

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y EXTENSIÓN
DIRECCIÓN DE PROYECTOS
INFORME FINAL DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN Y EXTENSIÓN

DOCUMENTO 1

1. **Código del Proyecto:** 1510102.
2. **Nombre del proyecto:** Estudio del potencial herbicida de nanopartículas de PGLA encapsulando atrazina, sobre vitro plantas de papa como modelo biológico.
3. **Escuela responsable:** Escuela de Biología.
4. **Otras escuelas participantes:** No participaron otras escuelas del ITCR.
5. **Instituciones participantes externas al ITCR:** Bioengineering Department. George Mason University, Virginia. USA.
6. **Investigador coordinador:** Dr. Eng. Randall Chacón Cerdas.
7. **Investigadores colaboradores:**
Ph.D. Carolina Salvador Morales. George Mason University, Virginia. USA. Professor.
M.Eng. Carlos Alvarado Ulloa. Escuela de Biología. Profesor Investigador.
M.Sc. Luis Alvarado Ulloa. Escuela de Biología. Profesor Investigador.
Lic. Alexander Schmidt Durán. Escuela de Biología. Profesor Investigador.
8. **Período de ejecución:** Enero 2018 – Mayo 2021.

Se generaron dos artículos científicos y se amplian/completan los resultados y la discusión en este documento.

Artículos
01: Brian Schnoor, Ahmad Elhendawy Suzanna Joseph, Mark Putman, Randall Chacón-Cerdas, Dora Flores-Mora, Felipe Bravo-Moraga, Fernando Gonzalez-Nilo, and Carolina Salvador-Morales. 2018. Engineering Atrazine Loaded Poly (lactic-co-glycolic Acid) Nanoparticles to Ameliorate Environmental Challenges. J. Agric. Food Chem. 2018, 66, 7889–7898. DOI:10.1021/acs.jafc.8b01911.
02: Vindas-Reyes, Erick; Quirós-Barrantes, Steve; Chacón-Cerdas, Randall. 2021. An alternative image cytometry protocol to study the cell cycle of a heterogeneous cell population from in vitro potato root-tips using CellProfiler®. Sometido a Methods and Protocols.

INDICE

RESUMEN	4
INTRODUCCIÓN.....	4
MARCO TEÓRICO.....	5
Atrazina	5
Nanoherbidas	5
Polímeros naturales para encapsulación	6
Síntesis de partículas poliméricas	7
Caracterización fisicoquímica de nanopartículas poliméricas	7
Espectroscopia infrarroja	7
Dispersión de luz dinámica.....	7
Tamaño de partícula	8
Potencial superficial	8
Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	8
Energía de interacción.....	8
Mecanismos de acción de las partículas poliméricas.....	9
METODOLOGÍA.....	9
Objetivo específico 01: Sintetizar, encapsular y caracterizar nanopartículas de PLGA con atrazina.....	9
Actividad 1.1 Síntesis de nanopartículas de PLGA encapsulando Atrazina.....	9
Actividad 1.2 Caracterización de nanopartículas de PLGA encapsulando Atrazina.....	10
Actividad 1.3 Eficiencia de encapsulación de nanopartículas de PLGA encapsulando Atrazina.....	10
Actividad 1.4 Análisis por RAMAN-Confocal de tejido vegetal tratado con nanopartículas.....	11
Actividad 1.5 Determinación de la interacción molecular entre PLGA, atrazina y solventes en la síntesis de partículas.....	11
Objetivo específico 02: Evaluar el efecto del nanoherbicida en el modelo biológico de vitroplantas de papa.....	11

Actividad 2.1 Micropropagación del material vegetal.	11
Actividad 2.2 Preparación de medios de cultivo con los diferentes tratamientos.	11
Actividad 2.3 Evaluación de crecimiento y desarrollo de las vitroplantas.	12
Actividad 2.4 Estudio de la ultraestructura de los ápices de raíz mediante microscopía óptica.	12
Actividad 2.5 Estudio de la división celular de ápices de raíz mediante fluorescencia.	12
Actividad 2.6 Análisis estadístico e interpretación de resultados.....	12
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	13
Objetivo específico 01: Sintetizar, encapsular y caracterizar nanopartículas de PLGA con atrazina.....	13
Actividad 1.1 Síntesis de nanopartículas de PLGA encapsulando Atrazina.....	13
Actividad 1.2 Caracterización de nanopartículas de PLGA encapsulando Atrazina.....	13
Actividad 1.3 Eficiencia de encapsulación de nanopartículas de PLGA encapsulando Atrazina.	15
Actividad 1.4 Análisis por RAMAM-Confocal de tejido vegetal tratado con nanopartículas....	16
Actividad 1.5 Determinación de la interacción molecular entre PLGA, atrazina y solventes en la síntesis de partículas.	17
Objetivo específico 02: Evaluar el efecto del nanoherbicida en el modelo biológico de vitroplantas de papa.	18
Actividad 2.1 Micropropagación del material vegetal.	18
Actividad 2.2 Preparación de medios de cultivo con los diferentes tratamientos.	19
Actividad 2.3 Evaluación de crecimiento y desarrollo de las vitroplantas.	19
Actividad 2.4 Estudio de la ultraestructura de los ápices de raíz mediante microscopía óptica.	21
Actividad 2.5 Estudio de la división celular de ápices de raíz mediante fluorescencia.	22
CONCLUSIONES	22
RECOMENDACIONES	23
AGRADECIMIENTOS.....	24
REFERENCIAS.....	24

RESUMEN

Los herbicidas son vitales para el manejo de los cultivos en cuanto a su función controladora de arvenses y el beneficio indirecto que esto trae a la productividad de los cultivos. No obstante, su uso genera problemas ambientales, de salud pública y económicos. Su nivel de toxicidad, la proporción de ingrediente activo que se retiene en el ambiente y los costos asociados se combinan para convertirlos en uno de los insumos agrícolas más costosos del mercado. Por lo tanto, existe una gran necesidad de desarrollar nuevos métodos para mitigar estos problemas. Aquí, informamos por primera vez sobre la síntesis de nanoherbicidas a base de poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) cargados con atrazina como ingrediente activo, obtenidos mediante el nanoprecipitación modificada. Caracterizamos las partículas según morfología, tamaño, interacción molecular, FTIR, eficiencia de encapsulación y tasa de liberación, entre otros. Finalmente usamos plantas de papa como modelo biológico para evaluar el herbicida donde evaluamos el efecto de diversas dosis sobre el crecimiento de plantas in vitro. Para poder observar los cambios ultraestructurales en las plantas analizadas, se adaptó un método para procesar las muestras de ápices radicales mediante tinción selectiva y observación de cambios en la ultraestructura con microscopía de fluorescencia con lo que se comparó la distorsión potencial del nanoherbicida en el ciclo celular.

Nuestro método produjo nanoherbicidas con un tamaño promedio de 110 ± 10 nm antes de la liofilización, cuyo tamaño se incrementó hasta cinco veces posterior a la liofilización. La eficiencia de encapsulación obtenida fue de 50%, y en cuanto a la tasa de liberación, el cincuenta por ciento de la atrazina cargada en la matriz de PLGA se libera en 72 h. Además, realizamos simulaciones Monte Carlo para determinar la interacción química entre atrazina, PLGA y el sistema solvente. Uno de los resultados más significativos de estas simulaciones fue encontrar la formación de un enlace de hidrógeno de $1,9 \text{ \AA}$ entre PLGA y atrazina, lo que hace que esta interacción sea muy estable. El análisis FTIR reveló grupos funcionales asociados a la estructura de las moléculas en estudio, tanto del polímero, la atrazina y la interacción de ambas.

Los bioensayos mostraron que conforme aumenta la concentración de atrazina en las nanopartículas de PLGA, las plantas de papa experimentaron una disminución significativa en la longitud del tallo, la longitud de la raíz, el peso fresco, el peso seco y el número de hojas, siendo la longitud de la raíz la más afectada. Estos resultados experimentales sugieren la eficacia herbicida de los nanoherbicidas PLGA cargados con atrazina para inhibir el crecimiento de la planta de patata. Por lo tanto, presentamos la prueba de concepto para el uso de nanoherbicidas PLGA como método alternativo para inhibir el crecimiento de arvenses. Los estudios futuros implicarán una comprensión profunda del mecanismo de interacción planta-nanoherbicida, así como el papel de PLGA como potenciador del crecimiento.

De los ensayos de tinción de núcleo selectiva y su exploración con microscopía fluorescente, se obtuvieron evidencias para verificar el efecto que presentan los herbicidas en la distorsión del ciclo celular, principalmente en el arresto parcial de algunas fases previas a la mitosis. El protocolo que se estandarizó para realizar estos ensayos se validó y ahora forma parte de las herramientas del laboratorio de bioquímica aplicada para el estudio del ciclo celular en ápices de raíz.

INTRODUCCIÓN

Proteger los cultivos de las arvenses que roban nutrientes es una parte esencial de la agricultura. Los herbicidas juegan un papel vital en el control y la conservación de cultivos. Sin embargo, su uso genera muchos problemas ambientales, económicos y de salud humana.

Los herbicidas actuales representan un riesgo significativo para el medio ambiente, ya que grandes cantidades de herbicidas son arrastrados a los arroyos y ríos por escorrentía, lo que puede eliminar

organismos que no son el objetivo y alterar los ecosistemas (Nicodemo et al., 2014; Corsini et al., 2013; Jie et al., 2012; Wauchope, 1978).

El uso generalizado de herbicidas, como la atrazina, también presenta problemas económicos porque estos herbicidas se evaporan rápidamente y quedan fácilmente atrapados en la capa superior del suelo debido a la absorción del suelo (Mudhoo et al., 2011; Gamble, 2008). Por lo tanto, menos del 0,1% de los herbicidas aplicados alcanzan los organismos objetivo (Otalvaro and Brigante, 2018). Incluso el herbicida que alcanza la arvense objetivo puede ser ineficaz debido a la mala translocación en la planta y al desarrollo de organismos resistentes a los herbicidas. Debido a este fenómeno, se requieren mayores cantidades de herbicidas, lo que puede exacerbar el daño ambiental. Para superar estos problemas, se necesita un nuevo sistema de distribución para proteger los herbicidas, garantizar que lleguen a la arvense y mejorar el transporte del herbicida dentro de la maleza objetivo.

Los sistemas de administración basados en nanopartículas para herbicidas, también conocidos como "nanoherbicidas", han demostrado ser muy prometedores para mejorar la eficacia de los herbicidas (Pereira et al., 2014; Grillo et al., 2014; Kah et al., 2013; Silva et al., 2011). Los nanoherbicidas consisten en un herbicida tradicional encapsulado dentro del núcleo de una nanopartícula, que protege y dirige el herbicida al organismo objetivo.

En esta investigación nos enfocamos en el desarrollo de un novedoso sistema de administración de nanoherbicidas basado en un polímero PLGA. PLGA es un copolímero biocompatible, biodegradable y aprobado por la Administración de Drogas y Alimentos (FDA) formado por dos monómeros diferentes: lactico y glicólico.

MARCO TEÓRICO

Atrazina

La atrazina es el segundo herbicida más popular en los Estados Unidos, ya que es muy eficaz para controlar las malas hierbas y ha demostrado ser inofensivo para los cultivos de maíz (Pereira et al., 2014). Sin embargo, la atrazina puede causar graves daños ambientales. Por ejemplo, en los Estados Unidos, contamina más fuentes de agua que cualquier otro pesticida (Giliom et al., 2006). En la Unión Europea, la atrazina ya ha sido prohibida porque la contaminación con atrazina en el agua subterránea excedió los límites máximos establecidos por la ley (EEC, 2014). Además, los estudios indicaron que la atrazina tiene efectos nocivos en los organismos no objetivo en los ecosistemas acuáticos (Corsini et al., 2013; Schulz, 2004; Wauchope et al., 1978).

Nanoherbicidas

Los nanoherbicidas tienen el potencial de prevenir la rápida evaporación de los ingredientes activos y mejorar tanto la absorción de los herbicidas a través de la raíz de la planta como la translocación dentro de la planta (Pereira et al., 2014; Grillo et al., 2014; Kah et al., 2013; Silva et al., 2011). Además, los nanoherbicidas pueden reducir la cantidad de herbicida atrapado en la capa superior del suelo, consecuentemente disminuyendo la contaminación del agua debido a la escorrentía removida del suelo superficial. De manera similar, la PEGilación de la superficie de las nanopartículas también puede mejorar la absorción y la translocación de las nanopartículas en la planta y disminuir la cantidad de herbicida libre que podría contaminar los arroyos y llegar a organismos no objetivo. Así, podemos reducir la cantidad de herbicida entregada a especies no objetivo en áreas circundantes o río abajo al aumentar la eficiencia de la entrega del herbicida a la maleza objetivo.

Varios grupos de investigación han sintetizado una amplia variedad de nanoherbicidas que combinan tensioactivos, polímeros y nanopartículas metálicas para facilitar la aplicación de herbicidas en campos de cultivo al superar la insolubilidad de algunos herbicidas. Cada tipo de nanoherbicida tiene un propósito específico. Por ejemplo, microemulsión (6–50 nm), nanoemulsión (20–200 nm) y la nanodispersión (50–200 nm) tienen como objetivo aumentar la solubilidad de los ingredientes activos (AI) poco solubles en agua (Kah et al., 2013).

Polímeros naturales para encapsulación

Existen reportes de nanoherbicidas a base de polímeros que buscan liberar la carga útil de manera lenta y sostenida mientras previenen la degradación prematura del ingrediente activo. Esta clase de nanoherbicidas incluye polímeros como poli(épsilon-caprolactona) (PCL) (de Oliveira et al., 2015; Pereira et al., 2014; Grillo et al., 2012), quitosano (Namasivayam and Aruna, 2017), y alginato (Kumar et al., 2014). Ahora con esta investigación estaremos sumando el reporte del PLGA como material transportador de nanoherbicidas.

El PLGA es un copolímero biocompatible, biodegradable y aprobado por la Administración de Drogas y Alimentos (FDA) formado por dos monómeros diferentes: láctico y glicólico. PLGA proporciona varias ventajas significativas sobre otros nanoherbicidas basados en polímeros. Primero, la tasa de degradación de este copolímero se puede manipular de acuerdo con nuestras necesidades agrícolas variando la relación entre los monómeros de láctico y glicólico. La degradación de PLGA se produce por hidrólisis, que escinde los enlaces éster de los monómeros láctico y glicólico. Los enlaces éster de los monómeros de láctico experimentan una tasa de degradación mucho más lenta debido al efecto estérico del grupo CH₃ que está presente en el monómero de láctico pero no en el de glicólico (Makadia and Siegel, 2011). Esta característica química permite ajustar el perfil de degradación del nanoherbicida PLGA, que no se puede lograr con otros materiales como por ejemplo el homopolímero PCL. Además, el quitosano, un polímero altamente hidrofílico (Namasivayam et al., 2014), no se puede utilizar para encapsular con éxito la atrazina. El PLGA tiene un perfil de liberación basado en la degradación (es decir, el ingrediente activo se libera al unísono con la degradación de la nanopartícula). Esto evitará el problema de la rápida separación del ingrediente activo del nanoportador después de llegar a la superficie del suelo/planta, lo que puede afectar significativamente el transporte del ingrediente activo (Chen et al., 2015; Chen and Yada, 2011; Graymore et al., 2001).

De hecho, el PCL también sigue este perfil de liberación basado en la degradación y logra un efecto de liberación similar. Sin embargo, presenta su propio desafío ambiental debido a su lenta tasa de degradación, a diferencia del PLGA, que se degradará por completo en 6 meses como máximo, el PCL se degrada en 1 a 3 años (Heimowska et al., 2017). Este es un período prolongado para que el PCL interactúe con los organismos del medio ambiente.

Además, otros polímeros como el alginato no son tóxicos solo cuando son de alta pureza. Obtener ese nivel de pureza a menudo implica procesos de síntesis extensos y costosos (Lee and Mooney, 2012). El PLGA, sin embargo, es un polímero inofensivo que se degrada completamente en subproductos no tóxicos. De hecho, cuando se produce la hidrólisis, los monómeros láctico y glicólico se transforman en ácido láctico y glicólico, respectivamente, que son metabolizados por el ciclo de Krebs. Los subproductos del ciclo de Krebs son dióxido de carbono y agua. Por lo tanto, el PLGA no es tóxico para humanos, plantas o animales (Makadia and Siegel, 2011). Además, vale la pena mencionar que el PLGA actualmente se puede comprar en kilogramos o toneladas a bajo costo de los fabricantes chinos. Por lo tanto, la producción a gran escala de nanoherbicidas PLGA puede no representar un desafío técnico para el uso de nanoherbicidas PLGA en entornos agrícolas.

Síntesis de partículas poliméricas

La nanotecnología se dedica al estudio de la manipulación de materiales a nivel nanométrico, con dimensiones entre 1 y 100 nanómetros. Esta escala de tamaño presenta propiedades fisicoquímicas únicas que permiten la creación de materiales y partículas con diversas aplicaciones multidisciplinarias, entre las que se destaca la capacidad de transporte y protección de metabolitos (Mohan et al., 2016). Debido a su tamaño y estructura, estas partículas pueden atravesar barreras biológicas y alcanzar su destino más rápidamente que moléculas de mayor tamaño (Su and Kang, 2020).

Por su parte, las micropartículas estructuradas tienen un tamaño de 1 a 1000 micrómetros y pueden tener diversas formas y estar hechas de polímeros tanto naturales como sintéticos. Estas partículas también presentan propiedades de transporte y protección del ingrediente activo, resultado de su estructura (Lengyel et al., 2019). La formulación de las partículas varía según el objetivo de la investigación, y existen varias estrategias y métodos para su producción, como la dispersión de polímeros preexistentes, la polimerización de diferentes materiales (Zielinska et al., 2020). Algunos de los métodos más utilizados son la gelificación ionotrópica (Khoder et al., 2010), microemulsión, emulsificación por difusión de solventes, coalescencia, coacervación (emulsión), evaporación de solventes (Nagpal et al., 2010), secado por aspersion (García et al., 2015), precipitación sónica, síntesis de fluidos supercríticos, métodos criogénicos, entre otros (Wais et al., 2016).

Caracterización fisicoquímica de nanopartículas poliméricas

Es necesaria la caracterización fisicoquímica tanto de las biopartículas resultantes como de los materiales originales, se utilizan por lo general métodos como la espectroscopía infrarroja, la dispersión de luz dinámica, la microscopía electrónica de barrido, la interacción molecular, entre otros.

Espectroscopia infrarroja

La espectroscopia infrarroja (IR) es una técnica que se basa en el espectro electromagnético y se utiliza para determinar los grupos funcionales presentes en la pectina y sus biopartículas. Al pasar radiación a través de una muestra y determinar qué fracción ha sido absorbida, se obtiene un espectro IR. La energía de cada pico en el espectro está relacionada con la frecuencia de vibración de una parte de la molécula, que se encuentra entre 12800-10 cm^{-1} y se divide en tres técnicas: IR lejano, IR medio y IR cercano. Con IR medio, se pueden realizar determinaciones cualitativas y estructuras moleculares de compuestos orgánicos e inorgánicos a partir de sus grupos funcionales con una preparación mínima de la muestra (Dutta, 2017; Stuart, 2005b, 2005a). La vibración puede ser de dos tipos, tensión y flexión, y dentro de cada tipo existen diferentes subtipos. Los factores que influyen en la energía de los fotones para producir vibraciones en las moléculas incluyen la masa de los átomos, la geometría de la molécula, la rigidez de los enlaces químicos y los períodos de las vibraciones atómicas (El-Azazy, 2018). Se pueden estudiar casi cualquier muestra en diferentes estados: líquido, polvo, pasta y gas, utilizando equipos que utilizan una transformada de Fourier de haz simple (Dutta, 2017; Stuart, 2005b, 2005a).

Dispersión de luz dinámica

La técnica de dispersión dinámica de luz (DLS) se utiliza para medir el tamaño de las partículas en una solución o su potencial superficial (Lawrie et al., 2009). Al ser alcanzadas por un rayo de luz láser, las partículas dispersan la luz en todas las direcciones posibles. La principal diferencia con la dispersión de luz estática radica en que la DLS se refiere a la variación de la intensidad de la luz a lo largo del tiempo, y el término "dinámico" se debe a las vibraciones de las partículas que se encuentran dispersas (Fennell and Wennerström, 1999; Cuadros-Moreno et al., 2014).

Tamaño de partícula

El tamaño de las partículas en movimiento browniano aleatorio está directamente relacionado con la velocidad a la que se difunden, siendo las partículas más pequeñas las que se difunden más rápido que las más grandes (Fennell and Wennerström, 1999). La temperatura en la que se realiza la medida influye en esta velocidad de difusión, por lo que es importante conocer su valor exacto antes de llevar a cabo el procedimiento (Kaszuba et al., 2008).

La medición de la velocidad de difusión se realiza observando el patrón de dispersión formado por las partículas al pasar por un haz de luz láser. La intensidad de dispersión se registra mediante un fotodiodo de avalancha (APD) y se genera una función de correlación que permite analizar el tamaño y la distribución de tamaños de las partículas (Naiim et al., 2014; Yadav et al., 2011).

Potencial superficial

El potencial superficial se produce debido a la doble carga eléctrica presente en las partículas, lo que afecta la distribución de iones en su entorno. Esta carga neta en la superficie de la partícula hace que los iones con cargas opuestas se acumulen a su alrededor, lo que resulta en una capa de líquido circundante dividida en una región interna y una externa. La región interna está unida fuertemente a los iones, mientras que la región externa está unida con menos firmeza. Dentro de la región externa se forma un límite donde las partículas y los iones forman una unidad estable. Cuando la partícula se mueve, los iones dentro de este límite se mueven con ella, mientras que los que están fuera no lo hacen. Este límite se conoce como la superficie de corte hidrodinámica o el plano de deslizamiento. El potencial en este límite se llama potencial zeta (Grahame, 1947; Bhattacharjee, 2016; Carvalho et al., 2018).

El potencial zeta puede ser utilizado como indicador de la estabilidad del sistema coloidal, donde valores grandes indican una mayor repulsión entre partículas y, por lo tanto, una menor probabilidad de floculación. En contraste, valores cercanos a cero sugieren una mayor atracción entre partículas, lo que puede resultar en floculación. Se considera generalmente que un potencial zeta de magnitud mayor a 30 o menor a -30 mV indica estabilidad en el sistema coloidal (Fennell and Wennerström, 2001).

Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La microscopía electrónica de barrido (SEM) permite la caracterización física de superficies y polímeros heterogéneos. El principio de su uso se basa en la irradiación de la muestra con un haz de electrones. Esta irradiación produce electrones secundarios, electrones retrodispersados, rayos X, fotones o electrones Auger. Estas señales luego son capturadas por el equipo y se utilizan para medir la composición o topografía de la superficie (Zankel et al., 2017; Zhou et al., 2006).

Energía de interacción

La energía de interacción se define como la diferencia entre la energía de un complejo no covalente y la suma de las energías de los fragmentos aislados. Esta energía se puede calcular encontrando la diferencia entre la energía combinada de los objetos y todas sus energías aisladas. Existen varios métodos para calcular la energía de interacción entre dos moléculas, incluyendo métodos basados en componentes y enfoques supermoleculares (Floris and Tani, 1999). Para explicar estos fenómenos se emplean modelos matemáticos que determinan cambio en la energía cuando ocurre una interacción. Una de las herramientas empleadas para este propósito es MOPAC, este un paquete de software de química computacional que se puede utilizar para calcular la energía de interacción entre moléculas o las energías de interacción electrostática

intermolecular entre dos especies radicales. MOPAC utiliza varios métodos teóricos, incluyendo cálculos SCF, capacidad de estado sólido, interacción de configuración multi-electrónica, optimización de geometría y análisis de coordenadas normales (Stewart, 2013).

Mecanismos de acción de las partículas poliméricas

La estructuración de micropartículas conlleva propiedades y ventajas para el transporte y protección de principios activos, que pueden ser liberados de forma inteligente y programada en diferentes tejidos. La clave para controlar la liberación o transporte de estas partículas es la respuesta a diferentes estímulos fisicoquímicos y biológicos en el entorno químico en el que se aplican, tanto por separado como en combinación. Algunos de estos estímulos incluyen la temperatura, campos magnéticos, luz, campos eléctricos, vibración ultrasónica, efecto mecánico, cambios de pH y acción enzimática, entre otros (Brigenti et al., 2020). Dependiendo de la estructura de la partícula, se pueden dividir en cápsulas o partículas que contienen una matriz con dominios variables que protegen el principio activo. Los mecanismos de activación son similares y se detallan en la figura 1.

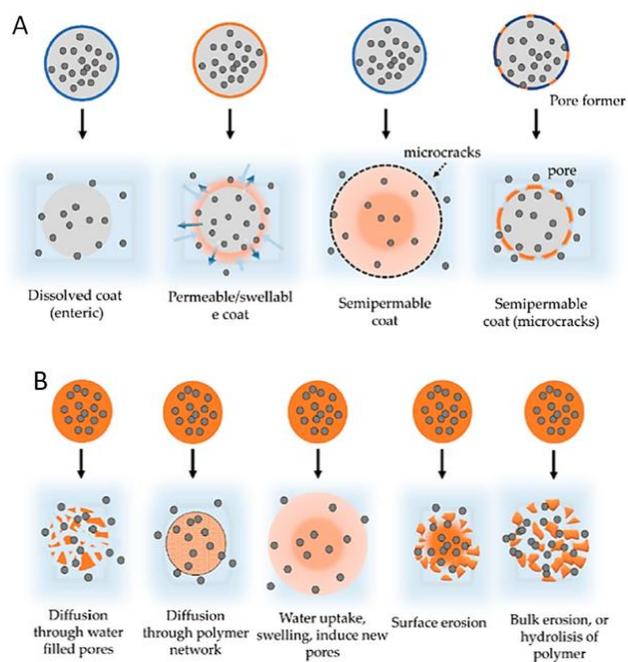


Figura 1. Mecanismos de activación de micropartículas. A. Cápsulas. B. Partículas. (Lengyel et al., 2019).

METODOLOGÍA

Objetivo específico 01: Sintetizar, encapsular y caracterizar nanopartículas de PLGA con atrazina.

Actividad 1.1 Síntesis de nanopartículas de PLGA encapsulando Atrazina.

Los nanoherbicidas PLGA se sintetizaron utilizando un método de nanoprecipitación modificado desarrollado *in house* por los colaboradores de la George Mason University (USA). Se prepararon soluciones madre de 1 mg/ml de DSPE-PEG-NH₂ y 1 mg/ml de lecitina en etanol al 4 %. Se agregaron 900 μ L de la solución de DSPE-PEG-NH₂ y 1200 μ L de la solución de lecitina a un vial de vidrio de 20 mL que contenía 12 mL de agua desionizada (diH₂O) y 1700 μ L de etanol al 4 %. Luego, la solución se

calentó a 68 °C durante 5 min con agitación ligera usando una placa caliente IKA para preparar una solución madre de 2 mg/mL de PLGA en acetona.

Posteriormente, 1 mL de la solución de PLGA y 2 mg de atrazina se añadieron a un vial de vidrio más pequeño. Utilizando una aguja de 25 G 1 x 1,5 y una jeringa de plástico, la fase orgánica se añadió gota a gota a la fase acuosa con agitación moderada. La aguja se sumergió en la solución y se movió lentamente hacia arriba y hacia abajo a medida que se añadía la fase orgánica a la fase acuosa para ayudar a prevenir la agregación de partículas. Para sintetizar cantidades más grandes de nanoherbicidas, este procedimiento se amplió cinco veces. Para realizar esta tarea, se utilizaron las mismas soluciones madre para preparar una solución acuosa que constaba de 60 ml de H₂O_{di}, 4,5 ml de solución madre de DSPE-PEG-NH₂ y 6 ml de solución madre de lecitina. A continuación, esta fase acuosa se calentó a 68 °C durante 8 min con ligera agitación. Luego, se agregaron 5 ml de solución madre de PLGA a un vial de vidrio que contenía 10 mg de atrazina. Luego se añadió la solución orgánica a la solución acuosa utilizando el mismo método descrito anteriormente.

Actividad 1.2 Caracterización de nanopartículas de PLGA encapsulando Atrazina.

Tamaño de partícula: se determinó mediante la técnica de dispersión dinámica de luz (DLS) utilizando un analizador de tamaño de partículas submicrométricas N5 (Beckman Coulter). Primero se calibró DLS utilizando perlas de polímero estandarizadas de 100 nm de tamaño. Luego, se mezclaron 3 µL de la solución de nanoherbicida con 2 mL de H₂O_{di} en una cubeta de plástico y se configuró el análisis para 25 °C y 90 ° de desviación.

Morfología: se analizó mediante un microscopio electrónico de transmisión (TEM), donde se pipetearon 10 µL de la muestra de nanoherbicida en el lado de carbono de una rejilla de cobre. Luego se agregaron 10 µL de acetato de uranilo a la rejilla y se dejó secar durante 12 horas. Luego se montaron las muestras en el goniómetro del TEM Tecnai G spirit BioTwin (80 kV) y se obtuvieron micrografías con la cámara integrada del equipo.

Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR): Los nanoherbicidas PLGA se caracterizaron con un espectrofotómetro Jasco FT/IR 4100, en el rango de 550-4000 cm⁻¹ empleando 36 escaneos por muestra y una resolución de 4 cm⁻¹. Las mediciones se realizaron en nanoherbicidas, nanopartículas de PLGA descargadas y atrazina pura. Para cada espectro FT-IR, se mezcló una muestra de 2 mg con 200 mg de bromuro de sodio usando un mortero antes de comprimirse en un disco translúcido plano. Posteriormente, cada muestra se analizó utilizando un espectrofotómetro FT/IR y se identificaron los picos más prominentes indicativos de la molécula de atrazina y el polímero.

Actividad 1.3 Eficiencia de encapsulación de nanopartículas de PLGA encapsulando Atrazina.

El porcentaje de atrazina nanoencapsulada en PLGA se determinó mediante cromatografía líquida/espectrometría de masas (LC-MS). Después de la síntesis de los nanoherbicidas se degradó su matriz polimérica utilizando un mililitro de acetonitrilo hasta obtener una solución transparente sin presencia de grumos del PLGA. Esta solución se agitó durante 5 min y luego se centrifugó con un Amicon® de 100 kDa a 2000 rpm a baja temperatura (5-8°C), permitiendo que la atrazina pasara al colector de filtrado sin degradarse. Antes de medir las muestras se calibró el cromatógrafo realizando una curva de concentraciones de atrazina utilizando soluciones madre de atrazina en metanol y terbutilazina en acetona (estándar interno) para mezclarlas a diferentes proporciones con una fase móvil de agua, acetonitrilo y ácido fórmico. La curva cubrió cinco puntos entre 7.5-100 µL de atrazina. Una vez calibrado el equipo se analizaron por triplicado muestras de nanoherbicida mezclando 300 µL con 75 µL del estándar interno y completando a 1500 µL con la fase móvil.

Actividad 1.4 Análisis por RAMAN-Confocal de tejido vegetal tratado con nanopartículas.

Se prepararon muestras frescas de raíces de vitroplantas de papa expuestas previamente a una dosis de 0.5mg/L de nanoherbicida colocado en el medio de cultivo gelificado por tres días. Las muestras se congelaron y fracturaron de forma aleatoria para obtener fragmentos del cilindro vascular de la raíz. Las muestras se colocaron en porta/cubre objetos de vidrio, y se sellaron con esmalte en los límites de la placa de vidrio sin que este material invadiera la zona de observación de las muestras. Los fragmentos se observaron en un microscopio RAMAN confocal con un objetivo de 100X, la intensidad del láser polarizado lineal fue de 150mW (0°) $\lambda_{ex}=785$ nm) y de 45mW para el láser $\lambda_{ex}=532$ nm (ambos con un tiempo de integración de 0.1s). La adquisición de datos se realizó cada 0.5 μ m mediante un espectrómetro integrado después de la respectiva calibración a la banda de silicio usada como patrón de calidad.

Actividad 1.5 Determinación de la interacción molecular entre PLGA, atrazina y solventes en la síntesis de partículas.

Se realizó un muestreo configuracional usando una estrategia de Monte Carlo para estudiar la interacción química entre PLGA, atrazina, acetonitrilo y acetona siguiendo la metodología de Avila et al (2012). El análisis de interacción de energía entre los pares de PLGA y las diversas moléculas (por ejemplo, atrazina, acetonitrilo y acetona) se realizó utilizando un total de 200.000 configuraciones de pares. La interacción de energía para cada configuración de par se calculó usando MOPAC 2016 y el método semiempírico PM7 (Vanommeslaeghe et al., 2012; Stewart, 1990). Las moléculas de atrazina, acetonitrilo y acetona se optimizaron geoméricamente usando Gaussian 09 (Frisch et al., 2013) con un nivel teórico HF/6-31G.

Objetivo específico 02: Evaluar el efecto del nanoherbicida en el modelo biológico de vitroplantas de papa.

Actividad 2.1 Micropropagación del material vegetal.

Utilizamos plantas in vitro de papa como modelo biológico para evaluar la actividad de los nanoherbicidas modificados. Las plantas se reprodujeron en medio de cultivo MS completo siguiendo el protocolo descrito en Flores et al.(2002) reproduciendoles por microestacas, tres por cada vial. Se utilizaron veinte mililitros de medio de cultivo MS completo por recipiente. Se incubaron a 22 °C con un fotoperíodo de 16/8 h y por 22 a 30 días hasta obtener ramificación de la raíz.

Actividad 2.2 Preparación de medios de cultivo con los diferentes tratamientos.

Los medios de cultivo base se prepararon según la receta completa de MS y se esterilizaron por medio de autoclave hasta alcanzar los 121°C por un periodo de 30 minutos.

La atrazina pura utilizada y los nanoherbicidas se disolvieron inicialmente en solución acuosa estéril y se adicionaron por filtrado (0.22micras) en diferentes proporciones en el medio de cultivo antes de la gelificación cuando aún estaban a 50°C.

Utilizamos atrazina con 98% de pureza, y los nanoherbicidas estaban compuestos por 42,38% de atrazina y 57,62% de PLGA, y liofilizados con 5% de sacarosa. Las nanopartículas de PLGA descargadas y el organismo objetivo cultivado solo con medio completo fueron los otros controles de este estudio. Las concentraciones de nanoherbicida utilizadas se seleccionaron para tener en cuenta la masa de la cubierta de nanopartículas y administrar la misma cantidad de atrazina que las muestras de atrazina pura. De manera similar, las concentraciones de partículas de PLGA sin atrazina se seleccionaron para administrar la misma cantidad de PLGA que los ensayos de nanoherbicidas.

Las concentraciones de PLGA, atrazina y nanopartículas de nanoherbicida utilizadas en este estudio se muestran en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Tratamientos utilizados para las pruebas de crecimiento y desarrollo.

Tratamiento	Dosis
CONTROL	0.0 µg/mL
ATRAZINA	0.7 µg/mL
ATRAZINA	6.3 µg/mL
ATRAZINA	54.0 µg/mL
NANOHERBICIDA	1.7 µg/mL
NANOHERBICIDA	14.9 µg/mL
NANOHERBICIDA	127.4 µg/mL
PARTÍCULAS PLGA VACIAS	1.0 µg/mL
PARTÍCULAS PLGA VACIAS	8.6 µg/mL
PARTÍCULAS PLGA VACIAS	73.4 µg/mL

Actividad 2.3 Evaluación de crecimiento y desarrollo de las vitroplantas.

Se inocularon vitroplantas (una densidad de 3 por frasco) en los medios de cultivo mencionados en la tabla 1, una vez que gelificaron y bajaron su temperatura. Se colocaron en un cuarto de incubación a 22 °C con un fotoperíodo de 16/8 h y por 22 a 30 días hasta obtener ramificación de la raíz en las plantas control. Una vez alcanzado este punto de desarrollo, todos los tratamientos se monitorearon y analizaron las siguientes variables clave: longitud del tallo, longitud de la raíz más larga, número de hojas, peso fresco y seco. Realizamos estos experimentos en 50 repeticiones por tratamiento.

Actividad 2.4 Estudio de la ultraestructura de los ápices de raíz mediante microscopía óptica.

Seleccionamos raíces de menos de 2 cm de longitud y disectamos sus ápices según cada tratamiento con PLGA, nanoherbicidas y atrazina. Los ápices se colocaron en ácido acético/etanol (3:1) durante 3 días en baja temperatura (4-6°C). Posteriormente el día de la observación, se realizaron tres lavados con H₂O_{di}. Luego, colocamos el ápice tratado en una solución de HCl de 0.1 M por 30 min. Finalmente, las muestras se volvieron a lavar tres veces con H₂O_{di}. Tomamos parte de la punta de la raíz para analizar con el microscopio óptico para investigar si el tratamiento producía alteraciones morfológicas celulares. Colocamos las muestras en un portaobjetos de microscopio y añadimos una gota de tinción de Giemsa a razón de 3:1. Luego, colocamos un cubreobjetos en la parte superior de la muestra y procedimos a la revisión microscópica.

Actividad 2.5 Estudio de la división celular de ápices de raíz mediante fluorescencia.

Metodología incluida en el paper: Vindas-Reyes, Erick; Quirós-Barrantes, Steve; Chacón-Cerdas, Randall. 2021. An alternative image cytometry protocol to study the cell cycle of heterogeneous cell population from in vitro potato root-tips using CellProfiler®. Sometido a Methods and Protocols.

Actividad 2.6 Análisis estadístico e interpretación de resultados.

Los datos se revisaron para el cumplimiento de los supuestos estadísticos de homocedasticidad (Levene) y normalidad (Anderson-Darling), posteriormente y dependiendo del cumplimiento de los supuestos estadísticos se analizaron utilizando ANOVA Welch junto con la comparación de medias en parejas de GAMES-Howell. Todas las pruebas fueron analizadas dentro del intervalo de confianza del 95%, $p = 0.05$, utilizando el programa estadístico Minitab 17 (Minitab, 2017).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Objetivo específico 01: Sintetizar, encapsular y caracterizar nanopartículas de PLGA con atrazina.

Actividad 1.1 Síntesis de nanopartículas de PLGA encapsulando Atrazina.

Las partículas se estructuraron utilizando una capa lipídica de DSPE-PEG-NH₂ que recubría el núcleo de PLGA combinado con la atrazina. La figura 1 presenta un esquema del formulado:

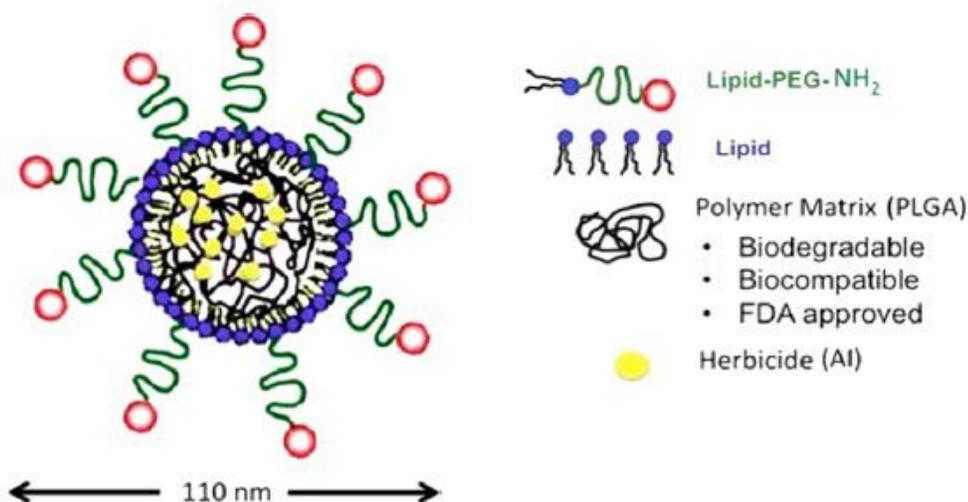


Figura 1. Esquema de la conformación del nanoherbicida. Autoensamblaje utilizando un método de nanoprecipitación modificado con lecitina, lípido-PEG-NH₂ y PLGA (Schnoor et al., 2018).

Se han sintetizado nanoherbicidas con diferentes polímeros como PCL (Pereira et al., 2014) y quitosano (Namasivayam and Aruna, 2014). Sin embargo, según nuestra búsqueda, estos serían los primeros nanoherbicidas basados en PLGA ya que este copolímero no ha sido muy explorado en entornos agrícolas. No obstante, sus propiedades fisicoquímicas únicas pueden ser muy útiles para las aplicaciones de dosificación controlada de agroquímicos.

Por ejemplo, dado que PLGA es un copolímero, podemos ajustar las características de degradación de los nanoherbicidas de PLGA variando la proporción de copolímero (El Yousfi et al., 2023). Esta funcionalidad específica no puede lograrse por completo con los otros materiales mencionados como PCL y quitosano porque no son copolímeros. Además, el hecho de que PLGA sea un copolímero le permite encapsular herbicidas no solubles en agua como la atrazina. En este estudio, utilizamos una proporción de copolímero de 75:25, 75 % de láctido y 25 % de monómeros de glicólido porque esta proporción de copolímero hace que toda la matriz de PLGA sea más hidrófoba debido a los efectos estéricos que otorga el grupo metilo presente en el monómero de láctido. Además, la proporción en PLGA (75:25) aún mantiene suficientes monómeros de glicólido hidrofílico para liberar el herbicida en forma controlada en un período de tiempo relativamente corto.

Actividad 1.2 Caracterización de nanopartículas de PLGA encapsulando Atrazina.

A continuación se presenta la caracterización realizada a los nanoherbicidas mediante diferentes técnicas.

Tamaño de partícula y morfología

Los resultados de DLS muestran que el tamaño promedio de los nanoherbicidas en agua destilada es de 110±10nm antes de la liofilización (Figura 2A), por su parte las micrografías TEM evidenciaron que

los nanoherbicidas PLGA tienen una forma esférica muy bien definida (Figura 2B). Estos nanoherbicidas permanecieron en suspensión durante varias semanas después de su síntesis. Liofilizamos los nanoherbicidas después de su síntesis para realizar los estudios en las plantas. Antes del proceso de liofilización, incorporamos sacarosa al 5% en la solución de nanoherbicida para evitar la precipitación después del paso de liofilización. Sin embargo, observamos un incremento sustancial en el tamaño del nanoherbicida después del proceso de liofilización. El tamaño de los nanoherbicidas liofilizados es de aproximadamente $500\text{ nm} \pm 10\text{ nm}$ y se observaron acumulados en las micrografías de TEM (Figura 2C y 2D). Este aumento en el tamaño es frecuente al procesar partículas poliméricas por el método de liofilizado (Wei-Chung et al., 2021). Posteriormente, probamos la estabilidad de estos nanoherbicidas en agua después del proceso de liofilización, y encontramos que permanecieron en suspensión durante varias semanas lo cual era una propiedad deseada en este tipo de partículas.

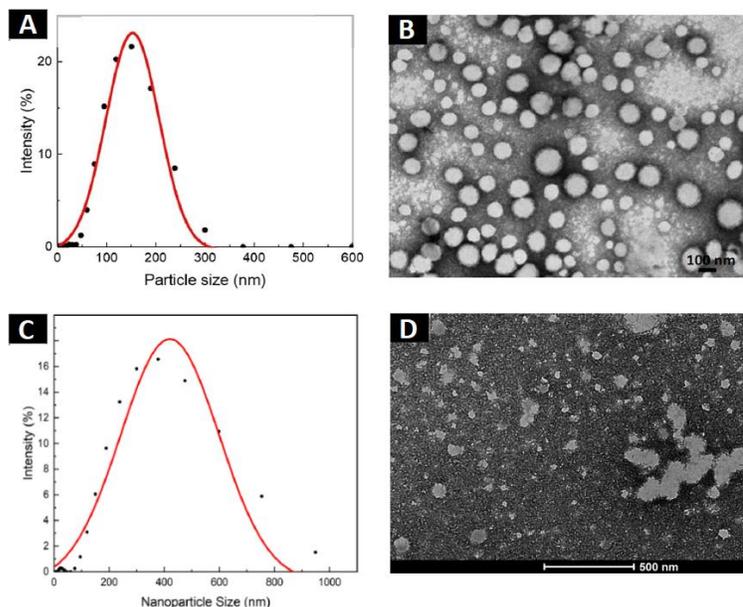


Figura 2. Tamaño de partícula y morfología de los nanoherbicidas antes (A y B) y después (C y D) del proceso de liofilización (Schnoor et al., 2018).

Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR)

En cuanto a la caracterización por infrarrojo, se logró identificar señales asociadas a los grupos funcionales del polímero, de la atrazina y la combinación de ambas en las partículas cargadas (Figura 3). El IR de la atrazina muestra una banda a 3258 cm^{-1} que corresponde al estiramiento del enlace N-H presente en el grupo funcional amina de la atrazina, mientras que la banda a 2973 cm^{-1} está asociada al estiramiento del grupo alquilo C-H enlace H. Las bandas de 1622 y 1557 cm^{-1} indicaron la deformación de los enlaces C=C y C=N, respectivamente, en la atrazina. Las nanopartículas poliméricas de PLGA (p. ej., nanoherbicidas descargados) mostraron bandas a 3388 cm^{-1} (estiramiento del enlace O-H), 1759 cm^{-1} (estiramiento del enlace carbonilo C=O) y 1068 cm^{-1} (deformación angular del enlace C-O). El espectro IR de los nanoherbicidas PLGA (p. ej., nanopartículas PLGA cargadas con atrazina) mostró tres picos distintivos en 3389 cm^{-1} , 1760 cm^{-1} y 1069 cm^{-1} que corresponden al componente PLGA de la muestra de nanoherbicida, mientras que los picos en 1623 y 1555 cm^{-1} corresponden a bandas de atrazina. Así, estos picos indican la presencia de atrazina en la matriz polimérica del nanoherbicida.

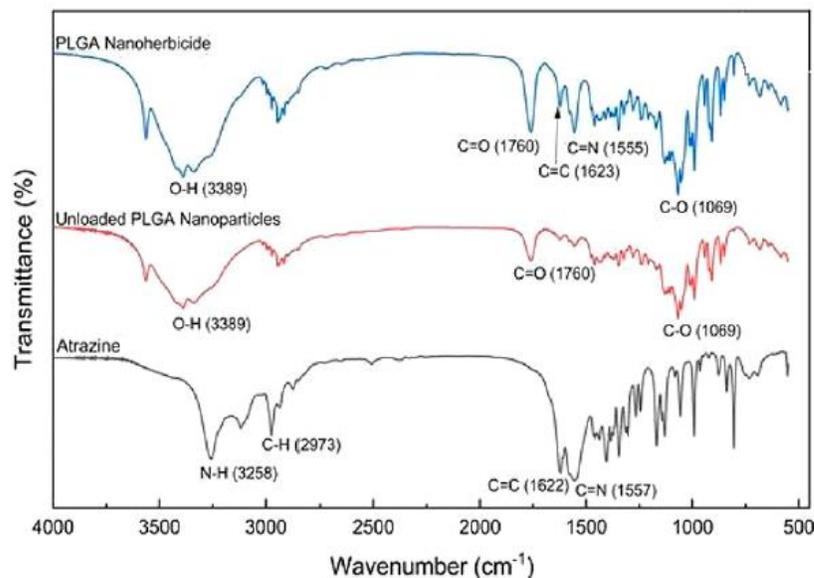


Figura 3. Espectro FT-IR de los nanoherbicidas sintetizados, la matriz polimérica y la atrazina (Schnoor et al., 2018)..

Actividad 1.3 Eficiencia de encapsulación de nanopartículas de PLGA encapsulando Atrazina.

La eficiencia de encapsulación para los nanoherbicidas preliofilizados fue del 50 %. En otros estudios con nanoherbicidas, Grillo et al(2012) lograron entre un 80 % y un 90 % de eficiencia de encapsulación de atrazina utilizando un método de deposición interfacial de polímero preformado y PCL como matriz polimérica. Este proceso produjo nanoherbicidas cargados con atrazina de aproximadamente 200-300 nm de tamaño antes de la liofilización.

Aunque nuestro método de nanoprecipitación modificado proporciona nanopartículas de PLGA cargadas con atrazina con menor eficiencia de encapsulación, el tamaño de partícula de nuestra muestra de nanoherbicida preliofilizado es de 110 ± 10 nm. Pereira et al (2014) reportaron una eficiencia de encapsulación de nanocápsulas y nanoesferas de PCL del 93%. El tamaño de las nanocápsulas y nanoesferas fue de $513 \pm 7,5$ nm y $365,1 \pm 0,16$ nm, respectivamente. Por lo tanto, parece que la eficiencia de encapsulación está relacionada con el tamaño de la partícula. Cuanto mayor sea el tamaño de partícula, mayor será la eficiencia de encapsulación.

En cuanto al perfil de liberación de atrazina, en el caso de los nanoherbicidas el 50% se alcanzó en 72h (Figura 4), mientras que la atrazina libre tarda 5 h en liberarse completamente (de Oliveira et al., 2015). El perfil de liberación de fármacos de los nanoherbicidas depende en gran medida de la proporción de copolímeros. En este estudio, los nanoherbicidas se sintetizaron con una proporción de copolímero de 75:25. Además, la tasa de degradación de los nanoherbicidas dependerá del tamaño de la partícula. Por ejemplo, Grillo et al (2012) mostró que las partículas de PCL cargadas con atrazina liberan el 50 % de atrazina en 36 h.

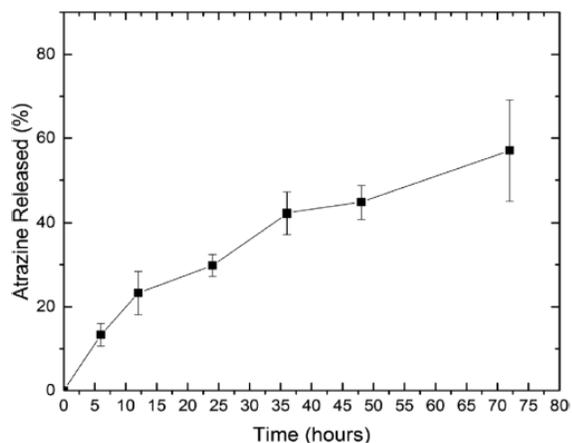


Figura 4. Perfil de liberación de atrazina por parte de los nanoherbicidas de PLGA (Schnoor et al., 2018).

Vale la pena mencionar que el perfil de degradación ajustable es una propiedad única de PLGA, que no se observa en otros polímeros biodegradables como el polihidroxibutyato (PHB) y el polihidroxivalerato (PHV). Además, otra gran ventaja del PLGA es que después de la hidrólisis de las nanopartículas, la matriz de PLGA restante se metaboliza por el ciclo de Krebs, al contrario de lo que se observa en las partículas que entregan el ingrediente activo solo por el proceso de difusión.

Si el polímero no es biodegradable, esas partículas aún podrían existir en el medio ambiente después de haber liberado su carga útil y, por lo tanto, podrían causar un efecto nocivo para el medio ambiente.

Actividad 1.4 Análisis por RAMAM-Confocal de tejido vegetal tratado con nanopartículas.

Se realizó previamente un análisis con muestras de maleza y se identificó la señal a detectar (Figura 5).

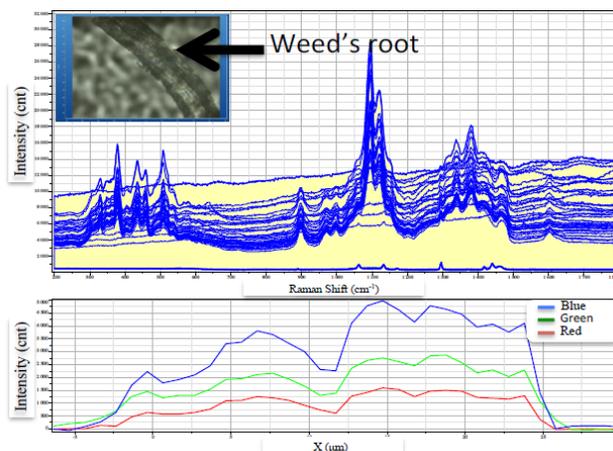


Figura 5. Ensayos preliminares para la detección de la señal RAMAN de la atrazina en tejido de raíz.

Sin embargo, en las muestras biológicas mínimamente procesadas tuvimos complicaciones metodológicas debido posiblemente a una rápida degradación de la molécula de atrazina y oxidación de los cortes lo que impidió realizar los análisis espectrales.

Actividad 1.5 Determinación de la interacción molecular entre PLGA, atrazina y solventes en la síntesis de partículas.

Para investigar más a fondo los parámetros que afectan la eficiencia de encapsulación de los nanoherbicidas, realizamos cálculos de mecánica cuántica para determinar el tipo de energía de interacción que tiene lugar entre el PLGA, la atrazina y los solventes (p. ej., acetonitrilo y acetona), así como la magnitud de dicha interacción (Figura 6). Es importante mencionar que usamos acetona para disolver PLGA durante el método de nanoprecipitación como se describió en la síntesis. Solo usamos acetonitrilo como solvente para degradar el nanoherbicida en cada punto de tiempo durante los estudios de liberación de atrazina y así cuantificar la eficiencia de encapsulación de atrazina en las partículas poliméricas.

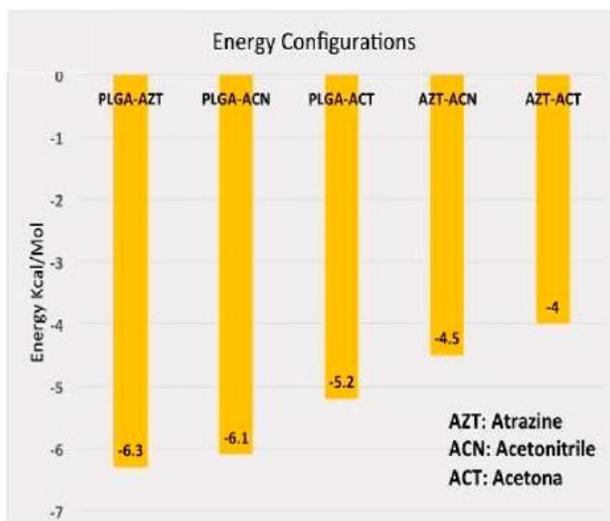


Figura 6. Configuración de la energía de afinidad entre la atrazina, el PLGA y los solventes de la síntesis (Schnoor et al., 2018).

La interacción energética muestra que la atrazina tiene una mejor afinidad química por el acetonitrilo ($-4,5$ kcal/mol) en comparación con la que tiene con la acetona (-4 kcal/mol) y el PLGA ($-3,9$ kcal/mol). Por otro lado, la acetona tiene casi la misma interacción energética para PLGA ($-3,7$ kcal/mol) y atrazina (-4 kcal/mol), mientras que el acetonitrilo tiene una mejor interacción energética con atrazina ($-4,5$ kcal/mol) que con PLGA ($-4,2$ kcal/mol). Estos resultados parecen sugerir que en una mezcla de atrazina con acetonitrilo y PLGA, la interacción entre atrazina y acetonitrilo será más favorable que la interacción entre atrazina y PLGA, reduciendo así la cantidad de atrazina encapsulada en la matriz de PLGA. Además, estos resultados parecen explicar nuestros hallazgos experimentales previos en los que encontramos que la eficiencia de encapsulación de atrazina en las partículas poliméricas fue del 8% cuando se usó acetonitrilo para disolver PLGA.

Debido a que PLGA y atrazina tienen casi la misma afinidad por la acetona, es probable que la eficiencia de encapsulación de atrazina en la matriz polimérica sea mayor cuando se usa acetona como disolvente para disolver PLGA. Este fenómeno coincide muy bien con la eficiencia de encapsulación de atrazina que se logró (50%) cuando se usó acetona como solvente para disolver PLGA.

Por lo tanto, la mejora de la eficiencia de encapsulación de atrazina en la matriz de PLGA podría lograrse encontrando un solvente que tenga una fuerte afinidad química tanto con la atrazina como con el PLGA para superar o reducir la competencia que ocurre entre el solvente-PLGA y el solvente-atrazina durante la síntesis del nanoherbicida.

Además, a través de simulaciones de Monte Carlo, aprendimos que el tipo de interacción química que ocurre entre la atrazina y el PLGA (75:25) es en general interacciones de van der Waals. En la

figura 7A se muestra 20 configuraciones diferentes de atrazina (en regaliz y diferentes colores) con un polímero PLGA (modelo de *ball and stick*). Estas configuraciones representan las energías más bajas del cálculo de un solo punto realizado con el método Mopac PM7. La figura 6B muestra la configuración óptima de atrazina y PLGA la cual tiene lugar cuando el átomo de hidrógeno de la atrazina y el átomo de oxígeno del enlace éster de PLGA forman un enlace de hidrógeno cuya longitud es cercana a 1,9 Å. Debido a que el oxígeno es un átomo electronegativo, permite la formación de ese tipo de enlace.

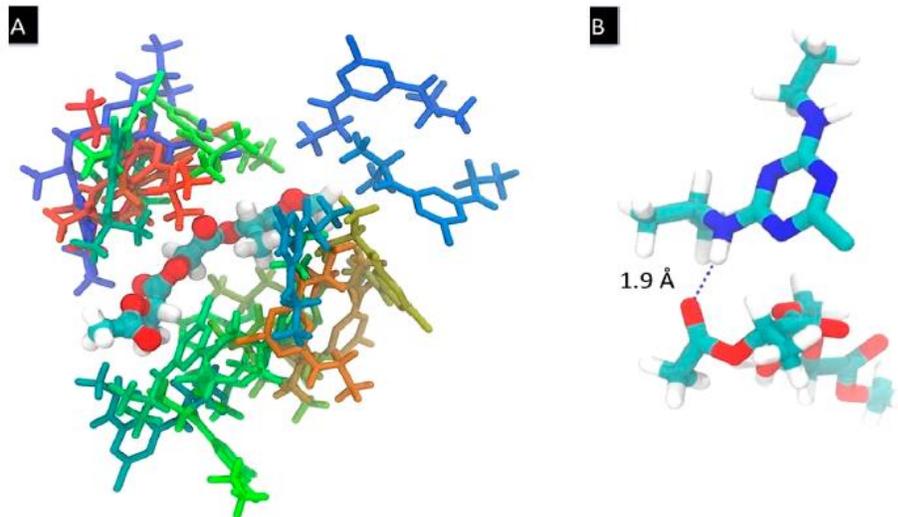


Figura 7. Simulación de Monte Carlo para la interacción más estable de la atrazina y el PLGA. A. 20 Configuraciones de atrazina. B. Interacción óptima de atrazina. Átomos de hidrógeno, oxígeno, carbono y nitrógeno se indican en blanco, rojo, cian y azul, respectivamente (Schnoor et al., 2018).

Objetivo específico 02: Evaluar el efecto del nanoherbicida en el modelo biológico de vitroplantas de papa.

Actividad 2.1 Micropropagación del material vegetal.

Se multiplicaron 450 microestacas las cuales fueron distribuidas para los nueve tratamientos ensayados (Figura 8).



Figura 8. Muestra representativa del stock de material vegetal para establecer los ensayos.

Actividad 2.2 Preparación de medios de cultivo con los diferentes tratamientos.

Se prepararon los medios de cultivo descritos en la metodología y se inocularon las microestacas para el ensayo de efecto herbicida. A manera de ejemplo, la figura 9 presenta plantas de varios de los tratamientos establecidos.

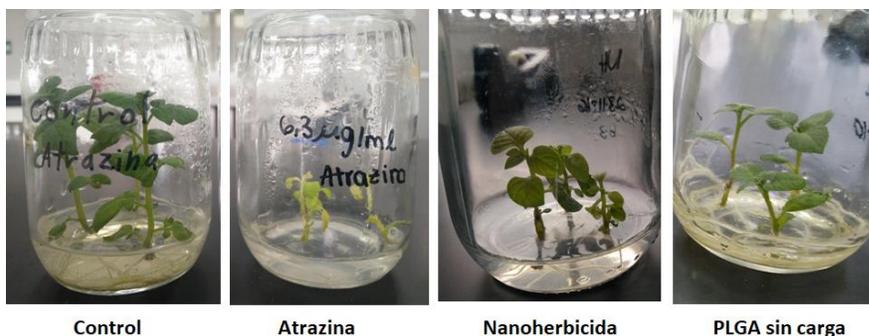


Figura 9. Ejemplos de los tratamientos en estudio.

Actividad 2.3 Evaluación de crecimiento y desarrollo de las vitroplantas.

Nota: Se incluye en esta sección de forma integrada la **Actividad 2.6** Análisis estadístico e interpretación de resultados que corresponden a este análisis de crecimiento y desarrollo.

Los resultados muestran que para todas las variables que evaluamos en los estudios de plantas *in vitro*, como la longitud del tallo, la longitud de la raíz, el número de hojas y el peso fresco y seco, observamos una tendencia similar en cuanto al efecto herbicida esperado, ya que las muestras tratadas con atrazina pura y nanoherbicidas sufrieron una disminución significativa en la longitud del tallo, la longitud de la raíz, el peso fresco y seco, así como en el número de hojas.

Además, la presencia de partículas de PLGA sin atrazina no afectó estas variables en las plantas evaluadas. De hecho, la longitud del tallo y la raíz de las plantas tratadas con nanopartículas de PLGA sin carga fue comparable con la de la muestra de control en la que las plantas solo se cultivaron con medio de crecimiento completo (Figura 10 A,B). Asimismo, no observamos cambios significativos en el peso fresco de la planta ni en el número de hojas entre las control y las nanopartículas de PLGA libres de atrazina (Figura 10 C,D,E). Sin embargo, existe una diferencia estadística en el peso seco de las plantas tratadas con PLGA y el control. Además, existe una diferencia significativa entre el control y el efecto producido por la atrazina y los nanoherbicidas. A medida que aumentamos la concentración de atrazina y nanoherbicidas, observamos una reducción del crecimiento en todas las variables evaluadas.

La longitud de la raíz fue la más afectada por la atrazina y los nanoherbicidas. Se encontró que la atrazina libre a la dosis de 0.7 ug/mL y 6.6 ug/mL no presenta diferencias significativas con respecto al control, pero cuando la Atrazina es encapsulada en la matriz polimérica, si observamos el menor crecimiento de la planta en comparación con el control para estas dosis. Esto significa que la encapsulación de atrazina en la matriz polimérica potencia los efectos de las raíces de las plantas independientemente de las dosis bajas del ingrediente activo. Observamos un efecto tóxico significativo en las plantas cuando las plantas fueron tratadas con la dosis más alta de atrazina libre y nanoherbicidas.

Los herbicidas se pueden clasificar según su modo de acción debido a la inhibición enzimática o prevención del crecimiento celular (Machado et al., 2006; Oliveira et al., 2015) En este estudio utilizamos atrazina como ingrediente activo, la cual interrumpe la fotosíntesis una vez que llega al cloroplasto. Más concretamente, la atrazina bloquea el flujo de electrones en la fotosíntesis

específicamente en el paso del fotosistema II, induciendo la inhibición de la asimilación de CO₂ y la generación de grandes cantidades de especies reactivas de oxígeno (Hess, 2000).

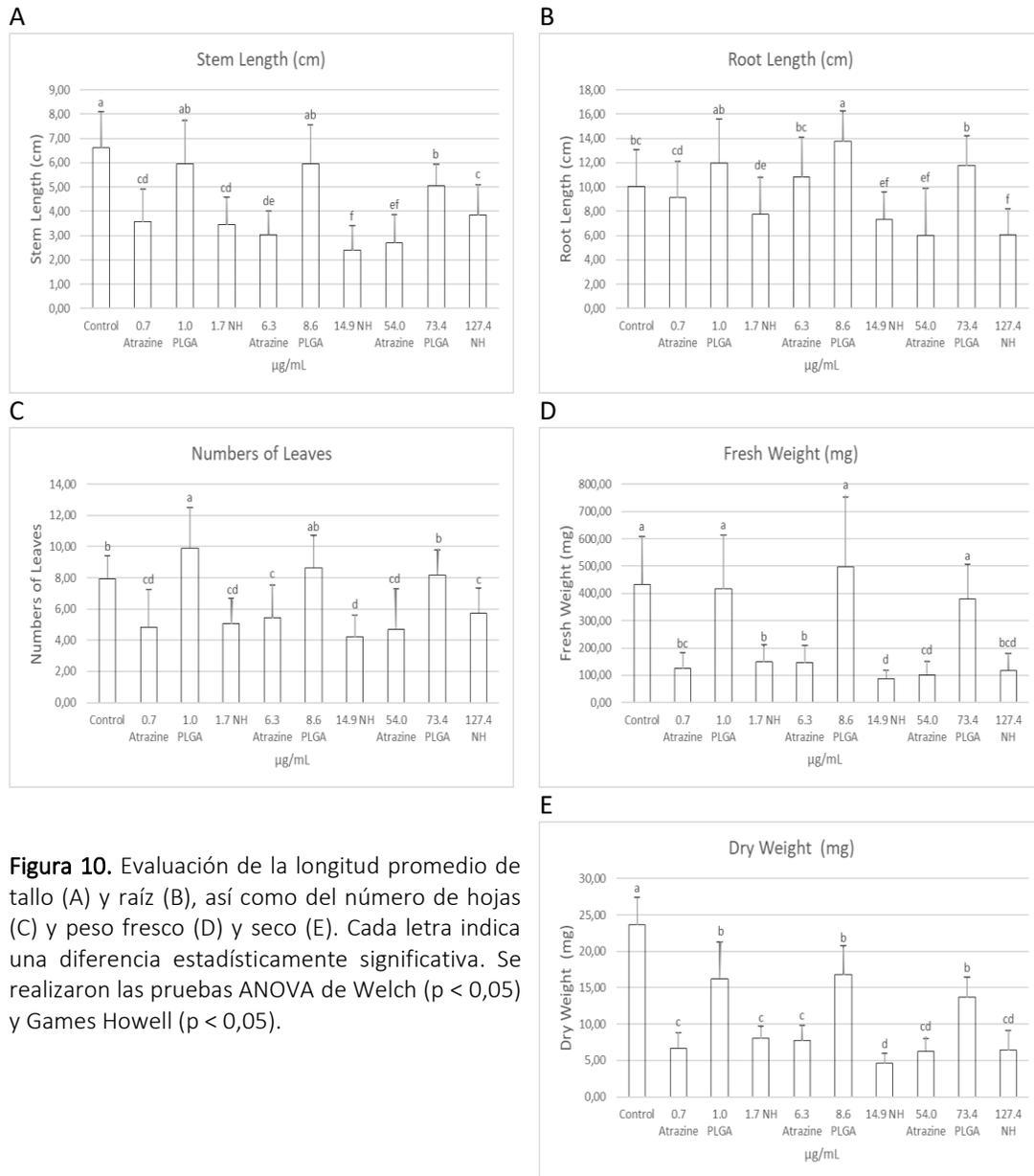


Figura 10. Evaluación de la longitud promedio de tallo (A) y raíz (B), así como del número de hojas (C) y peso fresco (D) y seco (E). Cada letra indica una diferencia estadísticamente significativa. Se realizaron las pruebas ANOVA de Welch ($p < 0,05$) y Games Howell ($p < 0,05$).

En los últimos diez años, han incrementado las investigaciones sobre la síntesis de nanoherbicidas utilizando diferentes polímeros como PCL y quitosano para encapsulación y dosificación controlada, logrando una mayor eficacia para eliminar las arvenses y con el beneficio adicional de reducir la toxicidad de los ingredientes activos en el medio ambiente y los alimentos. Por ejemplo, Grillo et al. (2012) y Pereira et al. (2014) sintetizaron nanocápsulas que transportan atrazina utilizando PCL, un poliéster alifático, que mejora la estabilidad de la formulación. Pereira et al (2014). evaluaron el efecto selectivo de estos nanoherbicidas en maíz encontrando que el índice de germinación del cultivo objetivo no se vio afectado por los nanoherbicidas ni el biopolímero, pero que el nanoherbicida pudo controlar las arvenses efectivamente, lo que confirmó que el proceso de encapsulación no afecta la actividad química del herbicida. Estos resultados coinciden con nuestros hallazgos con nanoherbicidas PLGA, donde la encapsulación de atrazina en las partículas poliméricas

de PLGA no afectó su actividad herbicida. Asimismo, el polímero en sí no generó efectos tóxicos en las plantas.

Por otro lado, Oliveira et al. en 2015 publicaron que la atrazina encapsulada en PCL era 10 veces más efectiva para inducir efectos en el crecimiento, fisiología y estrés oxidativo que la atrazina sin encapsular (Cooper and Hausman, 2011). Se sabe que los materiales que se utilizan en la síntesis de nanoherbicidas pueden producir efectos de fitotoxicidad en las plantas. En particular, pueden causar cambios en el índice de germinación, longitud de la raíz, y peso seco, así como también pueden mostrar efectos positivos como contribuir a la germinación y desarrollo de las plantas (Ma et al., 2010). En nuestro estudio, el uso del PLGA no afectó el crecimiento ni el desarrollo de las plantas porque en la mayoría de los casos, la longitud del tallo y la raíz de PLGA era comparable a la del control. Curiosamente, en algunas plantas, las nanopartículas de PLGA se comportan como un potenciador del crecimiento de la raíz y el número de hojas (Figura 10 B,C).

Dado el aumento de las interacciones entre la cubierta de partículas del nanoherbicida y la raíz, esperábamos ver un gran aumento en el efecto inhibitorio de los nanoherbicidas basados en PLGA sobre la atrazina tradicional. Sin embargo, los nanoherbicidas PLGA utilizados en los experimentos in vitro no mostraron mejoras significativas en la reducción del crecimiento con respecto a la atrazina pura. Como se muestra en la Figura 5, las plantas tratadas con nanoherbicida tenían una longitud de raíz, peso fresco, peso seco y número de hojas similares a las del tratamiento con atrazina correspondiente. Estos resultados muestran que aunque el nanoherbicida fue efectivo para inhibir el crecimiento, no inhibió el crecimiento de la planta de manera más significativa que la atrazina pura. Lo más probable es que la razón de este resultado sea la eficiencia de encapsulación del 50%.

Aunque la eficiencia de encapsulación (EE) de los nanoherbicidas PLGA no es tan alta como la de otros portadores, como PCL y quitosano, en los que se logró un 90% de EE, la eficacia de los nanoherbicidas PLGA aún puede brindar beneficios a la agricultura. Por ejemplo, es más probable que los nanoherbicidas de tamaño pequeño superen las barreras fisiológicas primarias de la planta, que a menudo incluyen la corteza de la raíz, la epidermis de las hojas y los estomas. En nuestro caso, el hecho de que los nanoherbicidas liofilizados tengan un tamaño medio de 500 nm \pm 10 nm es adecuado para los estomas de las hojas porque el tamaño de poro de nuestro modelo biológico es de 700 nm (medidas previas no incluidas en los resultados).

Por lo tanto, las nanopartículas pequeñas pueden administrar de manera efectiva los nanoherbicidas en el organismo objetivo. Además, los resultados indican claramente que el nanoherbicida es al menos tan efectivo para inhibir el crecimiento como la atrazina, incluso con una eficiencia de encapsulación del 50 %. A medida que se mejora la eficiencia de encapsulación, la eficacia del nanoherbicida podría aumentar.

Actividad 2.4 Estudio de la ultraestructura de los ápices de raíz mediante microscopía óptica.

Para observar las alteraciones celulares que los nanoherbicidas pueden producir en el meristemo de la raíz de las plantas, analizamos las células vegetales expuestas a diferentes tratamientos. Realizamos estos estudios utilizando un microscopio óptico. En la Figura 11A-C, mostramos evidencia relacionada con la preparación celular para su próxima división porque podemos observar muchas vesículas que se originan en diferentes orgánulos y citoplasma (Cooper and Hausman, 2011). Es importante señalar que en la Figura 11D podemos observar un detrimento celular, lo que corresponde con la evidencia de la Figura 11B en la que existe una diferencia significativa en la respuesta celular debido a la dosis de 54,0 μ g/mL de atrazina y nanoherbicida en comparación con la estructura celular del control. Además, a esta dosis, pudimos observar una disminución en la media de la longitud radical de la planta como se detalló anteriormente.

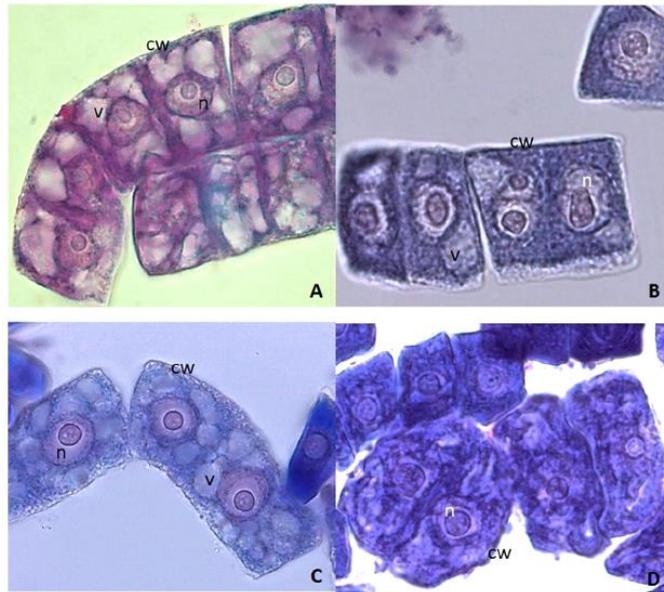


Figura 11. Micrografías de la estructura celular del control y muestras tratadas con tres dosis diferentes de nanoherbicidas. (A) Control, (B) 0,7 µg/mL, (C) 6,3 µg/mL y (D) 54 µg/mL; n = núcleo, cw = pared celular y v = vesículas (Schnoor et al., 2018).

Pereira et al (2014). determinaron la genotoxicidad en las raíces cuando aplicaron las nanocápsulas de atrazina sintetizadas con PCL. Estos resultados indicaron una interacción o posible absorción de las nanopartículas con las raíces, lo que mejoró la liberación del herbicida en el tejido vegetal. En este estudio, observamos toxicidad en las células vegetales a través de las variables evaluadas y el análisis estructural cuando aumentamos la dosis de atrazina tanto en los nanoherbicidas PLGA como en la atrazina libre (Figuras 10 y 11).

Actividad 2.5 Estudio de la división celular de ápices de raíz mediante fluorescencia.

Resultados y discusión incluida en el paper: Vindas-Reyes, Erick; Quirós-Barrantes, Steve; Chacón-Cerdas, Randall. 2021. An alternative image cytometry protocol to study the cell cycle of a heterogeneous cell population from in vitro potato root-tips using CellProfiler®. Sometido a Methods and Protocols.

CONCLUSIONES

En conclusión, realizamos por primera vez la síntesis de nanoherbicidas PLGA con una eficiencia de encapsulación del 50% de atrazina como ingrediente activo.

Comprobamos que el polímero PLGA es una excelente opción para la síntesis de nuevos nanoherbicidas debido a su biocompatibilidad, aprobación de la FDA, liberación personalizada de herbicidas y perfil biodegradable ajustable.

Encontramos que los nanoherbicidas liofilizados cuyo tamaño ronda los 500 nm ±10 nm afectan el crecimiento de las plantas. Dado que los nanoherbicidas están hechos del polímero PLGA, y este polímero se degrada en presencia de agua, tuvimos que liofilizar los nanoherbicidas para realizar los estudios de plantas in vitro. La eficiencia de encapsulación del 50% de la atrazina en la matriz de PLGA produjo una disminución del 40% en la longitud de la raíz.

Además, observamos que los nanoherbicidas PLGA son tan efectivos como la atrazina sin encapsular para reducir el crecimiento, pero sustancialmente menos tóxicos porque después de que la matriz

PLGA se degrada, será metabolizada por el ciclo de Krebs liberando solo CO₂ y agua como productos finales.

Por lo tanto, los resultados sugieren que los nanoherbicidas PLGA no inducirán efectos perjudiciales en el medio ambiente en comparación con otros tipos de nanoherbicidas o herbicidas puros. Igualmente importante, debido a que los nanoherbicidas PLGA controlan la liberación del ingrediente activo, reducirán en gran medida la toxicidad en el medio ambiente.

Los estudios futuros implicarán una comprensión del mecanismo de interacción planta-nanoherbicida, así como el papel de PLGA como potenciador del crecimiento.

RECOMENDACIONES

La liofilización de los nanoherbicidas es un proceso que produce incremento en el tamaño de las partículas, sin embargo, aunque esto no es un fenómeno que afecte posteriormente la acción biológica y puede interferir con su solubilidad. De esta forma, se recomienda explorar cambios en el procedimiento de liofilizado para lograr obtener partículas con más solubilidad post-liofilizado.

La caracterización de los nanoherbicidas bajo el parámetro de morfología se debe realizar con un microscopio electrónico de barrido que tenga la capacidad para resoluciones cerca de los 100nm, es posible que requiera un balance de voltaje superior a los 15kv.

El agua utilizada para la caracterización de tamaño mediante el diámetro hidrodinámico y la carga superficial mediante el potencial zeta de los nanoherbicidas, debe ser tipo I, para alcanzar mayor precisión en la determinación también del índice de polidispersión y evitar ruido por partículas tipo sales o sólidos suspendidos propios de agua de menos calidad.

La caracterización FTIR presenta mayor calidad y resolución cuando se realiza combinando la muestra del nanoherbicida con bromuro de bario y se comprime tipo pastilla.

La técnica de RAMAN confocal presenta limitaciones para el tipo de tejido que analizamos en esta investigación, se recomienda trabajar con tejidos no fotosintéticos (sin pigmentos que puedan aportar fluorescencia al análisis) y verificar la resolución del RAMAN para evitar no detectar los compuestos de interés por un efecto de baja concentración.

El material vegetal que se utiliza para los bioensayos debe ser de rápido crecimiento, ya que esto facilita la obtención de resultados en corto tiempo, donde se pueden evidenciar más los cambios iniciales del efecto del nanoherbicida en las plantas.

La tinción que se utilice para dar contraste a las células de la raíz que se estudiaron deben ser capaces de ingresar al citoplasma celular y alcanzar la membrana de organelas como las mitocondrias y la vacuola, así se facilita la identificación de cambios ultraestructurales producto de la aplicación del nanoherbicida.

Para el caso del análisis de los datos relacionados con la citometría de imágenes, se debe verificar la capacidad del ordenador que se use para procesar los datos, ya que los software de procesamiento de imágenes de alta calidad consumen una alta proporción de la memoria de video.

Dentro de los tratamientos que se utilizaron para inducir el arresto de la división celular en las células en el experimento de definición de las fases del ciclo celular, se recomienda aplicarles choques

térmicos y prolongar el tiempo de exposición a frío para mejorar la separación de las etapas G1/S/G2.

Parte de la configuración de comandos para el proceso de las imágenes de tinción del núcleo en las células incluyeron filtros para eliminar aquellas mediciones que por efectos de aglomeración celular podían agregar datos de intensidad incorrectos. Se recomienda filtrar por excentricidad y tamaño si se desea evaluar las muestras en escenarios más homogéneos.

El procedimiento de tinción utilizado para marcaje del ciclo celular con yoduro de propidio (PI) tiene puntos sensibles que se deben tomar en cuenta a la hora de fijar y observar las muestras. Uno de los puntos críticos para mantener la misma intensidad de evaluación en las micrografías es respetar los tiempos de incubación que sean homogéneos para todas las muestras, así como, preparar una dilución nueva del reactivo PI cada sesión de trabajo.

AGRADECIMIENTOS

Dentro del equipo de investigadores colaboró la Ph.D. Carolina Salvador Morales, experta de la George Mason University, Virginia, USA, a quien agradecemos su confianza para complementar su investigación con nuestros aportes. Ella desarrolló las nanopartículas y logramos establecer una colaboración para realizar la investigación biológica con este proyecto que entregamos en el presente informe.

Agradecemos a la Vicerrectoría de Investigación y Extensión, la cual a través del proyecto 1510102 financió y brindó el apoyo administrativo para esta investigación.

REFERENCIAS

Avila-Salas, F.; Sandoval, C.; Caballero, J.; Guíñez-Molinos, S.; Santos, L. S.; Cachau, R. E.; González-Nilo, F. D. Study of Interaction Energies between the PAMAM Dendrimer and Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug Using a Distributed Computational Strategy and Experimental Analysis by ESI-MS/MS. *J. Phys. Chem. B* 2012, 116, 2031–2039.

Bhattacharjee, S. (2016). DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release*, 235, 337–351. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2016.06.017>.

Carvalho, P. M., Felício, M. R., Santos, N. C., Gonçalves, S., & Domingues, M. M. (2018). Application of light scattering techniques to nanoparticle characterization and development. *Frontiers in Chemistry*, 6, 237. <https://doi.org/10.3389/FCHEM.2018.00237/BIBTEX>.

Chen, H.; Yada, R. Nanotechnologies in Agriculture: New Tools for Sustainable Development. *Trends Food Sci. Technol.* 2011, 22, 585–594.

Chen, Q.; Yang, B.; Wang, H.; He, F.; Gao, Y.; Scheel, R. A. Soil Microbial Community Toxic Response to Atrazine and its Residues Under Atrazine and Lead Contamination. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2015, 22, 996–1007.

Cooper, G. M.; Hausman, R. E. *La Celula*, 5th ed.; Marban Libros, S. L.: Madrid, Spain, 2011; pp 653–680.

Corsini, E.; Sokooti, M.; Galli, C. L.; Moretto, A.; Colosio, C. Pesticide Induced Immunotoxicity in Humans: A Comprehensive Review of the Existing Evidence. *Toxicology* 2013, 307, 123–135.

Cuadros-Moreno, A., Casañas Pimentel, R., San Martín-Martínez, E., & Yañes Fernandez, J. (2014). Dispersión de luz dinámica en la determinación de tamaño de nanopartículas poliméricas I. INTRODUCCIÓN. *Am. J. Phys. Educ.* 8(4). <http://www.lajpe.org>.

de Oliveira, J. L.; Campos, E. V.; Goncalves da Silva, C. M.; Pasquoto, T.; Lima, R.; Fraceto, L. F. Solid Lipid Nanoparticles Co-Loaded with Simazine and Atrazine: Preparation, Characterization, and Evaluation of Herbicidal Activity. *J. Agric. Food Chem.* 2015, 63, 422–432.

Dutta, A. (2017). Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Spectroscopic Methods for Nanomaterials Characterization*, 2, 73–93. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-46140-5.00004-2>.

EEC. 2004/248/EC: Commission Decision of 10 March 2004 concerning the noninclusion of atrazine in Annex I to Council Directive 91/414/EEC and the withdrawal of authorizations for plant protection products containing this active substance (Text with EEA relevance) (notified under document number C (2004) 731).

El Yousfi, R.; Brahmi, M.; Dalli, M.; Achalhi, N.; Azougagh, O.; Tahani, A.; Touzani, R.; El Idrissi, A. (2023). Recent Advances in Nanoparticle Development for Drug Delivery: A Comprehensive Review of Polycaprolactone-Based Multi-Arm Architectures. *Polymers*, 15, 1835. <https://doi.org/10.3390/polym15081835>.

El-Azazy, M. (2018). Introductory Chapter: Infrared Spectroscopy - A Synopsis of the Fundamentals and Applications. *Infrared Spectroscopy - Principles, Advances, and Applications*. <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.82210>.

Fennell, D., & Wennerström, H. (2001). The Colloidal Domain – where physics, chemistry, biology and technology meet. *Applied Rheology*, 11(4), 177–177. <https://doi.org/10.1515/ARH-2001-0032>.

Flores, D. Guidelines for the Production of Pre-basic and Basic Seed of Potato Plant in Costa Rica; Universidad Nacional Estatal a Distancia: San Jose, Costa Rica, 2002; Vol. 33.

Floris, F. M., & Tani, A. (1999). Interaction potentials for small molecules. En *Theoretical and Computational Chemistry* (Vol. 7, pp. 363–429). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S1380-7323\(99\)80043-0](https://doi.org/10.1016/S1380-7323(99)80043-0).

Gamble, D. S. Atrazine Sorption Kinetics in a Characterized Soil: Predictive Calculations. *Environ. Sci. Technol.* 2008, 42, 1537–1541.

García, A., Leonardi, D., Piccirilli, G. N., Mamprin, M. E., Olivieri, A. C., & Lamas, M. C. (2015). Spray drying formulation of albendazole microspheres by experimental design. *In vitro–in vivo studies. Drug Development and Industrial Pharmacy*, 41(2), 244–252. <https://doi.org/10.3109/03639045.2013.858737>.

Giliom, R. J.; Barbash, J. E.; Crawford, C. G.; Hamilton, P. A.; Martin, J. D.; Nakagaki, N.; Nowell, L.; Scott, J. C.; Stackleberg, P. E.; Thelin, G. P.; Wolock, D. M. The Quality of Our Nation's Waters: Pesticides in the Nation's Streams and Ground Water, 1992–2001. United States Geological Survey 2006, 1291, 41–66.

Graymore, M.; Stagnitti, F.; Allinson, G. Impacts of Atrazine in Aquatic Ecosystems. *Environ. Int.* 2001, 26, 483–495.

Grillo, R.; dos Santos, N. Z. P.; Maruyama, C. R.; Rosa, A. H.; de Lima, R.; Fraceto, L. F. Poly(ϵ -caprolactone) Nanocapsules as Carrier Systems for Herbicides: Physico-Chemical Characterization and Genotoxicity Evaluation. *J. Hazard. Mater.* 2012, 231–232, 1–9.

Grillo, R.; Pereira, A. E. S.; Nishisaka, C. S.; de Lima, R.; Oehlke, K.; Greiner, R.; Fraceto, L. F. Chitosan/tripolyphosphate Nanoparticles Loaded with Paraquat Herbicide: An Environmentally Safer Alternative for Weed Control. *J. Hazard. Mater.* 2014, 278, 163–171.

Heimowska, A.; Morawska, M.; Bocho-Janiszewska, A. Biodegradation of Poly(ϵ - caprolactone) in Natural Water Environments. *Pol. J. Chem. Technol.* 2017, 19, 120–126.

Hess, D. F. Light-dependent herbicides: an overview. *Weed Sci.* 2000, 48, 160–170.

Jie, G.; Yu, W.; Bin, G.; Lei, W.; Hao, C. Environmental Fate and Transport of Pesticides. *Pesticides*; CRC Press: Boca Raton, FL, 2012; pp 29–46.

Kah, M.; Beulke, S.; Tiede, K.; Hofmann, T. K. Nanopesticides: State of Knowledge, Environmental Fate and Exposure Modelling. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 2013, 43, 1823–1867.

Kaszuba, M., McKnight, D., Connah, M. T., McNeil-Watson, F. K., & Nobbmann, U. (2008). Measuring sub nanometre sizes using dynamic light scattering. *Journal of Nanoparticle Research*, 10(5), 823–829. <https://doi.org/10.1007/S11051-007-9317-4/FIGURES/6>.

Khoder, M., Tsapis, N., Domergue-Dupont, V., Gueutin, C., & Fattal, E. (2010). Removal of residual colonic ciprofloxacin in the rat by activated charcoal entrapped within zinc-pectinate beads. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 41(2), 281–288. <https://doi.org/10.1016/J.EJPS.2010.06.018>.

Kumar, S.; Bhanjana, G.; Sharma, A.; Sidhu, M. C.; Dilbaghi, N. Synthesis, Characterization and On Field Evaluation of Pesticide Loaded Sodium Alginate Nanoparticles. *Carbohydr. Polym.* 2014, 101, 1061–1067.

Lawrie, A. S., Albanyan, A., Cardigan, R. A., MacKie, I. J., & Harrison, P. (2009). Microparticle sizing by dynamic light scattering in fresh-frozen plasma. *Vox Sanguinis*, 96(3), 206–212. <https://doi.org/10.1111/J.1423-0410.2008.01151.X>.

Lee, K. Y.; Mooney, D. J. Alginate: Properties and Biomedical Applications. *Prog. Polym. Sci.* 2012, 37, 106–126.

- Lengyel, M., Kállai-Szabó, N., Antal, V., Laki, A. J., & Antal, I. (2019). Microparticles, Microspheres, and Microcapsules for Advanced Drug Delivery. *Scientia Pharmaceutica* 2019, Vol. 87, Page 20, 87(3), 20. <https://doi.org/10.3390/SCIPHARM87030020>.
- Ma, X.; Geiser-Lee, J.; Deng, Y.; Kolmakov, A. Interactions between Engineered Nanoparticles (ENPs) and Plants: Phytotoxicity Uptake and Accumulation. *Sci. Sci. Total Environ.* 2010, 408, 3053–3061.
- Machado, R. F.; Barros, A. C. S. A.; Zimmer, P. D.; Amaral, A. Reflexes of the Mechanism of Action of Herbicides on the Physiological Quality of Seeds and the Enzymatic Activity in Rice Seedlings. *Rev. Bras. Sementes* 2006, 28, 151–160.
- Makadia, H. K.; Siegel, S. J. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers* 2011, 3, 1377–1397.
- Minitab Statistical Software, version 17.2.1; Minitab 17.2.1 Inc.: State College, PA, 2013.
- Mohan, S., Oluwafemi, O. S., Kalarikkal, N., Thomas, S., & Songca, S. P. (2016). Biopolymers – Application in Nanoscience and Nanotechnology. *Recent Advances in Biopolymers*. <https://doi.org/10.5772/62225>.
- Mudhoo, A.; Garg, V. K. Sorption, Transport and Transformation of Atrazine in Soils Minerals and Composts: A Review. *Pedosphere* 2011, 21, 11–25.
- Nagpal, K., Singh, S. K., & Mishra, D. N. (2010). Chitosan nanoparticles: a promising system in novel drug delivery. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 58(11), 1423–1430. <https://doi.org/10.1248/CPB.58.1423>.
- Naiim, M., Boualem, A., Ferre, C., Jabloun, M., Jalocha, A., & Ravier, P. (2014). Multiangle dynamic light scattering for the improvement of multimodal particle size distribution measurements. *Soft Matter*, 11(1), 28–32. <https://doi.org/10.1039/C4SM01995D>.
- Namasivayam, S. K. R.; Aruna, A. Evaluation of Silver Nanoparticles-Chitosan Encapsulated Synthetic Herbicide Paraquat (AgNp-CS-PQ) Preparation for the Controlled Release and Improved Herbicidal Activity Against Eichhornia Crassipes. *Res. J. Biotechnol.* 2014, 9, 19–27.
- Nicodemo, D.; Maioli, M. A.; Medeiros, H. C. D.; Guelfi, M.; Balieira, K. V. B.; De Jong, D.; Mingatto, F. E. Fipronil and Imidacloprid Reduce Honeybee Mitochondrial Activity *Environ. Toxicol. Environ. Toxicol. Chem.* 2014, 33, 2070–2075.
- Oliveira, H. C.; Stolf-Moreira, R.; Martinez, C.; Sousa, G.; Grillo, R.; De Jesus, M.; Fraceto, L. Evaluation of the Side Effects of Poly(epsilon-caprolactone) Nanocapsules Containing Atrazine Toward Maize Plants. *Front. Chem.* 2015, 3, 61.
- Otalvaro, J. O.; Brigante, M. Interaction of Pesticides with Natural and Synthetic Solids. Evaluation in Dynamic and Equilibrium Conditions. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2018, 25, 6707–6719.
- Pereira, A. E. S.; Grillo, R.; Mello, N. F. S.; Rosa, A. H.; Fraceto, L. F. Application of Poly(epsilon-caprolactone) Nanoparticles Containing Atrazine Herbicide as an Alternative Technique to Control Weeds and Reduce Damage to the Environment. *J. Hazard. Mater.* 2014, 268, 207–215.
- Schulz, R. Field Studies on Exposure, Effects, and Risk Mitigation of Aquatic Nonpoint- Source Insecticide Pollution: A Review. *J. Environ. Qual.* 2004, 33, 419–448.
- Schnoor, Brian; Ahmad Elhendawy, Suzanna Joseph, Mark Putman, Randall Chacón-Cerdas, Dora Flores-Mora, Felipe Bravo-Moraga, Fernando Gonzalez-Nilo, and Carolina Salvador-Morales. (2018). Engineering Atrazine Loaded Poly (lactic-co-glycolic Acid) Nanoparticles to Ameliorate Environmental Challenges. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2018 66 (30), 7889-7898. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b01911>.
- Silva, M. S.; Cocenza, D. S.; Grillo, R.; de Melo, N. F. S.; Tonello, P. S.; de Oliveira, L. C.; Cassimiro, D. L.; Rosa, A. H.; Fraceto, L. F. Paraquat-Loaded Alginate/chitosan Nanoparticles: Preparation, Characterization and Soil Sorption Studies. *J. Hazard. Mater.* 2011, 190, 366–374.
- Stewart J. J. P. (2013). Optimization of parameters for semiempirical methods VI: more modifications to the NDDO approximations and re-optimization of parameters *J. Mol. Modeling* 19, 1-32.
- Stewart, J. J. P. MOPAC: A General Molecular Orbital Package. *Quant. Chem. Prog. Exch.* 1990, 10, 86. (28) Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; et al. Gaussian 09, revision D.01, Gaussian, Inc.: Wallingford CT, 2013.
- Stuart, B. (2005a). Experimental Methods. In D. Ando (Ed.), *Analytical Techniques in the Sciences* (pp. 15–44). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/0470011149.CH2>.
- Stuart, B. (2005b). Spectral Analysis. In D. Ando (Ed.), *Analytical Techniques in the Sciences* (pp. 45–70). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/0470011149.CH3>.

- Su, S., & Kang, P. M. (2020). Systemic Review of Biodegradable Nanomaterials in Nanomedicine. *Nanomaterials* (Basel, Switzerland), 10(4). <https://doi.org/10.3390/NANO10040656>.
- Vanommeslaeghe, K.; Hatcher, E.; Acharya, C.; Kundu, S.; Zhong, S.; Shim, J.; Darian, E.; Guvench, O.; Lopes, P.; Vorobyov, I.; Mackerell, A. D., Jr CHARMM General Force Field: A Force Field for Drug-Like Molecules Compatible with CHARMM All-Atom Additive Biological Force Fields. *J. Comput. Chem.* 2010, 31, 671–690.
- Wais, U., Jackson, A. W., He, T., & Zhang, H. (2016). Nanoformulation and encapsulation approaches for poorly water-soluble drug nanoparticles. *Nanoscale*, 8(4), 1746–1769. <https://doi.org/10.1039/C5NR07161E>.
- Wauchope, R. D. The Pesticide Content of Surface Water Draining from Agricultural Fields – A Review. *J. Environ. Qual.* 1978, 7, 459–472.
- Wei-Chung Luo; Andre O'Reilly Beringhs; Rachel Kim; William Zhang; Sajal M. Patel; Robin H. Bogner; Xiuling Lu. (2021). Impact of formulation on the quality and stability of freeze-dried nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 169 (2021) 256–267. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2021.10.014>.
- Yadav, S., Scherer, T. M., Shire, S. J., & Kalonia, D. S. (2011). Use of dynamic light scattering to determine second virial coefficient in a semidilute concentration regime. *Analytical Biochemistry*, 411(2), 292–296. <https://doi.org/10.1016/J.AB.2010.12.014>.
- Zankel, A., Nachtnebel, M., Mayrhofer, C., Wewerka, K., & Müllner, T. (2017). Characterisation of polymers in the scanning electron microscope—from low-voltage surface imaging to the 3D reconstruction of specimens. *Springer Series in Materials Science*, 247, 95–108. https://doi.org/10.1007/978-3-319-41879-7_7.
- Zhou, W., Apkarian, R., Wang, Z. L., & Joy, D. (2006). Fundamentals of Scanning Electron Microscopy (SEM). *Scanning Microscopy for Nanotechnology: Techniques and Applications*, 1–40. https://doi.org/10.1007/978-0-387-39620-0_1.
- Zielinska, A., Carreiró, F., Oliveira, A. M., Neves, A., Pires, B., Nagasamy Venkatesh, D., Durazzo, A., Lucarini, M., Eder, P., Silva, A. M., Santini, A., & Souto, E. B. (2020). Polymeric Nanoparticles: Production, Characterization, Toxicology and Ecotoxicology. *Molecules* (Basel, Switzerland), 25(16). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES25163731>.