ghorbanpour, Nabil Ibrahim El-Sheery, Marian Brestic. Application of silicon nanoparticles in agriculture. Doi:[10.1007/s13205-019-1626-7](https://doi.org/10.1007/s13205-019-1626-7)

[9]: Z. Youzuo, M. Zhang, H. Yang. Postharvest chitosan-g-salicylic acid application alleviates chilling injury and preserves cucumber fruit quality during cold storage. Food Chem., 174 (2018), pp. 558-563

[10]: Linqin Jiang, Lian Gao, Yangqiao Liu. Adsorption of salicylic acid, 5-sulfosalicylic acid and Tiron at the alumina/water interface. Elsevier. 2002.

[11]: N. Calero, J. Muñoz y A. Guerrero. Efecto del pH en emulsiones o/w formuladas con proteína de patata y quitosano. Departamento de Ingeniería Química. Facultad de Química. Universidad de Sevilla. 2012.