

Preparación y caracterización de nano- y micropartículas de sílice para la liberación controlada de atrazina

Preparation and characterization of silica nano- and microparticles for atrazine controlled release

Federico Adrian Fookes

INTEC – (UNL – CONICET) - Argentina
ffookes@santafe-conicet.gov.ar

Carlos Alberto Busatto

INTEC – (UNL – CONICET) - Argentina
cbusatto@santafe-conicet.gov.ar

María Eugenia Taverna

INTEC – (UNL – CONICET) - Argentina
UTN Facultad Regional San Francisco
metaverna@santafe-conicet.gov.ar

Maia Lescano

INTEC – (UNL – CONICET) - Argentina
mailescano@gmail.com

Diana Alejandra Estenoz

INTEC – (UNL – CONICET) - Argentina
destenoz@santafe-conicet.gov.ar

Resumen

La atrazina (2-cloro-4-etilamina-6-isopropilamina-s-triazina) es una triazina moderadamente tóxica, utilizada como herbicida selectivo de pre y post-emergencia. Después de su aplicación permanece en el medio ambiente debido a su baja biodegradabilidad y larga vida media en agua (entre 30 y 100 días). A fin de reducir el impacto ambiental de estos herbicidas se han empleado matrices orgánicas e inorgánicas para el desarrollo de sistemas de liberación controlada. Dentro de las matrices inorgánicas, se han evaluado las nanopartículas de sílice mesoporosas debido a su porosidad y elevada área superficial. En este trabajo se prepararon y caracterizaron nano- y micropartículas de sílice para la encapsulación de atrazina. Se evaluó el perfil de liberación mediante ensayos *in vitro* en agua y, además, se realizaron ensayos de fitotoxicidad en semillas de lechuga. Se observó que las nanopartículas mesoporosas presentan una liberación sostenida por al menos 24 h y una fitotoxicidad reducida.

Palabras clave: Atrazina, nanopartículas mesoporosas, liberación controlada

Abstract

Atrazine (2-chloro-4-ethylamine-6-isopropylamine-s-triazine) is a moderately toxic triazine, used as a selective pre- and post-emergence herbicide. After application, it remains in the environment due to its low biodegradability and long half-life in water (between 30 and 100 days) causing adverse environmental effects. In order to reduce them, controlled release systems based on mesoporous silica nanoparticles have been evaluated due to their porosity and high surface area. In this work, silica nano- and microparticles for atrazine encapsulation were prepared and characterized. The release profile was evaluated by *in vitro* assays in water. In addition, phytotoxicity tests were performed using lettuce seeds. The mesoporous nanoparticles exhibited sustained release for at least 24 h and reduced phytotoxicity.

Keywords: Atrazine, mesoporous nanoparticles, controlled release

Introducción

Los agroquímicos son utilizados ampliamente en la agricultura para la protección de los cultivos y control de plagas. La atrazina (2-cloro-4-etilamina-6-isopropilamina-s-triazina) es una triazina moderadamente tóxica, utilizada como herbicida selectivo de pre y post-emergencia en varios cultivos. Este herbicida pertenece a los contaminantes orgánicos persistentes debido a su baja biodegradabilidad y larga vida media en agua (entre 30 y 100 días). Se ha estimado que después de su aplicación, una gran parte persiste en el medio ambiente. Además, debido a su moderada solubilidad en agua (33 mg L^{-1}) y a su relativamente baja adsorción en el suelo, la atrazina puede migrar fácilmente hacia el agua subterránea, representando un peligro potencial para la salud humana ya que este herbicida y sus metabolitos clorados son considerados como disruptores endocrinos (Taverna *et al.*, 2018). A fin de reducir la toxicidad ambiental de estos agroquímicos, se han desarrollado matrices orgánicas e inorgánicas basadas en micro- y nanopartículas como posibles sistemas de liberación controlada. Estos sistemas ofrecen numerosas ventajas frente a su aplicación convencional tales como reducción de la cantidad de pesticida requerido para el control de cultivos, disminución del riesgo de contaminación ambiental, protección de los agroquímicos frente a factores ambientales y mejor eficiencia operativa (Grillo *et al.*, 2011). Dentro de las matrices inorgánicas empleadas como sistemas de liberación controlada, las nanopartículas de sílice mesoporosa (MSN) constituyen una alternativa de bajo costo con buena compatibilidad ambiental, gran superficie específica, tamaño de poro ajustable y alta capacidad de carga. Popat *et al.* estudiaron la carga y liberación de imidacloprid en MSN (Popat *et al.*, 2012). Los resultados demostraron que la cantidad adsorbida y el perfil de liberación son afectados por el tipo de estructura mesoporosa y el área superficial de las partículas. Por su parte, las MSN cargadas con abamectina demostraron un rendimiento notable, con fotoestabilidad, solubilidad en agua y biodisponibilidad del principio activo mejoradas (Feng *et al.*, 2020). La citotoxicidad y la actividad antibacteriana del tebuconazol fueron mejoradas cuando se utilizaron MSN como nanoportadores (Murguía *et al.*, 2014). Wanyika *et al.* prepararon MSN cargadas con metalaxilo, y las nanopartículas mostraron una liberación más lenta y sostenida de metaloxilo en comparación con el fungicida libre (Wanyika, 2013). Hasta el momento, no han sido reportados estudios sobre la aplicación de MSNs y de micropartículas de sílice en la encapsulación y liberación controlada de atrazina.

El objetivo de este trabajo es desarrollar sistemas nano y micro-particulados basados en sílice con diferentes estructuras porosas para la liberación controlada de atrazina, que permitan disminuir la dosis del herbicida y sus potenciales efectos nocivos. Se estudió la morfología y el tamaño medio de las partículas mediante microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido; y las cargas superficiales mediante determinaciones de potencial Z. Además, se evaluó la eficiencia de encapsulación y los perfiles de liberación *in vitro* del principio activo estudiado. Finalmente, se estudió la fitotoxicidad de la atrazina mediante el análisis de germinación y el crecimiento de semillas de lechuga (*Lactuca sativa*).

Trabajo Experimental

Materiales

Tetraetil ortosilicato (TEOS) (Fluka, Seelze, Alemania), bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) (Sigma-Adrich, St. Luis, MO, USA), hidróxido de sodio, hidróxido de amonio, etanol, metanol, acetonitrilo y hexano (Cicarelli, Argentina). Los reactivos fueron utilizados sin posteriores purificaciones. La atrazina utilizada fue de grado comercial ($\geq 90\%$, SYNGENTA, Argentina). Para la cuantificación del herbicida se emplearon estándares de atrazina (98%, Chem Service Inc. USA). Se utilizó agua ultrapura ($0,055 \mu\text{S}/\text{cm}$) obtenida en un equipo de purificación OSMOION.

Preparación de los sistemas particulados

Se prepararon tres tipos de sistemas particulados: i) nanopartículas de sílice no porosas (NP), ii) nanopartículas de sílice mesoporosas (MSN) y; iii) micropartículas de sílice nanoestructuradas a partir de NP y MSN.

i) Síntesis de NP

Para la síntesis de las NP se empleó el método Stöber modificado (Kadhem *et al.*, 2018). En un vaso de precipitado, 200 mL de etanol y 22 mL de hidróxido de amonio 25% p/v se mezclaron bajo agitación magnética a 300 rpm. Luego, se añadieron 14 mL de TEOS y la mezcla obtenida fue agitada durante 12 h a 25 °C. Finalmente, para eliminar el exceso de reactivo, las partículas fueron centrifugadas (7000 rpm, 10 min) y redispersadas en agua 3 veces.

ii) Síntesis de MSN

En un balón de vidrio se mezclaron 384 mL de agua, 2,8 mL de una solución 2 M de hidróxido de sodio y 800 mg de CTAB. Luego, se agregaron 4 mL de TEOS y la solución fue agitada durante 2 h a 80 °C. Posteriormente, se dejó enfriar a temperatura ambiente. Las partículas obtenidas fueron separadas por centrifugación (7000 rpm, 10 min) y resuspendidas en agua ultrapura. Este proceso se repitió 3 veces. Finalmente, las partículas se secaron a 60 °C y se calcinaron a 550 °C durante 4 h.

iii) Preparación de micropartículas de sílice nanoestructuradas (M-NP, M-MSN)

La preparación de micropartículas basadas en NP (M-NP) o MSN (M-MSN) se realizó mediante la técnica de microemulsión. A tales efectos, 0,5 mL de una solución hidroalcohólica (1:1) de 6,5 % p/v de nanopartículas se añadió gota a gota a 100 mL de aceite de girasol bajo agitación mecánica (400 rpm). Esta emulsión continuó en agitación por 4 h a 40 °C. Luego, las partículas obtenidas se lavaron 3 veces con hexano. Finalmente, las micropartículas se calcinaron a 550 °C durante 4 h.

Se determinó la morfología y el diámetro medio de las partículas por microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido (SEM). Además, se evaluó la carga superficial de los sistemas mediante el análisis de potencial Z. Para ello, se dispersaron las nanopartículas en agua, se inyectaron en una celda capilar plegada y se determinó el potencial Z por dispersión de luz electroforética midiendo la velocidad y la dirección de las partículas bajo un campo eléctrico. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

Eficiencia de encapsulación y ensayos de liberación de atrazina

Para la encapsulación de la atrazina, 30 mg de partículas (MSN, M-MSN y M-NP) fueron suspendidas en 5 mL de una solución saturada de atrazina en metanol (6,0 mg/mL). La mezcla se mantuvo bajo agitación durante 24 h y posteriormente se eliminó el solvente. Luego, se agregó etanol a fin de evaluar la atrazina encapsulada en los sistemas.

La cuantificación de la atrazina se llevó a cabo mediante HPLC utilizando un cromatógrafo HPLC-UV/Visible equipado con una columna C18 (tamaño de partícula de 5 μm) y un detector UV-vis. El tiempo de retención de la atrazina fue 5,32 min. La fase móvil empleada fue una mezcla de acetonitrilo/agua (70:30 v/v) acidificada con ácido acético con un caudal de 1 mL min^{-1} . La temperatura de la columna y la longitud de onda de detección fueron 25 °C y 221 nm, respectivamente. Para la calibración se utilizaron estándar de atrazina de 1, 5, 30, 60 y 100 mg mL^{-1} . El límite de detección (0,3 mg mL^{-1}) y el límite de cuantificación (1 mg mL^{-1}) fueron determinados de acuerdo con Miller y Miller (Miller & Miller, 2010).

Para los ensayos de liberación, aproximadamente 4 mg de atrazina contenidos en los diferentes sistemas particulados fueron dispersados en 25 mL de agua ultrapura e incubados a 25 °C. Se tomaron 2 mL de muestra a diferentes intervalos de tiempo y fueron renovados con medio fresco. Los ensayos fueron llevados a cabo por duplicado.

Ensayo de fitotoxicidad

Los ensayos de fitotoxicidad fueron realizados siguiendo el ensayo de toxicidad aguda propuesto por la norma IRAM 29.114 con modificaciones menores. Para tal fin, se colocó un disco de papel de filtro en una placa de Petri. Luego, se agregaron 4 mL de una solución acuosa de 50 ppm de atrazina libre o encapsulada en MSN o M-MSN. Posteriormente, se colocaron en cada placa 20 semillas de *Lactuca sativa*. Se utilizó agua destilada como control. Finalmente, las placas se incubaron a 24 °C y luego de 3 días se midió el largo de las raíces de las semillas germinadas y se determinó el índice de elongación de la raíz (RE) con la ecuación (1). Se usó agua destilada como control.

$$RE = (RL - RL_c) / RL_c \quad (1)$$

donde RL y RL_c son la longitud promedio de la raíz de la muestra estudiada y del control, respectivamente.

Resultados y discusión

En la Tabla 1, se presentan el tamaño medio y potencial Z de los sistemas particulados.

	Díámetro	Potencial Z
NP	192 ± 17 nm	-49,90 (±1,50)
MSN	304 ± 35 nm	-36,20 (±1,15)
M-MSN	158 ± 25 μm	-
M-NP	147 ± 32 μm	-

Tabla 1. Díámetro y potencial de superficie de las partículas de sílice.

El tamaño medio de las MSN es superior al de las NP. El potencial Z de las NP indica una mayor carga negativa superficial respecto a las partículas mesoporosas, lo cual puede atribuirse a mayor condensación de los grupos silanoles a siloxanos durante la calcinación durante la preparación de las MSN (Brahmkhatri & Patel, 2012). La Figura 1 muestra la morfología de las micropartículas conformadas por NP y MSN. En estas últimas, se observa una mayor porosidad de las micropartículas y menor área superficial. En ambos casos se observa una geometría esférica con un diámetro de aproximadamente 150 μm (Tabla 1).

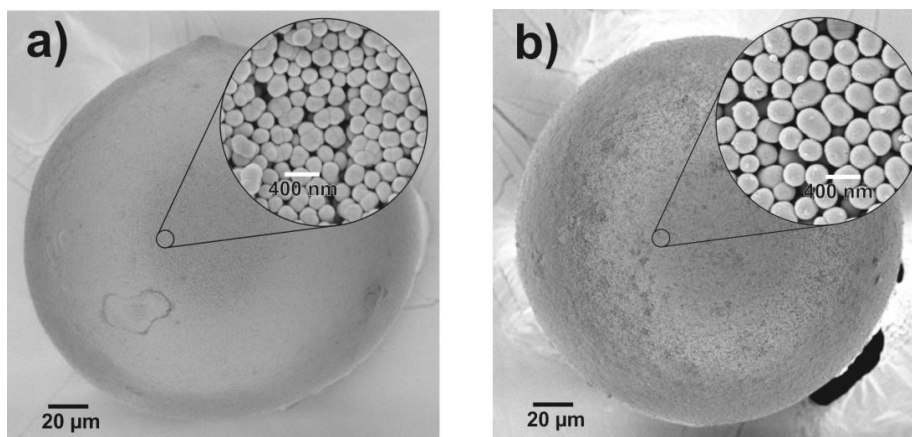


Figura 1. Micrografía de las micropartículas M-NP (a) y M-MSN (b).

La eficiencia de encapsulación de las partículas estudiadas se muestra en la Tabla 2. Como era de esperar las MSN presentaron una mayor eficiencia de encapsulación en comparación con las micropartículas debido a las menores limitaciones difusivas. Por otra parte, los valores de eficiencias de las micropartículas son consecuencia de efectos contrapuestos de las características morfológicas y superficiales. La mayor porosidad de las M-MSN favorece la accesibilidad del principio activo y

por lo tanto el grado de encapsulación, pero su menor área superficial y la menor carga superficial de las MSN desfavorecen la interacción del principio activo con la sílice.

	Eficiencia de encapsulación (mg/100 mg partícula)
MSN	5,41 ($\pm 0,53$)
M-MSN	3,21 ($\pm 0,28$)
M-NP	3,42 ($\pm 0,84$)

Tabla 2. Eficiencia de encapsulación de atrazina.

Los ensayos de liberación de atrazina mostraron diferencias entre los 3 sistemas estudiados (Figura 2). Las MSN y M-MSN mostraron una liberación sostenida luego de 24 h. Las MSN presentaron un mayor porcentaje de herbicida liberado que las M-MSN (aproximadamente 70% vs. 50% respectivamente), debido a las mayores limitaciones a la transferencia de materia presentes en las micropartículas. Por otro lado, en los ensayos con las M-NPs, el porcentaje final liberado en los tiempos estudiados es menor como consecuencia de los efectos difusivos y de las mayores interacciones superficiales presentes en estas partículas.

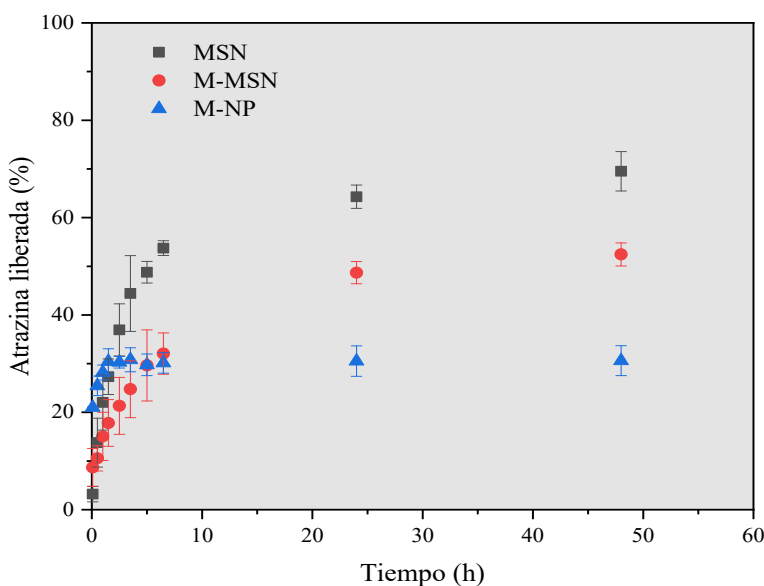


Figura 2. Perfiles de liberación de atrazina

	RE
MSN	-0,086
M-MSN	-0,613
Atrazina libre	-0,616

Tabla 3. RE de la atrazina libre y encapsulada

El parámetro RE brinda información sobre la fitotoxicidad de un compuesto en comparación con un control. Este índice puede tomar valores comprendidos desde -1 hasta mayores que 0, y con el aumento de RE disminuye la fitotoxicidad del sistema evaluado (Bagur-González *et al.*, 2011). Los resultados obtenidos para este ensayo (Tabla 3) evidencian que las MSN no presentan fitotoxicidad.

Conclusiones

Se sintetizaron y caracterizaron nanopartículas de sílice no porosas y mesoporosas, y micropartículas basadas en estas nanopartículas. Se estudió el encapsulamiento y la liberación controlada de atrazina encapsulada en los diferentes sistemas particulados. Además, se ensayó la fitotoxicidad de los sistemas desarrollados en *Lactuca sativa*. Se observó que las MSN

presentaron una liberación sostenida del principio activo durante aproximadamente 24 h y una fitotoxicidad inferior a la del herbicida libre.

Referencias

- Bagur-González, M. G., Estepa-Molina, C., Martín-Peinado, F., & Morales-Ruano, S. (2011). Toxicity assessment using *Lactuca sativa* L. bioassay of the metal(loid)s As, Cu, Mn, Pb and Zn in soluble-in-water saturated soil extracts from an abandoned mining site. *Journal of Soils and Sediments*, *11*(2), 281–289. <https://doi.org/10.1007/s11368-010-0285-4>
- Brahmkhatri, V., & Patel, A. (2012). An efficient green catalyst comprising 12-tungstophosphoric acid and MCM-41: Synthesis characterization and diesterification of succinic acid, a potential bio-platform molecule. *Green Chemistry Letters and Reviews*, *5*(2), 161–171. <https://doi.org/10.1080/17518253.2011.607471>
- Feng, J., Chen, W., Shen, Y., Chen, Q., Yang, J., Zhang, M., Yang, W., & Yuan, S. (2020). Fabrication of abamectin-loaded mesoporous silica nanoparticles by emulsion-solvent evaporation to improve photolysis stability and extend insecticidal activity. *Nanotechnology*, *31*(34), 345705. <https://doi.org/10.1088/1361-6528/ab91f0>
- Grillo, R., Pereira, A. do E. S., de Melo, N. F. S., Porto, R. M., Feitosa, L. O., Tonello, P. S., Filho, N. L. D., Rosa, A. H., Lima, R., & Fraceto, L. F. (2011). Controlled release system for ametryn using polymer microspheres: Preparation, characterization and release kinetics in water. *Journal of Hazardous Materials*, *186*(2–3), 1645–1651. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2010.12.044>
- Kadhem, A., Xiang, S., Nagel, S., Lin, C.-H., & Fidalgo de Cortalezzi, M. (2018). Photonic Molecularly Imprinted Polymer Film for the Detection of Testosterone in Aqueous Samples. *Polymers*, *10*(4), 349. <https://doi.org/10.3390/polym10040349>
- Miller, J. N., & Miller, J. C. (2010). *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry Sixth edition* (6th ed.). Pearson.
- Murguía, J. R., Mas, N., Galiana, I., Hurtado, S., Mondragon, L., Bernardos, A., Sancenon, F., Amoros, P., Abril-Utrillas, N., Marcos, D., & Martinez-Manez, R. (2014). Enhanced antifungal efficacy of tebuconazole using gated pH-driven mesoporous nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, *9*(1), 2597. <https://doi.org/10.2147/IJN.S59654>
- Popat, A., Liu, J., Hu, Q., Kennedy, M., Peters, B., Lu, G. Q. (Max), & Qiao, S. Z. (2012). Adsorption and release of biocides with mesoporous silica nanoparticles. *Nanoscale*, *4*(3), 970–975. <https://doi.org/10.1039/C2NR11691J>
- Taverna, M. E., Busatto, C. A., Lescano, M. R., Nicolau, V. V., Zalazar, C. S., Meira, G. R., & Estenoz, D. A. (2018). Microparticles based on ionic and organosolv lignins for the controlled release of atrazine. *Journal of Hazardous Materials*, *359*(February), 139–147. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.07.010>
- Wanyika, H. (2013). Sustained release of fungicide metalaxyl by mesoporous silica nanospheres. *Nanotechnology for Sustainable Development, First Edition*, 321–329. https://doi.org/10.1007/978-3-319-05041-6_25