



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Materiales Poliméricos

Obtención y caracterización de microesferas híbridas de polímeros biodegradables nanoreforzadas con paligorskita como estrategia para la liberación controlada de fertilizantes de N y K

Tesis que presenta

MANUEL ARMANDO XOOL HERRERA

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS  
(MATERIALES POLIMÉRICOS)

Mérida, Yucatán, México

2023

## DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de investigación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se regirán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma: \_\_\_\_\_

Manuel Armando Xool Herrera

*CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.*  
*POSGRADO EN MATERIALES POLIMÉRICOS*



**RECONOCIMIENTO**

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de **Manuel Armando Xool Herrera** titulado “**Obtención y caracterización de microesferas híbridas de polímeros biodegradables nanoreforzadas con paligorskita como estrategia para la liberación controlada de fertilizantes de N y K**”, fue realizado en la Unidad de Materiales, dentro de la Línea de Materiales Compuestos y Nanomateriales, en el laboratorio de Materiales Compuestos del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. Pedro Iván González Chí y la codirección de la Dra. Ileana Echevarría Machado de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, perteneciente al Programa de Posgrado en Materiales Poliméricos de este Centro.

**Atentamente**



---

**Dra. Cecilia Hernández Zepeda**  
**Directora de Docencia**

Mérida, Yucatán, México, a 13 de marzo de 2023

## AGRADECIMIENTOS

El desarrollo de este trabajo de tesis ha sido una de las etapas de mi vida más importantes, que han contribuido a mi formación profesional y a mi crecimiento personal. En este espacio quiero agradecer a todos aquellos que estuvieron presentes durante la realización y desarrollo de esta tesis y a aquellos que realizaron aportes que enriquecieron el presente trabajo.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. (CICY) por brindarme las facilidades para realizar este trabajo en sus instalaciones y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada (número de becario 1076448).

Al Dr. Alex Valadez González por permitirme el uso del laboratorio de materiales compuestos, al Dr. Juan Valerio Cauich Rodríguez por permitirme el uso de laboratorio de química macromolecular, a la Dra. Ileana de la Caridad Echevarría Machado y al Dr. Manuel Martínez Estévez por permitirme el uso de los laboratorios de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas.

A mis directores de tesis, el Dr. Pedro Iván González Chi y a la Dra. Ileana de la Caridad Echevarría Machado por haberme confiado el desarrollo de este proyecto, por su valioso asesoramiento y dirección que me permitieron elaborar este proyecto de tesis.

A mis tutores, el Dr. José Manuel Cervantes Uc y el Dr. Felipe Barrera Méndez por todas sus observaciones, sugerencias e indicaciones invaluables que apoyaron el desarrollo de esta tesis.

A mis revisores, el Dr. José Manuel Cervantes Uc, el Dr. Felipe Barrera Méndez, el Dr. Jorge Alonso Uribe Calderón y el Dr. Héctor Estrada Medina que, con sus valiosas sugerencias, observaciones y comentarios enriquecieron este proyecto de tesis.

A mis profesores, el Dr. Emmanuel Flores Johnson, el Dr. Fernando Hernández Sánchez, el Dr. Alex Valadez González, la Dra. Rita Sulub Sulub, el Dr. Juan Valerio Cauich Rodríguez, el Dr. Gonzalo Canché Escamilla, el Dr. Jorge Alonso Uribe Calderón, el Dr. Francis Avilés Cetina, el Dr. Cesar Alberto Cab Cauich, el Dr. Jesús Ortiz Espinoza y el

Dr. Alejandro May Pat por compartir sus conocimientos durante el periodo de mi formación como maestro en materiales poliméricos.

A los técnicos, M.C. César Martín Barrera por su apoyo técnico brindado en la capacitación y la operación del analizador Coulter y el microscopio óptico, así como la caracterización por FTIR, a la Q.I. Rossana Faride Vargas Coronado por su apoyo en la capacitación de uso del espectrofotómetro UV-visible, al Q.I. Santiago Duarte Aranda por su apoyo en la realización de las pruebas de caracterización SEM, a la M.C. María Verónica Chulim Moreno y al I.I. Miguel Ángel Rivero Ayala por su apoyo en la facilitación de material y equipo en el laboratorio de materiales compuestos para realizar este proyecto.

A la M.C. María de Fátima Medina Lara de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del CICY por su apoyo y capacitación durante la realización de las pruebas de determinación de potasio mediante Espectroscopía de Absorción Atómica.

A la Dra. Daniella Esperanza Pacheco Catalán y al M.C. José Martín Baas López de la Unidad de Energías Renovables del CICY por todo el apoyo brindado para la caracterización XRD.

Al Dr. Rubén Rangel Pérez Matú, por su apoyo en el análisis de los diseños experimentales, así como en el modelado de la cinética de liberación de fertilizantes.

Gracias a mi familia, a mis padres Armando Xool Villarreal y María Rosalía Herrera Puc, y a mis hermanos Jorge Andrés May Herrera y Roberto Elías May por su apoyo y compañía durante la maestría, son una parte importante de mi vida.

A mis amigos y compañeros de laboratorio: Enrique Torres, Juan Pablo Collí, María Fernanda Rojas, Priscila Collí, Helbert Canché, Abraham Balam, Andrey Can, Gualberto Zumbardo, Juan Encalada, Mónica Correa, Gabriela Uribe, Federico García, Fabiola León, Marta Lizama, Jafet Arcos, Jorge Araujo, Lucía Chi, Diana Sierra, Eliezer Bote, Manuel Braga y Valeria Gien, gracias por su amistad, apoyo y compañía en este período tan importante y trascendental de mi vida.

## ÍNDICE

Resumen.....	viii
Abstract.....	ix
INTRODUCCIÓN .....	1
CAPÍTULO 1 .....	3
1 ANTECEDENTES .....	3
1.1 Los fertilizantes en la agricultura del siglo XXI .....	3
1.1.1 Macronutrientes y micronutrientes .....	4
1.1.2 Nitrato de potasio como fuente de nutrientes vegetales .....	7
1.2 Liberación controlada de fertilizantes .....	8
1.2.1 Liberación controlada de fertilizantes a partir de microesferas poliméricas .....	9
1.3 Técnicas para la preparación de microesferas .....	9
1.3.1 Gelificación iónica .....	10
1.3.2 Emulsificación y evaporación de solvente .....	12
1.3.3 Emulsificación y entrecruzamiento .....	14
1.4 Tipos de matrices para microesferas .....	16
1.4.1 Alginato.....	17
1.4.2 Poli(ácido láctico).....	19
1.4.3 Quitosano .....	21
1.5 Arcillas .....	24
1.5.1 Propiedades fisicoquímicas de las arcillas .....	26
1.5.2 Paligorskita .....	26
1.6 Liberación de fertilizantes a partir de microesferas poliméricas: revisión de la literatura	29
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....	34
Hipótesis .....	34
Objetivo general .....	34
Objetivos específicos .....	34
CAPÍTULO 2 .....	35
2 MATERIALES Y MÉTODOS .....	35
2.1 Materiales .....	35
2.2 Metodología .....	35
2.3 Métodos de preparación de microesferas .....	36
2.3.1 Microesferas de alginato .....	36
2.3.2 Microesferas de poli(ácido láctico) .....	36
2.3.2.1 Microesferas híbridas de PLA/paligorskita y KNO <sub>3</sub> .....	36

2.3.3	Microesferas de Quitosano .....	37
2.3.3.1	Microesferas híbridas de quitosano/paligorskita y $\text{KNO}_3$ .....	37
2.4	Proceso para determinar la cantidad de $\text{NO}_3^-$ y $\text{K}^+$ capturado en las microesferas.....	38
2.4.1	Curva de calibración de $\text{NO}_3^-$ .....	38
2.4.2	Curva de calibración de $\text{K}^+$ .....	40
2.4.3	Método para determinar la cantidad de $\text{NO}_3^-$ y $\text{K}^+$ capturados en microesferas de QUI y PLA .....	41
2.5	Estudio de las condiciones de obtención de las microesferas de quitosano .....	41
2.5.1	Incorporación de $\text{KNO}_3$ en microesferas de quitosano .....	41
2.5.2	Evaluación de la velocidad de agitación.....	43
2.5.3	Evaluación de la cantidad de quitosano y tensoactivo.....	43
2.5.4	Evaluación de la cantidad de glutaraldehído .....	44
2.5.5	Condiciones de preparación de las microesferas híbridas de quitosano con diferentes contenidos de paligorskita y $\text{KNO}_3$ (diseño experimental factorial) .....	44
2.6	Caracterización de las microesferas .....	46
2.6.1	Análisis estructural y diámetros de las microesferas por microscopía óptica.....	46
2.6.2	Tamaños de partícula de las microesferas.....	47
2.6.3	Análisis superficial de las microesferas por microscopía electrónica de barrido .....	47
2.6.4	Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier .....	47
2.6.5	Difracción de Rayos X.....	47
2.7	Cinética de liberación de $\text{NO}_3^-$ y $\text{K}^+$ en microesferas híbridas de QUI/Pal/ $\text{KNO}_3$ .....	48
CAPÍTULO 3 .....		49
3	RESULTADOS.....	49
3.1	Microesferas de alginato .....	49
3.1.1	Obtención de microesferas de alginato .....	49
3.2	Microesferas de poli(ácido láctico) .....	51
3.2.1	Preparación de microesferas de poli(ácido láctico) .....	51
3.2.1.1	Distribución de tamaño de microesferas de poli(ácido láctico) .....	52
3.2.1.2	Rendimiento de microesferas de poli(ácido láctico) .....	52
3.2.2	Microesferas híbridas de poli(ácido láctico)/paligorskita y fertilizante .....	52
3.2.2.1	Morfología superficial de microesferas híbridas PLA/Pal/ $\text{KNO}_3$ .....	52
3.2.2.2	Tamaño de partícula de las microesferas híbridas PLA/Pal/ $\text{KNO}_3$ .....	56
3.2.2.3	Rendimiento de microesferas híbridas PLA/Pal/ $\text{KNO}_3$ .....	58
3.2.2.4	Capacidad de captura de nitrato en microesferas híbridas de PLA/Pal/ $\text{KNO}_3$ .....	59
3.2.2.5	Capacidad de captura de potasio en microesferas híbridas PLA/Pal/ $\text{KNO}_3$ .....	61
3.3	Microesferas de quitosano .....	63
3.3.1	Proceso preliminar de obtención de microesferas de quitosano.....	63

3.3.1.1	Tamaño de partícula de microesferas de quitosano.....	63
3.3.1.2	Rendimiento de microesferas de quitosano .....	64
3.3.2	Proceso preliminar de obtención de microesferas híbridas de quitosano .....	65
3.3.2.1	Morfología superficial de microesferas híbridas QUI/Pal/KNO <sub>3</sub> .....	65
3.3.2.2	Tamaño de partícula de las microesferas híbridas QUI/Pal/KNO <sub>3</sub> .....	66
3.3.2.3	Rendimiento de microesferas híbridas de QUI/Pal/KNO <sub>3</sub> .....	68
3.3.3	Optimización de las condiciones de obtención de las microesferas de quitosano .....	69
3.3.3.1	Evaluación de las velocidades de agitación.....	69
3.3.3.2	Evaluación de la cantidad de quitosano y tensoactivo .....	70
3.3.3.3	Evaluación de la cantidad de glutaraldehído.....	74
3.3.4	Resultados del diseño experimental para la optimización de las condiciones de preparación de microesferas híbridas de quitosano/paligorskita y KNO <sub>3</sub> .....	76
3.3.4.1	Rendimiento de microesferas híbridas QUI/Pal/KNO <sub>3</sub> .....	76
3.3.4.2	Nitrato capturado en microesferas híbridas QUI/Pal/KNO <sub>3</sub> .....	78
3.3.4.3	Potasio capturado en microesferas híbridas QUI/Pal/KNO <sub>3</sub> .....	80
3.3.4.4	Tamaño de partícula en microesferas híbridas QUI/Pal/KNO <sub>3</sub> .....	82
3.3.5	Caracterización fisicoquímica de las microesferas híbridas de quitosano .....	84
3.3.5.1	Distribución de tamaños de partícula en microesferas híbridas Qui/Pal/KNO <sub>3</sub> .....	84
3.3.5.2	Morfología de las microesferas híbridas QUI/Pal/KNO <sub>3</sub> .....	85
3.3.5.3	Difracción de rayos X de las microesferas híbridas QUI/Pal/KNO <sub>3</sub> .....	87
3.3.5.4	Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier de microesferas híbridas QUI/Pal/KNO <sub>3</sub> .....	90
3.3.6	Liberación controlada de fertilizantes (nitrógeno y potasio) en microesferas híbridas de quitosano .....	93
3.3.6.1	Selección de las microesferas híbridas QUI/Pal/KNO <sub>3</sub> para la liberación controlada de fertilizantes .....	93
3.3.6.2	Liberación de nitratos en microesferas híbridas QUI/Pal/KNO <sub>3</sub> .....	94
3.3.6.3	Liberación de potasio en microesferas híbridas QUI/Pal/KNO <sub>3</sub> .....	96
3.3.7	Liberación controlada de fertilizantes (nitrógeno y potasio) en microesferas híbridas de quitosano .....	97
	CONCLUSIONES.....	101
	RECOMENDACIONES .....	102
	REFERENCIAS.....	103
	ANEXOS .....	115



## Índice de tablas

<b>Tabla 1.1</b> Polímeros utilizados en la preparación de microesferas [56].	16
<b>Tabla 1.2.</b> Características de la paligorskita.	27
<b>Tabla 2.1.</b> Etapas de la metodología utilizada en el presente trabajo de investigación.	35
<b>Tabla 2.2.</b> Contenidos de $\text{KNO}_3$ y Paligorskita (Pal) agregados a microesferas de PLA.	37
<b>Tabla 2.3.</b> Contenidos de $\text{KNO}_3$ y Paligorskita (Pal) agregados a microesferas de QUI.	38
<b>Tabla 2.4.</b> Configuración experimental del diseño factorial.	43
<b>Tabla 2.5.</b> Matriz de diseño experimental factorial.	44
<b>Tabla 2.6.</b> Glutaraldehído utilizado en la experimentación.	44
<b>Tabla 2.7.</b> Condiciones experimentales para la preparación de microesferas de quitosano.	45
<b>Tabla 2.8.</b> Factores y niveles del diseño experimental.	45
<b>Tabla 2.9.</b> Variables de respuesta del diseño factorial.	45
<b>Tabla 2.10.</b> Matriz de diseño del diseño factorial completo.	46
<b>Tabla 3.1.</b> Análisis comparativo de medias de los tamaños de partícula de las diferentes microesferas de PLA.	58
<b>Tabla 3.2.</b> Rendimiento de microesferas de poli(ácido láctico).	59
<b>Tabla 3.3.</b> Análisis comparativo de medias del contenido de nitrato atrapado en las microesferas híbridas de PLA con $\text{KNO}_3$ y diferentes contenidos de paligorskita.	60
<b>Tabla 3.4.</b> Análisis de medias del contenido de potasio en las microesferas híbridas de PLA con $\text{KNO}_3$ y diferentes contenidos de paligorskita.	62
<b>Tabla 3.5.</b> Condiciones experimentales preliminares para la preparación de microesferas de quitosano.	63
<b>Tabla 3.6</b> Tamaño de partícula de microesferas de QUI/ $\text{KNO}_3$ /Pal.	66
<b>Tabla 3.7.</b> Análisis de medias del tamaño de partícula de las microesferas de QUI, QUI con $\text{KNO}_3$ e híbridas con diferentes contenidos de paligorskita.	68
<b>Tabla 3.8.</b> Rendimiento de las microesferas híbridas de quitosano.	68
<b>Tabla 3.9.</b> Análisis de varianza del diseño factorial $2^2$ .	71
<b>Tabla 3.10.</b> Comparación de medias de las formulaciones en el diseño factorial $2^2$ del rendimiento.	72
<b>Tabla 3.11.</b> Análisis de varianza para el diámetro en el diseño factorial $2^2$ del rendimiento.	72
<b>Tabla 3.12.</b> Comparación de medias del diámetro de las formulaciones en el diseño factorial $2^2$ .	73
<b>Tabla 3.13.</b> Análisis de varianza del rendimiento de obtención de microesferas híbridas de quitosano.	77
<b>Tabla 3.14.</b> Análisis de varianza del contenido de nitrato.	79
<b>Tabla 3.15.</b> Análisis de varianza del contenido potasio capturado en microesferas híbridas de quitosano.	81
<b>Tabla 3.16.</b> Análisis de varianza del tamaño promedio de microesferas híbridas de quitosano.	83
<b>Tabla 3.18.</b> Liberación saturada de $\text{NO}_3^-$ y coeficiente de difusión de microesferas híbridas de quitosano.	100
<b>Tabla 3.19.</b> Liberación saturada de $\text{K}^+$ y coeficiente de difusión de microesferas híbridas de quitosano.	100

## Índice de figuras

<b>Figura 1.1.</b> Patrón de liberación de nutrientes [19].....	4
<b>Figura 1.2.</b> Macro y micronutrientes necesarios para las plantas [21].....	5
<b>Figura 1.3.</b> Nitrato de potasio en a) cristales y b) gránulos. ....	7
<b>Figura 1.4.</b> Tipos de micropartículas [36]. ....	9
<b>Figura 1.5.</b> Representación del proceso de preparación de micropartículas por gelificación iónica, este proceso se realiza mediante agitación y a 25°C [39].....	10
<b>Figura 1.6.</b> Proceso de emulsificación/gelificación. a) gelificación externa y b) gelificación interna [44]. ....	12
<b>Figura 1.7.</b> Proceso de emulsificación y evaporación de solvente [50]. ....	13
<b>Figura 1.8.</b> Tipos de entrecruzamientos de cadenas poliméricas. a) físico y b) químico [59]. ...	15
<b>Figura 1.9.</b> Proceso de emulsificación y entrecruzamiento. ....	15
<b>Figura 1.10.</b> Características estructurales del alginato. a) monómeros de alginato, b) conformación de las cadenas y c) distribución de bloques [66]. ....	18
<b>Figura 1.11.</b> Formación de estructura "caja de huevo" durante la gelificación iónica de alginato de sodio [68].....	19
<b>Figura 1.12.</b> Estructura de los isómeros del ácido láctico. ....	19
<b>Figura 1.13.</b> Unidad repetitiva del PLA. ....	20
<b>Figura 1.14.</b> Representación esquemática de a) quitina completamente acetilada, b) quitosano completamente deacetilado y c) quitosano comercial [77]. ....	22
<b>Figura 1.15.</b> Entrecruzamiento del quitosano. a) covalente y b) iónico [80].....	23
<b>Figura 1.16.</b> Estructura del quitosano entrecruzado con glutaraldehído [85].....	24
<b>Figura 1.17.</b> Unidades estructurales de los minerales de arcilla. ....	25
<b>Figura 1.18.</b> Tipos de arcillas minerales [94].....	26
<b>Figura 1.19.</b> Estructura de la paligorskita [100]. ....	27
<b>Figura 1.20.</b> Proyección de la estructura cristalina de la paligorskita sobre el plano (001). ....	28
<b>Figura 2.1.</b> Longitud de onda de absorción de nitrato de una solución acuosa de 5 mg/L de nitrato. ....	38
<b>Figura 2.2.</b> Curva de calibración de $\text{NO}_3^-$ . ....	40
<b>Figura 3.1.</b> a) Micrografía óptica a 10X y b) Histograma de diámetro de microesferas de alginato procesadas a 700 rpm.....	49
<b>Figura 3.2.</b> a) Micrografía óptica de microesferas de Alg a 10X y b) Histograma de diámetros de microesferas de alginato procesados a 500 rpm. ....	50
<b>Figura 3.3.</b> a) Micrografía de microesferas de Alg a 10X y b) Histograma de diámetros de microesferas de alginato procesados con 1.5% (p/v) alginato y una velocidad de agitación de 500 rpm.....	50
<b>Figura 3.4.</b> Micrografías de microesferas de poli(ácido láctico) con aumentos de a) 10X y b) 20X. ....	51
<b>Figura 3.5.</b> Distribución de tamaño de partícula de microesferas de PLA mediante a) Analizador Coulter y b) Microscopía óptica. ....	52
<b>Figura 3.6.</b> Micrografías ópticas de las microesferas de a) PLA, b) PLA + $\text{KNO}_3$ , c) PLA + $\text{KNO}_3$ + 1%Pal, d) PLA + $\text{KNO}_3$ + 2%Pal, e) PLA + $\text{KNO}_3$ + 4%Pal y f) PLA + $\text{KNO}_3$ + 5%Pal. ....	53
<b>Figura 3.7.</b> Micrografías electrónicas a 100x de a) PLA, b) PLA + $\text{KNO}_3$ , c) PLA + $\text{KNO}_3$ + 1%Pal, d) PLA + $\text{KNO}_3$ + 2%Pal, e) PLA + $\text{KNO}_3$ + 4%Pal y f) PLA + $\text{KNO}_3$ + 5%Pal. ....	54
<b>Figura 3.8.</b> Micrografías electrónicas a 10,000x de a) PLA + $\text{KNO}_3$ + 1%Pal, b) PLA + $\text{KNO}_3$ + 2%Pal, c) PLA + $\text{KNO}_3$ + 4%Pal y d) PLA + $\text{KNO}_3$ + 5%Pal. ....	56

<b>Figura 3.9.</b> Distribución de diámetros de microesferas. a) PLA, b) PLA + KNO <sub>3</sub> , c) PLA + KNO <sub>3</sub> + 1%Pal, d) PLA + KNO <sub>3</sub> + 2%Pal, e) PLA + KNO <sub>3</sub> + 4%Pal y f) PLA + KNO <sub>3</sub> + 5%Pal. ....	57
<b>Figura 3.10.</b> Contenido de nitrato en microesferas híbridas de poli(ácido láctico) con diferentes contenidos de arcilla. Las barras representan el promedio de 3 mediciones (n=3) y las líneas verticales representan la desviación estándar. ....	60
<b>Figura 3.11.</b> Contenido de potasio en microesferas híbridas de poli (ácido láctico) con diferentes contenidos de arcilla. Las barras representan el promedio de 3 mediciones (n=3) y las líneas verticales representan la desviación estándar. ....	61
<b>Figura 3.12.</b> Micrografías ópticas de microesferas de quitosano con aumentos de a) 10x y b) 20x. ....	63
<b>Figura 3.13.</b> Distribución de tamaño de partícula de microesferas de QUI. a) Analizador Coulter y b) Microscopía óptica.....	64
<b>Figura 3.14.</b> Micrografías ópticas de esferas de a) QUI, b) Qui + KNO <sub>3</sub> , c) QUI + KNO <sub>3</sub> + 1%Pal, d) QUI + KNO <sub>3</sub> + 2%Pal, e) QUI + KNO <sub>3</sub> + 4%Pal y f) QUI + KNO <sub>3</sub> + 5%Pal.....	66
<b>Figura 3.15.</b> Distribuciones de tamaño de partícula de las microesferas por microscopía óptica de a) QUI, b) QUI + KNO <sub>3</sub> , c) QUI + KNO <sub>3</sub> + 1%Pal, d) QUI + KNO <sub>3</sub> + 2%Pal, e) QUI + KNO <sub>3</sub> + 4%Pal y f) QUI + KNO <sub>3</sub> + 5%Pal. ....	67
<b>Figura 3.16.</b> Micrografías ópticas de esferas de quitosano con agitación de a) 420, b) 1,320 y c) 1,800 rpm. ....	69
<b>Figura 3.17.</b> Curvas de distribución de tamaño de esferas de quitosano con agitación de a) 420, b) 1,320 y c) 1,800 rpm. ....	70
<b>Figura 3.18.</b> Rendimientos del diseño experimental factorial 2 <sup>2</sup> . Formulaciones: F1 (0.4 g QUI, 56.4 mg Span80), F2 (0.4 g QUI, 100 mg Span80), F3 (0.5 g QUI, 56.4 mg Span80) y F4 (0.5 g QUI, 100 mg Span80). Las barras representan el promedio de 3 mediciones (n=3) y las líneas verticales representan la desviación estándar. ....	71
<b>Figura 3.19.</b> Distribución de tamaño de partículas por Coulter del diseño experimental factorial 2 <sup>2</sup> . Formulaciones a) F1 (0.4 g QUI, 56.4 mg Span80) b) F2 (0.4 g QUI, 100 mg Span80), c) F3 (0.5 g QUI, 56.4 mg Span80) y d) F4 (0.5 g QUI, 100 mg Span80). ....	73
<b>Figura 3.20.</b> Rendimiento de las microesferas de quitosano entrecruzadas con diferentes cantidades de glutaraldehído. Las barras representan el promedio de 3 mediciones (n=3) y las líneas verticales representan la desviación estándar.....	74
<b>Figura 3.21.</b> Micrografías electrónicas de microesferas de quitosano entrecruzadas con: a) 240, b) 320, c) 475, d) 950, e) 1900 y f) 3800 μL de glutaraldehído. ....	75
<b>Figura 3.22.</b> Diámetro de microesferas de quitosano entrecruzadas con diferentes niveles de glutaraldehído. Las barras representan el promedio de 3 mediciones (n=3) y las líneas verticales representan la desviación estándar. ....	75
<b>Figura 3.23.</b> Superficie de respuesta del rendimiento de microesferas híbridas de quitosano. .	77
<b>Figura 3.24.</b> Gráfica de contorno del rendimiento de microesferas híbridas de quitosano. ....	78
<b>Figura 3.25.</b> Superficie de respuesta del contenido de nitrato capturado en microesferas híbridas de quitosano.....	78
<b>Figura 3.26.</b> Gráfica de contorno del contenido de nitrato capturado en microesferas híbridas de quitosano.....	79
<b>Figura 3.27.</b> Superficie de respuesta del potasio capturado en microesferas híbridas de quitosano.....	80
<b>Figura 3.28.</b> Gráfica de contorno del contenido de potasio atrapado en microesferas de quitosano. ....	81
<b>Figura 3.29.</b> Superficie de respuesta diámetro promedio de las microesferas de quitosano. ....	82

<b>Figura 3.30.</b> Gráfica de contorno del tamaño promedio de las microesferas híbridas de quitosano.	83
<b>Figura 3.31.</b> Distribuciones de tamaño de partícula de las microesferas híbridas. a) QUI-0%Pal-0mgKNO <sub>3</sub> , b) QUI-0%Pal-50mg KNO <sub>3</sub> , c) QUI-0%Pal-100mgKNO <sub>3</sub> , d) QUI-0%Pal-200mgKNO <sub>3</sub> , e) QUI-0.5%Pal-0mgKNO <sub>3</sub> , f) QUI-0.5%Pal-50mgKNO <sub>3</sub> , g) QUI-0.5%Pal-100mgKNO <sub>3</sub> , h) QUI-0.5%Pal-200mgKNO <sub>3</sub> , i) QUI-1%Pal-0mgKNO <sub>3</sub> , j) QUI-1%Pal-50mgKNO <sub>3</sub> , k) QUI-1%Pal-100mgKNO <sub>3</sub> , l) QUI-1%Pal-200mgKNO <sub>3</sub> , m) QUI-2%Pal-0mgKNO <sub>3</sub> , n) QUI-2%Pal-50mgKNO <sub>3</sub> , o) QUI-2%Pal-100mgKNO <sub>3</sub> y p) QUI-2%Pal-200mg KNO <sub>3</sub> .	85
<b>Figura 3.32.</b> Micrografías electrónicas de barrido (100x) de a) QUI-0%Pal-0mgKNO <sub>3</sub> , b) QUI-0%Pal-50mgKNO <sub>3</sub> , c) QUI-0%Pal-100mgKNO <sub>3</sub> , d) QUI-0%Pal-200mgKNO <sub>3</sub> , e) QUI-0.5%Pal-0mgKNO <sub>3</sub> , f) QUI-0.5%Pal-50mgKNO <sub>3</sub> , g) QUI-0.5%Pal-100mgKNO <sub>3</sub> , h) QUI-0.5%Pal-200mgKNO <sub>3</sub> , i) QUI-1%Pal-0mgKNO <sub>3</sub> , j) QUI-1%Pal-50mgKNO <sub>3</sub> , k) QUI-1%Pal-100mgKNO <sub>3</sub> , l) QUI-1%Pal-200mg KNO <sub>3</sub> , m) QUI-2%Pal-0mgKNO <sub>3</sub> , n) QUI-2%Pal-50mgKNO <sub>3</sub> , o) QUI-2%Pal-100mgKNO <sub>3</sub> y p) QUI-2%Pal-200mgKNO <sub>3</sub> .	86
<b>Figura 3.33.</b> Difractograma de rayos X de a) Quitosano, b) Paligorskita y c) KNO <sub>3</sub> .	87
<b>Figura 3.34.</b> Difractogramas de rayos X de a) Quitosano, b) Paligorskita, c) QUI-0.5%Pal, d) QUI-1%Pal y e) QUI-2%Pal.	88
<b>Figura 3.35.</b> Difractogramas de rayos X de a) Quitosano, b) Paligorskita, c) KNO <sub>3</sub> , d) QUI-0.5%Pal-50mgKNO <sub>3</sub> , e) QUI-1%Pal-50mgKNO <sub>3</sub> y f) QUI-2%Pal-50mgKNO <sub>3</sub> .	89
<b>Figura 3.36.</b> Difractogramas de rayos X de a) Quitosano, b) Paligorskita, c) KNO <sub>3</sub> , d) QUI-0.5%Pal-100mg KNO <sub>3</sub> , e) QUI-1%Pal-100mgKNO <sub>3</sub> y f) QUI-2%Pal-100mgKNO <sub>3</sub> .	89
<b>Figura 3.37.</b> Difractogramas de rayos x de a) Quitosano, b) Paligorskita, c) KNO <sub>3</sub> , d) QUI-0.5%Pal-200mg KNO <sub>3</sub> , e) QUI-1%Pal-200mgKNO <sub>3</sub> y f) QUI-2%Pal-200mgKNO <sub>3</sub> .	90
<b>Figura 3.38.</b> Espectros de infrarrojo de a) Quitosano, b) Paligorskita, c) KNO <sub>3</sub> , d) QUI-0.5%Pal-50mgKNO <sub>3</sub> , e) QUI-1%Pal-50mg KNO <sub>3</sub> y f) QUI-2%Pal-50mgKNO <sub>3</sub> .	92
<b>Figura 3.39.</b> Liberación en un medio acuoso de nitrato capturado en microesferas híbridas QUI/Pal/KNO <sub>3</sub> .	95
<b>Figura 3.40.</b> Ensayos de liberación de potasio en microesferas híbridas QUI/Pal/KNO <sub>3</sub> en un medio acuoso.	97
<b>Figura 3.41.</b> Curvas de liberación de NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> y K <sup>+</sup> vs la raíz cuadrada del tiempo de inmersión de microesferas de QUI híbridas ajustadas al modelo de Fick. a) QUI-0%Pal-50mgKNO <sub>3</sub> (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> liberado), b) QUI-0%Pal-50mgKNO <sub>3</sub> (K <sup>+</sup> liberado), c) QUI-1%Pal-50 mgKNO <sub>3</sub> (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> liberado), d) QUI-1%Pal-50mgKNO <sub>3</sub> (K <sup>+</sup> liberado), e) QUI-2%Pal-50mgKNO <sub>3</sub> (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> liberado) y f) QUI-2%Pal-50mg KNO <sub>3</sub> (K <sup>+</sup> liberado). La línea punteada es el tiempo en el que la liberación de NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /K <sup>+</sup> alcanza su saturación.	99
<b>Figura A1.</b> Regresión lineal de la curva de liberación de NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> vs la raíz cuadrada del tiempo de inmersión de microesferas de QUI-0%Pal-50mgKNO <sub>3</sub> al comienzo del proceso de liberación	115

## Resumen

Los sistemas de liberación controlada de fertilizantes buscan reducir su aplicación excesiva a los cultivos, aminorar los efectos dañinos hacia el medio ambiente, a la salud humana y mejorar la productividad agrícola. Las microesferas poliméricas han demostrado ser sistemas adecuados para lograr estos objetivos, ya que protegen un principio activo de estímulos externos, reducen el impacto de la liberación de éstos y, cuando se combinan con nanoarcillas, controlan la velocidad de administración de un fertilizante. El presente trabajo estudió la captura y liberación de nitrato y potasio a partir de microesferas híbridas preparadas a base de matrices biopoliméricas y arcilla de paligorskita (Pal) para generar un sistema de liberación controlada y sostenida de fertilizantes. Se elaboraron microesferas de alginato (Alg), poli(ácido láctico) (PLA) y quitosano (QUI), se caracterizaron para evaluar su estabilidad estructural y el tamaño promedio de partícula. Posteriormente, se prepararon microesferas híbridas de PLA y QUI con diferentes cantidades de Pal y  $\text{KNO}_3$ , incorporados de forma directa durante su obtención. Las pruebas de liberación se realizaron con las esferas híbridas de QUI, en una solución acuosa a 37 °C durante treinta días.

Se obtuvo que las microesferas de Alg alcanzaron un tamaño promedio de partícula menores a 100  $\mu\text{m}$ ; sin embargo, presentaron un estado gelificado inestable. Las microesferas de PLA mostraron estabilidad en tamaño de partícula, eficiencias de captura de nitrato bajas y captura de potasio entre 18 y 28%, altos rendimientos y la presencia de Pal en su superficie. La presencia del  $\text{KNO}_3$  y Pal modificó la morfología superficial de las microesferas de PLA, que presentaron morfologías esféricas irregulares y la presencia de poros. Las microesferas de QUI presentaron altos rendimientos, tamaños de partícula entre 150 y 302  $\mu\text{m}$ , eficiencias de atrapamiento de nitrato y potasio por encima del 34 y 55%, respectivamente, y se confirmó la presencia de Pal en su interior. Las pruebas de liberación mostraron una liberación superficial inicial tipo ráfaga de ambos iones, seguida de una liberación Fickiana controlada por las interacciones QUI/Pal/principio activo y una etapa final de liberación causada por el hinchamiento de la matriz.

## **Abstract**

Fertilizer delivery systems aim to reduce excessive application of fertilizers to crops, reduce harmful effects on the environment and human health, and improve agricultural productivity. Polymeric microspheres have proven to be suitable systems to achieve these objectives, since they protect an active ingredient from environmental factors, reduce their release impact and, when combined with nanoclays are able to control the fertilizer delivery rate. The present work studied the capture and delivery of nitrates and potassium from hybrid microspheres prepared from biopolymeric matrices and palygorskite (Pal) clay to generate a fertilizer delivery system. Alginate (Alg), poly(lactic acid) (PLA) and chitosan (QUI) microspheres were prepared and their structural stability and average particle size were characterized. PLA and QUI hybrid microspheres were prepared with different amounts of Pal, the  $\text{KNO}_3$  was directly incorporated to the microspheres during their preparation. Delivery tests were performed with the QUI hybrid spheres in an aqueous solution at 37 °C for thirty days.

Among the obtained results, Alg microspheres reached an average particle size smaller than 100  $\mu\text{m}$ , however, they presented an unstable gel state. PLA microspheres showed a homogeneous particle size, low nitrate capture efficiency and potassium capture between 18 and 28%, also was possible to identify the presence of Pal on the microsphere surface. The presence of  $\text{KNO}_3$  and Pal at the microspheres modified their surface morphology generating irregular spherical particles with pores. QUI microspheres showed high yields, particle sizes between 150 and 302  $\mu\text{m}$ , nitrate and potassium capture efficiencies above 34 and 55%, respectively, and the presence of Pal was confirmed. The delivery tests showed an initial burst-type release of both ions, followed by a Fickian release controlled by the interactions between QUI/Pal/active ingredient and a final release stage caused by matrix swelling.

## INTRODUCCIÓN

La revolución verde (GR) gestada en el siglo XX, permitió el incremento de la productividad agrícola con el desarrollo de variedades de plantas con alta producción, el mejoramiento de los rendimientos de los cultivos, y una transformación de las técnicas de gestión a través del uso a gran escala de fertilizantes y pesticidas sintéticos [1].

Sin embargo, esta revolución y sus importantes resultados trajo consigo diversos efectos adversos producidos por el uso excesivo de fertilizantes y pesticidas sintéticos sobre los ecosistemas, que incluyen la disminución de la fertilidad del suelo, la contaminación del agua, un mayor costo económico para la producción de alimentos, y un aprovechamiento poco eficiente de fertilizantes por parte de las plantas [1,2]. Sin embargo, a pesar de estos problemas, se piensa que no podemos dejar de producir alimentos de esta manera porque se requiere alimentar a una población en constante crecimiento que alcanzará los nueve mil millones de personas para el año 2050 [3]. Actualmente, más de la mitad de la población mundial se nutre de cultivos con fertilizantes nitrogenados sintéticos, que fueron posibles desde principios del siglo XX por la invención del proceso Haber-Bosch [4]. El suministro seguro de nitrógeno (N) y otros nutrientes para el crecimiento adecuado de las plantas ha permitido a los agricultores aumentar la producción por unidad de tierra cultivable durante el siglo pasado.

Se sabe que entre el 50-70% del nitrógeno aplicado como fertilizante se pierde mediante lixiviación [5], escapando de los suelos agrícolas y produciendo impactos adversos hacia el ambiente y la salud humana, que incluyen la contaminación del agua subterránea, eutrofización de ecosistemas de agua dulce, contaminación troposférica relacionada con emisiones de óxidos de N y gas amoníaco, y acumulación de óxido nitroso, un gas de efecto invernadero [4]. Debido a esta problemática, es necesario desarrollar sistemas de liberación controlada de fertilizantes que combinen los fertilizantes con sustancias que retarden y controlen la liberación de nutrientes, para minimizar las pérdidas y la contaminación ambiental [6].

La convergencia de diferentes disciplinas en la agricultura ha dado origen a la llamada agricultura de precisión, en donde los materiales compuestos poliméricos juegan un papel fundamental en el diseño de formulaciones para la aplicación adecuada, eficiente y sustentable de pesticidas y fertilizantes de última generación [7]. Tales materiales se desarrollan comúnmente como microesferas que posean buenas propiedades de intercambio de iones para la liberación lenta y continua de un principio activo (PA) [2, 8].

Entre los polímeros más estudiados se encuentran el alginato, el poli(ácido láctico) (PLA) y el quitosano (QUI). Las microesferas de alginato y sus propiedades de formación de geles se han investigado exhaustivamente como sistema de liberación de fármacos principalmente por ser un polímero biodegradable, biocompatible, no tóxico y se ha aplicado a la liberación controlada de fertilizantes [9]. Las microesferas de PLA se han desarrollado principalmente para la liberación controlada de pesticidas para disminuir los riesgos al medio ambiente, la salud animal y humana [10]. Las microesferas de quitosano (QUI) se han evaluado como vehículo para administrar fármacos, pesticidas, bioestimulantes, fungicidas y fertilizantes, que lo convierte en uno de los polímeros más estudiados en el área de la liberación controlada; estas aplicaciones son posibles debido a la naturaleza catiónica del QUI y su capacidad de formar geles entrecruzados con ayuda de un agente entrecruzante como el glutaraldehído [11].

La incorporación de materiales arcillosos en microesferas poliméricas mejora las propiedades de retención y liberación controlada de un PA [12, 13]. Las arcillas de paligorskita son arcillas fibrilares estudiadas como nanorrefuerzo en microesferas para diversas aplicaciones [12], entre las que se encuentra la liberación controlada de fertilizantes.

El nitrato de potasio ( $\text{KNO}_3$ ) es una fuente de dos macronutrientes para las plantas, el N y el K, que cumplen funciones importantes en las plantas y se han desarrollado diversas estrategias en forma de microesferas para disminuir y controlar su liberación [6, 14].

Las microesferas poliméricas orgánicas combinadas con un material arcilloso inorgánico dan origen a las microesferas híbridas. Las principales ventajas de usar las microesferas híbridas como sistemas de liberación controlada son: la entrega regular y continua de los nutrientes a las plantas; una baja frecuencia de aplicación de fertilizante a los suelos; una reducción en la pérdida de nutrientes debido a la lixiviación, volatilización e inmovilización; menor contaminación de los mantos acuíferos y una reducción en los costos de producción [2].

El presente trabajo de investigación estudió la incorporación del fertilizante inorgánico  $\text{KNO}_3$  y la arcilla fibrilar Paligorskita (Pal) en microesferas de alginato, PLA y QUI, mediante métodos de emulsión como una estrategia para disminuir y controlar la liberación del fertilizante, para su potencial aplicación en la nutrición vegetal de diferentes cultivos.



# CAPÍTULO 1

## ANTECEDENTES

### 1.1 Los fertilizantes en la agricultura del siglo XXI

Los fertilizantes, en un sentido amplio, son productos que mejoran los niveles de los nutrientes vegetales y/o las propiedades físicas y químicas del suelo, y por lo tanto mejoran directa o indirectamente el crecimiento de las plantas, el rendimiento y la calidad de los cultivos [15]. Los fertilizantes se clasifican en términos de su composición química, así, los fertilizantes minerales son aquellos que consisten de compuestos inorgánicos o compuestos orgánicos producidos sintéticamente; mientras que los fertilizantes orgánicos son productos de desecho de la cría de animales, de la descomposición de plantas o del tratamiento de desechos; los acondicionadores del suelo son productos cuya función principal es mejorar las propiedades físicas del suelo [15]. Los fertilizantes son esenciales en el sistema de agricultura actual para reemplazar los elementos extraídos del suelo en forma de alimentos y otros productos agrícolas [16].

Si bien la alta productividad agrícola ha contribuido al crecimiento de la población y al desarrollo económico, se deben considerar los impactos ambientales de la aplicación excesiva de agroquímicos, que han llevado al incremento de procesos tales como la eutroficación, la toxicidad del agua, la contaminación del aire, la degradación del suelo y los cambios en el ecosistema [8]. La aplicación convencional de agroquímicos proporciona una concentración superior (sobredosis) a los requerimientos nutricionales de los cultivos (estas concentraciones varían de acuerdo a los cultivos) e induce problemas de toxicidad para los organismos, con efectos secundarios no deseados hacia el medio ambiente [17, 18]. Una de las alternativas para mantener la productividad agrícola, el uso eficiente de los nutrientes y aminorar el impacto en el medio ambiente es el suministro de agroquímicos de una forma que sea más eficiente para las plantas.

El paradigma actual es que los fertilizantes convencionales (CFs) no pueden estar disponibles para las plantas al 100% debido a las pérdidas ambientales, con efectos diferentes en los cultivos según las especies y las condiciones pedoclimáticas locales (condiciones relativamente homogéneas en cuanto a clima y suelo en una zona) [19]. Se estima que entre el 20% y el 70% de la urea, aplicada en condiciones de campo abierto, se escapa al medio ambiente a través de la lixiviación, por procesos de nitrificación y volatilización [20]. Como resultado de esto, los agricultores realizan múltiples aplicaciones del fertilizante, aunque este proceso por lo general

sea poco eficiente para la nutrición vegetal. La demanda de nutrientes por parte de los cultivos se produce de forma dinámica, por tanto, un fertilizante aplicado de forma eficiente es aquel que es capaz de ajustarse a los requerimientos nutricionales de los cultivos durante su ciclo completo de crecimiento (figura 1.1) [19].

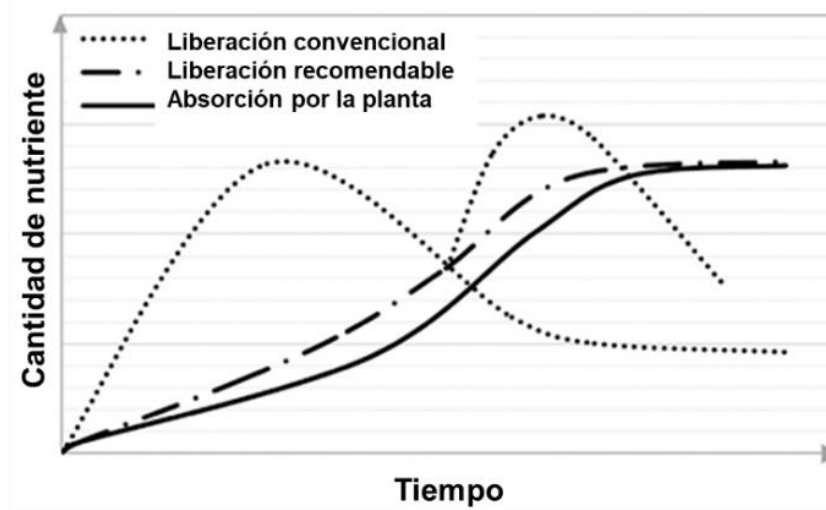
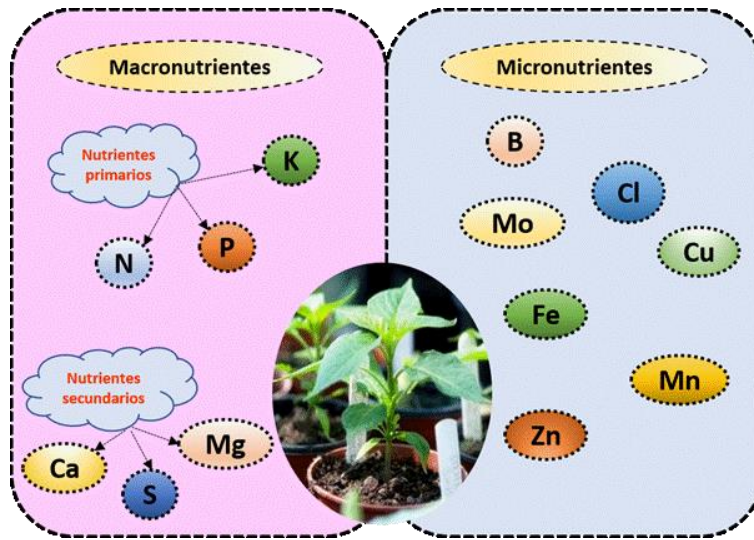


Figura 1.1. Patrón de liberación de nutrientes [19].

### 1.1.1 Macronutrientes y micronutrientes

Los elementos químicos que son requeridos para el crecimiento y desarrollo apropiado de las plantas típicamente se conocen como nutrientes vegetales. Se clasifican en dos grandes grupos: macronutrientes y micronutrientes (figura 1.2). Los macronutrientes son aquellos requeridos por las plantas en cantidades relativamente grandes (milimolares), entre los que se encuentran el carbono (C), el hidrógeno (H), el oxígeno (O) (disponibles desde el aire o el agua), el nitrógeno (N), el fósforo (P), el potasio (K) (conocidos como nutrientes primarios), y el calcio (Ca), el magnesio (Mg) y el azufre (S) (denominados nutrientes secundarios). Los micronutrientes son requeridos en cantidades más pequeñas (micromolares), dentro de los que se encuentran el boro (B), el cloro (Cl), el cobre (Cu), el hierro (Fe), el manganeso (Mn), el molibdeno (Mo) y el zinc (Zn) [16].



*Figura 1.2. Macro y micronutrientes necesarios para las plantas [21].*

Uno de los macronutrientes más indispensables para el crecimiento de las plantas es el N. Después del carbono, el N es el elemento requerido en mayores cantidades por las plantas, ya que cerca del 1-5% de la materia seca de la planta consiste en N, que es un constituyente integral de proteínas, ácidos nucleicos, clorofila, coenzimas, fitohormonas y metabolitos secundarios [22]. La mayoría de las plantas dependen de los compuestos nitrogenados para su crecimiento. Las principales fuentes de N que son absorbidas por las raíces las plantas son el nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) y amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) [22]. Generalmente, solo el 40-50% de los fertilizantes nitrogenados utilizados en la agricultura son aprovechados por los cultivos, y el N que se pierde en el sistema planta-suelo puede generar problemas ambientales que incluyen la contaminación del agua y el aire.

El nitrato y el amonio son las principales fuentes del N inorgánico disponible para las plantas. El nitrato se presenta generalmente en concentraciones más altas (1-5 mM) que el amonio (20-200  $\mu\text{m}$ ) en las soluciones de suelos agrícolas. El nitrato posee una movilidad más alta que el amonio en los suelos agrícolas y está más disponible para las plantas [22].

Además de la adquisición del N inorgánico por las plantas a través del nitrato y el amonio, el N orgánico también contribuye a la nutrición de las plantas [23]. El N orgánico es la forma principal de N en los suelos: es parte de la materia orgánica en forma de péptidos y proteínas, aminoácidos y urea. La urea es en sí misma utilizada como un fertilizante nitrogenado (fuente disponible de N en el suelo); sin embargo, la urea requiere diversos procesos hasta llegar a una forma de N asimilable por las plantas. La urea se hidroliza a amonio en el suelo por la acción de la enzima

ureasa que es producida por microorganismos del suelo, y así puede estar disponible para las plantas [24].

Después del nitrato, el K es el nutriente requerido en mayores cantidades por las plantas. El K es considerablemente diferente de otros macronutrientes, tanto en su función dentro de las plantas como en la forma en la que está disponible. A diferencia de otros nutrientes, el K en las plantas no constituye en componente estructural, ni de proteínas, carbohidratos, etc., pero sí cumple diferentes roles como ion en líquidos celulares [16]. Posee funciones en la apertura y cierre de estomas, el control de la turgencia en células, el mecanismo de transporte de almidones y azúcares, actúa en la síntesis de proteínas, en la activación de enzimas, favorece el crecimiento de raíces, propicia que los tallos de las plantas estén sanos y resistentes, así como en la reducción de los efectos de la sequía [16, 25].

La captura de K por las plantas es un proceso altamente selectivo y está acoplado a la actividad metabólica. Se caracteriza por una alta movilidad en todos los niveles de la planta, dentro de las células individuales, dentro de tejidos, así como en el transporte a larga distancia a través de las estructuras vasculares de la planta [22].

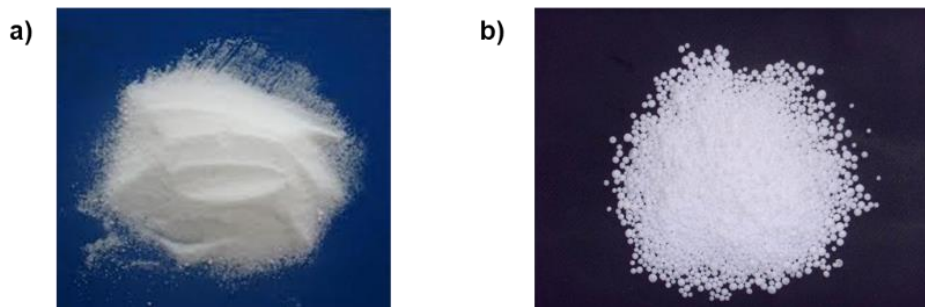
Algunas de las funciones del K en las plantas son [22, 26]:

- La activación enzimática: un gran número de enzimas son completamente dependientes o están estimuladas por el K y otros cationes univalentes, induciendo cambios conformacionales en las proteínas.
- La síntesis de proteínas: el K se requiere en concentraciones más altas para la síntesis de proteínas que para la activación enzimática.
- La fotosíntesis: el proceso de fotosíntesis se ve reducido fuertemente en las hojas de plantas con deficiencias de potasio.

Existen cuatro diferentes fuentes de K en el suelo. Entre el 90-98% del K se encuentra en los minerales como feldespato y la mica, el K contenido en estas fuentes presenta una baja disponibilidad para las plantas. La segunda fuente es el K no intercambiable, entre 1 y 10%, está asociado a los minerales de arcilla 2:1. La tercera fuente de K, del 1 al 2%, es el K intercambiable que se encuentra en los sitios de intercambio de cationes o en la solución del suelo, y la cuarta es el K contenido en la materia orgánica y en la población microbiana del suelo [26]. Como se describió anteriormente, casi todo el K del suelo se encuentra como componente estructural de los minerales del suelo, y está escasamente disponible para el aprovechamiento por parte de las plantas [27].

### 1.1.2 Nitrato de potasio como fuente de nutrientes vegetales

El nitrato de potasio ( $\text{KNO}_3$ ) es una fuente soluble de dos nutrientes esenciales muy importantes, y se usa como fertilizante para cultivos que se benefician con la nutrición de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) y una fuente de K libre de cloruros. Es fabricado mediante la reacción de cloruro de potasio con una fuente disponible de nitrato (nitrato de sodio, ácido nítrico o nitrato de amonio). Se comercializa como un material cristalino, altamente soluble en agua y puede administrarse mediante la disolución y aplicación con agua (foliar y en solución nutritiva) o en forma perlada para suministrarlo al suelo (figura 1.3) [28].



*Figura 1.3. Nitrato de potasio en a) cristales y b) gránulos [28].*

El empleo de nitrato de potasio es requerido ya que es una fuente de nutrientes con una alta solubilidad y libre de cloro, además de que el N y el K están disponibles inmediatamente para la absorción por las plantas, sin la necesidad de transformarse en el suelo mediante la acción microbiana, como sucede con las fuentes orgánicas de nitrato [29]. El  $\text{KNO}_3$  posee una relación N:K de aproximadamente 1:3, que permite maximizar su utilización en los cultivos. El nitrato de potasio presenta un efecto sinérgico entre  $\text{K}^+$  y  $\text{NO}_3^-$  que facilita la absorción de ambos nutrientes por las raíces de las plantas [29]. Se debe tener en cuenta que la alta solubilidad del  $\text{KNO}_3$  a altas temperaturas puede ocasionar una alta movilidad del nitrato hacia el suelo y tener baja disponibilidad de absorción por las plantas [28].

La alta solubilidad del  $\text{KNO}_3$  es un factor limitante de su aplicación en estudios de campo, ya que presenta una alta movilidad hacia el suelo y al agua subterránea, no permiten un aprovechamiento adecuado en el ciclo de crecimiento de las plantas y conlleva a una aplicación excesiva para lograr la efectividad deseada que, a largo plazo, produce efectos adversos hacia el medio ambiente y la salud humana [19]. Una de las alternativas más exploradas, es el desarrollo de tecnologías que controlen la liberación de fertilizantes, en los que el fertilizante aplicado sea menor, con una reducción en la sobredosis, su aplicación efectiva durante un

intervalo de tiempo dado, que al mismo protejan el fertilizante de factores ambientales como la radiación, la humedad, el pH del suelo, la temperatura y, finalmente, se produzca una administración automática a los cultivos a velocidades controladas que mantengan su concentración dentro de un intervalo de tiempo óptimo [18, 30].

## **1.2 Liberación controlada de fertilizantes**

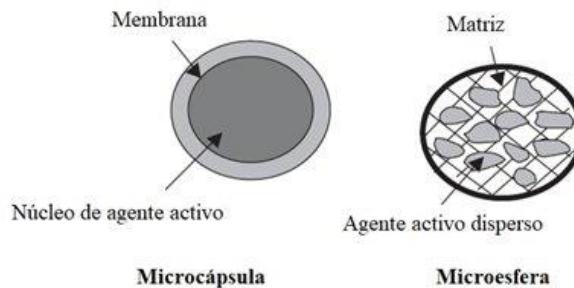
La liberación controlada es la administración a medida de compuestos, que pueden ser fármacos, proteínas, péptidos, pesticidas y fertilizantes, etc., para mantener una concentración determinada durante un tiempo específico en respuesta a estímulos (por ejemplo, ósmosis, pH, temperatura, luz ultravioleta, campos magnéticos y enzimas) [18]. La tecnología de liberación controlada comenzó desde 1950 con el desarrollo de sistemas poliméricos que fueran capaces de liberar fármacos orales y desde entonces, ha recibido una atención mayor ante la creciente evidencia de que las sustancias que van desde los fármacos hasta los productos químicos agrícolas aplicados por medios convencionales son a menudo tóxicos y con frecuencia ineficaces [18].

Esto ha llevado al desarrollo de fertilizantes de eficiencia mejorada (EEF) que, son productos con características que permiten aumentar la captación de nutrientes por las plantas, se tiene un mejor control sobre la administración de los nutrientes vegetales en los sistemas agrícolas, minimizando las pérdidas por lixiviación y volatilización, así como la reducción de los problemas socioambientales derivados del uso excesivo de fertilizantes [31]. Un EEF es capaz de reducir el uso de agroquímicos y de esta manera aminorar el impacto al medioambiente y a la economía, sin comprometer la productividad agrícola. Es dependiente de matrices poliméricas para recubrir, dispersar o encapsular el nutriente; se clasifican en fertilizantes de liberación lenta, liberación controlada y amigables con el medio ambiente [8, 31].

En un sistema de fertilizante de liberación lenta (SFR), los nutrientes se liberan a una velocidad menor que en un fertilizante convencional. Sin embargo, la velocidad, el patrón y la duración de la liberación no se controlan y su efectividad es altamente dependiente de la actividad microbiana, la humedad y la temperatura del suelo, así como su tipo y condiciones de uso [8, 19]. En los sistemas de fertilizantes de liberación controlada (CRF) se conocen los factores que tienen influencia sobre la velocidad, el patrón y la duración de la liberación y pueden ser controlados durante su preparación [32]. En un sistema de fertilizante amigable con el medio ambiente, los materiales utilizados para cubrir, encapsular o dispersar los fertilizantes deben degradarse en el suelo, y convertirse en dióxido de carbono, agua, metano, compuestos inorgánicos o biomasa microbiana después de la liberación del fertilizante sin causar daños en el medio ambiente [33].

### 1.2.1 Liberación controlada de fertilizantes a partir de microesferas poliméricas

Existen diversos métodos para la liberación controlada de un principio activo; el uso de micropartículas es uno de estos métodos y existen de dos tipos, microcápsulas y micromatrices (también llamadas microesferas) (figura 1.4). Las microesferas son matrices poliméricas en las que una sustancia está dispersada homogéneamente en su interior [34]. Las sustancias dispersadas en el interior de las microesferas se conocen como principio activo, relleno, fase interna o carga útil. Las microesferas se presentan en un intervalo de tamaño entre 1 a 1000  $\mu\text{m}$  y pueden presentar diferentes tipos de estructuras [34, 35].



*Figura 1.4. Tipos de micropartículas [36].*

Las microesferas protegen el principio activo de condiciones ambientales desfavorables como la temperatura, el pH, la luz y la humedad, lo que aumenta su tiempo de vida útil y disminuye su degradación. Las microesferas ofrecen la posibilidad de crear soluciones individuales a problemas específicos en diversas áreas de aplicación. Las ventajas más comunes son: liberación controlada de un principio activo específico, productos con nuevas características, protección del ambiente de ingredientes activos y reducción del impacto ambiental. Sus aplicaciones se extienden a diferentes sectores industriales tales como productos farmacéuticos, cosméticos, biotecnología, producción de químicos, etc. [37, 38].

### 1.3 Técnicas para la preparación de microesferas

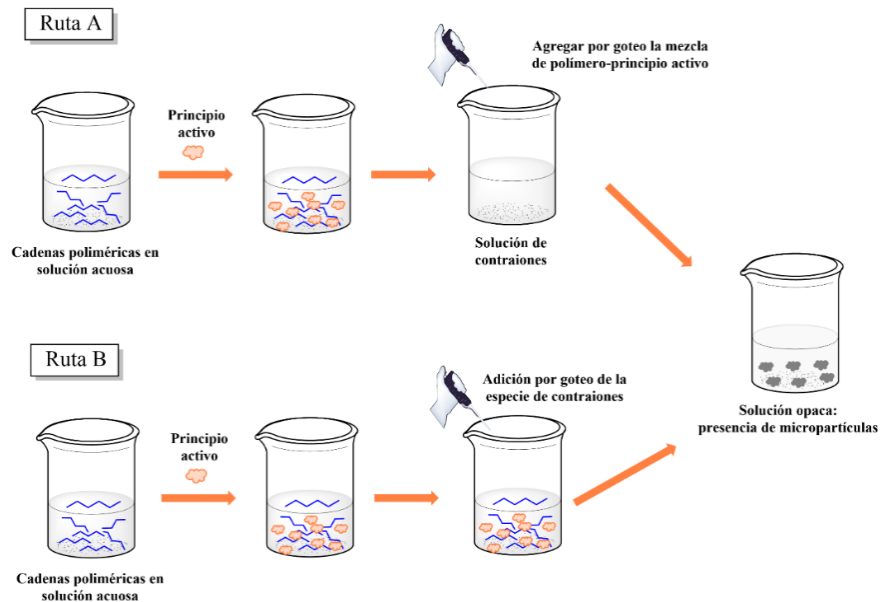
Las técnicas para la preparación de microesferas pueden dividirse en métodos químicos o físicos. Los métodos químicos involucran fuerzas intermoleculares fuertes (interacciones electrostáticas, enlaces de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas) o reacciones químicas. Los métodos físicos se basan en el aspecto o estructura [37]. La elección del proceso de microencapsulación está gobernada por las propiedades físicas y químicas del principio activo, el material matriz, el mecanismo de liberación, el tamaño de partícula y la aplicación requerida [38]. Algunas de las técnicas más populares son el secado por aspersion, el recubrimiento en lecho fluidizado, la

encapsulación con fluidos supercríticos, la liofilización, la gelificación iónica, los métodos de emulsificación-eliminación de solventes y la formulación de liposomas [36].

### 1.3.1 Gelificación iónica

La gelificación ionotrópica es una técnica que permite producir nanopartículas (NPs) y micropartículas (MPs) a través de interacciones electrostáticas entre dos especies iónicas bajo ciertas condiciones [37], en donde al menos una de estas especies es un polímero. Cuando un fármaco, molécula bioactiva o principio activo se agrega en la reacción, puede ser atrapado en las cadenas poliméricas, dando como resultado su captura dentro de la estructura de la nanopartícula/micropartícula [40].

El método de gelificación iónica se desarrolla por dos rutas diferentes. En la figura 1.5 se muestran las dos rutas que pueden seguirse para obtener micropartículas mediante gelificación iónica. En la ruta A la solución polimérica se mezcla previamente con el principio activo y posteriormente se agrega a la solución de contraiones usando una jeringa. En la ruta B, la solución polimérica se mezcla con el principio activo y luego se agregan los contraiones mediante goteo. En las dos rutas se pueden utilizar polímeros catiónicos o aniónicos [39, 41].



**Figura 1.5.** Representación del proceso de preparación de micropartículas por gelificación iónica, este proceso se realiza mediante agitación y a 25°C [39].

Entre los polímeros más utilizados para obtener micropartículas por gelificación iónica se encuentran el quitosano, alginato de sodio, carboximetilcelulosa, goma gellan, fibrina, colágeno,

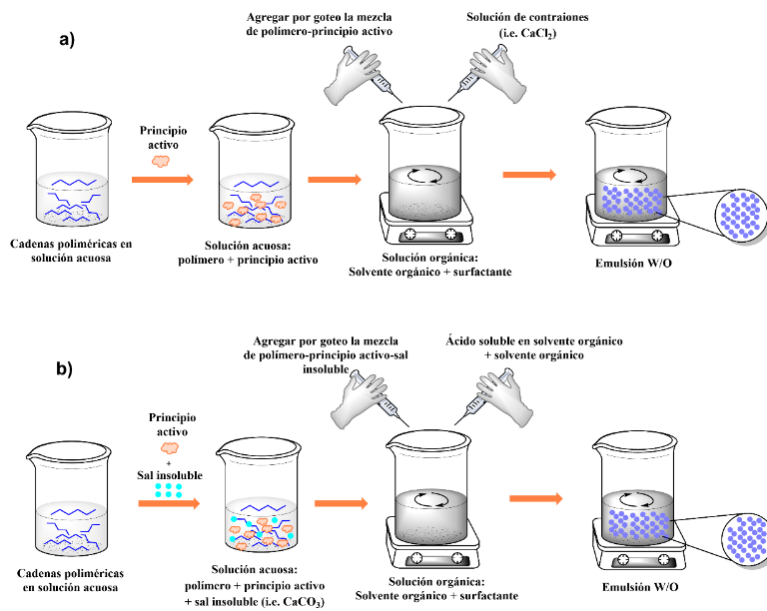


gelatina, ácido hialurónico, dextran y pectina. Así mismo, las especies iónicas que han sido utilizadas con estos polímeros son sales de sodio, calcio y magnesio [42, 43]. Los tamaños de partícula mediante la gelificación iónica generalmente se encuentran desde los cientos de micrómetros hasta los milímetros, convirtiendo la obtención de un tamaño de partícula homogéneo en uno de sus principales retos. Para obtener los tamaños de partícula deseados, se requieren estudiar variables como la concentración de la solución polimérica, la distancia de goteo de la solución de contraiones, el tamaño de la boquilla de la jeringa, la concentración de la solución de contraiones, entre otros [44].

Las emulsiones se encuentran en los ámbitos industriales y domésticos, y consisten en una mezcla de líquidos inmiscibles, usualmente agua y aceite, en la que uno se dispersa dentro del otro en forma de gotas usando un esfuerzo mecánico y un surfactante [45, 46]. La técnica de gelificación iónica puede ser realizada a través de un proceso de emulsificación y es factible para la producción de microesferas con tamaños menores a 100  $\mu\text{m}$ , con un bajo costo y con una estrategia de experimentación sencilla [44, 47]. De manera general, esta técnica implica dos pasos, la formación de las gotas de polímero estable en la emulsión y el endurecimiento de las partículas. En este método, la gelificación tiene lugar cuando la solución polimérica colisiona con los iones de la solución de contraiones y se divide en dos tipos: gelificación interna y externa [44].

En el proceso de gelificación externa realizada a través de una emulsificación, el principio activo es dispersado completamente a través de la solución polimérica acuosa (fase dispersa), previo al proceso de emulsión. Luego, la mezcla es agregada a la fase orgánica (fase continua) que contiene un surfactante adecuado para formar una emulsión de agua en aceite (W/O) bajo agitación continua [44]. El agente entrecruzante, se agrega por goteo lentamente en la emulsión y se mantiene la agitación durante el tiempo de entrecruzamiento. Finalmente, las microesferas se lavan para remover el exceso de la fase orgánica, se filtran y son secadas a temperatura ambiente.

En el proceso de gelificación interna, la sal de los contraiones se agrega en la solución de polímero-activo antes de que la gelificación ocurra, y los contraiones son liberados cuando la fase orgánica se acidifica, permitiendo el entrecruzamiento de los contraiones y el polímero [44, 48]. El polímero más utilizado para la fabricación de micropartículas por este método es el alginato de sodio [47]. La figura 1.6 muestra el proceso de emulsificación con gelificación externa e interna.

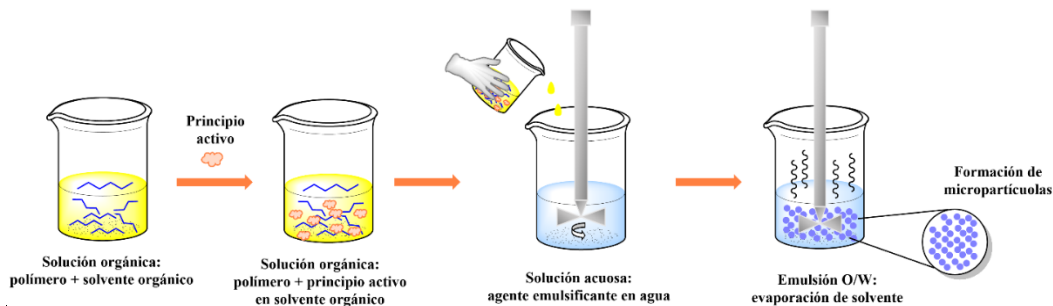


**Figura 1.6.** Proceso de emulsificación/gelificación. a) gelificación externa y b) gelificación interna [44].

### 1.3.2 Emulsificación y evaporación de solvente

La técnica de emulsificación y evaporación de solvente es de amplia aplicación en la industria farmacéutica para desarrollar sistemas de liberación controlada de fármacos [49], y se ha utilizado para la preparación de micro y nanopartículas, mediante el uso de polímeros que son disueltos en solventes orgánicos volátiles inmiscibles en agua [50]. Fue desarrollada en 1979 por Vanderhoff *et al.* [51], que tuvo por objetivo proporcionar un método para producir una emulsión polimérica acuosa, y particularmente un método para producir una emulsión en la que el tamaño de las partículas de polímero fuese menor a 0.5  $\mu\text{m}$  mediante la emulsificación del polímero.

El método de emulsificación con evaporación de solvente se compone de dos pasos. El primero consiste en la disolución del polímero y el principio activo en un solvente orgánico volátil (diclorometano, cloroformo, acetato de etilo, entre otros), para formar la solución orgánica [50]. La emulsión de aceite en agua (O/W) se forma al agregar la solución polimérica en una solución acuosa que contiene un agente emulsificante (no-ionico, aniónico o catiónico) para la formación de gotas discretas [51, 52]. En el segundo paso, el solvente orgánico se evapora, ya sea por agitación continua a temperatura ambiente o bajo presión reducida. Para que las microesferas se formen, el solvente orgánico primero debe difundirse hacia la fase acuosa y luego evaporarse en la interfaz agua/aire [52]. Conforme se evapora el solvente, las microesferas se endurecen y se obtienen mediante una filtración y secado adecuados. La figura 1.7 muestra una representación esquemática del proceso de emulsión y evaporación de solvente.



**Figura 1.7.** Proceso de emulsificación y evaporación de solvente [50].

En esta técnica de preparación de microesferas poliméricas, se ha identificado que existen diversos factores que tienen influencia sobre sus propiedades, como son: la naturaleza y solubilidad del ingrediente activo; la concentración, el peso molecular y el tipo de polímero; la proporción activo/polímero; la concentración y tipo de agente emulsificante utilizado; la velocidad de agitación y temperatura del proceso de emulsificación; los volúmenes y viscosidades de la fase dispersa y continua; el tipo de solvente orgánico utilizado y su tasa de difusión [50, 52].

Mediante esta técnica, se han obtenido microesferas poliméricas de diferentes polímeros como Poli(ácido láctico) (PLA), Poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), Poli(ácido glicólico) (PGA), etilcelulosa (EC), ftalato de acetato de celulosa (CAP), Poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL), Poli( $\beta$ -hidroxibutirato) (PHB) e Hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) [50, 53]. Los ingredientes activos comúnmente empleados para su microencapsulación en polímeros mediante este método son de naturaleza hidrofóbica e hidrofílica con diferentes propiedades físicas y químicas [52]. Los agentes emulsificantes que se incorporan a la fase acuosa consisten en polímeros hidrofílicos y surfactantes aniónicos y catiónicos, entre los que se encuentran el Poli(alcohol vinílico) (PVA), copolímeros como Poloxamer 127 y Poloxamer 188 y Polisorbato 80 (Tween 80), entre otros [50].

Los solventes usados para la solución orgánica deben ser inmiscibles con agua y con un punto de ebullición mayor que la del agua, que aseguren su evaporación completa y sin dejar rastros en las micropartículas [50]. De acuerdo con los lineamientos del Consejo Internacional para la Armonización de los Requerimientos Técnicos para los Productos Farmacéuticos de Uso Humano (ICH), sobre la cantidad de solventes residuales en las formulaciones, los residuos de solventes están divididos en tres clases principales: la clase 1 está conformada por aquellos solventes con una toxicidad inaceptable o con efectos ambientales perjudiciales, la clase 2 por solventes que tienen asociada una toxicidad menos severa y por tanto debe limitarse su uso y la clase 3 por aquellos que presentan una baja toxicidad y bajo riesgo para la salud humana [54].

Los solventes más usados en la técnica de emulsión y evaporación de solvente son diclorometano (DCM) y acetato de etilo, que pertenecen a la clase 2 [50]. De acuerdo con Vanderhoff *et al.* [51] la técnica permite la utilización de otros solventes como butanol, pentanol, ciclopentanol, éter de petróleo, solventes tóxicos como cloroformo, acetonitrilo, entre otros.

La efectividad del método de emulsificación y evaporación de solvente para la producción de microesferas depende del atrapamiento exitoso del principio activo dentro de las partículas, y este proceso se logra si el activo es escasamente soluble en el medio acuoso que conforma la fase continua de la emulsión [52]. Las propiedades físicas de las microesferas tienen una fuerte dependencia de la naturaleza de los materiales empleados y los parámetros utilizados durante el proceso de manufactura [49]. Esta técnica ha sido empleada exitosamente para el atrapamiento de diferentes activos hidrofóbicos (en el área farmacéutica) en matrices poliméricas, con alta producción, buena reproducibilidad y facilidad de escalamiento a nivel industrial [50].

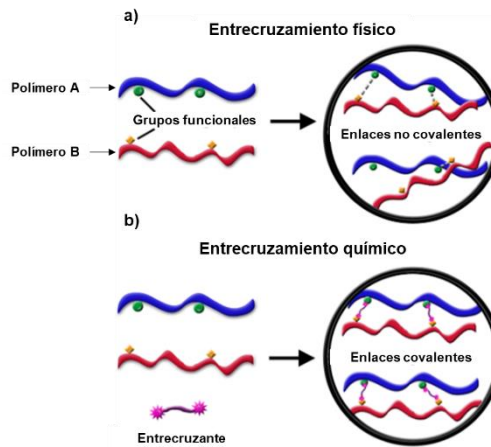
### **1.3.3 Emulsificación y entrecruzamiento**

Las técnicas de fabricación de micropartículas mediante un proceso de emulsión se pueden realizar mediante diversas formas, como la emulsión-gelificación iónica y la emulsión-evaporación de solvente [55]. Las micropartículas obtenidas por estos métodos usualmente presentan propiedades mecánicas bajas y se requieren hacer modificaciones para obtener mayor resistencia mecánica, dureza y rigidez, así como propiedades de estabilidad térmica, hinchamiento y permeabilidad [56].

Entre las modificaciones se encuentra el entrecruzamiento de las cadenas poliméricas. El entrecruzamiento es un proceso en química de polímeros que da lugar a una estructura de red en donde las cadenas poliméricas están unidas unas a otras mediante enlaces cruzados de tipo iónico o covalente [57].

Estas modificaciones consisten en entrecruzamientos físicos o químicos. En el entrecruzamiento físico, los polianiones y policationes son los entrecruzantes más comunes para la modificación de la superficie de carga opuesta mediante la técnica de coacervación compleja, emulsificación y secado por aspersión [6, 56, 58]. Este tipo de entrecruzamiento de polímeros se produce a través de fuerzas físicas como fuerzas electrostáticas, enlaces de puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas [58]. El entrecruzamiento químico de micropartículas se realiza mediante agentes como el glutaraldehído (GA), hidróxido de sodio (NaOH), epíclorhidrina (ECH), etilenglicol diglicidil éter (EGDE), entre otros [57]. El entrecruzamiento se produce por enlaces

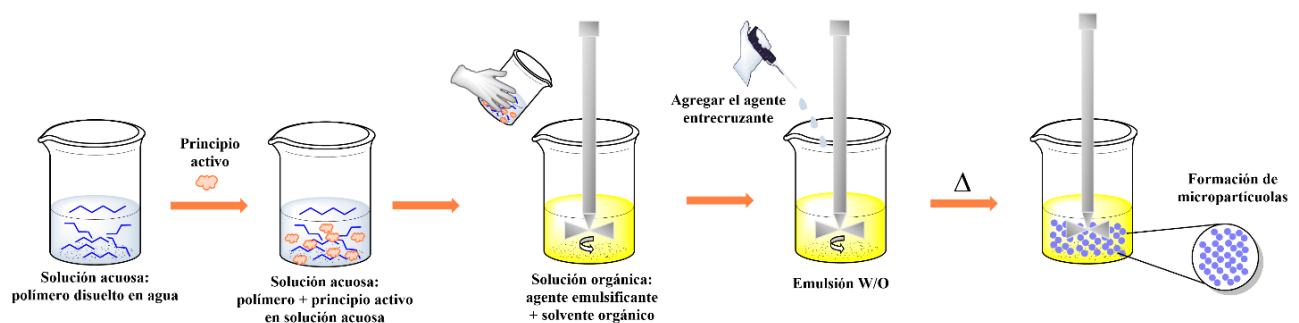
covalentes mediante reacciones químicas [57]. Estos dos tipos de entrecruzamiento se muestran en la figura 1.8.



**Figura 1.8.** Tipos de entrecruzamientos de cadenas poliméricas. a) físico y b) químico [59].

La elección del tipo de entrecruzamiento depende de la aplicación final de las micropartículas. Los entrecruzamientos físicos se prefieren generalmente cuando la aplicación involucra la liberación de fármacos, en donde se ha demostrado que los agentes como el glutaraldehído producen toxicidad fisiológica e irritación de las mucosas, incrementan su resistencia a la degradación química o biodegradación a largo plazo [58, 60]. El entrecruzamiento químico se ha utilizado como una forma de mejorar la estabilidad química y mecánica del polímero, estos sistemas tienen aplicaciones como la liberación de pesticidas [13], la absorción de contaminantes en el agua [61], la liberación de fármacos [62], etc.

La fabricación de micropartículas mediante emulsificación y entrecruzamiento consiste en la formación de la emulsión y la adición de un agente entrecruzante soluble en la fase dispersa durante el proceso de preparación de las partículas, como se ilustra en la figura 1.9.



**Figura 1.9.** Proceso de emulsificación y entrecruzamiento.

## 1.4 Tipos de matrices para microesferas

Las micropartículas poliméricas pueden fabricarse con distintos tipos de polímeros, naturales, semisintéticos y sintéticos. Los polímeros naturales (polisacáridos, proteínas, poli hidroxiaácidos, etc.) no son tóxicos, son biodegradables, biocompatibles, abundantes, de fácil modificación química y con un amplio uso en la industria farmacéutica [56]. Los polímeros semisintéticos (aquellos derivados de celulosa, etc.) y sintéticos (policondensados, poliésteres, polianhídridos, poliamidas, polímeros vinílicos y copolímeros, etc.) se presentan en un amplio intervalo de composiciones y moléculas con propiedades ajustables, con capacidad de modificarlas para mejorar su resistencia mecánica, propiedades de permeabilidad, entre otras [56, 63]. Sin embargo, se debe tener en cuenta que la mayoría de los polímeros sintéticos tienen una falta de biocompatibilidad (para aplicaciones médicas) y cuyo tiempo de degradación puede ser mayor que en el caso de los polímeros naturales. La tabla 1.1 presenta los tipos de polímeros más utilizados para la formación de microesferas.

*Tabla 1.1 Polímeros utilizados en la preparación de microesferas [56].*

Tipos de polímeros		Material de pared/matriz
<b>De origen natural</b>	Polisacáridos	Agar, agarosa <sup>A</sup> , alginato <sup>A</sup> (Alg), carragenano <sup>A</sup> , quitosano <sup>C</sup> (Chit), goma gellan <sup>A</sup> , almidón, xantano <sup>A</sup> , sulfato de condroitina-6 <sup>A</sup> , sulfato de dextran <sup>A</sup> , acacia <sup>A</sup> , pectina <sup>A</sup> , ácido hialurónico <sup>A</sup> (HA)
	Proteínas/polipéptidos	Albumina <sup>C</sup> , colágeno, gelatina <sup>A,C</sup>
	Lípidos	Lecitina, heparina <sup>A</sup>
<b>Semisintéticos</b>	Celulosas modificadas	Carboximetilcelulosa <sup>A</sup> (CMC), carboximetilcelulosa de sodio <sup>A</sup> (NaCMC), sulfato de celulosa <sup>A</sup> (CS), etilcelulosa <sup>A</sup> (EC), ftalato de acetato de celulosa (CAP), butirato de acetato de celulosa (CAB)
<b>Sintéticos</b>		Poli(ácido acrílico) <sup>A</sup> (PAA), poliaminoácidos <sup>A</sup> , poli(alilamina) <sup>C</sup> (PAAm), polianhídridos, poliésteres, poli(etilenimina) <sup>C</sup> (PEI), poli(etilenglicol) (PEG), poli(óxido de etileno) (PEO), poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), alginato, poli-L-lisina (PLL), polimetacrilatos, poli(metilmacrilato) (PMMA), polimetilen-co-guadinina <sup>C</sup> , tripolifosfato <sup>A</sup> (TPP), polifosfacenos (PZ), poli(alcohol vinílico) (PVA), polivinilamina <sup>C</sup> , poli(vinil pirrolidona) (PVP)

El superíndice A se refiere a polianiones y el C a policationes.

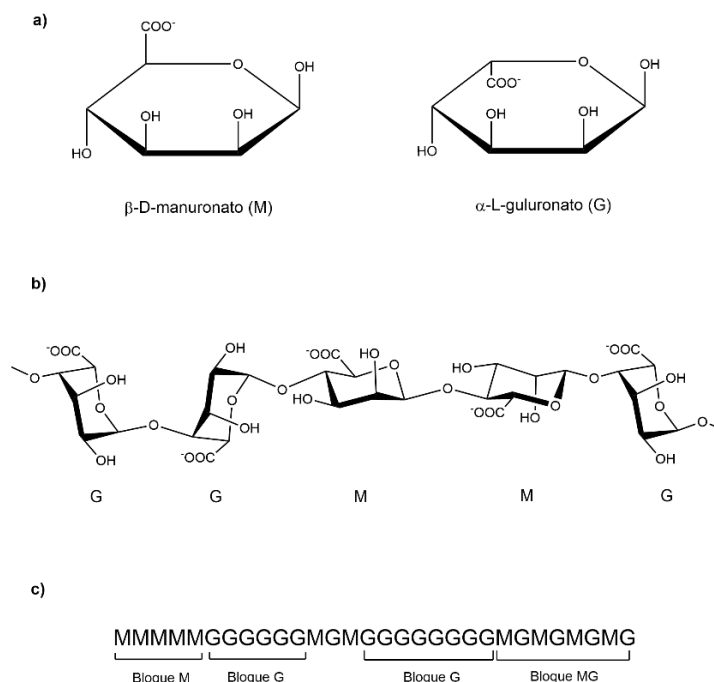
Entre los polímeros de origen natural más estudiados para la fabricación de micropartículas (microcápsulas/microesferas) se encuentran el alginato de sodio y el quitosano por sus características de bajo costo, buena biocompatibilidad, biodegradabilidad, buenas habilidades de formación de membranas y películas, facilidad de modificación química y no toxicidad, además, se han utilizado como sistemas de liberación de fármacos [6, 47, 56]. El PLA es uno de los polímeros sintéticos más utilizados en la preparación de micropartículas para la liberación de fármacos por su biocompatibilidad y biodegradabilidad [64].

#### **1.4.1 Alginato**

El alginato es un término utilizado para referirse a las sales del ácido algínico y está presente en las paredes celulares de las algas pardas en forma de sales de calcio, magnesio y sodio del ácido algínico [65]. El alginato tiene una función biológica como componente para la formación de estructuras en las algas pardas que les proporciona resistencia mecánica y flexibilidad [66].

La industria farmacéutica, la alimenticia y la textil (pasta para estampados) son los principales mercados hacia los que se dirige la producción de alginatos; sin embargo, también se están empleando en aplicaciones biotecnológicas para la encapsulación de agentes activos (células vivas para aplicaciones *in vitro* e *in vivo*) [66].

Respecto a su composición química, el alginato es un polisacárido natural conformado por una familia de copolímeros lineales binarios compuestos de dos tipos de monómeros, el ácido  $\beta$ -D-manurónico (M) y el ácido  $\alpha$ -L-gulurónico (G) unidos por enlaces glucosídicos (1-4). Estos monómeros forman estructuras homopoliméricas (bloques M que provienen de las unidades manurónicas y bloques G que provienen de unidades gulurónicas). Los alginatos se conforman por regiones de bloques M y G, intercaladas con regiones de estructura alterna (bloques MG) [44, 56, 66]. La figura 1.10 muestra las características estructurales del alginato.



**Figura 1.10.** Características estructurales del alginato. a) monómeros de alginato, b) conformación de las cadenas y c) distribución de bloques [66].

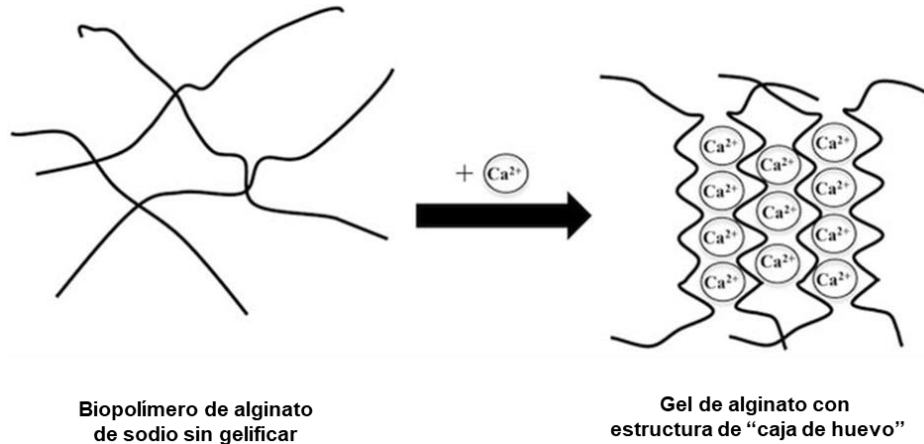
Los alginatos se utilizan ampliamente en la industria alimentaria, en la industria textil, en la fabricación de papel, en el ámbito medicinal, en el tratamiento de aguas residuales y en la industria farmacéutica debido a su biocompatibilidad, biodegradabilidad y no toxicidad [44, 66, 67]. Sus aplicaciones se basan en la habilidad de los alginatos para retener agua, y en sus propiedades gelificantes, viscosificantes y estabilizantes [66]. La formación de geles de alginato puede lograrse a través de dos métodos: el entrecruzamiento iónico con cationes (geles iónicos) o por precipitación ácida (geles ácidos) [68].

La formación de geles de alginato por entrecruzamiento iónico es posible gracias a sus características de enlazamiento iónico y su afinidad a cationes multivalentes, que son directamente dependientes de la cantidad de bloques G presentes en la estructura del alginato [66, 68]. La matriz de alginato tiene la capacidad de formar un gel en presencia de cationes divalentes mediante un proceso altamente selectivo ya que el alginato tiene una afinidad hacia los cationes en orden creciente:  $Mn < Zn, Ni, Co < Fe < Ca < Sr < Ba < Cd < Cu < Pb$  [68]. El  $Ca^{2+}$  es el catión divalente con mayor uso, debido a que no es tóxico como los cationes de Pb, Cu y Cd.

La gelificación del alginato se produce por el enlazamiento entre los cationes divalentes y las regiones con los bloques G del polímero. La adición de los iones de calcio a las moléculas del



alginate une dos cadenas G en lados opuestos formando una cavidad; los iones de Ca se unen al oxígeno de los grupos carboxilo por multicoordinación [66, 68]. Esta configuración polimérica da lugar a la estructura conocida como “egg-box”, como se muestra en la figura 1.11.

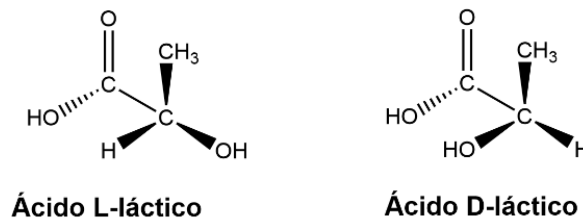


**Figura 1.11.** Formación de estructura "caja de huevo" durante la gelificación iónica de alginato de sodio [68].

Las micropartículas de alginato comúnmente son fabricadas mediante tres procesos: secado por aspersión, extrusión y el método de emulsificación-gelificación iónica [44].

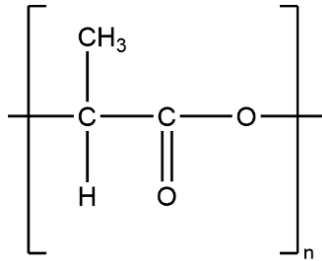
#### 1.4.2 Poli(ácido láctico)

El PLA es un biopolímero termoplástico proveniente de fuentes renovables que se produce a escala industrial, disponible de manera comercial, que ha sido ampliamente estudiado para su uso en aplicaciones médicas por sus propiedades biorreabsorbibles y biocompatibles en el cuerpo humano [69, 70]. La unidad constituyente del PLA es el ácido láctico, que se produce por la fermentación de carbohidratos o síntesis química [69]. El ácido láctico (ácido 2-hidroxipropiónico) es el ácido hidroxilo más simple, posee un átomo de carbono asimétrico y se encuentra en dos configuraciones ópticamente activas, los isómeros L(+) y el D(-) (figura 1.12) [69].



**Figura 1.12.** Estructura de los isómeros del ácido láctico.

El PLA de alto peso molecular (mayor a 100,000 Da) se puede producir por tres métodos: polimerización por condensación directa o policondensación, condensación azeotrópica deshidratante y polimerización por apertura de anillo (ROP) (método más usado) [69]. La figura 1.13 presenta la unidad repetitiva del PLA.



**Figura 1.13.** Unidad repetitiva del PLA.

Las propiedades del PLA de alto peso molecular, como punto de fusión, resistencia mecánica y cristalinidad, están determinadas por la arquitectura polimérica (la estereoquímica de la cadena principal) y la masa molecular, que está controlado por la adición de compuestos con grupos hidroxilo [69]. Muchas propiedades importantes del PLA están controladas por la proporción de enantiómeros D y L usados y su secuencia de ordenamiento en los polímeros. El PLA puede producirse de forma totalmente amorfa o con hasta un 40 por ciento de cristalinidad. El PLA obtenido con un contenido mayor al 93% de ácido L-láctico puede ser semicristalino, mientras que el PLA con un contenido entre 50-93% de ácido L-láctico es amorfo [69, 71, 72].

El PLA y la mayoría de sus copolímeros son solubles en dioxano, acetonitrilo, cloroformo, cloruro de metileno, 1,1,2-tricloroetano y ácido dicloroacético. El PLA cristalino no es soluble en acetona, etil acetato y tetrahidrofurano. Todos los polilácticos son insolubles en agua, algunos alcoholes y alcanos [71]. Sus propiedades ópticas de transmisión de luz visible y ultravioleta han sido investigadas para aplicaciones en empaques [69].

La temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) del PLA amorfo y la  $T_g$  y la temperatura de fusión ( $T_m$ ) del PLA semicristalino son parámetros físicos importantes para predecir su comportamiento [69], mientras que las propiedades reológicas del PLA, como la viscosidad de corte, afectan el procesado térmico, como moldeo por inyección, extrusión, soplado de películas, formación de láminas, hilado de fibras y termoformado [69]. Las propiedades mecánicas del PLA dependen de su composición estereoquímica; por ejemplo, el alineamiento del PLA aumenta su resistencia a la tensión, el incremento en la estereoregularidad de las cadenas mejora su resistencia al impacto

debido a los efectos de empaquetamiento de los dominios cristalinos [69]. Se han investigado las propiedades de barrera de gases a dióxido de carbono, oxígeno, agua, nitrógeno, compuestos orgánicos (etil acetato y D-limoneno) y sus propiedades de biodegradación, resistencia al fuego, reciclaje y de liberación de sustancias activas [64, 69].

Entre las principales aplicaciones del PLA se encuentran las médicas debido a sus propiedades de bioreabsorción y biocompatibilidad en el cuerpo humano, en la industria de empaques de alimentos por su factibilidad económica, en bolsas compostables, en la industria textil, en recubrimientos de papel, producción de envases, en aplicaciones ambientales como la tecnología de sorción de contaminantes y la bioremediación [69, 72, 73].

La combinación de una matriz polimérica orgánica (por ejemplo, el alginato, el quitosano y el PLA) y un material inorgánico (carbonato de calcio, fosfato de calcio, sílice, minerales de arcillas, entre otros) dan lugar a un material compuesto híbrido [74, 75]; estos materiales poseen propiedades novedosas para aplicaciones estructurales (en los sectores automotriz, ingeniería civil, telecomunicaciones), de catálisis, en la generación de biomateriales, en la liberación de fármacos, etc.

### 1.4.3 Quitosano

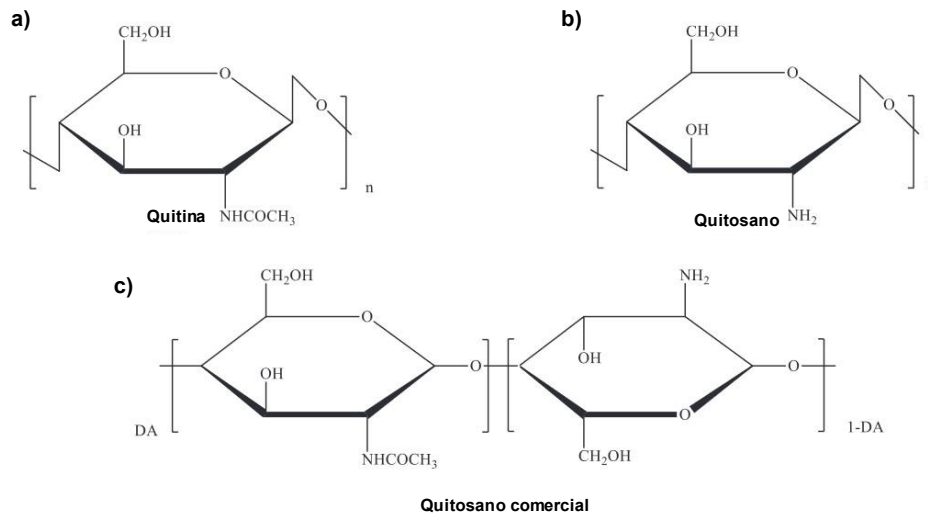
La quitina es uno de los materiales orgánicos más abundantes en la naturaleza y ocupa el segundo lugar después de la celulosa, respecto a la cantidad producida anualmente por biosíntesis [76]. Se encuentra principalmente en los exoesqueletos de crustáceos, moluscos e insectos y en ciertos hongos en los que se presenta como un polímero fibrilar presente en sus paredes celulares [76, 77]. Es un homopolímero lineal de cadena larga compuesta de unidades 2-acetamido-2-deoxi-D-glucopiranosas (N-acetil- $\beta$ -D-glucosamina) unidas por enlaces glucosídicos  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4). La figura 1.14a muestra la estructura química de la quitina.

El derivado principal de la quitina es el quitosano, un amino polisacárido que puede encontrarse de forma natural en las paredes celulares de algunas plantas y hongos [78]. En el ámbito industrial, el quitosano se obtiene mediante un proceso de desacetilación parcial de la quitina bajo condiciones alcalinas (usando NaOH concentrado) o por hidrólisis enzimática en presencia de la quitina deacetilasa [76, 79] (figura 1.14b).

Estructuralmente, el quitosano es un copolímero binario lineal de unidades 2-acetamido-2-deoxi-D-glucopiranosas (N-acetil-D-glucosamina) y 2-amino-deoxi-D-glucopiranosas (D-glucosamina) unidos por enlaces glucosídicos  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) [76, 80]. Los quitosanos pueden considerarse una

familia de copolímeros, no son un polisacárido definido particularmente ya que sus moléculas contienen diferentes proporciones de unidades D-glucosamina y N-acetil-G-glucosamina con diferentes longitudes de cadena [77] (figura 1.14c).

El quitosano comercial es un copolímero que se caracteriza por su grado de acetilación (DA). Este grado de acetilación se define como el porcentaje DA o fracción  $F_A$  de unidades glicosídicas N-acetiladas en la quitina o el quitosano [77]. También puede expresarse como el grado de deacetilación, DD ( $1 - F_A = 100 - DA$ , por ciento), que representa la proporción de unidades glicosídicas deacetiladas [77, 80]. Cuando el grado de deacetilación de la quitina se encuentra por encima del 50% se vuelve soluble en medios acuosos ácidos y se denomina quitosano [79], es decir, el polímero tiene un contenido de unidades acetiladas menores a 25-40% [77].



**Figura 1.14.** Representación esquemática de a) quitina completamente acetilada, b) quitosano completamente deacetilado y c) quitosano comercial [77].

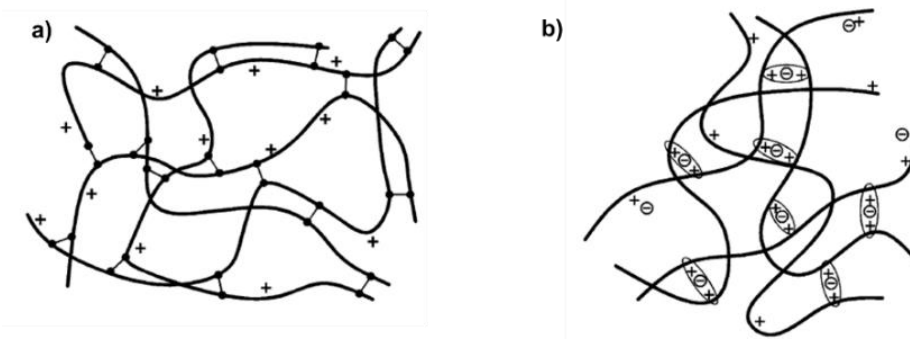
Los principales parámetros que influyen en las propiedades del quitosano son su peso molecular (MW) y su grado de deacetilación (DD), los cuales son determinados por las condiciones de obtención [80]. Las principales propiedades del quitosano son su naturaleza catiónica y su comportamiento en solución, aunque también posee propiedades específicas [77]:

- Propiedades fisicoquímicas: solubilidad en soluciones acuosas ácidas diluidas, capacidad de formación de enlaces de hidrógeno e interacciones químicas, propiedades electrostáticas, quelantes y de formación de complejos, entre otras.

- Propiedades biológicas: no toxicidad, biocompatibilidad, biodegradabilidad, agente hidratante, material encapsulante, vehículo para la administración y liberación de fármacos, antimicrobiano (antibacterial y antifúngico), mucoadhesión, etc.
- Propiedades tecnológicas: polielectrolito a pH ácidos, biopolímero catiónico con altas densidades de carga a pH < 6.3, interacción con moléculas cargadas negativamente, bioadhesividad, capacidad de formación de películas, habilidad de gelificación, agente coagulante y floculante, propiedades de captura y adsorción, entre otros.

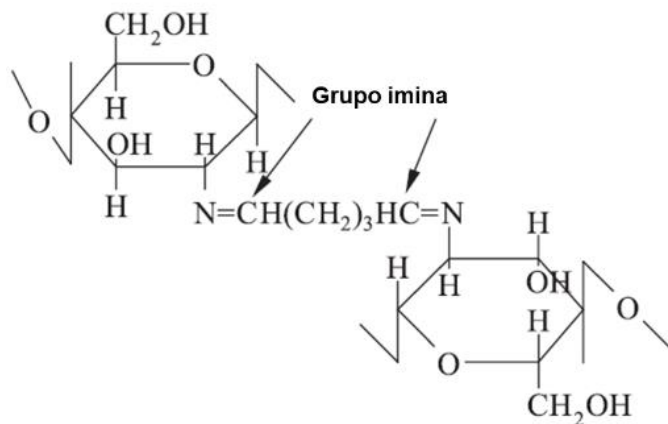
El quitosano tiene aplicaciones prácticas en forma de soluciones, suspensiones, partículas (capsulas, resinas, esferas, nanopartículas y esponjas, geles/hidrogeles, espumas, membranas y películas, fibras, etc.) [77], en la industria alimentaria (espesantes, gelificantes, emulsificantes y clarificadores de bebidas), la agricultura (recubrimiento de semillas para su conservación, sistemas de liberación de fertilizantes, fungicida para protección de plántulas), la medicina (producción de suturas quirúrgicas, gasas, vendajes y cremas bactericidas), tratamiento de aguas residuales (agente coagulante y floculante, captura de metales pesados y pesticidas) y desarrollo de sensores (inmovilización de enzimas y nanopartículas) [78, 79, 81].

Estructuralmente, el quitosano posee grupos aminos libres en su unidad repetitiva que le confieren una carga positiva que puede ser utilizada para promover reacciones con superficies y polímeros cargados negativamente y actuar como un agente quelante con iones metálicos [82]. Entre las reacciones más estudiadas del quitosano se encuentran aquellas que dan origen a la producción de geles entrecruzados, cuyo entrecruzamiento puede ser de tipo iónico y covalente [80]. Estas reacciones de entrecruzamiento mejoran las propiedades mecánicas y la estabilidad estructural de los geles de quitosano [83]. En los geles entrecruzados, las cadenas poliméricas están conectadas por moléculas entrecruzantes, que dan lugar a la formación de una red tridimensional (figura 1.15).



**Figura 1.15.** Entrecruzamiento del quitosano. a) covalente y b) iónico [80].

Los entrecruzantes son moléculas con un peso molecular menor que el de las cadenas poliméricas del quitosano [80]. Algunos de los agentes de entrecruzamiento covalente estudiados son dialdehídos (glutaraldehído, glioxal), formaldehído, escuarato de dietilo, ácido oxálico, entre otros [80, 82, 84, 85]. De igual forma se han utilizados agentes no tóxicos como la genipina, tripolifosfato de sodio, heparina, sulfato de sodio, y citrato de sodio que interactúan iónicamente con el quitosano [82, 83, 86]. El entrecruzamiento del quitosano con el glutaraldehído se produce mediante la formación de un enlace imina por la reacción de un grupo aldehído del glutaraldehído y del grupo amina del quitosano, y que es estabilizado por resonancia con el doble enlace etilénico adyacente (figura 1.16) [84].



*Figura 1.16. Estructura del quitosano entrecruzado con glutaraldehído [85].*

Las propiedades de los geles entrecruzados dependen de la densidad de entrecruzamiento, el tipo de entrecruzante, la concentración del entrecruzante, el grado de deacetilación del quitosano, la temperatura y el tiempo de duración de la reacción de entrecruzamiento [80].

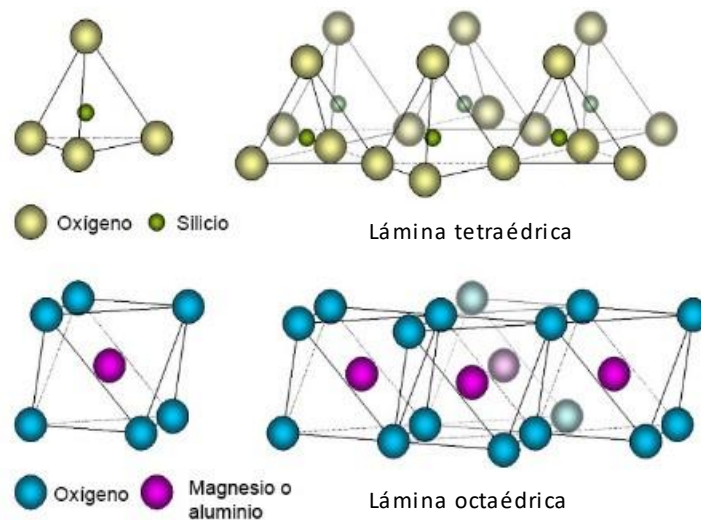
## 1.5 Arcillas

Los silicatos son minerales constituidos por láminas estructurales que tienen contenidos elevados de silicio. La estructura atómica de un silicato consta de una unidad básica representada por un tetraedro, en cuyos vértices hay cuatro átomos de oxígeno y en el centro un átomo de silicio unido a los oxígenos mediante enlaces de carácter intermedio entre los de tipo iónico y de tipo covalente [87]. Su estructura se basa en la repetición de la unidad tetraédrica  $\text{SiO}_4^{4-}$  que forma parte de la mayoría de las rocas, arenas y arcillas. Están clasificados por la forma en la que se unen los tetraedros entre sí: nesosilicatos, sorosilicatos, ciclosilicatos, inosilicatos, filosilicatos y tectosilicatos [88].

Los filosilicatos en particular son una subdivisión de los silicatos que incluyen minerales comunes en ambientes muy diversos, que poseen una morfología de tipo hojas (phyllon = hoja) o capas [89]. Son una subclase de los silicatos con hábito hojoso (aparición de hojas) o bien fibroso, que poseen una estructura de capas de dimensionalidad infinita en dos direcciones del espacio conformada por unidades repetitivas de tetraedros y octaedros [90].

Las arcillas son minerales naturales constituidos principalmente por una mezcla de aluminosilicatos cristalinos (denominados minerales arcillosos), silicatos y minerales de hierro, calcio, titanio, acompañados de materia orgánica. Estos minerales arcillosos son numerosos y se diferencian entre sí por su forma, estructura, apilamiento de las capas y la simetría de la red que forman entre sí [91]. Los minerales de arcilla se producen por intemperismo, diagénesis o alteración hidrotermal (interacciones agua-roca a temperaturas 100-250°C) [92].

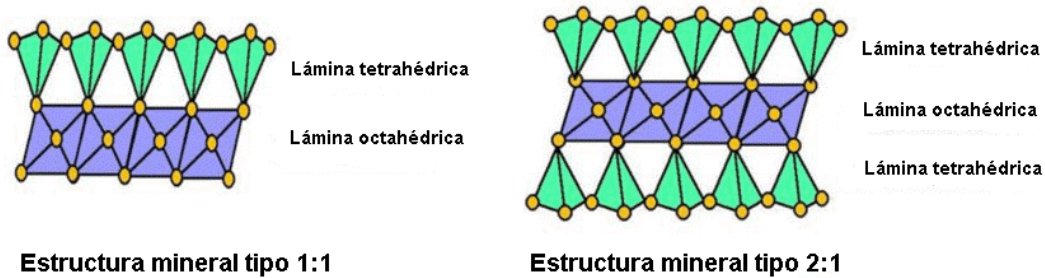
Las arcillas se clasifican de acuerdo a su estructura y poseen dos tipos de unidades estructurales, un tetraedro compuesto de un átomo de silicio en el centro y cuatro átomos de oxígeno equidistantes, y un octaedro con un átomo de aluminio o magnesio en el centro que se encuentran equidistantes a seis átomos de oxígeno o seis grupos hidroxilo (figura 1.17) [92].



**Figura 1.17.** Unidades estructurales de los minerales de arcilla.

La unión de las unidades tetraédricas forma una lámina tetraédrica y la unión de las unidades octaédricas da lugar a una lámina octaédrica. Los diferentes tipos de minerales de arcilla pueden describirse mediante la disposición de las láminas tetraédricas y octaédricas. Un mineral de arcilla tipo 1:1 posee una lámina tetraédrica y una octaédrica por capa de arcilla y un mineral de arcilla

tipo 2:1 contiene dos láminas tetrahédricas con una lámina octaédrica por capa de arcilla (figura 1.18) [93].



*Figura 1.18. Tipos de arcillas minerales [94].*

### 1.5.1 Propiedades fisicoquímicas de las arcillas

Las propiedades físicas y químicas de una arcilla dependen de su estructura y composición. Algunas propiedades de las arcillas que las hacen atractivas para su implementación en aplicaciones industriales y científicas son: tamaño de partícula, morfología y distribución; mineralogía; área, carga y química superficial; pH; capacidad de intercambio catiónico (CIC); brillo y color; capacidad sorcitiva; reología; dispersabilidad y capacidad de experimentar sustituciones isomórficas, que dan lugar a la aparición de cargas en las láminas y a la presencia de cationes con una interacción débil en el espacio interlamina [95].

Estas propiedades de las arcillas que, junto a su área superficial elevada con la presencia de enlaces no saturados, le proporcionan la capacidad para interactuar con diversas sustancias, como compuestos polares; lo que permite su utilización como absorbentes, desarrollo de nanocompuestos, materiales retardantes de fuego, sistemas de liberación de fármacos, pesticidas y fertilizantes [96, 97].

### 1.5.2 Paligorskita

La paligorskita (Pal) es un aluminosilicato de magnesio, hidroxilado e hidratado, con aspecto fibroso, cuya estructura química es  $\text{Si}_8\text{O}_{20}(\text{Al}_2\text{Mg}_{22})(\text{OH})_2 \cdot (\text{OH}_2)_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ . La paligorskita presenta tres tipos de moléculas de agua en su estructura: el agua coordinada con el magnesio, el agua adsorbida, y el tercer tipo se encuentra en el interior de los canales zeolíticos, denominado agua zeolítica [98].

Esta arcilla posee cationes en su estructura ligados débilmente, que permiten intercambiarse por otros cationes presentes en disoluciones acuosas que, junto con su área superficial elevada, en



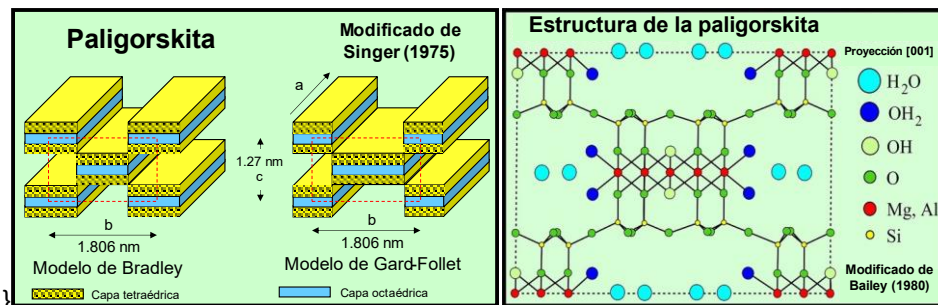
presencia de enlaces no saturados hacen posible su interacción con diversas sustancias, en especial compuestos polares.

Las propiedades fisicoquímicas de la paligorskita dependen en gran medida de su tamaño de partícula, de la porosidad de su estructura, su dispersabilidad, etc. Algunas características de la paligorskita se describen en la tabla 1.2 [95].

**Tabla 1.2.** Características de la paligorskita.

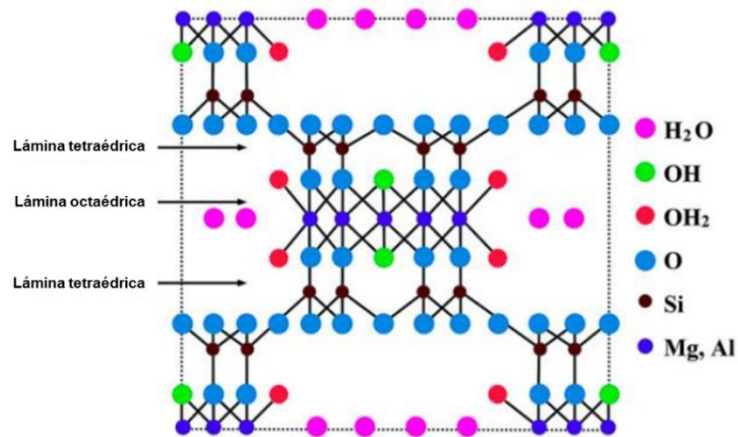
Arcilla de capas 2:1
Color bronceado claro, marrón, crema o verde azulado
Partículas elongadas y muy delgadas
Presentan algunas sustituciones en su red cristalina
Carga superficial moderada
Capacidad de intercambio de base media
Área superficial alta (entre 100-200 m <sup>2</sup> /g)
Alta capacidad sorcitiva

La paligorskita y sepiolita son filosilicatos que contienen una lámina tetraédrica bidimensional continua; sin embargo, se diferencian de otros tipos de silicatos en que carecen de láminas octaédricas continuas (figura 1.19). Se puede considerar que su estructura contiene capas de una estructura de filosilicato 2:1; cada capa está vinculada entre sus láminas debido a la inversión de los tetraedros de SiO<sub>4</sub> a lo largo de un conjunto de enlaces Si-O [99]. Esta conformación de las láminas tetraédricas y octaédricas cuando se extienden en la dirección paralela a las dimensiones de la celda unitaria les proporciona a los cristales una apariencia fibrosa.



**Figura 1.19.** Estructura de la paligorskita [100].

Por tanto, la estructura de la paligorskita (figura 1.20) está conformada por el agrupamiento de láminas octaédricas y tetraédricas de silicatos 2:1 que dan origen a canales con dimensiones de 6.2 y 3.6 Å; las láminas tetraédricas continuas, distribuidas en forma de capas 2:1 unidas entre sí con las octaédricas mediante los oxígenos basales de los tetraedros. Los canales que son paralelos a las fibras y que contienen el agua zeolítica poseen dimensiones de 0.37 nm por 0.64 nm [101].



**Figura 1.20.** Proyección de la estructura cristalina de la paligorskita sobre el plano (001).

La estructura de esta arcilla puede considerarse como polidispersa, tiene un tamaño efectivo de poro de alrededor de 30 nm, mesoporos con intervalo de tamaños de 2 a 8 nm y microporos de 2 nm; estos poros en la estructura de la paligorskita y sus canales internos constituyen el 50% de su superficie total.

En ciencia de materiales, se considera que los materiales que poseen algunas de sus dimensiones en el intervalo de 1 a 100 nm se encuentran en la nanoescala. Un nanomaterial es un material con una o varias dimensiones externas en la nanoescala o con una estructura interna o superficial en la nanoescala [102]. De manera específica, la paligorskita posee dos dimensiones externas en la nanoescala (figura 1.19) y la tercera en la escala micrométrica. De acuerdo con lo anterior, la paligorskita es una nanoarcilla, un tipo de arcilla con morfología de nanofibra [103]; es hidrofílica y usada como un nanorrefuerzo debido a su alta resistencia mecánica, área superficial específica y relación de aspecto. Las nanofibras de paligorskita han sido explotadas como nanorrefuerzo de polímeros hidrofílicos debido a sus propiedades únicas, tales como hidrofiliidad, capacidad de intercambio catiónico, área de superficie grande, estabilidad térmica, módulo de elasticidad alto y alta relación de aspecto [104, 105].

## 1.6 Liberación de fertilizantes a partir de microesferas poliméricas: revisión de la literatura

Las microesferas poliméricas se han usado ampliamente como vehículos para la administración de fármacos y agroquímicos (pesticidas, bioestimulantes del crecimiento vegetal y fertilizantes). Se han desarrollado como estrategias viables, tanto económica como ambientalmente para la dosificación de principios activos de manera lenta, progresiva y controlada.

Un sistema de liberación de fármacos bastante conocido, emplea los alginatos para suministrar un medicamento de forma controlada y específica, a la vez que segura para el cuerpo humano [47]. La matriz polimérica de alginato de sodio, al tener propiedades de biocompatibilidad, no toxicidad y degradabilidad la hacen un candidato idóneo para capturar principios activos en su estructura. Diversos estudios se han hecho para usar el alginato de sodio con este fin [44]. En el área de liberación de agroquímicos, Zhou y col. [106] estudiaron la liberación controlada de clorpirifos (un insecticida) en microesferas híbridas de alginato-paligorskita preparados mediante gelificación iónica; obtuvieron microesferas con morfología esférica, regular y con la presencia de poros. La caracterización fisicoquímica indicó que el insecticida fue capturado en el interior y la superficie de las esferas. Los ensayos de liberación del pesticida mostraron que la presencia de la paligorskita a concentraciones de 10 y 20% disminuyen la liberación de clorpirifos en comparación de las microesferas sin la arcilla, atribuido a los enlaces de puentes de hidrógeno entre la paligorskita y el ácido algínico que mejoraron la densidad de entrecruzamiento de la red polimérica.

Los hidróxidos laminares dobles (LDHs) son compuestos de tipo hidrocalcita (también llamados arcillas sintéticas o aniónicas), formadas por láminas de hidróxidos metálicos cargadas positivamente, que se estabilizan electrostáticamente con aniones en las regiones interlaminares [9]. Han sido estudiado como portadores de fertilizantes basados en fósforo y nitrógeno y en estudios recientes se han incorporado arcillas a las microesferas de alginato para evaluar sus características de liberación controlada de fertilizantes. Nunes y col. [9] obtuvieron microesferas de alginato que contienen nitrato en la estructura de hidróxidos dobles laminares. El nitrato fue incorporado a las arcillas por coprecipitación y posteriormente, las arcillas cargadas fueron capturadas en las microesferas de alginato obtenidas por extrusión. La caracterización fisicoquímica mostró la presencia de reflexiones cristalinas del  $\text{NO}_3^-$  en las arcillas, indicando una incorporación del fertilizante en las arcillas; el análisis infrarrojo de las microesferas con arcilla y fertilizante presentaron las vibraciones características del alginato, de las arcillas y del nitrato, confirmado la integridad de los materiales utilizados. Los estudios de liberación de nitrato se

realizaron con tres materiales: el  $\text{KNO}_3$  en polvo, las arcillas cargadas con nitrato y las microesferas de alginato con las arcillas cargadas de nitratos. La liberación de nitrato del polvo de  $\text{KNO}_3$  fue del 100% antes de los primeros 20 min; el nitrato se liberó de manera gradual desde la arcilla cargada con nitrato y se observó una menor liberación de nitrato desde las microesferas de alginato con arcilla, en comparación con las arcillas cargadas con nitrato. La preparación de microesferas de alginato mejoró las aplicaciones prácticas de los LDHs para la liberación lenta de nitratos.

Otra de las aplicaciones de los hidróxidos laminares dobles incorporados en microesferas de alginato para liberar fertilizantes fue estudiado por Castro y col. [107] para la liberación de boro (un micronutriente de plantas), mejorar la retención en el suelo y disminuir la lixiviación. Se intercaló en la arcilla el boro (en forma de ácido bórico) y se incorporaron en las microesferas de alginato mediante la técnica de coacervación compleja. La caracterización fisicoquímica mostró la incorporación de la arcilla enriquecida con boro y la presencia del ácido bórico en las microesferas; la liberación y lixiviación del boro contenido en las microesferas disminuyó en comparación con su liberación de las arcillas enriquecidas y sin alginato y de las esferas con ácido bórico sin arcillas.

El PLA es un polímero sintético biocompatible, biodegradable, derivado de recursos renovables utilizado para capturar diversos principios activos como fármacos y extractos de plantas, protegiéndolos de factores ambientales como el pH, la humedad y la degradación térmica [64, 108]. Liu y col. obtuvieron microesferas de PLA a través de la técnica de emulsión y combinada con emulsión premezclada por membrana para la liberación controlada de lambda-cyhalotrin (un pesticida). Las microesferas tenían una morfología esférica y superficies suaves, con una distribución de tamaño de partícula estrecha y tamaño promedio entre 0.68 y 4.6  $\mu\text{m}$ , con eficiencias de captura mayores al 82%. Las microesferas presentaron una liberación sostenida del pesticida durante 10 días en comparación con la liberación rápida del pesticida en las formulaciones comerciales evaluadas.

De manera similar, Wang y col. [109] prepararon microesferas de una mezcla polimérica de PLA y Poli(butilen succinato) para la captura de dos pesticidas (azoxistrobina y difenoconazol) mediante emulsificación y evaporación del solvente para evaluar la capacidad de las microesferas de entregar dos agroquímicos para el control de plagas. Entre los resultados obtenidos, las microesferas presentaron un diámetro promedio de 7.2  $\mu\text{m}$ . Los ensayos de liberación presentaron una tasa de liberación acumulada del pesticida compuesto de alrededor del 85% para el día 25, que fue mayor a la liberación acumulada del 80% al día 5 en la suspensión

concentrada de ambos pesticidas. Por otro lado, Li y col. [10], en un esfuerzo por estudiar las aplicaciones del PLA en el área agrícola, incorporaron un insecticida (buprofezin) en microesferas de PLA producidas mediante el método de emulsión con evaporación del solvente. Aplicaron la metodología de superficie de respuesta para optimizar la eficiencia de encapsulación del pesticida, de acuerdo a las siguientes condiciones: concentración de PLA (mg/mL), concentración de PVA (%), proporción PLA/pesticida (m/m) y velocidad de agitación (rpm). Se obtuvo una eficiencia de captura del 96.47%, morfología esférica, aspecto liso y buena dispersión con un tamaño de partícula promedio de 32.4  $\mu\text{m}$ .

Para obtener un sistema de liberación controlada de un fertilizante que sea ecológicamente amigable, se requiere de matrices poliméricas de origen natural, biocompatibles, no tóxicos para el ambiente y con buenas propiedades para formar la microesfera. Tal es el caso del quitosano, que, por ser de origen natural, se ha estudiado ampliamente para su aplicación en pesticidas, bioestimulantes vegetales (sustancias que estimulan procesos biológicos con una optimización en la absorción de nutrientes) y fertilizantes [6]. El estudio desarrollado por Santos y col. [2] evaluó las capacidades de formación de microesferas poliméricas de quitosano empleadas como micromatrices de materiales arcillosos como la montmorillonita (MMT) para la liberación controlada y eficiente de  $\text{KNO}_3$ . La caracterización fisicoquímica de las microesferas mostró un desplazamiento del espacio basal en la montmorillonita, atribuida a la intercalación y exfoliación de las láminas por la presencia del quitosano y el  $\text{KNO}_3$ . En este mismo estudio, el análisis de infrarrojo mostró un aumento en las bandas de la arcilla conforme se incrementó el contenido de arcilla en las microesferas y la presencia del nitrato por sus bandas características. Se obtuvieron microesferas con morfología esférica y superficie rugosa atribuido a la presencia de la arcilla. Se encontró que la arcilla mejoró las propiedades de sorción del fertilizante en las microesferas, una absorción efectiva del nutriente en los espacios interlaminares de la MMT, liberación controlada del nutriente y estabilidad térmica a altas temperaturas.

Es importante considerar que la matriz debe tener buenas propiedades de absorción de agua (hinchamiento) que favorezca la liberación del principio activo. Para tal fin dos Santos y col. [14] desarrollaron microesferas de quitosano reforzadas con un material de desecho como lo es el bagazo de la caña de azúcar que, al incorporarse en la matriz polimérica favorece la absorción de agua y la incorporación de nitrato de potasio en su estructura mediante su inmersión en una solución acuosa del fertilizante, donde el nutriente se liberó mediante un proceso de difusión.

Se han reportado diversos estudios sobre la incorporación de paligorskita en microesferas de quitosano para la liberación controlada de fármacos, como el trabajo de Yahia y col. [12], en

donde se prepararon microesferas de quitosano entrecruzadas con tripolifosfato para la incorporación de diclofenaco de sodio. Las microesferas obtenidas presentaron morfología esférica, con rugosidad superficial atribuida a la presencia de la arcilla. La caracterización indicó que no se encontró interacción química entre el diclofenaco y los demás componentes de las microesferas y que la presencia de la paligorskita aumentó la eficiencia de carga del principio activo. La presencia de la arcilla en la microesfera modificó el patrón de liberación del fármaco, disminuyendo la liberación del diclofenaco, lo que fue atribuido a la capacidad de adsorción de la arcilla que limitó su liberación.

La liberación controlada de pesticidas es un área de estudio creciente para combatir los problemas ambientales del uso excesivo de estos agroquímicos. Ramos y col. [13] prepararon microesferas de quitosano nanoreforzadas con paligorskita mediante el método de emulsión y entrecruzamiento con glutaraldehído para reducir y controlar la liberación de timol (un pesticida). Desarrollaron un diseño experimental para evaluar las mejores condiciones de procesamiento de su sistema considerando el contenido de paligorskita y de glutaraldehído y su efecto sobre las capacidades de hinchamiento de las esferas, la eficiencia de encapsulación, tamaño promedio de partícula y su distribución, así como la liberación controlada del timol. Se obtuvieron microesferas con morfología esférica y superficie suave, que fue volviéndose irregular y rugosa a partir de 2.5% de Pal utilizada. El tamaño promedio de partícula y su distribución disminuyó con el aumento en el contenido de paligorskita; el grado de entrecruzamiento y el contenido de arcilla modificaron el grado de hinchamiento de las esferas. En este trabajo se obtuvieron eficiencias de encapsulación entre un 40 y 65% que fueron mejoradas por la presencia de la arcilla con el menor contenido de entrecruzante. Se demostró que la presencia de la paligorskita modificó los perfiles de liberación, reduciendo ésta, lo que fue atribuido a la interacción molecular entre los grupos OH del timol con los grupos OH y NH<sub>2</sub> del quitosano, así como las interacciones físicas entre los grupos OH de la paligorskita y el timol.

La presente tesis estudia la obtención de microesferas poliméricas de alginato, PLA con paligorskita y la incorporación del fertilizante inorgánico KNO<sub>3</sub> *in situ* en las microesferas. Se obtuvieron también microesferas híbridas de quitosano con KNO<sub>3</sub> y se caracterizaron mediante microscopía óptica, analizador Coulter de tamaño de partícula y Microscopía Electrónica de Barrido para la determinación de la morfología superficial de las microesferas. Fisicoquímicamente se caracterizaron mediante Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier y Difracción de Rayos X. Técnicas de espectrofotometría (Espectrofotometría UV-Vis y Espectroscopía de Absorción Atómica) fueron usadas para la determinación de nitrato y potasio

en las microesferas. La parte final de la tesis, evaluó las capacidades de liberación controlada de nitrato y potasio de las microesferas híbridas de quitosano en función de la cantidad de paligorskita agregada en la preparación de las microesferas.

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **Hipótesis**

La presencia de nanoarcillas de paligorskita en las microesferas de polímeros biodegradables permite controlar la liberación de fertilizantes de N y K.

### **Objetivo general**

Estudiar el efecto del contenido de paligorskita sobre la liberación controlada del nitrato de potasio capturado en microesferas híbridas de polímeros biodegradables.

### **Objetivos específicos**

- Obtener microesferas de quitosano, alginato de sodio y poli(ácido láctico) para su uso como sistemas de liberación de fertilizantes.
- Caracterizar morfológicamente las microesferas poliméricas y establecer la matriz polimérica como sistema de liberación de fertilizantes.
- Incorporar a las microesferas las nanoarcillas de paligorskita con el fertilizante.
- Caracterización de las microesferas con las nanoarcillas y el fertilizante incorporado.
- Determinar el efecto de la adición de nanoarcillas de paligorskita a las microesferas sobre la liberación de nitrato y potasio, mediante ensayos de liberación de fertilizantes.



## CAPÍTULO 2

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 2.1 Materiales

Polímeros utilizados: Alginato de sodio (Deiman), Poli (ácido láctico) (Ingeo 2002D, peso molecular 170,000 g/mol, adquirido de Natureworks LLC), Quitosano (grado de deacetilación 80%, peso molecular 220,000 g/mol, de Vepinsa Foods),

Agente entrecruzante: Glutaraldehído 25% (J.T. Baker),

Solventes: Éter de petróleo (Wöhler), Hexano (Wöhler), Diclorometano (Sigma-Aldrich), Aceite mineral de parafina 55 USP, Etanol 70%,

Tensoactivo: Sorbitan monooleato (Span 80, Sigma-Aldrich), Poli(alcohol vinílico) de Faga LAB,

Arcilla: Paligorskita “Sak lu’um”, recolectada a las afueras del municipio de Ticul, Yucatán con coordenadas geográficas entre los paralelos 20°25’ y 20°35’ de latitud norte y los meridianos 89°24’ y 89°36’ de longitud oeste.

Reactivos: Cloruro de calcio dihidratado (Deiman), Ácido acético glacial (Química Meyer), Nitrato de potasio ACS (Fermont), Ácido clorhídrico y Cloruro de Lantano heptahidratado (J.T. Baker), Solución estándar de potasio grado absorción atómica 997 µg/mL (Aldrich Chemical Company).

#### 2.2 Metodología

La tabla 2.1 presenta un esquema general de las etapas de la metodología utilizada en el presente trabajo de investigación, el cual se dividió en tres etapas principales.

*Tabla 2.1. Etapas de la metodología utilizada en el presente trabajo de investigación.*

<b>1. Obtención de sistemas de liberación de fertilizantes</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Microesferas de Alginato</li><li>• Microesferas de Poli(ácido láctico)<ul style="list-style-type: none"><li>• Microesferas de Poli(ácido láctico)/Paligorskita/<math>KNO_3</math></li></ul></li><li>• Microesferas de Quitosano<ul style="list-style-type: none"><li>• Microesferas de Quitosano/Paligorskita/<math>KNO_3</math></li></ul></li></ul>
<b>2. Caracterización de microesferas poliméricas</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Microscopía óptica</li><li>• Analizador de tamaño de partícula Coulter</li><li>• Microscopía Electrónica de Barrido</li><li>• Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier</li><li>• Difracción de Rayos X</li><li>• Determinación de nitratos por Espectrofotometría UV-Vis</li><li>• Determinación de potasio por Espectroscopía de Absorción Atómica</li></ul>
<b>3. Liberación de <math>NO_3^-</math> y <math>K^+</math></b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Liberación de nitrato y potasio de microesferas híbridas de quitosano</li></ul>

## **2.3 Métodos de preparación de microesferas**

### **2.3.1 Microesferas de alginato**

Las microesferas de alginato de sodio se prepararon por el método de emulsión y gelificación iónica externa a partir de una emulsión de agua en aceite (sección 1.3.1) [44]. Para la fase acuosa se disolvieron 0.3 g de alginato de sodio en 10 mL de agua destilada (3% p/v) con agitación magnética a 300 rpm a temperatura ambiente (25 °C) durante 60 min. La fase orgánica se preparó con 100 mL de aceite de parafina con 2% (v/v) del tensoactivo Span 80. La emulsión se formó agregando la fase acuosa a la fase oleosa manteniendo una agitación a 700 rpm a 25 °C. Entonces, para generar la gelificación, 10 mL de una solución acuosa de cloruro de calcio dihidratado al 10% (p/v) se agregó por goteo a la emulsión mientras se mantuvo la velocidad de agitación por 90 min más. Posterior a ello, las microesferas se recuperaron por filtración; se aplicaron tres lavados con éter de petróleo y se secaron a 25 °C durante 24 h.

### **2.3.2 Microesferas de poli(ácido láctico)**

Las microesferas de poli(ácido láctico) (PLA) se prepararon mediante el método de emulsión y evaporación del solvente a partir de una emulsión de aceite en agua (sección 1.3.2) [10, 108, 109]. La fase orgánica se preparó al disolver 0.5 g de PLA en 10 mL de diclorometano mediante agitación magnética a 25 °C hasta la completa disolución del polímero. La fase acuosa se preparó disolviendo 1 g de poli(alcohol vinílico) en 100 mL de agua destilada agitando magnéticamente a 700 rpm. La emulsión se formó al agregar lentamente la fase orgánica de PLA a la fase acuosa de poli(alcohol vinílico) agitando magnéticamente a 420 rpm. Se mantuvo la agitación magnética durante 4 h hasta la completa evaporación del diclorometano. Las microesferas se recuperaron por filtración, y se lavaron tres veces con agua destilada para remover el poli(alcohol vinílico) residual y finalmente fueron secadas en una estufa de convección a 80 °C por 24 h.

#### **2.3.2.1 Microesferas híbridas de PLA/paligorskita y KNO<sub>3</sub>**

Las microesferas híbridas de PLA se prepararon por emulsión y evaporación del solvente (sección 1.3.2) durante este proceso se incorporaron de forma directa el principio activo y la arcilla.

La paligorskita pristina utilizada fue purificada para reducir impurezas (calcita y ankerita) y aglomerados en la arcilla, de acuerdo a la metodología reportada [110] que se basa en tres tratamientos, con agua destilada, peróxido de hidrógeno y acetato de sodio.

El  $\text{KNO}_3$  y la paligorskita purificada se agregaron a la solución de poli(ácido láctico) en diclorometano en las proporciones de la tabla 2.2 y se mantuvieron en agitación magnética a 420 rpm hasta su completa disolución [109]. Posteriormente, se siguió la metodología descrita en la sección 2.3.2 para la preparación de las microesferas de PLA. La fase acuosa después de la emulsión se conservó para la posterior cuantificación del nitrato y potasio atrapado en las microesferas.

**Tabla 2.2.** *Contenidos de  $\text{KNO}_3$  y Paligorskita (Pal) agregados a microesferas de PLA.*

$\text{KNO}_3$ (mg)	Pal (% peso de PLA)
100	0
100	1
100	2
100	4
100	5

### 2.3.3 Microesferas de Quitosano

La preparación de las microesferas de quitosano (QUI) se realizó con el método de emulsión y entrecruzamiento con glutaraldehído en una emulsión de agua en aceite (sección 1.3.3) [13, 111]. La fase acuosa se obtuvo al disolver 0.5 g de quitosano en 10 mL de una solución acuosa de ácido acético glacial al 2% (v/v) con agitación a 500 rpm a 25 °C. La fase orgánica se obtuvo al mezclar 40 mL de aceite mineral de parafina con 56.4 mg de Span 80 (tensoactivo) a 500 rpm durante 15 min a 25 °C hasta disolver la mezcla completamente. La emulsión agua en aceite se formó al agregar la fase acuosa a la fase orgánica por goteo manteniendo la agitación a 420 rpm a 25 °C durante 30 min. Transcurrido el tiempo de agitación se agregaron 950  $\mu\text{L}$  de glutaraldehído a la emulsión para iniciar el proceso de entrecruzamiento y se mantuvo la agitación magnética a 420 rpm, a 60 °C durante 3 h. Las microesferas de quitosano se recuperaron por filtración de la fase orgánica (aceite mineral/Span 80), se lavaron tres veces con 10 mL de hexano y se secaron en una estufa de convección durante 24 h a 80 °C. Posteriormente, las esferas se etiquetaron y se guardaron en una campana de desecación para prevenir la absorción de humedad.

#### 2.3.3.1 Microesferas híbridas de quitosano/paligorskita y $\text{KNO}_3$

Las microesferas de quitosano se prepararon mediante la técnica de emulsión y entrecruzamiento con glutaraldehído; el  $\text{KNO}_3$  y la arcilla se agregaron de forma directa durante el proceso de preparación de las microesferas en la solución acuosa de quitosano y ácido acético en las cantidades mostradas en la tabla 2.3. El  $\text{KNO}_3$  y la arcilla se mezclaron en la fase acuosa de la

emulsión y se agitó magnéticamente a 500 rpm durante 30 min hasta alcanzar la completa disolución. Posteriormente, se siguió la metodología descrita en la sección 2.3.3 para la preparación de las microesferas de quitosano.

**Tabla 2.3.** Contenidos de  $KNO_3$  y Paligorskita (Pal) agregados a microesferas de QUI.

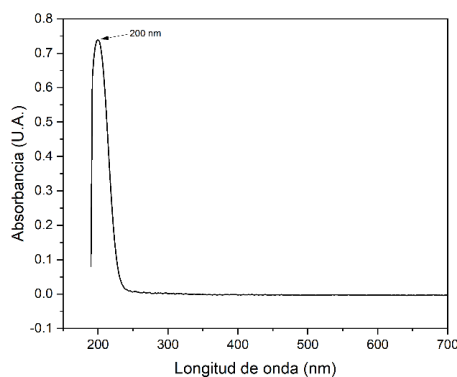
$KNO_3$ (mg)	Pal (% peso de QUI)
100	0
100	1
100	2
100	4
100	5

## 2.4 Proceso para determinar la cantidad de $NO_3^-$ y $K^+$ capturado en las microesferas

### 2.4.1 Curva de calibración de $NO_3^-$

El procedimiento para determinar la cantidad de nitratos capturado en las microesferas mediante espectrofotometría UV-Vis [112], requiere de una curva de calibración a base de un estándar del  $KNO_3$ . Para esto se preparó una solución madre de nitratos con 81.5 mg de  $KNO_3$  grado reactivo en 500 mL de agua destilada (pH = 7.4). A partir de esta solución madre que contiene 100 mg/L de  $NO_3^-$  se preparó una dilución con una concentración de 5 mg/L y se registró su espectro en un espectrofotómetro UV-Vis marca A&E modelo AE-UV1608, el rango de absorción de 190 a 700 nm; en este intervalo se debe detectar la longitud de onda máxima de absorción UV-Vis del nitrato en solución acuosa (figura 2.1); ésta debe encontrarse alrededor de  $\lambda = 200$  nm.

El intervalo de detección para nitratos libres de materia orgánica se encuentra entre 200 y 210 nm, en el presente estudio se utilizó la lectura a 205 nm por su menor sensibilidad a la presencia de materia orgánica [113].



**Figura 2.1.** Longitud de onda de absorción de nitrato de una solución acuosa de 5 mg/L de nitrato.

De la solución madre (81.5 mg de  $\text{KNO}_3$ /500 mL de agua destilada que equivale a 100 mg/L de  $\text{NO}_3^-$ ) se preparan diluciones que contengan 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12 mg/L de nitrato y se determinaron sus respectivas absorbancias a la longitud de onda UV-Vis de máxima de absorción de  $\text{NO}_3^-$  seleccionada. Se utilizó agua destilada sin nitratos como blanco. La curva de calibración de nitratos por espectrofotometría UV-Vis se obtuvo graficando la absorbancia de las diluciones en función de la concentración de  $\text{NO}_3^-$  y realizando un análisis de regresión lineal. De esta forma, el valor de la absorbancia UV-Vis de una solución problema puede usarse para cuantificar la concentración de  $\text{NO}_3^-$  presente en esta solución problema al comparar la intensidad de su señal con la curva de calibración; si la señal de esta solución problema rebasa el intervalo de nitratos aceptados por la curva de calibración, será necesario diluirla y multiplicar el resultado por el factor de dilución correspondiente.

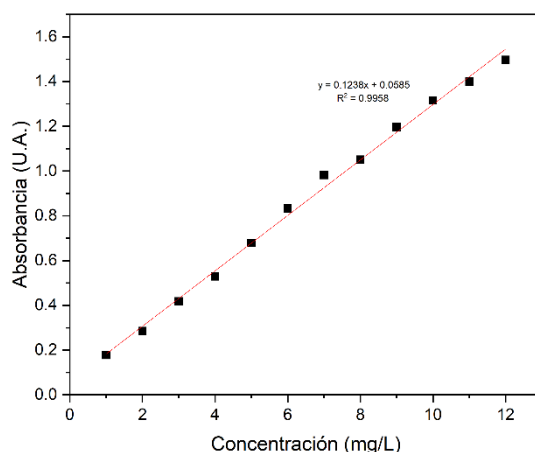
La curva de calibración de nitrato (figura 2.2) se encuentra en un intervalo de concentraciones de 0 a 12 mg/L, con un valor de correlación de  $R^2 = 0.9958$ . La ecuación 2.1 corresponde a la regresión que relaciona la concentración de nitratos con su absorbancia a 205 nm.

$$y = 0.1238x + 0.0585 \quad (2.1)$$

donde  $y$  es la absorbancia,  $x$  la concentración de nitrato (en mg/L), 0.1238 la pendiente de la curva y 0.0585 la ordenada al origen. La concentración de nitratos (en mg/L) presente en una muestra se calcula con la ecuación 2.2.

$$x = \frac{y - 0.0585}{0.1238} \quad (2.2)$$

La cantidad de  $\text{NO}_3^-$  (en mg) presente en una muestra específica se obtiene al multiplicar la concentración de  $\text{NO}_3^-$  calculada con la ecuación 2.2 por el volumen de la muestra (en L); en caso de que la concentración esté fuera del intervalo de concentraciones estudiado, se requerirá una dilución y este factor de dilución deberá aplicarse para el cálculo de la cantidad de  $\text{NO}_3^-$  (en mg).



**Figura 2.2.** Curva de calibración de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>.

### 2.4.2 Curva de calibración de K<sup>+</sup>

La cantidad de potasio capturado en las microesferas se evaluó usando espectroscopía de absorción atómica en un espectrómetro de absorción atómica Perkin Elmer, modelo AAnalyst 200, con señal de absorción atómica y lámpara de potasio. El primer paso fue construir una curva de calibración. Los materiales de vidrio y plástico a utilizar en las lecturas de potasio (tubos de ensayo, matraces aforados, vasos de precipitados y puntas de micropipetas) se remojaron previamente en una solución acuosa de HCl al 25% (v/v) por 24 h, se enjuagaron dos veces con agua destilada y se secaron en una estufa a 65°C por 8h. Una solución estándar de cobre (grado absorción atómica) de 1000 ppm se usó para calibrar el espectrómetro y una solución estándar de potasio (grado absorción atómica) de 1000 ppm se usó para preparar diluciones acuosas a 0, 0.1, 0.2, 0.5, 1.5 y 2 mg/L de K<sup>+</sup>; estas diluciones fueron usadas para construir una curva de calibración en un intervalo de 0-2 mg/L de K<sup>+</sup>. A cada dilución se agregó cloruro de lantano al 10% (p/v) para eliminar la posible interferencia de otros iones.

Esta técnica determina la concentración de K<sup>+</sup> en una solución problema acuosa de hasta 2 mg/L de K<sup>+</sup>; si la lectura excede esta concentración, se requiere diluir la solución problema y el factor de dilución correspondiente se usará para calcular la concentración real de K<sup>+</sup> (en mg) en la solución problema (en L).

El espectrofotómetro de absorción atómica requiere una curva de calibración cada vez que se caracterice un lote de microesferas para proporcionar una lectura adecuada del K<sup>+</sup>.

### **2.4.3 Método para determinar la cantidad de $\text{NO}_3^-$ y $\text{K}^+$ capturados en microesferas de QUI y PLA**

La determinación de la cantidad de nitrato y potasio capturados en las microesferas depende del tipo de matriz polimérica. En el caso del PLA se analizó la fase acuosa de la emulsión después de la precipitación de las microesferas, ésta se centrifugó a 1,500 rpm durante 20 min, se filtró con papel filtro Whatman; una alícuota de la solución acuosa sobrenadante se analizó por espectrofotometría UV-Vis para los nitratos y por espectroscopía de absorción atómica para el potasio. La cantidad de  $\text{NO}_3^-$  (en mg) se calculó multiplicando la concentración de  $\text{NO}_3^-$  obtenida a partir de la curva de calibración correspondiente (ecuación 2.2) por el volumen de la fase acuosa de la emulsión (0.1 L, sección 2.4.1) y la cantidad de  $\text{K}^+$  (en mg) se calculó multiplicando la concentración de potasio reportada espectrofotómetro de absorción atómica (en mg/L) por el volumen de la fase acuosa de la emulsión (0.1 L, sección 2.4.2).

En el caso de las microesferas de QUI, el nitrato y potasio se extrajeron de éstas. Para ello, se trituró una cantidad conocida de las microesferas (100 mg), se dispersaron en 200 mL de agua destilada (pH =7.4) durante 24 h. La dispersión acuosa se centrifugó a 1,500 rpm durante 20 min, se filtró con papel filtro Whatman y se tomó una alícuota de la solución acuosa sobrenadante para su análisis por espectrofotometría UV-Vis para el  $\text{NO}_3^-$  y por espectroscopía de absorción atómica para el  $\text{K}^+$ . La cantidad de  $\text{NO}_3^-$  (en mg) se calculó multiplicando la concentración de  $\text{NO}_3^-$  obtenida a partir de la curva de calibración correspondiente (ecuación 2.2) por el volumen de agua usado en la dispersión (0.2 L) y la cantidad de  $\text{K}^+$  (en mg) se calculó multiplicando la concentración de potasio reportado en el espectrofotómetro de absorción atómica (en mg/L) por el volumen de agua destilada usado en la dispersión (0.2 L).

## **2.5 Estudio de las condiciones de obtención de las microesferas de quitosano**

### **2.5.1 Incorporación de $\text{KNO}_3$ en microesferas de quitosano**

La evaluación de la forma de incorporar el principio activo en las microesferas de quitosano se determinó por dos formas. Mediante incorporación directa *in situ* y mediante absorción pasiva de una solución acuosa de nitrato de potasio.

La incorporación directa del principio activo durante la emulsión se realizó agregando 0.1 g de nitrato de potasio triturados en un mortero a la solución ácida acuosa de quitosano y se agitaron magnéticamente a 500 rpm durante 30 min. Posteriormente, se continuó con la metodología descrita en la sección 2.3.3 para la preparación de las microesferas de quitosano. De las microesferas preparadas, 50 mg fueron trituradas en un mortero y se depositaron en 100 mL de

agua destilada para extraer por difusión los nitratos y el potasio. A las 24 h, se tomaron 5 mL del líquido sobrenadante y se analizaron por espectrofotometría UV-Vis para determinar la cantidad de nitrato y por espectroscopía de absorción atómica la cantidad de potasio (sección 2.4.3). El contenido del principio activo ( $\text{NO}_3^-$  o  $\text{K}^+$ ) capturado en las microesferas se determinó usando la ecuación 2.3 [114]:

$$\text{CID (\%)} = \frac{(m_{ms}) \cdot \left( \frac{m'_{PA}}{m_{ms}} \right)}{m_{PA}} \times 100 \quad (2.3)$$

Donde CID es el contenido de principio activo por incorporación directa,  $m'_{PA}$  es la masa del principio activo en una muestra de microesferas,  $m'_{ms}$  es la masa de la muestra de microesferas,  $m_{ms}$  es la masa de todas las microesferas obtenidas en cada emulsión, y  $m_{PA}$  es la masa del principio activo usada en cada emulsión.

La incorporación del nitrato de potasio por absorción pasiva en las microesferas se realizó a partir de una solución acuosa de nitrato de potasio. Se utilizaron 100 mg de microesferas de quitosano preparadas con las condiciones establecidas en la sección 2.3.3 y se pusieron en contacto por 4 días con 100 mL de una solución acuosa de nitrato de 100 mg/L preparada al disolver 81.5 mg de  $\text{KNO}_3$  en 500 mL de agua destilada. Posteriormente, las microesferas tratadas se recuperaron por filtración y se secaron en una estufa de convección a  $80^\circ\text{C}$  por 24 h. La solución acuosa de nitratos se analizó por espectrofotometría UV-Vis y espectroscopía de absorción atómica para obtener la cantidad de nitratos y potasio, respectivamente (sección 2.4.3). El contenido del principio activo ( $\text{NO}_3^-$  o  $\text{K}^+$ ) en las microesferas, corresponde a la diferencia entre la cantidad de nitrato/potasio agregado durante la absorción pasiva de las microesferas y la cantidad de nitrato/potasio remanente en el sobrenadante acuoso después de la absorción pasiva de las microesferas [115]; siguiendo la ecuación 2.4:

$$\text{CAP (\%)} = \left[ \frac{(m_{\text{NO}_3\text{K-AS}}) - (m_{\text{NO}_3\text{K-RS}})}{(m_{\text{NO}_3\text{K-AS}})} \right] \times 100 \quad (2.4)$$

donde CAP es el contenido de principio activo por absorción pasiva,  $m_{\text{NO}_3\text{K-AS}}$  la masa del principio activo agregada a la solución de inmersión y  $m_{\text{NO}_3\text{K-RS}}$  es la masa del principio activo remanente en el sobrenadante de la solución después de la inmersión.



### 2.5.2 Evaluación de la velocidad de agitación

Se estudió el efecto de la velocidad de agitación usada durante el proceso de obtención de las microesferas de quitosano sobre el tamaño de partícula de las microesferas. Para ello se evaluaron tres niveles de velocidad de agitación: 420, 1320 y 1800 rpm. Los parámetros del proceso de obtención de las microesferas que se mantuvieron constantes fueron cantidad de quitosano (500 mg), cantidad de aceite de parafina (40 mL), de tensoactivo span80 (56.4 mg) y entrecruzante de glutaraldehído (950  $\mu$ L) descritas en la sección 2.3.3. De igual forma, las microesferas se caracterizaron mediante microscopía óptica y analizador de tamaño de partícula para determinar el efecto de la velocidad de agitación sobre el tamaño y distribución de tamaños de las microesferas obtenidas.

### 2.5.3 Evaluación de la cantidad de quitosano y tensoactivo

Se estudió el efecto de la cantidad de quitosano y tensoactivo sobre el rendimiento, el tamaño promedio de partícula y la distribución de tamaños de partícula de las microesferas de quitosano. Los parámetros que se mantuvieron constantes fueron: 40 mL de aceite mineral, 950  $\mu$ L de glutaraldehído y 1,800 rpm de velocidad de agitación. Este estudio consistió en un diseño experimental factorial  $2^2$ , cuya configuración de factores, sus niveles y las formulaciones se presentan en la tabla 2.4. El diseño se realizó con el software Minitab (versión 8, Minitab, LLC).

*Tabla 2.4. Configuración experimental del diseño factorial.*

Formulación	Quitosano (mg)	Span80 (mg)	Niveles	
F1	400	56.4	-	-
F2	400	100	-	+
F3	500	56.4	+	-
F4	500	100	+	+

Los experimentos del diseño experimental factorial se realizaron de forma aleatoria y por triplicado, siguiendo el orden establecido por la matriz de diseño experimental (tabla 2.5).

**Tabla 2.5.** Matriz de diseño experimental factorial.

Orden Estándar	Orden de Ejecución	Quitosano (mg)	Span80 (mg)
2	1	500	56.4
1	2	400	56.4
9	3	400	56.4
11	4	400	100
5	5	400	56.4
12	6	500	100
6	7	500	56.4
10	8	500	56.4
8	9	500	100
3	10	400	100
4	11	500	100
7	12	400	100

Las variables de respuesta (control) para este diseño experimental fueron el diámetro de partícula y el rendimiento, calculado de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{\text{Microesferas obtenidas después del secado (mg)}}{\text{Material inicial utilizado (mg)}} \times 100 \quad (2.5)$$

#### 2.5.4 Evaluación de la cantidad de glutaraldehído

Se estudió el efecto del contenido de entrecruzante (glutaraldehído) sobre el rendimiento, su morfología y el tamaño de partícula. Para este fin los parámetros que se mantuvieron constantes fueron: ácido acético 2% (V/V), 40 mL de aceite de parafina, 100 mg Span80 y velocidad de agitación de 1,800 rpm (con la que se obtuvieron tamaños promedio de partícula menores a 200 µm). Las cantidades utilizadas de glutaraldehído se presentan en la tabla 2.6.

**Tabla 2.6.** Glutaraldehído utilizado en la experimentación.

Tratamiento	Glutaraldehído (µL)
1	240
2	320
3	475
4	950
5	1,900
6	3,800

#### 2.5.5 Condiciones de preparación de las microesferas híbridas de quitosano con diferentes contenidos de paligorskita y KNO<sub>3</sub> (diseño experimental factorial)

Las condiciones de preparación de las microesferas de quitosano como son la cantidad de quitosano, de tensoactivo, de entrecruzante y la velocidad de agitación presentadas en la tabla

2.7 son las que producen las microesferas con el mayor rendimiento, baja dispersión de tamaños y morfología esférica (sección 2.3.4).

**Tabla 2.7.** Condiciones experimentales para la preparación de microesferas de quitosano.

Componente	Cantidad
Quitosano	0.5 g
Span80	100 mg
Glutaraldehído	240 $\mu$ L
Aceite de parafina	40 mL
Agitación	1,800 rpm

La adición directa de la paligorskita purificada y del nitrato de potasio durante la preparación de las microesferas de quitosano afectan el tamaño, la morfología de las microesferas, el rendimiento y la cantidad de nitrato y potasio capturados. Para evaluar estos efectos en las microesferas se planteó un diseño experimental estadístico. Por tal motivo, se creó un diseño experimental factorial completo (tabla 2.8) con en el software Minitab. Tomando como base las condiciones experimentales de la tabla 2.5 se escogieron dos factores: cantidad de paligorskita y cantidad de  $\text{KNO}_3$  y se seleccionaron cuatro niveles para estos factores, los cuales se definieron con base a los resultados de un estudio preliminar (sección 2.3.3.1).

**Tabla 2.8.** Factores y niveles del diseño experimental.

Factor	Niveles			
Paligorskita (% p/p)	0	0.5	1	2
$\text{KNO}_3$ (mg)	0	50	100	200

Las variables de respuesta evaluadas fueron el rendimiento, el tamaño promedio de éstas y la cantidad de nitrato y de potasio capturados por las microesferas (tabla 2.9). La matriz del diseño experimental factorial completo con sus repeticiones (tabla 2.10) se evaluó con un análisis de comparación de medias mediante pruebas de Tukey con  $p < 0.05$ .

**Tabla 2.9.** Variables de respuesta del diseño factorial.

Variable de respuesta	Unidades
Rendimiento	%
Intervalo de tamaño	$\mu$ m
Nitrato atrapado	%
Potasio atrapado	%

**Tabla 2.10.** Matriz de diseño del diseño factorial completo.

Orden Estándar	Orden de Ejecución	Paligorskita (%p/p)	KNO <sub>3</sub> (mg)	Orden Estándar	Orden de Ejecución	Paligorskita (%p/p)	KNO <sub>3</sub> (mg)
36	1	0.0	200	3	25	0.0	100
18	2	0.0	50	10	26	1.0	50
29	3	2.0	0	43	27	1.0	100
4	4	0.0	200	6	28	0.5	50
12	5	1.0	200	27	29	1.0	100
7	6	0.5	100	41	30	1.0	0
2	7	0.0	50	1	31	0.0	0
32	8	2.0	200	44	32	1.0	200
24	9	0.5	200	5	33	0.5	0
17	10	0.0	0	37	34	0.5	0
30	11	2.0	50	14	35	2.0	50
22	12	0.5	50	19	36	0.0	100
38	13	0.5	50	33	37	0.0	0
40	14	0.5	200	20	38	0.0	200
28	15	1.0	200	13	39	2.0	0
42	16	1.0	50	31	40	2.0	100
47	17	2.0	100	39	41	0.5	100
11	18	1.0	100	35	42	0.0	100
26	19	1.0	50	15	43	2.0	100
16	20	2.0	200	23	44	0.5	100
9	21	1.0	0	48	45	2.0	200
46	22	2.0	50	25	46	1.0	0
45	23	2.0	0	34	47	0.0	50
21	24	0.5	0	8	48	0.5	200

Se seleccionaron las formulaciones de microesferas de quitosano con altos rendimientos, distribución de tamaño de partícula estable, morfología superficial esférica, altas cantidades de nitrato y potasio capturados para las pruebas de liberación de nitrato y potasio.

## 2.6 Caracterización de las microesferas

### 2.6.1 Análisis estructural y diámetros de las microesferas por microscopía óptica

Las microesferas de quitosano, alginato de sodio y poli(ácido láctico) se observaron en un microscopio óptico Leica DMLM, para ello, una pequeña cantidad de las microesferas secas se suspendió en aceite de parafina y se observó con diferentes objetivos (10X y 20X). Se tomaron 10 fotos a un aumento de 10X por muestra y se realizaron 150 mediciones del diámetro de las microesferas con el software ImageJ (National Institutes of Health, USA, versión 1.53f51). A partir de estas mediciones se generaron los histogramas de frecuencia de los diámetros.

### **2.6.2 Tamaños de partícula de las microesferas**

La medición del diámetro de partícula de las microesferas y su distribución se realizaron con el analizador de tamaño de partículas Coulter (Coulter LS100Q) [109]. Para esto se depositó una pequeña cantidad de microesferas en la celdilla de lectura, usando el medio de dispersión que evitara la aglomeración de las microesferas; para las de PLA se utilizó agua destilada y para las de QUI etanol al 70%. Se ajustó el equipo a una obscuración de 8-12%, con un tiempo de prueba de 60 s. Se realizaron tres corridas por muestra con un intervalo de lectura de 0.4 – 1000  $\mu\text{m}$ .

### **2.6.3 Análisis superficial de las microesferas por microscopía electrónica de barrido**

Las microesferas se caracterizaron por microscopía electrónica de barrido en un microscopio JEOL modelo JSM-6360 LV. Para el análisis, se depositó una pequeña cantidad de microesferas sobre el porta muestras circular del MEB con cinta adhesiva doble cara de carbono, la muestra se metalizó por sputtering con un recubrimiento de oro de 1-100 nm de espesor. La observación de la muestra se realizó con un voltaje de 20 kV en modo de detección de análisis de electrones secundarios (SEI), a diferentes aumentos para la observación superficial y la detección de la nanoarcilla de paligorskita.

### **2.6.4 Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier**

La caracterización de la composición química de las microesferas se realizó por espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier en un espectrofotómetro Thermo Scientific Modelo Nicolet 8700. El análisis de la muestra fue por transmisión, por lo que se elaboraron pastillas con una mezcla de 100 mg de KBr y 1 mg de microesferas secas que se trituraron en un mortero de ágata, en seguida se introdujo la mezcla en un pastillador y se aplicó una presión de 4 ton durante 7 min; las pastillas generadas se guardaron en un desecador. La lectura de cada muestra se obtuvo en un intervalo de número de onda de 4000 – 400  $\text{cm}^{-1}$ , con una resolución de 1  $\text{cm}^{-1}$  y un promedio de 100 barridos.

### **2.6.5 Difracción de Rayos X**

La caracterización cristalográfica de las microesferas se realizó en un difractómetro de rayos X marca BRUKER, modelo D2 Phaser, con un ánodo de cobre  $\text{K}\alpha_1$  ( $\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$ ), operado con corriente de 10 mA y un voltaje de 30 kV. Las condiciones para las muestras en polvo fueron: barrido  $2\theta$  de 3 a  $60^\circ$ , tamaño de paso de  $0.02^\circ$  y 1.5 s de tiempo de paso.

## 2.7 Cinética de liberación de $\text{NO}_3^-$ y $\text{K}^+$ en microesferas híbridas de QUI/PaI/ $\text{KNO}_3$

100 mg de microesferas de quitosano previamente preparadas con paligorskita y  $\text{KNO}_3$  se colocaron en un vaso de precipitados con 200 mL de agua destilada a un pH de 7.4 y  $37 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  y se agitaron magnéticamente. Alícuotas de 5 mL del sobrenadante se extrajeron a cada hora durante las primeras 6h de iniciada la inmersión, reemplazando cada alícuota con el mismo volumen de agua destilada. Posteriormente, se colectaron 5 mL del sobrenadante cada 24 h durante 30 días, reponiendo el volumen del medio acuoso. Las alícuotas del sobrenadante se analizaron por espectroscopía UV-Vis y espectroscopía de absorción atómica para determinar la cantidad de nitrato y potasio liberado, respectivamente (sección 2.4.3). Como control, este procedimiento se aplicó a una cantidad de  $\text{KNO}_3$  equivalente a la cantidad de nitrato y potasio contenido en las microesferas (5 mg  $\text{KNO}_3$  en 200 mL de agua destilada).

La curva de liberación de  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{K}^+$  se obtuvo empleando la ecuación 2.6 [116], la cual calcula la liberación acumulada de  $\text{NO}_3^-$  o  $\text{K}^+$ , tomando en cuenta la contribución de la cantidad de los iones presentes en las alícuotas de 5 mL ( $V_a$ ) que se retiraron del medio de liberación ( $V_{ml} = 200 \text{ mL}$ ) en cada uno de los tiempos experimentales.

$$\text{Porcentaje de liberación acumulada (\%)} = \frac{V_a \text{ (mL)}}{V_{ml} \text{ (mL)}} \cdot P_{(t-1)} + P_t \quad (2.6)$$

donde  $V_a$  es el volumen de la alícuota,  $V_{ml}$  es el volumen del medio de liberación usado,  $P_t$  es el porcentaje liberado del principio activo ( $\text{NO}_3^-$  o  $\text{K}^+$ ) al tiempo  $t$  (ecuación 2.7) y  $P_{(t-1)}$  es el porcentaje liberado del principio activo ( $\text{NO}_3^-$  o  $\text{K}^+$ ) previo al tiempo  $t$ .

$$P_t (\%) = \frac{m_{\text{NO}_3\text{K}-t}}{m_{\text{NO}_3\text{K}-T}} \times 100 \quad (2.7)$$

donde  $m_{\text{NO}_3\text{K}-t}$  es la masa del principio activo ( $\text{NO}_3^-$  o  $\text{K}^+$ ) liberado por las microesferas al tiempo  $t$ ,  $m_{\text{NO}_3\text{K}-T}$  es la masa del principio activo total ( $\text{NO}_3^-$  o  $\text{K}^+$ ) presente en 100 mg de microesferas, ambos determinados por los métodos de la sección 2.4.3.

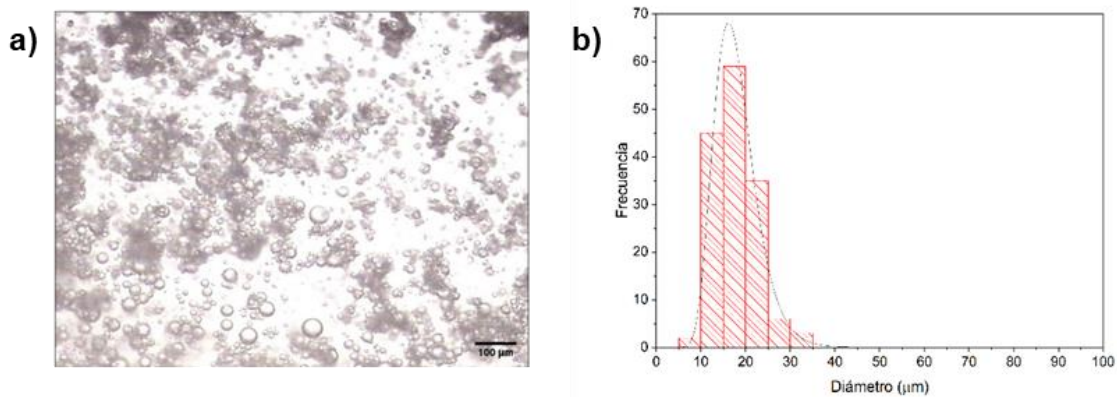
## CAPÍTULO 3

### RESULTADOS

#### 3.1 Microesferas de alginato

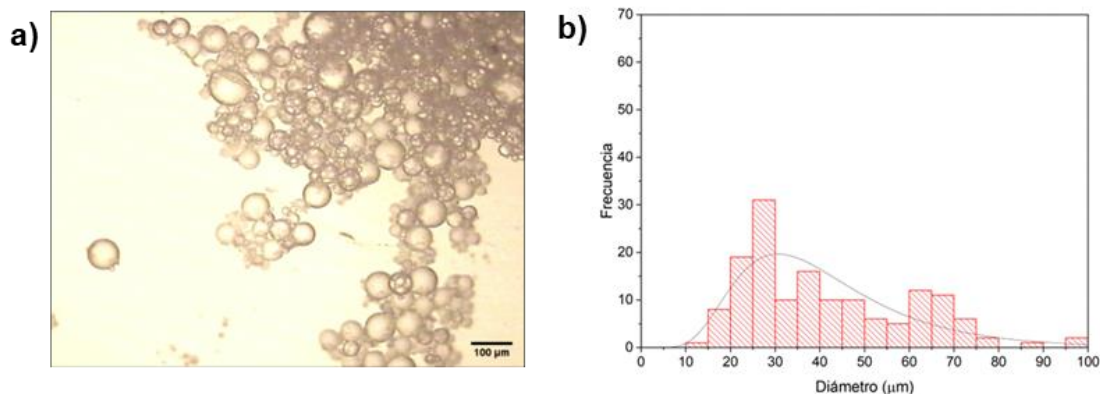
##### 3.1.1 Obtención de microesferas de alginato

El proceso de obtención de las microesferas de alginato de sodio por la técnica de emulsificación con gelificación iónica con la metodología inicial (sección 2.3.1) generó microesferas con aspecto esférico, con contornos suaves que se encontraron aglomeradas (figura 3.1a) y con consistencia de un gel. El conteo de los diámetros de las microesferas (150 mediciones) por el método de microscopía óptica (figura 3.1b) indicó que las microesferas presentaron una distribución de diámetros entre 5 y 35  $\mu\text{m}$ , con un diámetro promedio de 20  $\mu\text{m}$  ( $\pm 4.65 \mu\text{m}$ ).



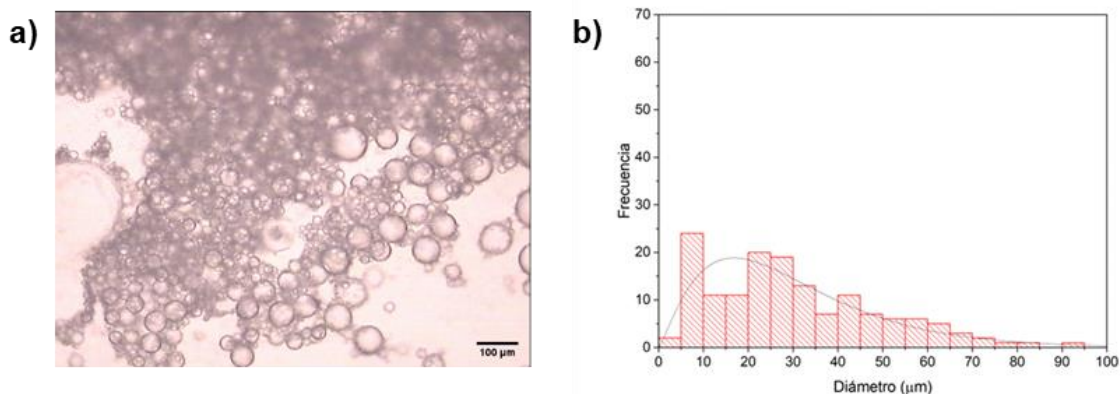
**Figura 3.1.** a) Micrografía óptica a 10X y b) Histograma de diámetro de microesferas de alginato procesadas a 700 rpm.

A partir de este resultado y con el objetivo de mejorar las características morfológicas de las microesferas de alginato, así como su diámetro promedio de partícula y su distribución, se variaron algunos de los parámetros anteriores del proceso de obtención de las microesferas, como la velocidad de agitación (figura 3.2a, 3.2b) y el contenido de alginato (figura 3.3a, 3.3b). La velocidad de agitación se disminuyó de 700 a 500 rpm, manteniendo el contenido de alginato al 3% (p/v). Bajo estas condiciones se observaron microesferas aglomeradas (figura 3.2a) con morfología esférica y bordes lisos; el diámetro de las microesferas (figura 3.2b), aumentó con respecto al valor anterior y su distribución varió de 10 a 100  $\mu\text{m}$  con un diámetro promedio de 41  $\mu\text{m}$  ( $\pm 18.59 \mu\text{m}$ ).



**Figura 3.2.** a) Micrografía óptica de microesferas de Alg a 10X y b) Histograma de diámetros de microesferas de alginato procesados a 500 rpm.

Igualmente, se disminuyó la cantidad de alginato utilizado durante la obtención de las microesferas de 3 a 1.5% (p/v) y se utilizó una velocidad de agitación de 500 rpm. En esta ocasión, se observó un cambio en el diámetro de las microesferas, pero no en su distribución. Las microesferas se observaron dispersas (figura 3.3a), con morfología esférica y bordes lisos; el diámetro de las microesferas (figura 3.3b) tuvo una distribución entre 0 y 100 μm con un diámetro promedio de 30 μm ( $\pm 18.96 \mu\text{m}$ ).



**Figura 3.3.** a) Micrografía de microesferas de Alg a 10X y b) Histograma de diámetros de microesferas de alginato procesados con 1.5% (p/v) alginato y una velocidad de agitación de 500 rpm.

De acuerdo con los resultados observados, al disminuir la velocidad de agitación, aumentó el diámetro de las microesferas debido a una disminución de los esfuerzos de corte en la emulsión. Al disminuir el contenido de alginato y disminuir la velocidad de agitación, se promovió una



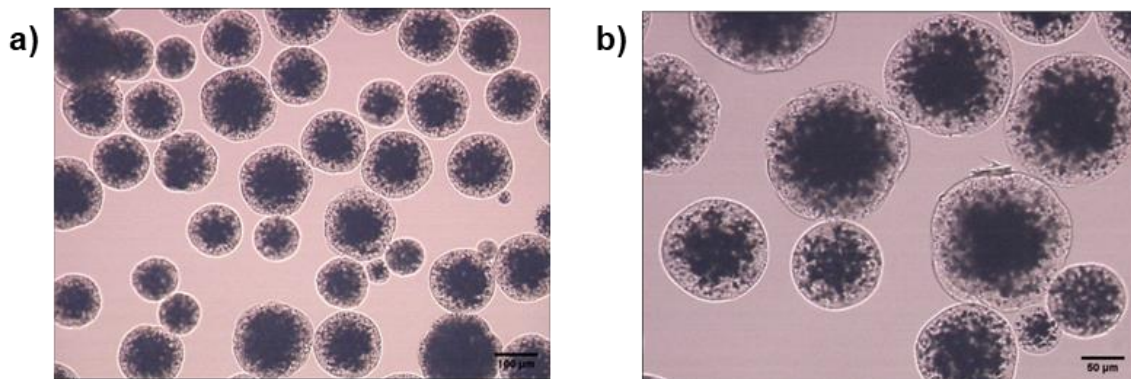
disminución de la viscosidad del polímero durante el proceso de emulsificación lo que resultó en una disminución del diámetro promedio.

Las microesferas de alginato presentaron un estado gelificado, alta aglomeración entre partículas y una baja resistencia mecánica, lo que impidió medir su tamaño vía Coulter (sección 2.4.2). En consecuencia, este sistema polimérico resultó poco viable para emplearlo como sistema de liberación controlada de fertilizantes. Estos inconvenientes podrían ser superados con un estudio a profundidad de las condiciones de procesamiento de las microesferas de alginato, como ha sido explorado por Nguyen y col. [44] y Uyen y col. [47], que podrían aplicarse a las microesferas de alginato obtenidas en esta investigación y la determinación del efecto de las cantidades de paligorskita y  $\text{KNO}_3$  en dichas condiciones de procesamiento y su comportamiento de liberación de nitrato y potasio.

## 3.2 Microesferas de poli(ácido láctico)

### 3.2.1 Preparación de microesferas de poli(ácido láctico)

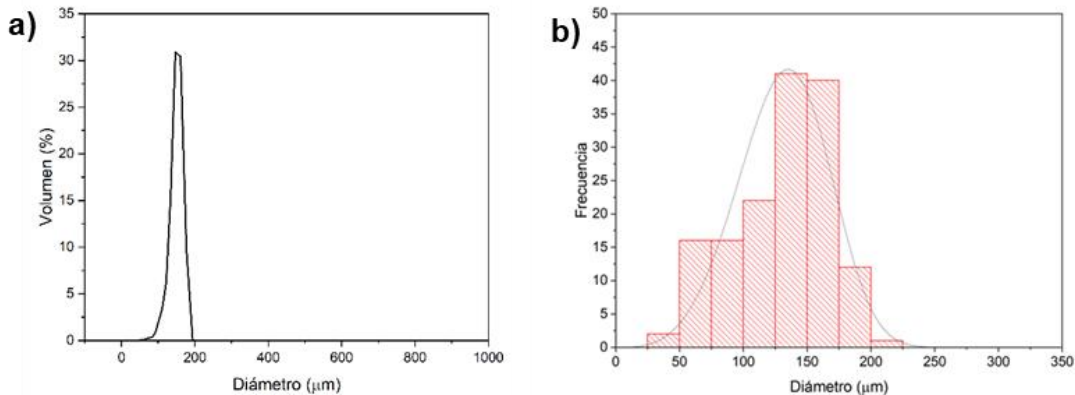
El proceso de emulsificación y evaporación de solvente es una técnica muy utilizada para la obtención de microesferas de PLA, principalmente en el área de liberación de fármacos. Su uso en el área agrícola como sistema de liberación de fertilizantes implica lograr la formación de partículas esféricas, con tamaño controlado y altamente dispersas. Los resultados experimentales indican que la metodología inicial de la sección 2.3.2 generó microesferas de PLA con una morfología esférica con bordes lisos y una buena dispersión (figura 3.4a, 3.4b); las microesferas presentaron estabilidad en los tamaños de partícula obtenidos, lo que favorecen su utilización como sistema de liberación de principios activos.



**Figura 3.4.** Micrografías de microesferas de poli(ácido láctico) con aumentos de a) 10X y b) 20X.

### 3.2.1.1 Distribución de tamaño de microesferas de poli(ácido láctico)

Las microesferas de PLA presentaron una morfología esférica y su distribución de diámetros obtenida por el analizador de tamaño de partícula Coulter (figura 3.5a) mostró que se encuentra entre 50 y 200  $\mu\text{m}$  con un diámetro promedio de 154  $\mu\text{m}$  ( $\pm 12.30$ ). Este mismo parámetro, pero medido por microscopía óptica (figura 3.5b) presentó un tamaño de partícula en el intervalo de 25 y 225  $\mu\text{m}$ , con un tamaño promedio de 128  $\mu\text{m}$  ( $\pm 21.15 \mu\text{m}$ ). De acuerdo con lo anterior, se obtuvieron resultados similares con ambas técnicas, lo que indica que el proceso de medición por Coulter no fue afectado por aglomeraciones de las partículas en la celdilla de observación y que el medio acuoso utilizado contribuyó a una lectura consistente.



*Figura 3.5. Distribución de tamaño de partícula de microesferas de PLA mediante a) Analizador Coulter y b) Microscopía óptica.*

### 3.2.1.2 Rendimiento de microesferas de poli(ácido láctico)

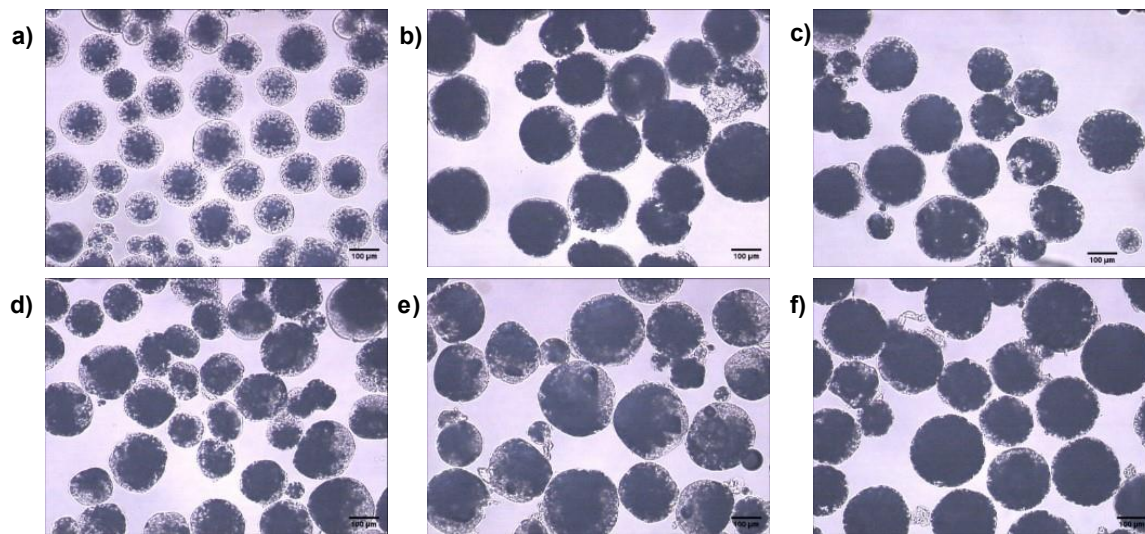
El rendimiento de las microesferas de PLA se calculó con la ecuación 2.3 y demuestra que las microesferas presentaron un rendimiento del 91%, por lo que la mayor parte del material usado se recuperó en forma de microesfera. Los altos rendimientos indicaron que el proceso de obtención fue altamente eficiente.

## 3.2.2 Microesferas híbridas de poli(ácido láctico)/paligorskita y fertilizante

### 3.2.2.1 Morfología superficial de microesferas híbridas PLA/Pal/ $\text{KNO}_3$

Uno de los aspectos más importantes en el desarrollo de un sistema de liberación de fertilizantes es el control de la morfología de las partículas durante el proceso de preparación. Se ha reportado que en la técnica de emulsión y evaporación de solvente, la morfología de las partículas se ve fuertemente influenciada por el proceso de evaporación del solvente.

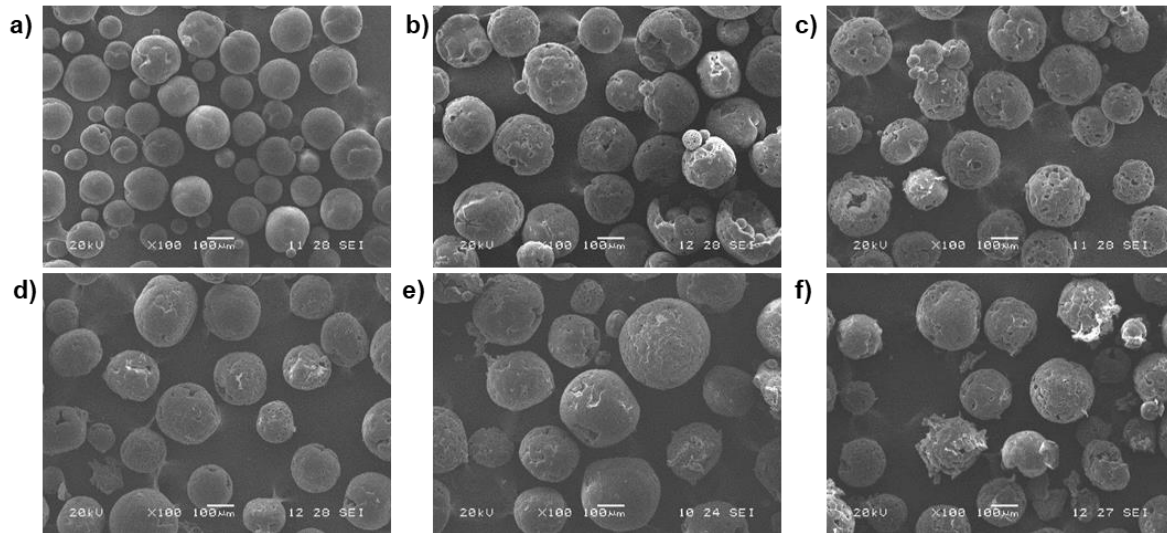
Las figuras 3.6(a-f) presentan las micrografías ópticas de las microesferas preparadas por el método de emulsión con evaporación de solvente (sección 2.3.2.1). La figura 3.6a corresponde a las microesferas de PLA, las cuales presentaron un aspecto esférico, con buena dispersión y sin presencia de aglomeración. Al agregar el principio activo ( $\text{KNO}_3$ ) se observó un incremento del tamaño de algunas de las microesferas (figura 3.6b) y conservaron la morfología esférica, sin presencia de aglomerados. El efecto de la presencia de la paligorskita en las microesferas (figura 3.6c-f) sobre su morfología no es perceptible; tanto el tamaño de partícula como en su dispersión, son similares a los de las microesferas con el principio activo.



**Figura 3.6.** Micrografías ópticas de las microesferas de a) PLA, b) PLA +  $\text{KNO}_3$ , c) PLA +  $\text{KNO}_3$  + 1%Pal, d) PLA +  $\text{KNO}_3$  + 2%Pal, e) PLA +  $\text{KNO}_3$  + 4%Pal y f) PLA +  $\text{KNO}_3$  + 5%Pal.

La microscopía electrónica de barrido es una técnica que permite observar la morfología superficial de las partículas con aumentos mayores a los obtenidos mediante microscopía óptica y con la ventaja de un mayor nivel de detalle. La figura 3.7 presenta las micrografías electrónicas de las microesferas de PLA preparadas por el método de emulsión con evaporación del solvente. Las microesferas de solo PLA (figura 3.7a) presentaron una morfología esférica, aspecto liso, dispersas, sin presencia de grietas o porosidades. Cuando se agregó el  $\text{KNO}_3$ , las microesferas (figura 3.7b) presentaron una morfología esférica, mayores tamaños de partícula, con irregularidades superficiales y poros, lo que indica que el ingrediente activo en contacto con la matriz de PLA provoca inestabilidad en el proceso de formación de las esferas. Cuando se agrega a la emulsión  $\text{KNO}_3$  y 1% de arcilla (figura 3.7c), la morfología de las microesferas híbridas siguió siendo similar a las esferas sin arcilla, con irregularidades superficiales, dispersas y porosas. Las microesferas con 2% de arcilla y el principio activo (figura 3.7d) mostraron una morfología similar

a las esferas preparadas con el 1% de arcilla. Las microesferas de PLA preparadas con  $\text{KNO}_3$  y 4 y 5% de arcilla (figura 3.7e, f) mostraron una morfología similar a las esferas con concentraciones menores de arcilla; sin embargo, se encontraron microesferas que no se formaron completamente depositadas sobre la superficie de otras microesferas.



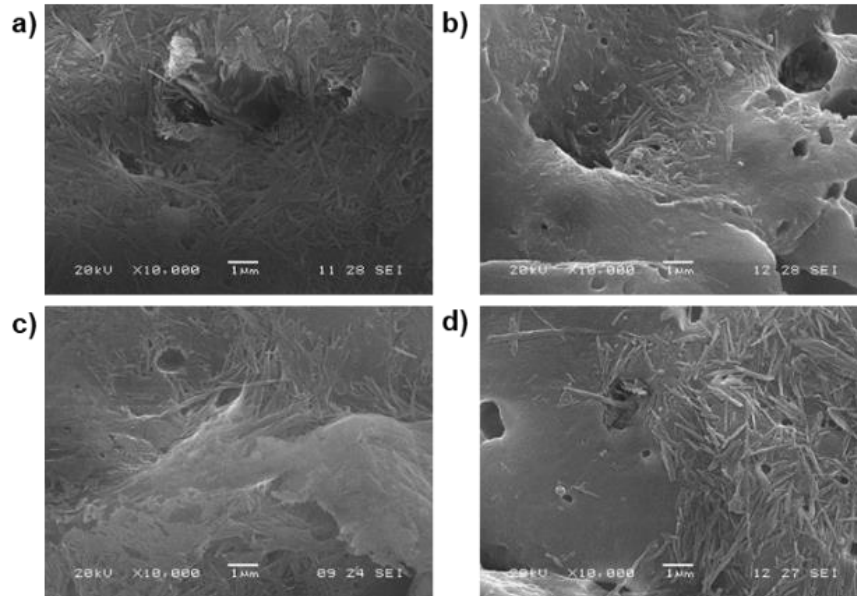
**Figura 3.7.** Micrográficas electrónicas a 100x de a) PLA, b) PLA +  $\text{KNO}_3$ , c) PLA +  $\text{KNO}_3$  + 1%Pal, d) PLA +  $\text{KNO}_3$  + 2%Pal, e) PLA +  $\text{KNO}_3$  + 4%Pal y f) PLA +  $\text{KNO}_3$  + 5%Pal.

De acuerdo con los resultados de microscopía electrónica, la morfología de las microesferas de PLA presentó cambios morfológicos cuando se agregó  $\text{KNO}_3$  y paligorskita. La presencia de grietas y poros indican que la interacción entre la matriz de PLA con arcilla y el principio activo indujeron cambios en el proceso de evaporación del solvente. Estos cambios morfológicos podrían atribuirse a la naturaleza hidrofílica de la arcilla y a la alta afinidad del  $\text{KNO}_3$  con solventes polares, lo que promueve la migración del principio activo hacia la fase acuosa de la emulsión durante la formación de las microesferas. Yan y col. [117] reportaron que la presencia de nanopartículas de hidroxapatita (HAP) en microesferas de PLA indujeron a la formación de poros superficiales debido a la baja afinidad entre el PLA y la HAP, así como a la interacción entre el poli(alcohol vinílico) (tensoactivo) y la HAP en la interfaz aceite-agua de la emulsión. La mayoría de los estudios para la preparación de microesferas de PLA por emulsión y evaporación del solvente involucran la captura de fármacos y los estudios con agroquímicos (pesticidas, bioestimulantes y fertilizantes) aún son escasos. Los cambios morfológicos observados en las microesferas con el principio activo son similares a los reportados por Fuentes [118], que establece que altas cantidades de pramipexol (un fármaco para tratar la enfermedad de Parkinson) producen cambios superficiales en las microesferas, como la presencia de poros.

Estudios similares realizados por Rajkumar y col. [119] para la captura de fármacos antidepresivos usando montmorillonita en una matriz de PLA, reportaron que la morfología es dependiente del tipo de principio activo atrapado en las microesferas.

La microscopía electrónica de las microesferas de PLA proporcionó información importante acerca del tamaño de las partículas, su distribución, la presencia o ausencia de sustancias depositadas en su superficie, así como su morfología. Esta técnica también se ha empleado para la observación de estructuras en la escala nanométrica o submicrométrica como lo son nanotubos de carbono, grafeno, hojas grafénicas, etc. También, se ha empleado para la observación de minerales arcillosos como la montmorillonita (una arcilla laminar) y paligorskita (una arcilla fibrilar) por su alta capacidad de observación a grandes aumentos y el nivel de detalle obtenido [120, 121], lo que permite observar de forma directa la distribución de las nanoarcillas sobre la superficie de las microesferas.

La figura 3.8 presenta las micrografías electrónicas ampliadas de las microesferas de PLA/Pal/ $\text{KNO}_3$  con diferentes contenidos de arcilla. Las esferas con el 1% de Pal mostraron aglomeración superficial de la paligorskita, en ellas se puede observar su estructura fibrilar característica (figura 3.8a), así mismo, se observa la presencia de poros superficiales. La figura 3.8b corresponde a las microesferas con el 2% de arcilla y revelan con detalle como las arcillas se encuentran distribuidas y aglomeradas en la superficie de las mismas. Las esferas con 4 y 5% de arcilla (figura 3.8c y d, respectivamente) presentaron una morfología similar a las esferas con contenidos menores de esta arcilla; incrustaciones superficiales y una alta aglomeración de las arcillas. Estos resultados podrían indicar que las arcillas migraron hacia la superficie de las microesferas debido a la naturaleza hidrofílica de la paligorskita, ya que en el exterior de las microesferas se encuentra la fase acuosa de la emulsión.



**Figura 3.8.** Micrografías electrónicas a 10,000x de a) PLA + KNO<sub>3</sub> + 1%Pal, b) PLA + KNO<sub>3</sub> + 2%Pal, c) PLA + KNO<sub>3</sub> + 4%Pal y d) PLA + KNO<sub>3</sub> + 5%Pal.

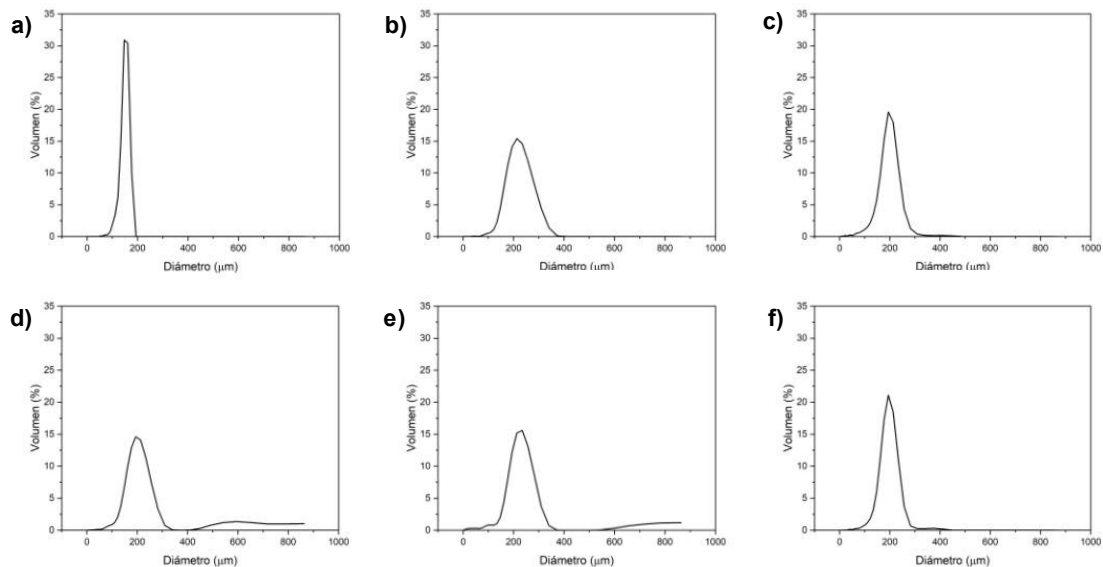
Estos resultados indican que la presencia del KNO<sub>3</sub> por sí mismo produce cambios en la morfología de las microesferas de PLA; genera poros en la superficie de las microesferas en todos los niveles de arcilla evaluados. La arcilla por su parte, presentó una migración hacia la superficie de las microesferas, con alto nivel de aglomeración e incrustada en los poros de las esferas. La interacción PLA-paligorskita se debe a la interacción entre los grupos carbonilo del PLA y los grupos OH de la arcilla mediante enlaces de puente de hidrógeno, así como la interacción interfacial entre los grupos silanol (Si-OH) de la arcilla y los grupos éster del PLA como se ha reportado por Liu y col. [122].

### 3.2.2.2 Tamaño de partícula de las microesferas híbridas PLA/Pal/KNO<sub>3</sub>

Uno de los parámetros más importantes de las microesferas para la liberación controlada de un principio activo (fármacos, aceites esenciales, pesticidas y fertilizantes) es el adecuado control sobre el tamaño y la distribución de las partículas. Es por ello que en el presente trabajo se evaluó la influencia de la paligorskita y el KNO<sub>3</sub> sobre el tamaño y la distribución de las partículas de PLA.

Las figuras 3.9(a-f) muestran las distribuciones de tamaño de las microesferas de PLA, PLA con KNO<sub>3</sub>, y PLA con KNO<sub>3</sub> y diferentes cantidades de paligorskita por el método Coulter (sección 2.4.2). Se encontró que las microesferas de PLA poseen un intervalo de tamaños entre 90 y 200  $\mu\text{m}$ , con un diámetro promedio de 154  $\mu\text{m}$  (figura 3.9a). Cuando el principio activo se añade a la

fase orgánica de la emulsión durante el proceso de obtención de las microesferas, se encontró un aumento en la distribución de tamaños (90 y 390  $\mu\text{m}$ ) y del diámetro promedio (223  $\mu\text{m}$ ) (figura 3.9b). Esto puede deberse a que el  $\text{KNO}_3$  aumentó la viscosidad de la solución polimérica, promoviendo un aumento del tamaño de partícula. Cuando las microesferas fueron preparadas con 1% de arcilla (figura 3.9c) se encontró una disminución en el tamaño promedio de partícula (193  $\mu\text{m}$ ) en comparación con las microesferas con nitrato de potasio y sin arcilla. Las condiciones de la emulsión cambiaron debido a la presencia de la nanoarcilla que, por su naturaleza hidrofílica, actúa como un centro de nucleación para la formación de las microesferas. Al aumentar el contenido de arcilla a 2 y 4% (figura 3.9d, 2e) se produjo un aumento en el tamaño promedio de partícula (237 y 239  $\mu\text{m}$ , respectivamente) y en su distribución de tamaños de partícula. Un aumento en el contenido de paligorskita favoreció la tendencia de éstas a aglomerarse, lo que aumentó la viscosidad de la emulsión, generando un mayor tamaño micelar que se refleja en el tamaño promedio de las partículas. Una concentración de 5% de paligorskita (figura 3.9f) produjo una disminución en el tamaño promedio de partícula con respecto a las formulaciones con menor contenido de arcilla, pero mayor que las de las microesferas sin arcilla y sin principio activo. Esto podría atribuirse a que un contenido muy elevado de arcilla produce aglomerados que promovieron tanto centros de nucleación como el aumento de la viscosidad de la emulsión, la competencia de estos parámetros llevó a la formación de microesferas grandes.



**Figura 3.9.** Distribución de diámetros de microesferas. a) PLA, b) PLA +  $\text{KNO}_3$ , c) PLA +  $\text{KNO}_3$  + 1%Pal, d) PLA +  $\text{KNO}_3$  + 2%Pal, e) PLA +  $\text{KNO}_3$  + 4%Pal y f) PLA +  $\text{KNO}_3$  + 5%Pal.

Los tamaños de partícula fueron analizados mediante la prueba de comparación de medias (tabla 3.1). De acuerdo con este análisis estadístico, no se encontraron diferencias significativas en el tamaño de partícula en las microesferas de PLA.

**Tabla 3.1.** Análisis comparativo de medias de los tamaños de partícula de las diferentes microesferas de PLA.

<b>Información agrupada usando el Método de Tukey con intervalo de confianza de 95%</b>			
<b>Formulación</b>	<b>N</b>	<b>Promedio</b>	<b>Agrupamiento</b>
PLA + KNO <sub>3</sub> + 4%Pal	3	239.4	A
PLA + KNO <sub>3</sub> + 2%Pal	3	237.3	A
PLA + KNO <sub>3</sub>	3	223.1	A
PLA + KNO <sub>3</sub> + 5%Pal	3	197.3	A
PLA + KNO <sub>3</sub> + 1%Pal	3	193.1	A
PLA	3	154.1	A

Los promedios que no comparten una letra son significativamente diferentes.

El tamaño de partícula generado por el método de obtención usado para las micropartículas de PLA (emulsificación y evaporación del solvente) está gobernado principalmente por la velocidad de agitación usada durante la formación de la emulsión y la morfología de las esferas depende del proceso subsecuente de evaporación del solvente, como se ha reportado ampliamente [9, 10]. Por tanto, los resultados anteriores indican que, si bien no se encontraron diferencias significativas respecto al tamaño promedio de partícula en los niveles de KNO<sub>3</sub> y arcilla evaluados, sí se observó un efecto sobre la distribución del tamaño de partícula, por lo que la presencia del principio activo y arcilla en la emulsión deben ser tomados en cuenta para el diseño de una formulación que sea útil como sistema de liberación controlada de fertilizantes.

### 3.2.2.3 Rendimiento de microesferas híbridas PLA/Pal/KNO<sub>3</sub>

Un parámetro importante de la obtención de microesferas de PLA y la incorporación del principio activo es el rendimiento, que evalúa el grado de eficiencia en el uso de los reactivos (PLA, KNO<sub>3</sub> y Pal) durante la formación de las esferas. La tabla 3.2 muestra los rendimientos de preparación de las esferas de PLA, PLA/KNO<sub>3</sub> y PLA/KNO<sub>3</sub>/Pal. Se encontró que el rendimiento de preparación más alto, del 93.4%, correspondió a las microesferas de PLA solas, indicando que más del 90% del PLA utilizado se convirtió en microesferas. Las microesferas con KNO<sub>3</sub> y arcilla se obtuvieron con rendimientos en el intervalo de 74 a 77%.



**Tabla 3.2.** Rendimiento de microesferas de poli(ácido láctico).

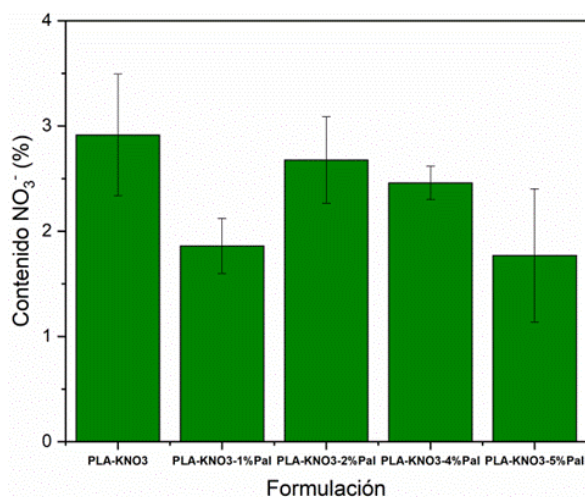
Formulación	Rendimiento (%)	Desviación estándar (%)
PLA	93.4	1.44
PLA + KNO <sub>3</sub>	77.83	1.74
PLA + KNO <sub>3</sub> + 1%Pal	76.80	0.91
PLA + KNO <sub>3</sub> + 2%Pal	77.32	2.62
PLA + KNO <sub>3</sub> + 4%Pal	77.63	2.62
PLA + KNO <sub>3</sub> + 5%Pal	74.93	6.44

La disminución en el rendimiento de microesferas indicó que la presencia del KNO<sub>3</sub> y la paligorskita ejercen un efecto desestabilizador en la emulsión, generando microesferas incompletas (figura 3.7). La sola presencia del KNO<sub>3</sub> produjo este efecto, lo cual indica que esta sal muy probablemente interactuó con el poli(alcohol vinílico), que es el tensoactivo que permite la formación adecuada de las microesferas, desestabilizando el proceso de emulsificación y en consecuencia la formación de las microesferas.

#### **3.2.2.4 Capacidad de captura de nitrato en microesferas híbridas de PLA/Pal/KNO<sub>3</sub>**

Además de los efectos observados por la presencia del principio activo y la arcilla sobre la morfología, tamaño, distribución de tamaños y rendimiento de microesferas de PLA, es importante conocer su eficiencia en la captura de nitrato. Para esto, se analizó el sobrenadante de la fase acuosa después de la emulsión mediante espectrofotometría UV-Vis (sección 2.5.3).

La figura 3.10 muestra los contenidos de nitrato obtenidos en las microesferas de PLA preparadas con KNO<sub>3</sub> y diferentes contenidos de arcilla. Se observó que el contenido de nitrato en las microesferas de PLA está en el intervalo de 1.76 y 2.91%. Las microesferas de PLA con KNO<sub>3</sub> presentaron un contenido de 2.91%, y cuando se agregó 1% de arcilla disminuyó hasta 1.86%, lo que podría atribuirse a las arcillas atrapadas en la superficie de las microesferas por su baja afinidad con éstas y a la matriz de PLA (figura 3.8a) y a la presencia de poros que pudieron facilitar la migración de los nitratos hacia la fase acuosa durante el proceso de evaporación del solvente. La capacidad de captura de nitrato de las microesferas con 2 y 4% de arcilla fue de 2.67 y 2.45%, respectivamente; la aglomeración de las arcillas en la superficie podría haber obstruido los poros de las microesferas y aumentar la captura de nitratos. Sin embargo, las microesferas con el máximo contenido de arcilla (5%) capturaron solo 1.76% de nitrato, atribuido posiblemente a la saturación superficial de las esferas con aglomerados de paligorskita (figura 3.8d).



**Figura 3.10.** Contenido de nitrato en microesferas híbridas de poli(ácido láctico) con diferentes contenidos de arcilla. Las barras representan el promedio de 3 mediciones ( $n=3$ ) y las líneas verticales representan la desviación estándar.

El contenido de nitrato atrapado se analizó mediante la comparación de medias. De acuerdo con este análisis estadístico (tabla 3.3) no se encontraron diferencias significativas en el contenido de nitrato de las microesferas respecto a los porcentajes de arcilla estudiados.

**Tabla 3.3.** Análisis comparativo de medias del contenido de nitrato atrapado en las microesferas híbridas de PLA con KNO<sub>3</sub> y diferentes contenidos de paligorskita.

Información agrupada usando el Método de Tukey con intervalo de confianza de 95%			
Formulación	N	Promedio	Agrupamiento
PLA + KNO <sub>3</sub>	2	2.914	A
PLA + KNO <sub>3</sub> + 2%Pal	2	2.677	A
PLA + KNO <sub>3</sub> + 4%Pal	2	2.459	A
PLA + KNO <sub>3</sub> + 1%Pal	2	1.860	A
PLA + KNO <sub>3</sub> + 5%Pal	2	1.768	A

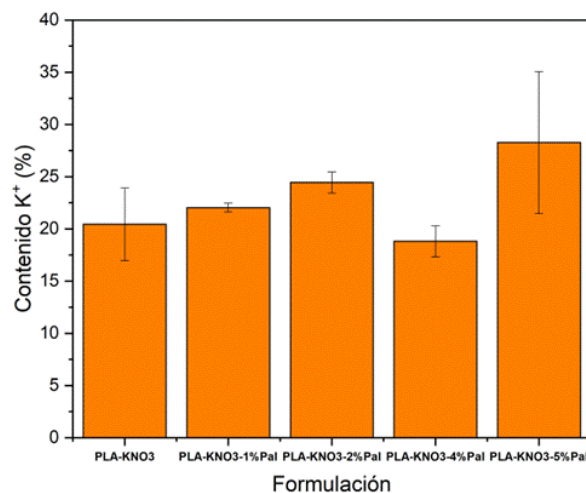
Los promedios que no comparten una letra son significativamente diferentes.

La captura de nitrato en la matriz de PLA es fuertemente dependiente del tipo de ingrediente activo. Por lo general las sustancias altamente solubles en agua tienden a migrar hacia la fase acuosa de la emulsión y producen eficiencias de captura bajas. En las microesferas de PLA cargadas de nitrato de potasio y arcilla obtenidas mediante emulsión y evaporación de solvente, las interacciones entre la matriz y el nitrato son débiles, además de que la formación promovida de poros interiores y superficiales aumentó la posibilidad de migración del nitrato hacia fuera de las esferas.

### 3.2.2.5 Capacidad de captura de potasio en microesferas híbridas PLA/Pal/KNO<sub>3</sub>

El principio activo empleado durante la obtención de las microesferas de PLA por emulsión y evaporación del solvente se compone de dos iones, el nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) y el potasio (K<sup>+</sup>). El empleo de la matriz de PLA para el desarrollo de un sistema de liberación controlada de fertilizantes implica que se deben atrapar altos porcentajes de ambos iones.

La figura 3.11 muestra los contenidos de potasio atrapado en las microesferas de PLA preparadas con KNO<sub>3</sub> y diferentes contenidos de arcilla. A partir del análisis mediante espectroscopía de absorción atómica de la fase acuosa de la emulsión (sección 2.5.3) se obtuvo que las microesferas de PLA con KNO<sub>3</sub> presentaron una capacidad de captura de potasio de 20.44%, indicando una compatibilidad de este ion con la matriz de PLA. Al agregar a las microesferas 1 y 2% de arcilla, el contenido de potasio aumentó a 22.03 y 24.44%, respectivamente. Esto podría deberse a la interacción PLA-arcilla-potasio que favorecen la incorporación del K<sup>+</sup> en la matriz. Se ha reportado la interacción entre los grupos silanol (Si-OH) de la arcilla y los grupos éster del PLA, además de la capacidad de intercambio catiónico de las arcillas [122]. Las microesferas de PLA-KNO<sub>3</sub> con 4% de arcilla mostraron un contenido de potasio de 18.81%, lo que representa una disminución respecto a las microesferas sin y con 1 y 2% de arcilla. Esto podría atribuirse a la aglomeración superficial de las arcillas, reduciendo la eficiencia la interacción PLA-arcilla-potasio. Finalmente, con 5% de arcilla, las microesferas presentaron un 28.27% de potasio, lo que indica un efecto favorable al aumentar el contenido de arcilla en estas microesferas.



**Figura 3.11.** Contenido de potasio en microesferas híbridas de poli (ácido láctico) con diferentes contenidos de arcilla. Las barras representan el promedio de 3 mediciones (n=3) y las líneas verticales representan la desviación estándar.

Un análisis de comparación de medias (tabla 3.4) se aplicó a estos resultados, lo que demostró que no existen diferencias significativas en el contenido de potasio capturado en las microesferas de PLA con los niveles de arcilla evaluados.

**Tabla 3.4.** Análisis de medias del contenido de potasio en las microesferas híbridas de PLA con KNO<sub>3</sub> y diferentes contenidos de paligorskita.

<b>Información agrupada usando el Método de Tukey con intervalo de confianza de 95%</b>			
<b>Formulación</b>	<b>N</b>	<b>Promedio</b>	<b>Agrupamiento</b>
PLA + KNO <sub>3</sub> + 5%Pal	2	28.27	A
PLA + KNO <sub>3</sub> + 2%Pal	2	24.44	A
PLA + KNO <sub>3</sub> + 1%Pal	2	22.039	A
PLA + KNO <sub>3</sub>	2	20.44	A
PLA + KNO <sub>3</sub> + 4%Pal	2	18.81	A

Los promedios que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Estos contenidos de potasio capturado indican que en las interacciones PLA-arcilla-K y la capacidad de intercambio catiónico de la paligorskita pueden estar involucradas en el aumento de los mismos.

Las microesferas de PLA que tienen KNO<sub>3</sub> y arcilla presentaron tamaños promedio entre 154 y 239  $\mu\text{m}$  y distribuciones de partícula entre 90 y 400  $\mu\text{m}$  y una morfología esférica. La incorporación de arcilla en la matriz permitió una captura de potasio del 18 al 28%. Sin embargo, la incorporación del principio activo induce cambios superficiales, como la presencia de poros (figuras 3.7 y 3.8), la disrupción de la emulsión y en consecuencia en la formación incompleta de las microesferas y el bajo contenido de nitrato capturado. Una opción para aminorar estos efectos es la búsqueda de la compatibilidad química entre el principio activo y el PLA, así como modificar el proceso de emulsificación, de tal forma que mejore la eficiencia de captura del principio activo, disminuya la formación de poros, establezca el tamaño de partícula y aumente el rendimiento (reducción de las microesferas incompletas) para producir un sistema de liberación controlada de nitrato y potasio eficiente. Por ejemplo, la modificación en las condiciones de procesamiento de las microesferas de PLA ha sido estudiado por Bodmeier y col. [123], en donde modificaron el pH de la fase acuosa, lo que mejoró la retención del principio activo.

### 3.3 Microesferas de quitosano

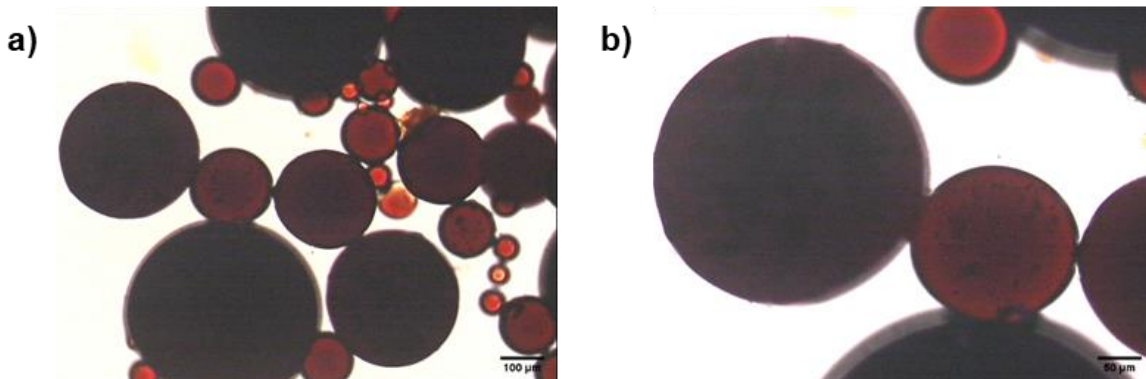
#### 3.3.1 Proceso preliminar de obtención de microesferas de quitosano

Las esferas de quitosano fueron obtenidas mediante un proceso de emulsión y entrecruzamiento con glutaraldehído. La figura 3.12 muestra las micrografías ópticas de las microesferas de quitosano obtenidas con la metodología inicial que se basa en la reportada en la sección 2.3.3, presentadas en la tabla 3.5.

**Tabla 3.5.** Condiciones experimentales preliminares para la preparación de microesferas de quitosano.

Componente	Cantidad
Quitosano	0.5 g
Span80	56.8 mg
Glutaraldehído	950 $\mu$ L
Aceite de parafina	40 mL
Agitación	420 rpm

Estas microesferas presentaron un aspecto esférico, con bordes lisos y una buena dispersión. No se observa la presencia de grietas o fracturas en la superficie de las microesferas; sin embargo, se aprecian formas irregulares sobre la superficie de estas, que puede deberse a burbujas de aire acumuladas y/o microesferas incompletas.



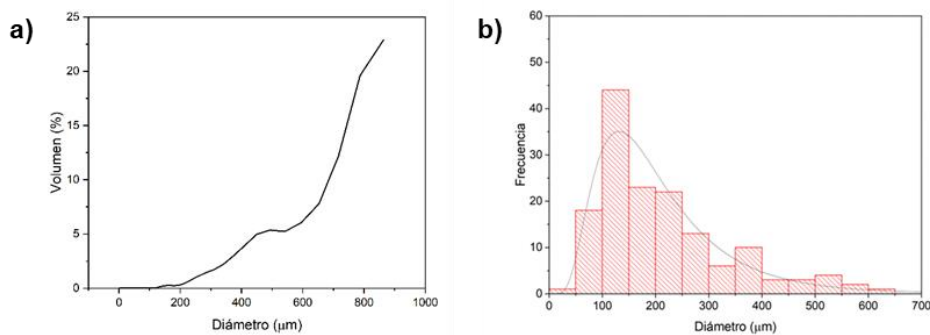
**Figura 3.12.** Micrografías ópticas de microesferas de quitosano con aumentos de a) 10x y b) 20x.

##### 3.3.1.1 Tamaño de partícula de microesferas de quitosano

El tamaño de partícula de las microesferas de quitosano (sección 3.3.1) se determinó con el analizador Coulter y mediante las imágenes de microscopía óptica. El tamaño de partícula Coulter (figura 3.13a) mostró una distribución desde 150  $\mu$ m y hasta llegar al límite de detección del analizador, que corresponde a 943  $\mu$ m. Este comportamiento podría deberse a la aglomeración de las partículas en el proceso de agitación para el Coulter, a la interacción del medio acuoso con

la celdilla de observación, o bien, las esferas obtenidas son demasiado grandes, quedando fuera del intervalo de medición del equipo.

La figura 3.13b muestra la distribución de tamaño de partícula por el método óptico de las microesferas de quitosano; el tamaño promedio de partícula fue de  $193 \mu\text{m}$  ( $\pm 13 \mu\text{m}$ ) y un intervalo de tamaño de partícula de 49 a  $650 \mu\text{m}$ . Es importante resaltar que esta distribución implica que se obtuvieron partículas con tamaños de 300, 400, 500 y  $600 \mu\text{m}$ , por tanto, para las mediciones del tamaño de partícula con Coulter las esferas fueron muy grandes con las condiciones de procesamiento iniciales.



**Figura 3.13.** Distribución de tamaño de partícula de microesferas de QUI. a) Analizador Coulter y b) Microscopía óptica.

La amplia distribución de tamaños de partícula sugirió que es necesario ajustar las condiciones de procesamiento para favorecer la obtención de una distribución de tamaños más estrecha, clave para generar un sistema de liberación controlada a base de microesferas con un tamaño adecuado para este fin.

### 3.3.1.2 Rendimiento de microesferas de quitosano

El rendimiento de las microesferas de quitosano es un factor clave que permite evaluar la eficiencia del método usado en cuanto al aprovechamiento de las materias primas iniciales y la posibilidad de escalamiento de este. Las microesferas de quitosano (sección 3.3.1) obtenidas por emulsión y entrecruzamiento presentaron un rendimiento del 46%, que se considera bajo, teniendo en cuenta que en las esferas de PLA se obtuvo un rendimiento del 93%. Este bajo rendimiento podría estar vinculado fuertemente a las condiciones de procesamiento iniciales (tabla 3.5).

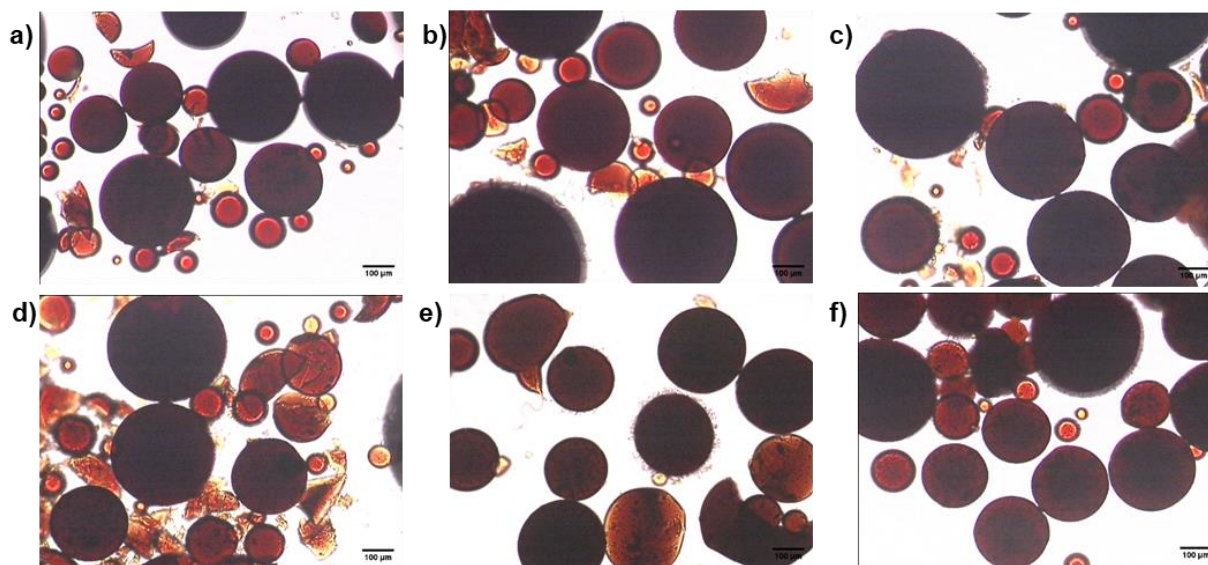
La distribución amplia de tamaño de partícula y el rendimiento bajo de las microesferas de quitosano, implican que es necesario el diseño de nuevas condiciones de procesamiento que disminuyan el primero y aumenten el segundo (sección 2.3.4).

### **3.3.2 Proceso preliminar de obtención de microesferas híbridas de quitosano**

#### **3.3.2.1 Morfología superficial de microesferas híbridas QUI/Pal/KNO<sub>3</sub>**

Para determinar la forma de incorporar el nitrato de potasio en las microesferas híbridas de quitosano se realizaron algunas pruebas preliminares basadas en el método de la sección 2.3.3.1, pero con las condiciones de procesamiento de la tabla 3.5. Se evaluaron dos vías, la primera fue la incorporación directa en el proceso de emulsificación y la segunda mediante absorción pasiva de una solución acuosa de nitrato de potasio (sección 2.3.4.1). La incorporación directa del principio activo produjo una eficiencia de captura de nitratos del 54.60% y de potasio del 90.89%. Por otra parte, mediante absorción pasiva se obtuvieron eficiencias de captura del 39.65 % para nitratos y de 3.97% para potasio. En vista de lo anterior, los experimentos subsecuentes para obtener microesferas híbridas contemplaron la incorporación del principio activo de manera directa en el proceso de emulsificación.

Un sistema de liberación de fertilizantes basado en quitosano requiere conocer el efecto de la presencia del principio activo y la arcilla sobre la morfología de las microesferas. Se ha demostrado que la presencia de la arcilla de paligorskita a altas concentraciones (10% p/p) inducen cambios en la morfología de las microesferas [13]. La figura 3.14 muestra las micrografías ópticas de las microesferas híbridas de quitosano con nitrato de potasio y paligorskita obtenidas por la metodología preliminar (tabla 3.5). Se observó una morfología esférica, baja aglomeración entre microesferas y tamaños de partícula similares. Las microesferas híbridas con KNO<sub>3</sub> y 1% Pal (figura 3.14b) mostraron microesferas con algunos cambios superficiales atribuibles a la presencia del principio activo sobre su superficie y la formación incompleta de las microesferas. Las microesferas híbridas con KNO<sub>3</sub> y contenidos superiores de arcilla (figuras 3.14c-f) mostraron una morfología esférica similar, buena dispersión entre microesferas sin presencia de aglomerados y algunas microesferas híbridas que presentaron cambios en su superficie, que pueden atribuirse a la presencia del principio activo sobre la superficie.



**Figura 3.14.** Micrografías ópticas de esferas de a) QUI, b) Qui + KNO<sub>3</sub>, c) Qui + KNO<sub>3</sub> + 1%Pal, d) Qui + KNO<sub>3</sub> + 2%Pal, e) Qui + KNO<sub>3</sub> + 4%Pal y f) Qui + KNO<sub>3</sub> + 5%Pal.

Los cambios morfológicos observados en las microesferas híbridas de quitosano indican que la presencia del principio activo y la arcilla conlleva a modificaciones en el proceso de formación de las esferas.

### 3.3.2.2 Tamaño de partícula de las microesferas híbridas QUI/Pal/KNO<sub>3</sub>

El tamaño de partícula de las microesferas híbridas de quitosano (tabla 3.5) se midió con el analizador Coulter; sin embargo, los tamaños de partícula obtenidos fueron muy grandes para el Coulter, con distribuciones de tamaño similares a las de la figura 3.13a. Alternativamente, mediante las imágenes obtenidas de microscopía óptica y empleando el software ImageJ se generaron los histogramas de tamaño de partícula. La tabla 3.6 muestra los tamaños de partícula obtenidos en las microesferas de QUI, QUI/KNO<sub>3</sub> y QUI/KNO<sub>3</sub>/Pal.

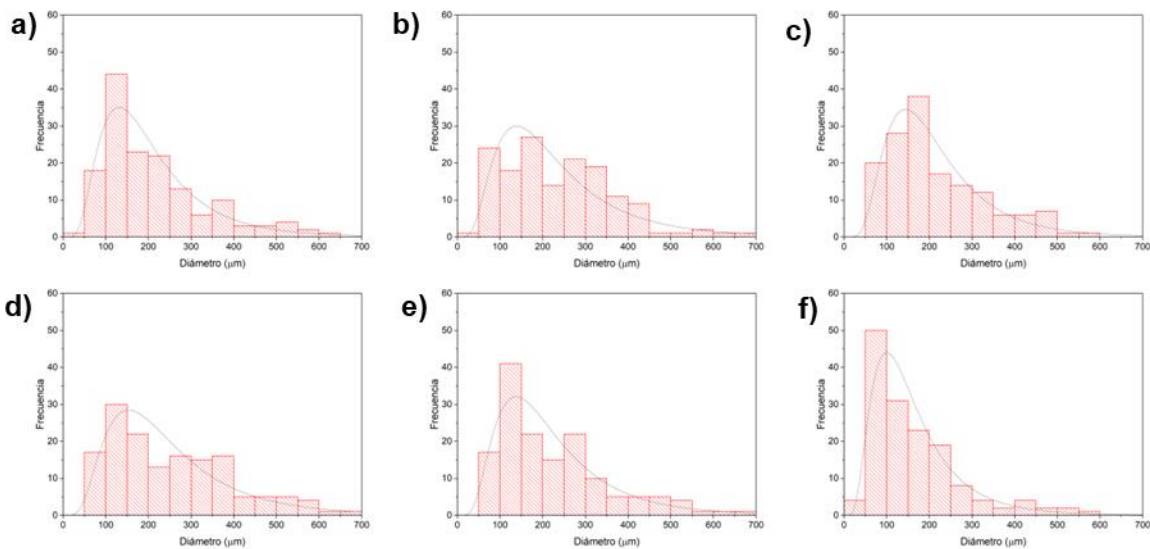
**Tabla 3.6** Tamaño de partícula de microesferas de QUI/KNO<sub>3</sub>/Pal.

Formulación	Diámetro promedio (µm)	Desviación estándar (µm)
QUI	193.48	13.06
QUI + KNO <sub>3</sub>	186.20	34.54
QUI + KNO <sub>3</sub> + 1%Pal	218.26	3.91
QUI + KNO <sub>3</sub> + 2%Pal	204.98	38.94
QUI + KNO <sub>3</sub> + 4%Pal	189.40	25.63
QUI + KNO <sub>3</sub> + 5%Pal	182.17	12.47

La figura 3.15 muestra estas distribuciones; las microesferas híbridas de quitosano (figura 3.15a) presentaron tamaños de partícula en el intervalo de 50 y 650 µm, con un tamaño promedio de



193  $\mu\text{m}$ . La presencia del  $\text{KNO}_3$  aumentó la distribución del tamaño de partícula a un intervalo de 40 y 700  $\mu\text{m}$  con un tamaño promedio de 186  $\mu\text{m}$  (figura 3.15b). La presencia de la arcilla al 1% (figura 3.15c) produjo una distribución de tamaño de partícula de 50-600  $\mu\text{m}$  con un tamaño promedio de partícula de 218  $\mu\text{m}$ , que es mayor al de las esferas sin y con  $\text{KNO}_3$ . A contenidos de arcilla de 2% (figura 3.15d) se produjeron distribuciones entre 50 y 700  $\mu\text{m}$  con un tamaño promedio de partícula de 205  $\mu\text{m}$  y al 4% de arcilla se alcanzó un intervalo entre 70 y 700  $\mu\text{m}$  con un tamaño promedio de partícula de 189  $\mu\text{m}$  (figura 3.15e). El 5% de arcilla produjo microesferas con un intervalo de tamaño de partícula de 40 y 600  $\mu\text{m}$  con un tamaño promedio de 182  $\mu\text{m}$  (figura 3.15f).



**Figura 3.15.** Distribuciones de tamaño de partícula de las microesferas por microscopía óptica de a) QUI, b) QUI +  $\text{KNO}_3$ , c) QUI +  $\text{KNO}_3$  + 1%Pal, d) QUI +  $\text{KNO}_3$  + 2%Pal, e) QUI +  $\text{KNO}_3$  + 4%Pal y f) QUI +  $\text{KNO}_3$  + 5%Pal.

Las variaciones encontradas en el tamaño de partícula y su distribución en las microesferas híbridas de quitosano preparadas con  $\text{KNO}_3$  y arcilla podrían atribuirse al cambio en la viscosidad de la solución polimérica durante el proceso de emulsificación, generando tamaños de partícula mayores a los observados con las microesferas de solo quitosano.

La tabla 3.7 presenta el análisis de medias usado para evaluar el efecto del  $\text{KNO}_3$  y la arcilla sobre el tamaño de partícula. La variabilidad encontrada en las distribuciones de tamaño de partícula y sus tamaños promedio observadas en los histogramas de la figura 3.15 no tienen una relación directa con las concentraciones de arcilla evaluadas. Adicionalmente, la diferencia entre el tamaño de las esferas de quitosano con y sin  $\text{KNO}_3$  no varían de forma significativa. De manera general, la presencia de la arcilla y el activo permiten obtener tamaños de partícula similares a

los obtenidos en las esferas de quitosano solas, indicando que las interacciones polímero-activo-arcilla favorecen la estabilidad del tamaño. Es necesario tener en cuenta que para lograr la liberación controlada de un principio activo se debe establecer un intervalo de tamaños de partícula estrecho (100-500  $\mu\text{m}$ ), lo que lleva a sugerir que es necesario establecer las condiciones de procesamiento que permitan obtener dichos tamaños.

**Tabla 3.7.** Análisis de medias del tamaño de partícula de las microesferas de QUI, QUI con  $\text{KNO}_3$  e híbridas con diferentes contenidos de paligorskita.

<b>Información agrupada usando el Método de Tukey con intervalo de confianza de 95%</b>			
<b>Formulación</b>	<b>N</b>	<b>Promedio</b>	<b>Agrupamiento</b>
QUI + $\text{KNO}_3$ + 1%Pal	3	218.26	A
QUI + $\text{KNO}_3$ + 2%Pal	3	205.0	A
QUI	3	193.49	A
QUI + $\text{KNO}_3$ + 4%Pal	3	189.9	A
QUI + $\text{KNO}_3$	3	186.2	A
QUI + $\text{KNO}_3$ + 5%Pal	3	182.17	A

Los promedios que no comparten una letra son significativamente diferentes.

### 3.3.2.3 Rendimiento de microesferas híbridas de QUI/Pal/ $\text{KNO}_3$

El rendimiento de las microesferas híbridas de quitosano obtenidas por emulsión y entrecruzamiento a las que se les agregó nitrato de potasio y arcilla de forma directa durante su obtención (tabla 3.5) se presentan en la tabla 3.8. Las microesferas de quitosano presentaron un rendimiento del 46%, al obtenerlas en presencia del  $\text{KNO}_3$  su rendimiento aumentó hasta 49%, y cuando se prepararon con  $\text{KNO}_3$  y a 1, 2, 4 y 5% (p/p) de arcilla se obtuvieron rendimientos de 48, 51, 49 y 47%, respectivamente.

**Tabla 3.8.** Rendimiento de las microesferas híbridas de quitosano.

<b>Formulación</b>	<b>Rendimiento (%)</b>	<b>Desviación Estándar (%)</b>
QUI	46.23	3.09
QUI + $\text{KNO}_3$	48.78	1.50
QUI + $\text{KNO}_3$ + 1%Pal	48.30	1.80
QUI + $\text{KNO}_3$ + 2%Pal	50.71	2.14
QUI + $\text{KNO}_3$ + 4%Pal	49.47	1.11
QUI + $\text{KNO}_3$ + 5%Pal	46.95	0.67

El rendimiento de las microesferas híbridas de quitosano en presencia de  $\text{KNO}_3$  y diferentes contenidos de arcilla se mantuvo en el intervalo de 46 y 51%, indicando que este parámetro no está relacionado con la presencia en la emulsión del principio activo o la arcilla. Estos

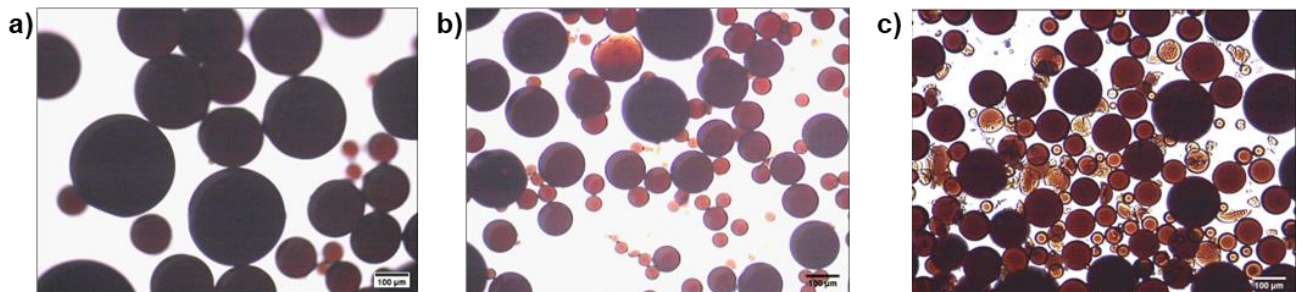
rendimientos son similares a los obtenidos por Messa y col. [6] en microesferas de quitosano-montmorillonita obtenidas por secado y aspersion (41 y 52%). Los resultados alcanzados sugieren que los factores que controlan el rendimiento podrían estar relacionados con las condiciones de procesamiento, tales como la velocidad de agitación, la cantidad de quitosano, la del tensoactivo Span80 y la del entrecruzante glutaraldehído, propuestos en la metodología preliminar (sección 2.3.3) y mostrados en la tabla 3.5.

### 3.3.3 Optimización de las condiciones de obtención de las microesferas de quitosano

#### 3.3.3.1 Evaluación de las velocidades de agitación

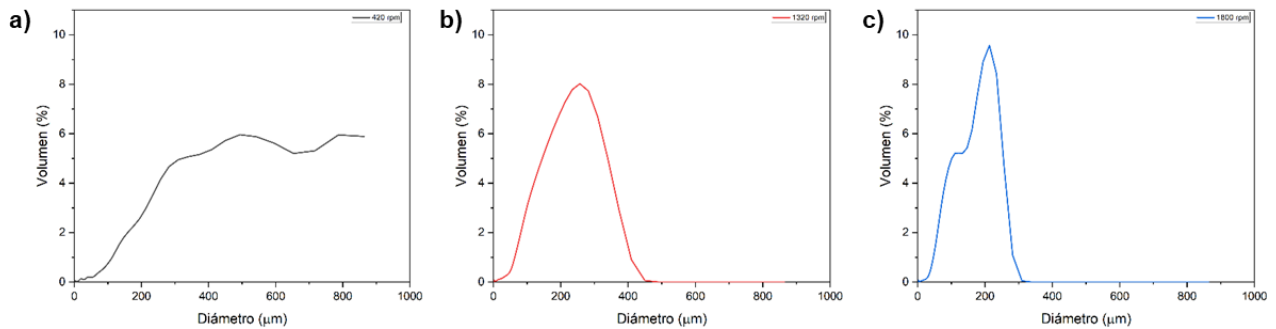
Las condiciones de obtención preliminares (0.5 g de QUI, 56.4 mg de Span80, 40 mL de aceite mineral, 950  $\mu$ L de glutaraldehído y agitación de 420 rpm - sección 3.3.1) utilizadas para la obtención de las microesferas de quitosano generaron partículas con un intervalo de tamaño de partícula entre 40 y 650  $\mu$ m (sección 3.3.1.1) y para las esferas híbridas QUI/Pal/ $\text{KNO}_3$  entre 50 y 700  $\mu$ m (sección 3.3.2.2). Además, sus rendimientos fueron de 46 y 51%, respectivamente; lo que implica un bajo aprovechamiento de los materiales utilizados. Por ello, fue necesario hallar las condiciones de procesamiento más adecuadas que produjeran microesferas con un intervalo de tamaño de partícula de 50 y 400  $\mu$ m, con baja polidispersidad de tamaños y con altos rendimientos (sección 2.3.4).

La reducción del intervalo de tamaño de partícula se alcanzó aumentando la velocidad de agitación; se evaluaron tres velocidades de agitación: 420, 1,320 y 1,800 rpm, y se mantuvieron las demás condiciones de preparación de la tabla 3.5. Las microesferas de quitosano obtenidas se caracterizaron por microscopía óptica y analizador Coulter. Las microesferas preparadas con altas velocidades de agitación mostraron una reducción del tamaño de partícula (figura 3.16).



**Figura 3.16.** Micrografías ópticas de esferas de quitosano con agitación de a) 420, b) 1,320 y c) 1,800 rpm.

Las velocidades de agitación evaluadas disminuyeron el intervalo de distribución del tamaño de partícula (figura 3.17). En el proceso de emulsificación la agitación a 1,800 rpm produjo un intervalo de distribución de tamaño de partícula de 30-300  $\mu\text{m}$  de tipo bimodal (figura 3.17c) y un tamaño de partícula promedio de 196  $\mu\text{m}$ .



**Figura 3.17.** Curvas de distribución de tamaño de esferas de quitosano con agitación de a) 420, b) 1,320 y c) 1,800 rpm.

Las altas velocidades de agitación produjeron una reducción del tamaño de partícula y su distribución de tamaños. Estos resultados son coherentes con lo reportado por Denkbas y col. [124] que establecieron que el aumento en la velocidad de agitación proporciona la energía necesaria para dispersar la solución de quitosano en gotas finas en la fase orgánica, y crean microesferas con tamaño promedio más pequeño con una distribución de tamaños estrecha.

### 3.3.3.2 Evaluación de la cantidad de quitosano y tensoactivo

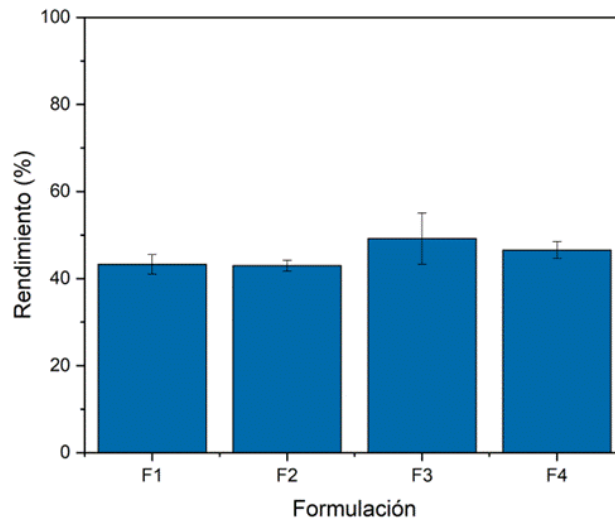
La mejora del rendimiento de las microesferas de quitosano requirió evaluar las condiciones de procesamiento: cantidad de quitosano y la cantidad de tensoactivo (a una velocidad de agitación de 1800 rpm y un volumen de glutaraldehído de 950  $\mu\text{L}$ ). La evaluación del efecto de la cantidad de quitosano y tensoactivo requirió un diseño experimental factorial  $2^2$  de dos factores con dos niveles (sección 2.3.4.3).

El análisis de varianza (tabla 3.9) muestra que el factor que más contribuye a la variabilidad en las lecturas del rendimiento es el contenido de quitosano ( $p < 0.05$ ). Sin embargo, respecto al contenido de tensoactivo, se encontró una baja influencia de este factor en el rendimiento ( $p > 0.05$ ).

**Tabla 3.9.** Análisis de varianza del diseño factorial 2<sup>2</sup>.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados ajustada	Cuadrado medio ajustado	Valor F	Valor P
Modelo	3	78.112	26.037	2.31	0.153
Lineal	2	74.075	37.038	3.28	0.091
Qitosano	1	67.593	67.593	5.99	0.040
Span80	1	6.483	6.483	0.57	0.470
Interacción de 2 factores	1	4.037	4.037	0.36	0.566
Qitosano*Span80	1	4.037	4.037	0.36	0.66
Error	8	90.227	11.285		
Total	11	168.389			

La figura 3.18 muestra los rendimientos del diseño experimental factorial de las microesferas de quitosano. Los rendimientos obtenidos fueron de 43, 42, 49 y 46% para las formulaciones F1, F2, F3 y F4, respectivamente.



**Figura 3.18.** Rendimientos del diseño experimental factorial 2<sup>2</sup>. Formulaciones: F1 (0.4 g QUI, 56.4 mg Span80), F2 (0.4 g QUI, 100 mg Span80), F3 (0.5 g QUI, 56.4 mg Span80) y F4 (0.5 g QUI, 100 mg Span80). Las barras representan el promedio de 3 mediciones (n=3) y las líneas verticales representan la desviación estándar.

Los rendimientos en todas las formulaciones fueron similares entre sí, por lo que se realizó un análisis de comparación de medias para encontrar la formulación que produjo el rendimiento más alto (tabla 3.10). Las formulaciones 3 y 4 produjeron los mayores valores de rendimientos: 49.19 y 46.56%, respectivamente, sin embargo, de acuerdo con el análisis de medias, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. Por lo que, en la práctica, todas las formulaciones producen rendimientos similares entre sí y se encuentran en un intervalo de 42 a 49%.

**Tabla 3.10.** Comparación de medias de las formulaciones en el diseño factorial 2<sup>2</sup> del rendimiento.

<b>Información agrupada usando el Método de Tukey con intervalo de confianza de 95%</b>			
<b>Formulación</b>	<b>N</b>	<b>Promedio</b>	<b>Agrupamiento</b>
F3	3	49.19	A
F4	3	46.56	A
F1	3	43.28	A
F2	3	42.970	A

Los promedios que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Además del rendimiento, se tomó en cuenta el efecto de las formulaciones sobre el diámetro de las micropartículas obtenidas. El análisis de varianza (tabla 3.11) muestra que el contenido de quitosano tiene un efecto significativo sobre el tamaño de partícula ( $p < 0.05$ ), el contenido del tensoactivo, por el contrario, no presentó un efecto significativo sobre el tamaño de partícula ( $p > 0.05$ ), aunque la interacción entre ambos factores sí posee un efecto significativo ( $p < 0.024$ ).

**Tabla 3.11.** Análisis de varianza para el diámetro en el diseño factorial 2<sup>2</sup> del rendimiento.

<b>Fuente</b>	<b>Grados de libertad</b>	<b>Suma de cuadrados ajustada</b>	<b>Cuadrado medio ajustado</b>	<b>Valor F</b>	<b>Valor P</b>
Modelo	3	4959.6	1653.2	11.87	0.003
Lineal	2	3876.6	1938.2	13.92	0.002
Quitosano	1	3400.3	3400.3	24.42	0.001
Span80	1	476.3	476.3	3.42	0.102
Interacción de 2 factores	1	1083.0	1083.0	7.78	0.024
Quitosano*Span80	1	1083.0	1083.0	7.78	0.024
Error	8	1114.0	139.2		
Total	11	6073.6			

Respecto al análisis de comparación de medias de los diámetros de las microesferas (tabla 3.12), se encontró que la formulación 2 es aquella que difiere de manera significativa del resto de las formulaciones y es la que presentó el menor diámetro de partícula. Estos resultados indican que los efectos del quitosano y la interacción entre el contenido de quitosano y tensoactivo estuvieron involucrados en esta disminución del tamaño de partícula.

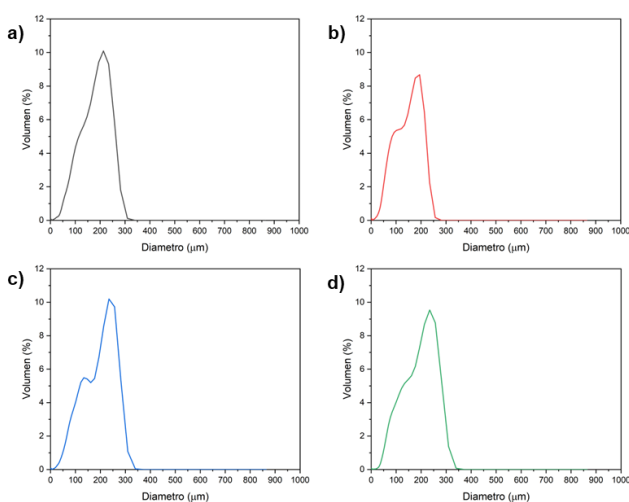
**Tabla 3.12.** Comparación de medias del diámetro de las formulaciones en el diseño factorial 2<sup>2</sup>.

Información agrupada usando el Método de Tukey con intervalo de confianza de 95%			
Formulación	N	Promedio	Agrupamiento
F4	3	171.233	A
F3	3	164.83	A
F1	3	150.17	A
F2	3	118.57	B

Los promedios que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Los resultados anteriores indican que un contenido bajo de quitosano y un alto contenido del tensoactivo favorecen la disminución del tamaño de partícula. El bajo contenido de quitosano permite una baja viscosidad de la solución polimérica en la fase acuosa de la emulsión, que cuando se somete a altas agitaciones da como resultado gotas pequeñas. El efecto del tensoactivo favorece una mejor interacción entre las fases acuosa y orgánica, reduciendo la tensión interfacial entre las gotas de quitosano y la fase orgánica, lo que favorece la disminución del tamaño de partícula, como se ha reportado por Denkbas y col. [124].

De esta forma, la cantidad de quitosano y tensoactivo generaron las distribuciones de tamaños de partícula (Coulter) presentados en la figura 3.19. Se obtuvieron tamaños promedio de partícula en el intervalo de 119 y 171  $\mu\text{m}$ , y una distribución de tamaño de partícula en el intervalo de 40 y 350  $\mu\text{m}$ . En esta figura se observa la disminución del tamaño de las partículas a bajas cantidades de quitosano.



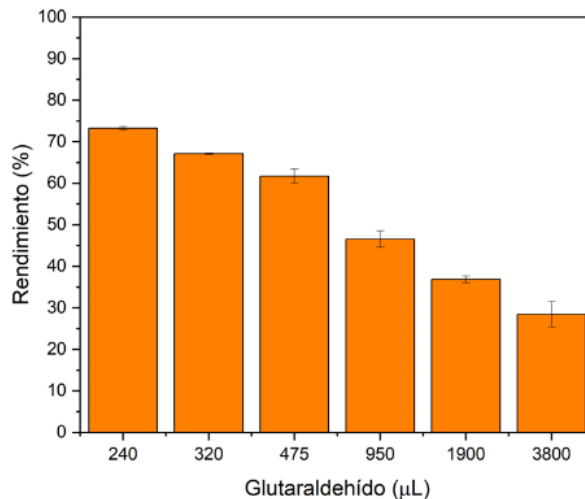
**Figura 3.19.** Distribución de tamaño de partículas por Coulter del diseño experimental factorial 2<sup>2</sup>. Formulaciones a) F1 (0.4 g QUI, 56.4 mg Span80) b) F2 (0.4 g QUI, 100 mg Span80), c) F3 (0.5 g QUI, 56.4 mg Span80) y d) F4 (0.5 g QUI, 100 mg Span80).

De lo anterior se concluye que 0.5 g de quitosano y 100 mg de Span80 produjeron las esferas con mejor rendimiento, a la par de una distribución adecuada de tamaño de partícula.

### 3.3.3.3 Evaluación de la cantidad de glutaraldehído

La cantidad de entrecruzante (glutaraldehído) se estudió como un factor de procesamiento relacionado con el rendimiento de las microesferas de quitosano. Para este fin, los parámetros que se mantuvieron constantes fueron: 0.5 g QUI, concentración de ácido acético 2% (v/v), 40 mL de aceite de parafina, 100 mg Span80 y agitación de 1,800 rpm.

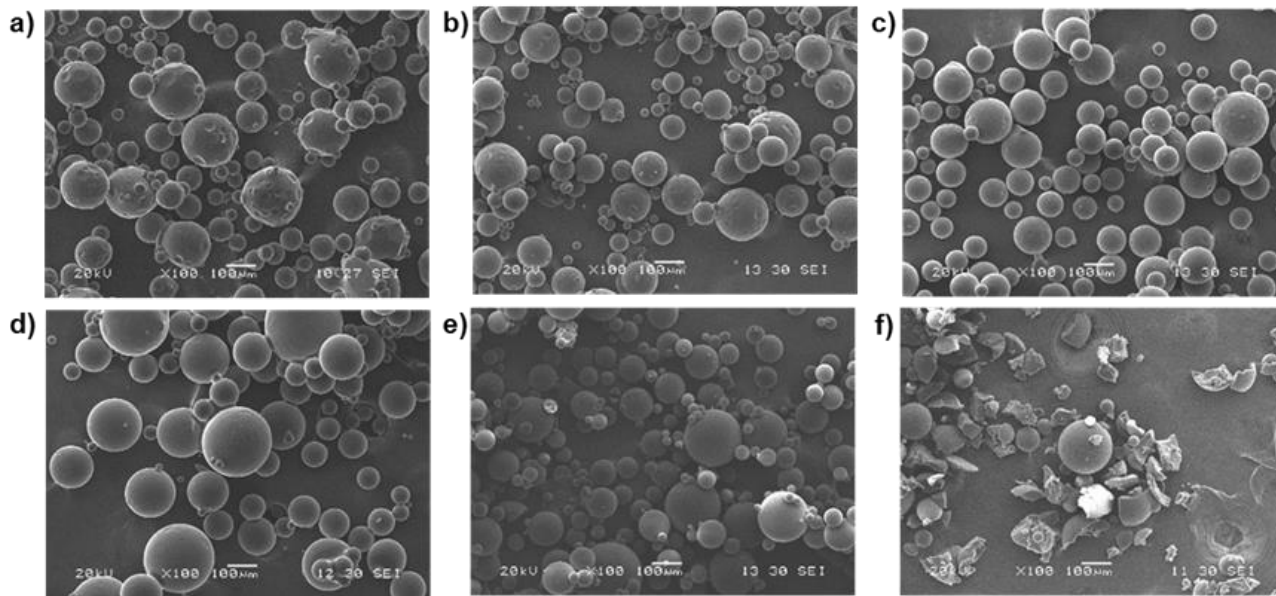
La figura 3.20 muestra que los rendimientos obtenidos, dependiendo de la cantidad de glutaraldehído, los cuales fueron: 73, 67, 61, 46, 36 y 28% para las microesferas de quitosano entrecruzadas con 240, 320, 475, 950, 1,900 y 3,800  $\mu\text{L}$  de glutaraldehído, respectivamente. Se encontró que, al disminuir la cantidad de glutaraldehído, el rendimiento de las microesferas aumentó de forma significativa.



**Figura 3.20.** Rendimiento de las microesferas de quitosano entrecruzadas con diferentes cantidades de glutaraldehído. Las barras representan el promedio de 3 mediciones ( $n=3$ ) y las líneas verticales representan la desviación estándar.

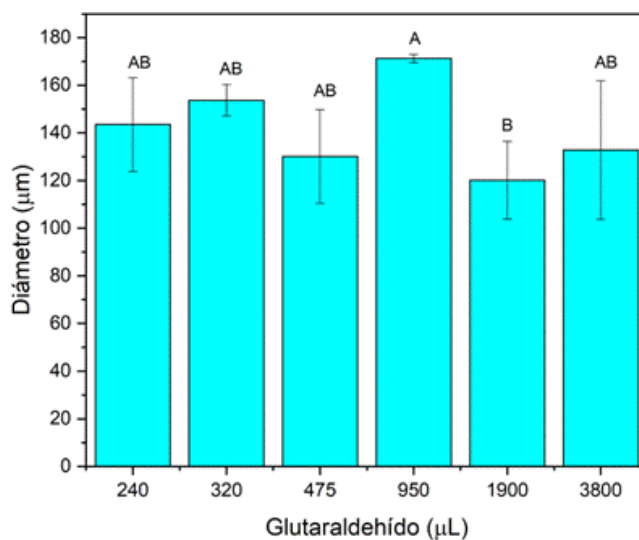
A bajos contenidos de entrecruzante las microesferas conservaron su morfología esférica, superficie lisa y baja aglomeración; en el nivel más alto de entrecruzante el proceso de obtención generó microesferas irregulares, atribuible a la aceleración del proceso de entrecruzamiento (figura 3.21).





**Figura 3.21.** Micrografías electrónicas de microesferas de quitosano entrecruzadas con: a) 240, b) 320, c) 475, d) 950, e) 1900 y f) 3800  $\mu\text{L}$  de glutaraldehído.

La figura 3.22 muestra que los tamaños promedio de partícula obtenidos fueron de 120, 130, 132, 143, 153 y 171  $\mu\text{m}$  para las microesferas de quitosano entrecruzadas con 1900, 475, 3800, 240, 320 y 950  $\mu\text{L}$  de glutaraldehído, respectivamente.



**Figura 3.22.** Diámetro de microesferas de quitosano entrecruzadas con diferentes niveles de glutaraldehído. Las barras representan el promedio de 3 mediciones ( $n=3$ ) y las líneas verticales representan la desviación estándar. Las barras que no comparten las mismas letras son estadísticamente diferentes.

Las microesferas de quitosano producidas con agitación de 1800 rpm, 0.5 g de quitosano, 100 mg de Span80 y 240  $\mu\text{L}$  de glutaraldehído (sección 2.3.5) produjeron las microesferas con tamaño promedio de partícula reducido (143  $\mu\text{m}$ ), el mayor rendimiento (73%) y manteniendo su morfología esférica y bajo nivel de aglomeración.

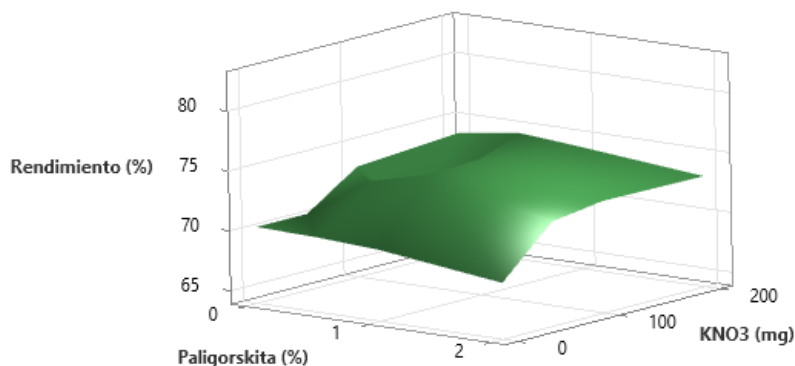
### **3.3.4 Resultados del diseño experimental para la optimización de las condiciones de preparación de microesferas híbridas de quitosano/paligorskita y $\text{KNO}_3$**

La obtención de un sistema de liberación controlada de nitrato de potasio a base de microesferas híbridas de quitosano requirió determinar las mejores condiciones de procesamiento y preparación de éstas. Los resultados obtenidos (secciones 3.3.1 y 3.3.3) mostraron los efectos de la velocidad de agitación sobre la morfología y tamaño de partícula, el contenido de quitosano y tensoactivo sobre el rendimiento y tamaño promedio de partícula y el efecto del contenido de glutaraldehído sobre el rendimiento, morfología y tamaño de partícula de las microesferas de quitosano. Los resultados indicaron que las condiciones de procesamiento de las microesferas de quitosano para obtener adecuados tamaños promedios de partícula, rendimiento y morfología esférica son: 0.5 g de QUI, 100 mg de Span80, 40 mL de aceite mineral, 240  $\mu\text{L}$  de glutaraldehído y 1800 rpm de agitación. Estas condiciones fueron usadas como base para el presente estudio.

En la sección 3.3.2 se evaluaron los efectos de un contenido fijo de  $\text{KNO}_3$  (100 mg) y cinco contenidos de paligorskita (0, 1, 2, 3, 4 y 5%) sobre la morfología, rendimiento y tamaño de partícula. Los resultados indicaron que era necesario encontrar las condiciones de procesamiento para diferentes contenidos de paligorskita y  $\text{KNO}_3$  y evaluar su efecto sobre los parámetros: rendimiento, tamaño promedio de partícula, morfología de las microesferas de quitosano. La evaluación de dichos efectos se llevó a cabo mediante un diseño experimental completo (sección 2.3.5), con el fin de obtener los mejores sistemas para las pruebas de liberación controlada de nitrato y potasio. Estos resultados se presentan en las secciones siguientes.

#### **3.3.4.1 Rendimiento de microesferas híbridas QUI/Pal/ $\text{KNO}_3$**

La figura 3.23 presenta la superficie de respuesta del rendimiento de las microesferas en función de la cantidad de paligorskita y nitrato de potasio usados. Estos resultados corresponden a una de las variables de respuesta establecidas (sección 2.3.5). Se obtuvieron rendimientos en el intervalo de 68 y 75%. El rendimiento más bajo se obtuvo con el 2% de arcilla y 0 mg de  $\text{KNO}_3$ , mientras que el rendimiento más alto correspondió a 1% de arcilla y 100 mg de  $\text{KNO}_3$ .



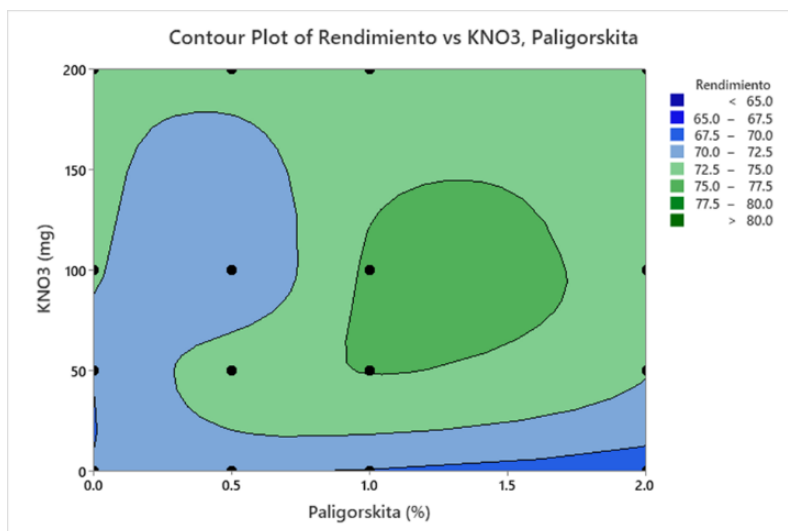
**Figura 3.23.** Superficie de respuesta del rendimiento de microesferas híbridas de quitosano.

La superficie de respuesta indica que los parámetros estudiados influyen en el 40% ( $R^2$ ) de la variabilidad observada en el rendimiento de obtención de microesferas, es decir, el rendimiento está gobernado por factores adicionales a la cantidad de  $KNO_3$  y Pal usados durante la emulsión. De acuerdo con el análisis de varianza (tabla 3.13), la variabilidad observada en el rendimiento es atribuida a la presencia del  $KNO_3$  utilizado en el proceso de preparación de las microesferas.

**Tabla 3.13.** Análisis de varianza del rendimiento de obtención de microesferas híbridas de quitosano.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados ajustada	Cuadrado medio ajustado	Valor F	Valor P
Modelo	15	202.10	13.474	1.43	0.191
Lineal	6	141.12	23.520	2.50	0.042
Paligorskita	3	23.49	7.829	0.83	0.486
$KNO_3$	3	117.63	39.211	4.17	0.013
Interacción de 2 factores	9	60.99	6.776	0.72	0.686
Paligorskita* $KNO_3$	9	60.99	6.776	0.72	0.686
Error	32	300.68	9.396		
Total	47	502.79			

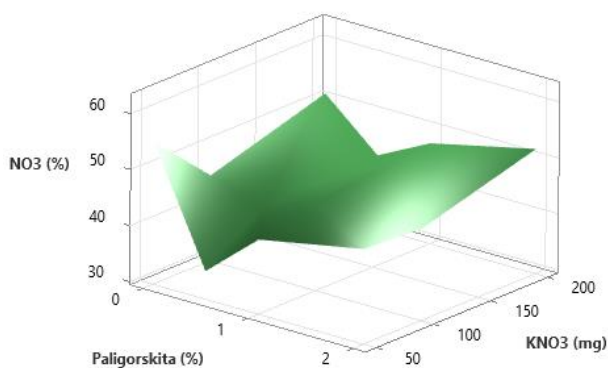
La figura 3.24 muestra la gráfica de contorno del rendimiento, se observa que la zona óptima de respuesta se encuentra con las formulaciones de 1% Pal con 50 y 100 mg de  $KNO_3$ , las cuales presentaron rendimientos en el intervalo de 75 a 77.5%. Estos resultados indican que las microesferas preparadas bajo estas condiciones obtuvieron los rendimientos más altos en todo el intervalo de condiciones utilizadas.



**Figura 3.24.** Gráfica de contorno del rendimiento de microesferas híbridas de quitosano.

### 3.3.4.2 Nitrato capturado en microesferas híbridas QUI/Pal/KNO<sub>3</sub>

La figura 3.25 corresponde a la superficie de respuesta del contenido de nitrato capturado en las microesferas híbridas (determinado por espectrofotometría UV-Vis) en función de la cantidad de paligorskita y del nitrato de potasio usados en la emulsión. Se encontraron contenidos de nitrato capturado en el intervalo de 34 y 55%. El contenido de nitrato más alto ocurre cuando la arcilla está ausente y disminuye al agregar 0.5% de arcilla, posteriormente se recupera a medida que aumentó el contenido de arcilla.



**Figura 3.25.** Superficie de respuesta del contenido de nitrato capturado en microesferas híbridas de quitosano.

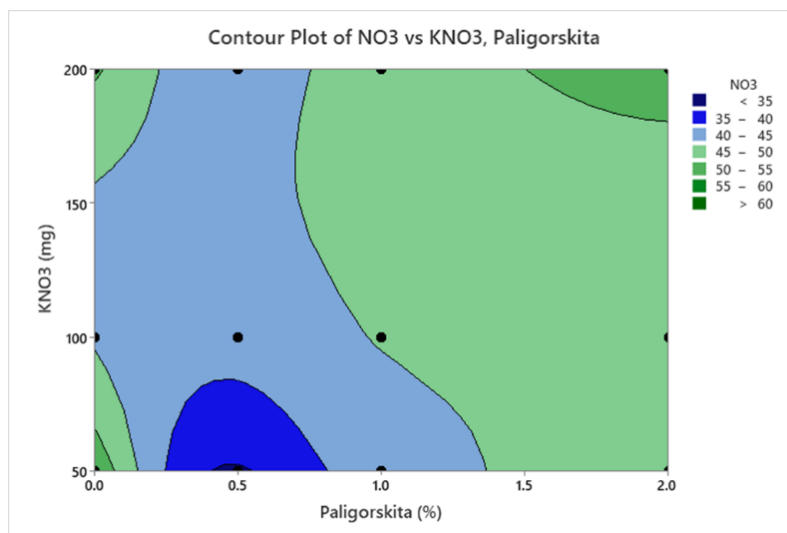
La superficie de respuesta indica que los parámetros estudiados explican el 78% ( $R^2$ ) de la variabilidad observada en el contenido de nitrato capturado por las microesferas de quitosano, híbridas, indicando una estrecha relación entre la cantidad de KNO<sub>3</sub> y Pal utilizadas durante la

emulsión. De acuerdo con el análisis de varianza (tabla 3.14), el contenido de paligorskita es el factor que contribuye con la variabilidad observada.

**Tabla 3.14.** Análisis de varianza del contenido de nitrato.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados ajustada	Cuadrado medio ajustado	Valor F	Valor P
Modelo	11	626.98	57.00	3.82	0.015
Lineal	5	453.40	90.68	6.07	0.005
Paligorskita	3	381.03	127.01	8.51	0.003
KNO <sub>3</sub>	2	72.37	36.18	2.42	0.131
Interacción de 2 factores	6	173.58	28.93	1.94	0.155
Paligorskita*KNO <sub>3</sub>	6	173.58	28.93	1.94	0.155
Error	12	179.14	14.93		
Total	23	806.11			

La figura 3.26 corresponde a la gráfica de contorno de la superficie de respuesta del contenido de nitrato capturado en las microesferas híbridas de quitosano. Es importante resaltar que la gráfica puede dividirse en dos zonas, una por debajo de 1% Pal, donde se encontró heterogeneidad en los contenidos de nitrato capturado (intervalo 35 - 45%); la segunda zona se encuentra por encima del 1% Pal, la cual presentó contenidos de nitrato capturado en el intervalo 45 - 55%. Las formulaciones 1%Pal-100mgKNO<sub>3</sub>, 1%Pal-200mgKNO<sub>3</sub>, 2%Pal-50mg KNO<sub>3</sub> y 2% Pal-100mgKNO<sub>3</sub> presentaron un contenido de nitrato capturado en el intervalo 45 - 50%, siendo la formulación 2%Pal-200mgKNO<sub>3</sub> la que presentó un contenido de nitrato capturado por encima de 50%.

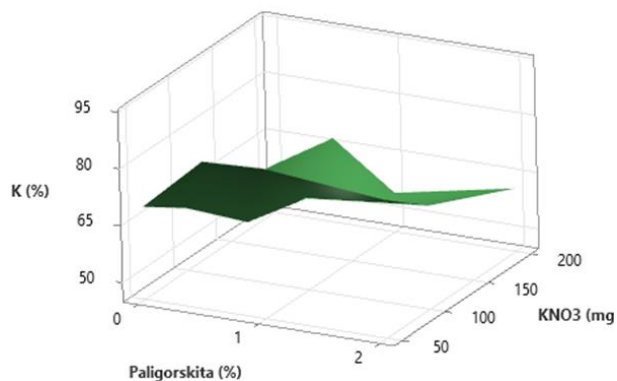


**Figura 3.26.** Gráfica de contorno del contenido de nitrato capturado en microesferas híbridas de quitosano.

Por tanto, el contenido de nitrato capturado es fuertemente dependiente de la cantidad de  $\text{KNO}_3$  utilizado en la emulsión. Esto concuerda con el hecho estudiado de que en la captura del principio activo de un sistema de liberación controlada de fármacos, existe una estrecha relación entre la razón principio activo:polímero y el principio activo capturado, indicando que una mayor razón favorece la incorporación del principio activo, ya que la formación de las microesferas por entrecruzamiento con glutaraldehído disminuye la migración del principio activo durante la emulsión, como ha sido reportado por Patel y col. [125].

### 3.3.4.3 Potasio capturado en microesferas híbridas QUI/Pal/ $\text{KNO}_3$

La superficie de respuesta presentada en la figura 3.27 corresponde al contenido de potasio capturado en las microesferas de quitosano en función de la cantidad de arcilla y  $\text{KNO}_3$  usados durante la emulsión. Se encontraron contenidos de potasio capturado en el intervalo de 55 y 84%. Los contenidos de potasio más altos se encontraron en las microesferas preparadas con 50 mg  $\text{KNO}_3$ , que disminuye conforme aumenta el principio activo. El mayor contenido de potasio capturado (84%) se encuentra en las microesferas con 1% Pal y 50 mg de  $\text{KNO}_3$  y el menor (55%) se encuentra en las microesferas con 1% Pal y 200 mg  $\text{KNO}_3$ . La región comprendida entre 1 y 2% de arcilla junto con los niveles evaluados de  $\text{KNO}_3$  (50, 100 y 200 mg) mostraron un comportamiento similar, indicando poca variabilidad en el contenido de potasio capturado.



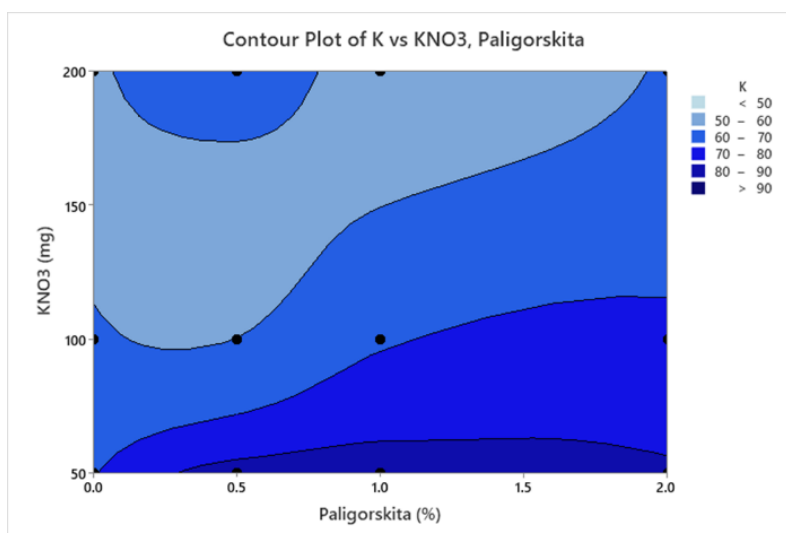
**Figura 3.27.** Superficie de respuesta del potasio capturado en microesferas híbridas de quitosano.

La superficie de respuesta indica que los parámetros estudiados explican el 73% ( $R^2$ ) de la variabilidad observada en el potasio capturado en las microesferas de quitosano; por lo tanto, la cantidad de  $\text{KNO}_3$  y Pal usados en la emulsión son factores estrechamente relacionados con la capacidad de las esferas para incorporar el potasio en su estructura. El análisis de varianza (tabla 3.15) indica que la variabilidad observada en el potasio capturado en las microesferas híbridas de quitosano está relacionada a la cantidad de  $\text{KNO}_3$  utilizado en la emulsión.

**Tabla 3.15.** Análisis de varianza del contenido potasio capturado en microesferas híbridas de quitosano.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados ajustada	Cuadrado medio ajustado	Valor F	Valor P
Modelo	11	3444.3	313.12	5.81	0.000
Lineal	5	2875.3	575.17	10.67	0.000
Paligorskita	3	441.2	147.08	2.73	0.066
KNO <sub>3</sub>	2	2434.2	1217.29	22.57	0.000
Interacción de 2 factores	6	568.5	94.75	1.76	0.151
Paligorskita*KNO <sub>3</sub>	6	568.5	94.75	1.76	0.151
Error	24	1294.3	53.93		
Total	35	4738.6			

La gráfica de contorno del contenido de potasio capturado respecto a la cantidad de paligorskita y KNO<sub>3</sub> usados en la emulsión (figura 3.28) mostró con claridad una tendencia creciente en el potasio capturado, a medida que disminuye la cantidad de principio activo utilizado durante la emulsión: 200 mg de KNO<sub>3</sub> generaron contenidos de potasio capturado en el intervalo de 55 y 67%; la disminución del ingrediente activo a 100 mg aumentó el contenido de potasio capturado en la microesfera al intervalo de 61 y 72%. Los contenidos de potasio capturado más altos se obtuvieron en las microesferas preparadas con 50 mg de KNO<sub>3</sub>, con un intervalo de 69 y 84%. Estos resultados indican que el potasio capturado en las microesferas tiene una estrecha relación con la cantidad de KNO<sub>3</sub> empleado durante su preparación.

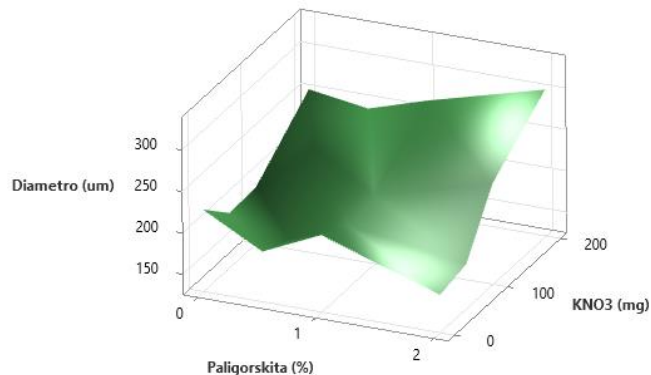


**Figura 3.28.** Gráfica de contorno del contenido de potasio atrapado en microesferas de quitosano.

El aumento en la eficiencia de captura de potasio a medida que disminuye la cantidad de  $\text{KNO}_3$  utilizado en la emulsión podría estar relacionado a la repulsión electrostática existente entre los grupos amino protonados del quitosano solubilizado en ácido acético y los iones de potasio disponibles. Los contenidos altos del principio activo generan una alta repulsión electrostática que promueve la migración de estos iones hacia la fase orgánica de la emulsión, produciendo bajos contenidos de potasio capturado.

#### 3.3.4.4 Tamaño de partícula en microesferas híbridas QUI/Pal/ $\text{KNO}_3$

La superficie de respuesta de la figura 3.29 corresponde al tamaño de partícula en función de la cantidad de paligorskita y  $\text{KNO}_3$  utilizados durante la preparación de las microesferas; se aprecia que los tamaños de partícula más pequeños se produjeron sin  $\text{KNO}_3$  y que a medida que va aumentando la cantidad de  $\text{KNO}_3$  se generaron tamaños de partícula más grandes. Se obtuvo un tamaño promedio de partícula en el intervalo de 170 y 302  $\mu\text{m}$ . Los tamaños de partícula más pequeños se obtuvieron con 2% de arcilla sin  $\text{KNO}_3$  y los más grandes con 2% de arcilla y 200 mg de  $\text{KNO}_3$ . De acuerdo a estos resultados, la variabilidad de tamaños encontrada se atribuyó a la cantidad de  $\text{KNO}_3$  y paligorskita usadas durante la preparación de las microesferas.



**Figura 3.29.** Superficie de respuesta diámetro promedio de las microesferas de quitosano.

Los resultados de la superficie de respuesta indican que los parámetros estudiados explican el 71% ( $R^2$ ) de la variabilidad observada en el tamaño de las microesferas de quitosano obtenidas por emulsión y entrecruzamiento con glutaraldehído.

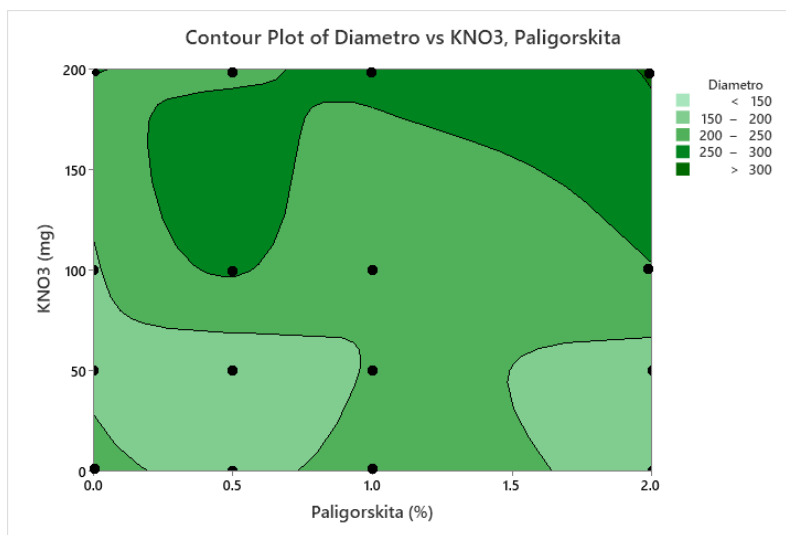
El análisis de varianza (tabla 3.16) indica que la variabilidad observada en el tamaño de partícula promedio de las microesferas de quitosano está relacionada a la cantidad de  $\text{KNO}_3$  utilizado en la emulsión y a su interacción con la paligorskita.



**Tabla 3.16.** Análisis de varianza del tamaño promedio de microesferas híbridas de quitosano.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados ajustada	Cuadrado medio ajustado	Valor F	Valor P
Modelo	15	64765	4317.7	5.16	0.000
Lineal	6	44736	7456.0	8.92	0.000
Paligorskita	3	1145	381.7	0.46	0.715
KNO <sub>3</sub>	3	43591	14530.2	17.37	0.000
Interacción de 2 factores	9	20029	2225.4	2.66	0.020
Paligorskita*KNO <sub>3</sub>	9	20029	2225.4	2.66	0.020
Error	32	26762	836.3		
Total	47	91527			

La figura 3.30 corresponde a la gráfica de contorno del tamaño de partícula de las microesferas de quitosano; se observan microesferas con un tamaño en el intervalo de 150 – 302 µm. A baja cantidad de arcilla y KNO<sub>3</sub> utilizados durante la emulsión generaron microesferas en el intervalo de tamaños de 150 - 200 µm, seguido por una zona intermedia dominada por el intervalo de 200 - 250 µm y finalizando con tamaños de partícula mayores a 300 µm con las más altas cantidades de arcilla y KNO<sub>3</sub> en la emulsión. El intervalo de tamaño de partícula predominante en este diseño experimental fue de 200 a 300 µm, confirmando la influencia la arcilla y el KNO<sub>3</sub> durante el proceso de emulsificación sobre los tamaños de las microesferas.



**Figura 3.30.** Gráfica de contorno del tamaño promedio de las microesferas híbridas de quitosano.

### **3.3.5 Caracterización fisicoquímica de las microesferas híbridas de quitosano**

#### **3.3.5.1 Distribución de tamaños de partícula en microesferas híbridas Qui/Pal/KNO<sub>3</sub>**

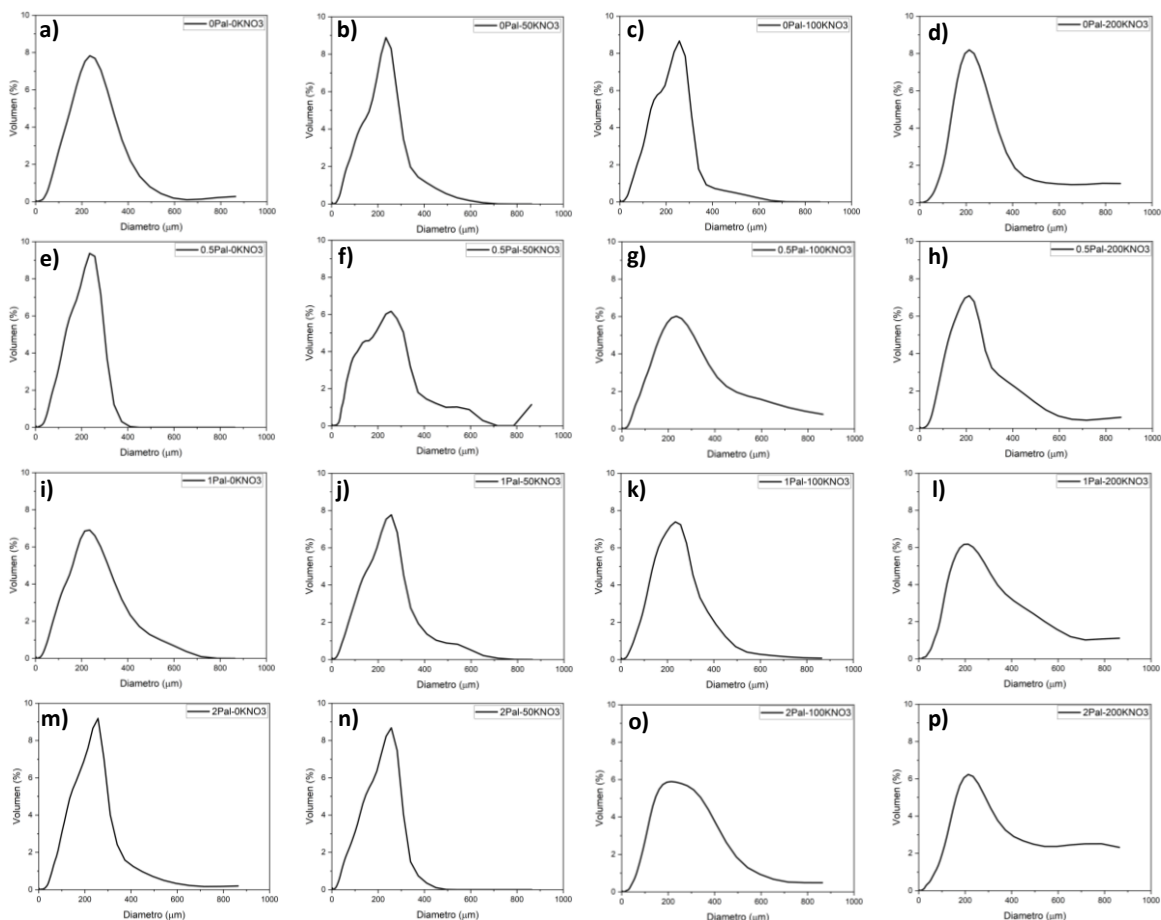
La figura 3.31 presenta las curvas de distribución de tamaño de partícula de las microesferas híbridas de quitosano. El efecto de la cantidad de arcilla utilizada durante la emulsión se observa al analizar las imágenes de manera vertical y de la cantidad de KNO<sub>3</sub> al analizar las imágenes de derecha a izquierda.

Las figuras 3.31 (a, e, i, m) corresponden a las curvas de distribución de tamaño de partícula de las microesferas preparadas con 0, 0.5, y 2% de arcilla sin KNO<sub>3</sub> la cual está en el intervalo de 30 a 800  $\mu\text{m}$ . Las figuras 3.31 (a, b, c, d) corresponden a las curvas de distribución de tamaño de partícula de las microesferas sin arcilla preparadas con 0, 50, 100 y 200 mg de KNO<sub>3</sub>; en ellas se aprecia una ampliación del intervalo de tamaños de partícula y se generan distribuciones bimodales (figura 3.31b, c).

Las figuras 3.31 (b, f, j, n) corresponden a las distribuciones de tamaño de partícula de las microesferas preparadas con 0, 0.5, 1 y 2% de arcilla y 50 mg de KNO<sub>3</sub>; éstas presentan un intervalo de tamaños de 15 a 700  $\mu\text{m}$  y una distribución bimodal. Las distribuciones de tamaño de las microesferas preparadas con 0.5% de arcilla y 0, 50, 100 y 200 mg de KNO<sub>3</sub> (figuras 3.31e, f, g y h) muestran un incremento en la amplitud de la distribución del tamaño de partícula.

Las distribuciones de tamaño de partícula de las microesferas preparadas con 0, 0.5, 1 y 2% de arcilla y 100 mg de KNO<sub>3</sub> (figuras 3.31c, g, k y o) estuvieron en el intervalo de 20 a 800  $\mu\text{m}$ , con una distribución unimodal (excepto a 0% arcilla). Las distribuciones de tamaño de las microesferas preparadas con 1% de arcilla y 0, 50, 100 y 200 mg de KNO<sub>3</sub>, presentaron distribuciones de tamaño de partícula bimodales (figuras 3.31i, j) y unimodales (figuras 3.31k, l), con intervalo de 20 a 864  $\mu\text{m}$ .

Las distribuciones de tamaño de partícula de las microesferas preparadas con 0, 0.5, 1 y 2% arcilla y 200 mg de KNO<sub>3</sub> presentaron un intervalo entre 30 y 864  $\mu\text{m}$  (figuras 3.31d, h, l y p) de tipo unimodal. Las microesferas preparadas con 2% de arcilla y 0, 50, 100 y 200 mg de KNO<sub>3</sub> presentaron distribuciones de tamaño de tipo bimodal (figuras 3.31m, n) y unimodal (figuras 3.31o, p), en un intervalo de 100 a 200 mg de KNO<sub>3</sub>.



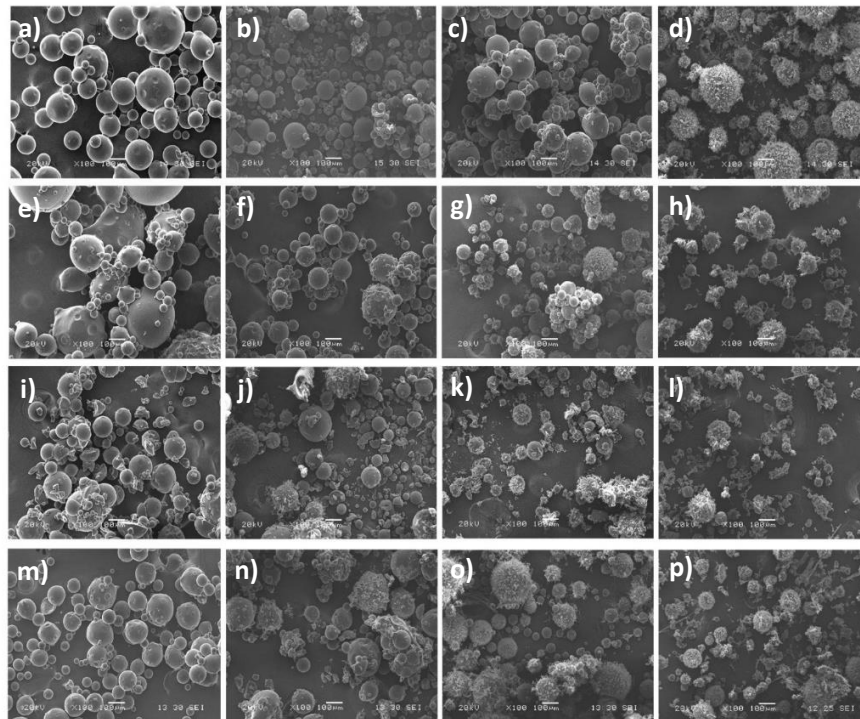
**Figura 3.31.** Distribuciones de tamaño de partícula de las microesferas híbridas. a) QUI-0%Pal-0mgKNO<sub>3</sub>, b) QUI-0%Pal-50mg KNO<sub>3</sub>, c) QUI-0%Pal-100mgKNO<sub>3</sub>, d) QUI-0%Pal-200mgKNO<sub>3</sub>, e) QUI-0.5%Pal-0mgKNO<sub>3</sub>, f) QUI-0.5%Pal-50mgKNO<sub>3</sub>, g) QUI-0.5%Pal-100mgKNO<sub>3</sub>, h) QUI-0.5%Pal-200mgKNO<sub>3</sub>, i) QUI-1%Pal-0mgKNO<sub>3</sub>, j) QUI-1%Pal-50mgKNO<sub>3</sub>, k) QUI-1%Pal-100mgKNO<sub>3</sub>, l) QUI-1%Pal-200mgKNO<sub>3</sub>, m) QUI-2%Pal-0mgKNO<sub>3</sub>, n) QUI-2%Pal-50mgKNO<sub>3</sub>, o) QUI-2%Pal-100mgKNO<sub>3</sub> y p) QUI-2%Pal-200mg KNO<sub>3</sub>.

La presencia del KNO<sub>3</sub> mostró un efecto claro sobre la distribución del tamaño de partícula. A 0 mg de KNO<sub>3</sub> las distribuciones obtenidas fueron similares y estrechas. La presencia de 50 mg de KNO<sub>3</sub> produjo un aumento en la viscosidad de las gotas de quitosano que promovieron un aumento en el tamaño de partícula y, por ende, en su distribución. La presencia de 100 y 200 mg de KNO<sub>3</sub> en las microesferas híbridas de quitosano mostraron un ensanchamiento en la distribución de tamaño de las partículas, lo que significa un mayor número de tipos de tamaño de partícula e indicando un aumento en la polidispersidad de los diámetros de las microesferas.

### 3.3.5.2 Morfología de las microesferas híbridas QUI/Pal/KNO<sub>3</sub>

La figura 3.32 ilustra la morfología de las microesferas híbridas de quitosano observadas al microscopio electrónico de barrido. Todas las microesferas presentaron una morfología esférica sin presencia de grietas. Las microesferas preparadas sin KNO<sub>3</sub> y las preparadas con arcilla

(figuras 3.32a, e, i y m) presentaron aglomeraciones de partículas, con morfología esférica y con algunos remanentes de microesferas sin formar. Las microesferas preparadas con 50 mg de  $\text{KNO}_3$  presentaron una mayor dispersión de tamaños (figuras 3.32b, f, j y n), manteniendo la morfología esférica. Adicionalmente las microesferas preparadas con 50 mg de  $\text{KNO}_3$  con 1 y 2% de arcilla (figuras 3.32j y n) presentaron en su superficie estructuras atribuibles a la presencia del principio activo. El aumento de  $\text{KNO}_3$  a 100 mg (figuras 3.32c, g, k y o) resultó en una menor dispersión de tamaños de las microesferas, con morfología esférica, con pocos remanentes de esferas sin formar y con un mayor contenido del principio activo sobre su superficie. A 200 mg de  $\text{KNO}_3$ , las microesferas obtenidas tuvieron tamaños completamente dispersos, conservando su morfología esférica, su superficie está completamente recubierta por el principio activo y su presencia en los alrededores de las microesferas (figuras 3.32d, h, l y p). El aumento en la cantidad de  $\text{KNO}_3$  usado en la preparación de las microesferas indujo al depósito del principio activo sobre la superficie de las mismas. No se observó la presencia de la arcilla en la superficie de las microesferas.

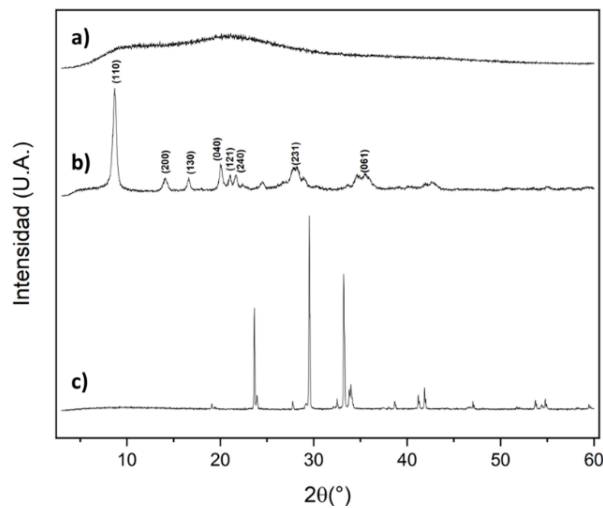


**Figura 3.32.** Micrografías electrónicas de barrido (100x) de a) QUI-0%Pal-0mg $\text{KNO}_3$ , b) QUI-0%Pal-50mg $\text{KNO}_3$ , c) QUI-0%Pal-100mg $\text{KNO}_3$ , d) QUI-0%Pal-200mg $\text{KNO}_3$ , e) QUI-0.5%Pal-0mg $\text{KNO}_3$ , f) QUI-0.5%Pal-50mg $\text{KNO}_3$ , g) QUI-0.5%Pal-100mg $\text{KNO}_3$ , h) QUI-0.5%Pal-200mg $\text{KNO}_3$ , i) QUI-1%Pal-0mg $\text{KNO}_3$ , j) QUI-1%Pal-50mg $\text{KNO}_3$ , k) QUI-1%Pal-100mg $\text{KNO}_3$ , l) QUI-1%Pal-200mg $\text{KNO}_3$ , m) QUI-2%Pal-0mg $\text{KNO}_3$ , n) QUI-2%Pal-50mg $\text{KNO}_3$ , o) QUI-2%Pal-100mg $\text{KNO}_3$  y p) QUI-2%Pal-200mg $\text{KNO}_3$ .

Las imágenes de las microesferas al microscopio electrónico de barrido sugieren que cuando se prepararon con 50 mg de  $\text{KNO}_3$ , las microesferas mostraron una baja presencia de  $\text{KNO}_3$  sobre su superficie, sin importar la cantidad de arcilla usada en su preparación. A 100 y 200 mg de  $\text{KNO}_3$ , éste recubrió la superficie de las esferas, además presentaron una baja captura de potasio en su estructura (sección 3.3.4.2), y su distribución de tamaños de partícula aumentó (sección 3.3.5.1). Las esferas con 0.5, 1 y 2%Pal-50mg $\text{KNO}_3$  se ajustaron a los requisitos de morfología, tamaño de partícula, altas cantidades de nitrato y potasio capturados para las pruebas de liberación de nitrato y potasio.

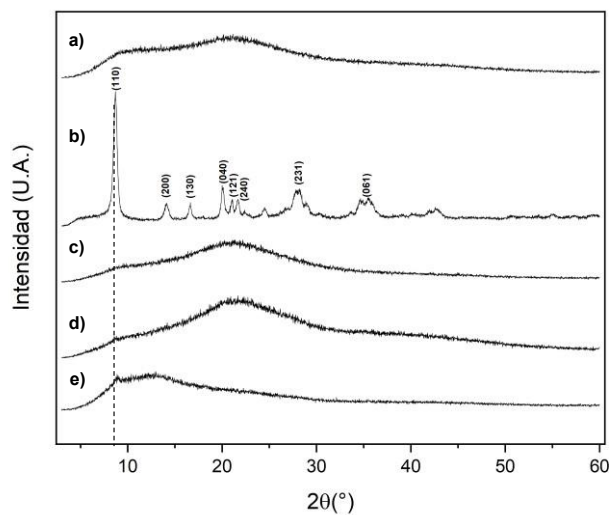
### 3.3.5.3 Difracción de rayos X de las microesferas híbridas QUI/Pal/ $\text{KNO}_3$

La figura 3.33 muestra los patrones de difracción de rayos X del quitosano, paligorskita y nitrato de potasio. Respecto al patrón de difracción del quitosano, se encontraron dos picos alrededor de  $10^\circ$  y  $20^\circ$  de  $2\theta$  atribuidos a sus planos cristalográficos 020 (cristal 1) y 110 (cristal 2), respectivamente [14, 126]. El patrón de difracción de rayos X de la paligorskita presentó ocho picos a  $2\theta$ , ubicados a  $8.69, 14.10, 16.63, 20, 21.03, 21.70, 27.80$  y  $35.50^\circ$  que corresponden a los planos cristalográficos (110), (200), (130), (040), (121), (240), (231) y (061) con sus respectivas distancias interplanares  $d_{110}= 1.054, d_{200}= 0.643, d_{130}= 0.538, d_{040}= 0.446, d_{121}= 0.429, d_{240}= 0.367, d_{231}= 0.324$  y  $d_{061}= 0.253$  nm [13, 121, 127]. El difractograma del  $\text{KNO}_3$  presentó 12 picos a  $2\theta$  ubicados a  $19.10, 23.64, 23.91, 27.74, 29.52, 32.50, 33.21, 33.98, 38.68, 41.19, 41.86$  y  $47.03^\circ$ . Los picos de difracción a  $23.64, 23.91, 29.52$  y  $32.50^\circ$  corresponden a los planos cristalográficos (111), (021), (012) y (102) de la estructura cristalina de la fase II del  $\text{KNO}_3$  que se encuentran a temperatura ambiente y presión atmosférica [14, 128].



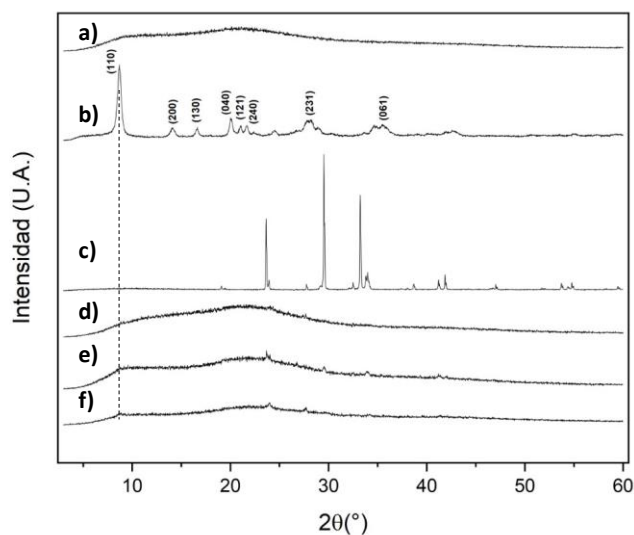
**Figura 3.33.** Difractograma de rayos X de a) Quitosano, b) Paligorskita y c)  $\text{KNO}_3$ .

La figura 3.34 muestra los patrones de difracción del quitosano, paligorskita y de las microesferas híbridas preparadas con 0.5, 1 y 2% de arcilla. Las microesferas preparadas con 0.5% de arcilla no mostraron claramente la banda a  $2\theta/8.69^\circ$  característico de la paligorskita, muy probablemente por la muy baja cantidad de arcilla usada durante la emulsión. Las microesferas con un contenido de arcilla de 1% mostraron tenuemente la banda a  $8.69^\circ$  de la paligorskita que corresponde al plano cristalográfico (110). El aumento en el contenido de arcilla al 2% permitió observar el pico de difracción de la arcilla a  $8.69^\circ$  con mayor claridad, indicando la presencia de la arcilla en la matriz polimérica, por tanto, la paligorskita se incorporó a las microesferas de manera efectiva en su proceso de preparación.



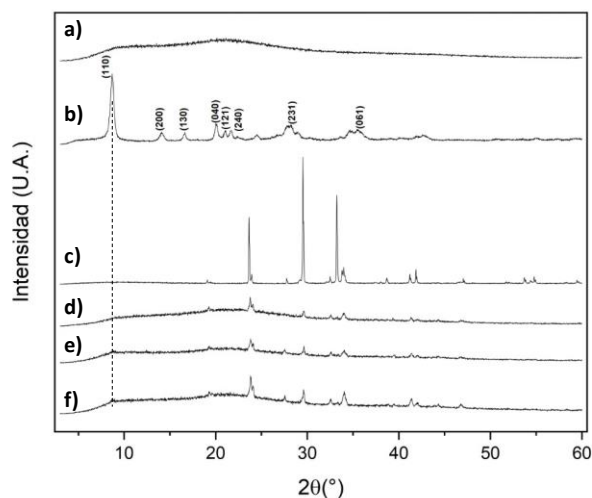
**Figura 3.34.** Difractogramas de rayos X de a) Quitosano, b) Paligorskita, c) QUI-0.5%Pal, d) QUI-1%Pal y e) QUI-2%Pal.

La figura 3.35 presenta los patrones de difracción del quitosano, paligorskita,  $\text{KNO}_3$  y microesferas híbridas preparadas con 0.5, 1 y 2% de arcilla y 50 mg de  $\text{KNO}_3$ . En las microesferas con 0.5% y 1% de arcilla (figura 3.35d y e) se observó la señal característica a  $8.69^\circ$  de la paligorskita, y las señales características tenues del  $\text{KNO}_3$  ( $2\theta$  a  $23.91$  y  $27.74^\circ$ ). Con 2% de arcilla (figura 3.35f) se incrementó su señal ( $2\theta$  a  $8.69^\circ$ ) y la de  $\text{KNO}_3$  ( $2\theta$  a  $23.91$  y  $27.74^\circ$ ).



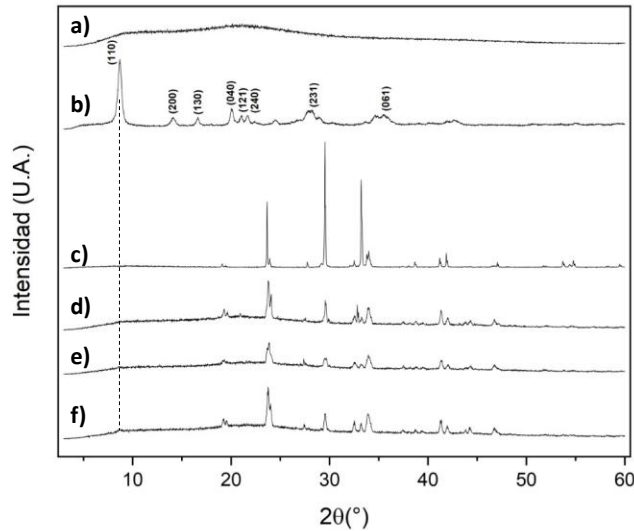
**Figura 3.35.** Difractogramas de rayos X de a) Quitosano, b) Paligorskita, c)  $KNO_3$ , d) QUI-0.5%Pal-50mg $KNO_3$ , e) QUI-1%Pal-50mg $KNO_3$  y f) QUI-2%Pal-50mg $KNO_3$ .

La figura 3.36 muestra los patrones de difracción de rayos x del quitosano, paligorskita,  $KNO_3$  y las microesferas de quitosano con 0.5, 1 y 2% de arcilla preparadas con 100 mg de  $KNO_3$ . En las microesferas de quitosano con 0.5% de arcilla, la presencia de las señales de difracción del  $KNO_3$ , son tenues. Las microesferas con 1% de arcilla mostraron una señal débil de la paligorskita a  $8.69^\circ$  y las señales correspondientes a  $KNO_3$  con mayor intensidad. Con el máximo contenido de arcilla (2%) se detectó la señal del plano (110) de la arcilla a  $8.69^\circ$  con mayor intensidad, así como las señales de la estructura cristalina del  $KNO_3$ . Los resultados muestran que con 100 mg de  $KNO_3$  las arcillas de paligorskita se incorporaron en la matriz polimérica de quitosano.



**Figura 3.36.** Difractogramas de rayos X de a) Quitosano, b) Paligorskita, c)  $KNO_3$ , d) QUI-0.5%Pal-100mg  $KNO_3$ , e) QUI-1%Pal-100mg $KNO_3$  y f) QUI-2%Pal-100mg $KNO_3$ .

La figura 3.37 muestra los patrones de difracción de rayos x del quitosano, paligorskita y de las microesferas con 0.5, 1 y 2% de arcilla preparadas con 200 mg de  $\text{KNO}_3$ . Cuando las microesferas se prepararon con 0.5% de arcilla las señales son tenues; sin embargo, con 1% y 2% de arcilla las microesferas mostraron las señales de la arcilla y de la estructura cristalina del  $\text{KNO}_3$ . Los resultados indican la presencia del principio activo cuando las microesferas se prepararon con 200 mg de  $\text{KNO}_3$ , presentando una buena intensidad de la señal del principio activo.



**Figura 3.37.** Difractogramas de rayos x de a) Quitosano, b) Paligorskita, c)  $\text{KNO}_3$ , d) QUI-0.5%Pal-200mg  $\text{KNO}_3$ , e) QUI-1%Pal-200mg $\text{KNO}_3$  y f) QUI-2%Pal-200mg $\text{KNO}_3$ .

El análisis de difracción de rayos X demuestra la presencia del principio activo y la arcilla en las microesferas de quitosano. Estos resultados son similares a los reportados por Ramos y col. [13], en donde la presencia de la paligorskita fue identificada en microesferas de quitosano preparadas con paligorskita en un intervalo de 2.5-10% de Pal.

#### 3.3.5.4 Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier de microesferas híbridas QUI/Pal/ $\text{KNO}_3$

El análisis de infrarrojo de las microesferas híbridas de quitosano permitió estudiar las interacciones existentes entre el polímero, la arcilla y el ingrediente activo. La figura 3.38 muestra el análisis de infrarrojo de los componentes de las microesferas híbridas preparadas con 0, 1 y 2%Pal y 50 mg de  $\text{KNO}_3$ .

Las principales bandas vibracionales del espectro infrarrojo de quitosano en el intervalo de 3750-3000  $\text{cm}^{-1}$  se deben al traslape de las vibraciones de estiramiento simétrico O-H y las vibraciones de estiramiento N-H. Las bandas de 2925 y 2854  $\text{cm}^{-1}$  se deben a las vibraciones de estiramiento



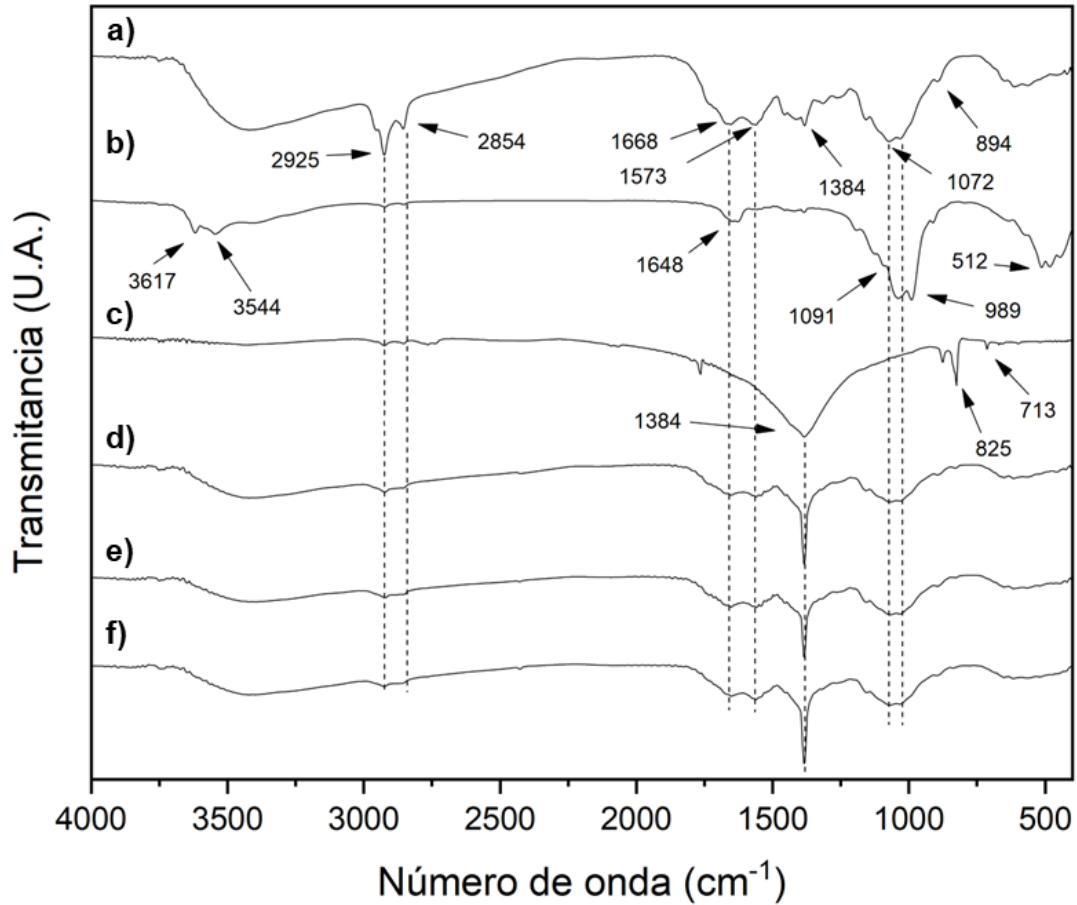
asimétrico del enlace C-H del grupo  $-\text{CH}_2$  y estiramiento simétrico del enlace C-H en el grupo  $-\text{CH}_3$  [129]. La banda observada a  $1668\text{ cm}^{-1}$  se atribuye a la vibración de estiramiento simétrico del grupo  $\text{C}=\text{O}$ , a  $1573\text{ cm}^{-1}$  corresponde a las vibraciones de estiramiento de los grupos amino protonados y la banda a  $1562\text{ cm}^{-1}$  al estiramiento del grupo amida (amida II) [130, 131]. Las bandas de  $1384$  y  $1317\text{ cm}^{-1}$  corresponden a las vibraciones de deformación angular de grupo metilo ( $-\text{CH}_3$ ) y a las vibraciones de estiramiento simétrico del enlace  $-\text{CH}_3$  de la amida terciaria [14, 132]. La banda a  $1263\text{ cm}^{-1}$  corresponde a la vibración de estiramiento del enlace C-O-H. La banda a  $1157\text{ cm}^{-1}$  corresponde a las vibraciones de flexión del enlace C-O-C, la banda a  $1072\text{ cm}^{-1}$  corresponde a la vibración de estiramiento del enlace C-OH y la banda a  $1031\text{ cm}^{-1}$  corresponde a la vibración de estiramiento simétrico del enlace C-O en el anillo COH, COC y  $\text{CH}_2\text{OH}$  [129, 130, 132, 133]. La banda a  $894\text{ cm}^{-1}$  corresponde a las vibraciones C-H de la estructura sacárida del quitosano [132].

Las bandas características de la paligorskita se dividen en tres regiones, de acuerdo con Madejová [134]. La primera región, la de números de onda altos en el intervalo de  $3700\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$ , está asignado a la vibración estructural del OH y el agua higroscópica. La segunda región, la de números de onda medios en el intervalo de  $1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ , está atribuida a las vibraciones en modo flexión del agua higroscópica y el agua absorbida. La tercera región, es la de números de onda bajos en el intervalo de  $1400\text{-}400\text{ cm}^{-1}$  y está asignado a los movimientos y vibraciones de los enlaces Si-O [135].

El espectro de infrarrojo de la paligorskita purificada muestra las bandas principales de la arcilla a  $3617\text{ cm}^{-1}$  que corresponde al estiramiento de enlaces Al-OH-Al y a  $3581\text{ cm}^{-1}$  para el estiramiento de los enlaces Mg-OH-Mg. Las bandas de absorción a  $3544$  y  $3399\text{ cm}^{-1}$  corresponden a las vibraciones de estiramiento del OH del agua en los enlaces (Fe, Mg)-OH y Si(OH)Si, respectivamente, incluyendo el agua zeolítica y el agua adsorbida superficialmente. La banda a  $3282\text{ cm}^{-1}$  es atribuida al estiramiento simétrico del agua enlazada al oxígeno en la unión Si(OH)Al. En la región de números de onda medios, la banda a  $1648\text{ cm}^{-1}$  corresponde a la vibración en modo flexión del enlace OH del agua absorbida. La región con números de onda bajos presenta bandas de absorción a  $1403\text{ cm}^{-1}$  atribuidas a la vibración del grupo carbonilo del ión carboxilato (asociado con impurezas de carbonatos), a  $1193\text{ cm}^{-1}$  para el estiramiento del enlace Si-O-Si, a  $1091$  y  $1039\text{ cm}^{-1}$  para las vibraciones de estiramiento del enlace Si-O. Las bandas de absorción a  $989$  y  $912\text{ cm}^{-1}$  se atribuyen al estiramiento del enlace Si-O-Mg y a la deformación del enlace Al-OH-Al, respectivamente. La vibración de estiramiento del enlace

Al,Mg-OH presenta una banda de absorción a  $865\text{ cm}^{-1}$ , la deformación de los enlaces Si-O-Al a  $512\text{ cm}^{-1}$  y la deformación de los enlaces Si-O-Si a  $484\text{ cm}^{-1}$  [134 – 137].

El espectro de infrarrojo del  $\text{KNO}_3$  muestra las bandas de absorción principales a  $1384$  y  $1050\text{ cm}^{-1}$  que corresponden al estiramiento simétrico del grupo  $\text{NO}_3^-$ , la banda de absorción a  $825\text{ cm}^{-1}$  atribuida a la flexión fuera del plano del grupo  $\text{NO}$ , así como las bandas a  $713$  y  $696\text{ cm}^{-1}$  correspondientes a las vibraciones de deformación del grupo  $\text{NO}_2$  [138 – 142].



**Figura 3.38.** Espectros de infrarrojo de a) Quitosano, b) Paligorskita, c)  $\text{KNO}_3$ , d) QUI-0.5%Pal-50mg $\text{KNO}_3$ , e) QUI-1%Pal-50mg  $\text{KNO}_3$  y f) QUI-2%Pal-50mg $\text{KNO}_3$ .

Los espectros de infrarrojo de las microesferas híbridas (figura 3.35d, e y f) mostraron las vibraciones características del quitosano a  $2925$  y  $2854\text{ cm}^{-1}$  que corresponden al estiramiento del enlace C-H de grupos etileno y estiramiento asimétrico del enlace C-H del grupo metilo, respectivamente. Las vibraciones a  $1668\text{ cm}^{-1}$  asignado al estiramiento simétrico del grupo C=O (amida I), a  $1573\text{ cm}^{-1}$  de estiramiento de grupos amino protonados, así como las vibraciones a  $1072$  y  $1031\text{ cm}^{-1}$  de las vibraciones de estiramiento C-OH y C-O en el anillo y COH, COC y

CH<sub>2</sub>OH de la estructura sacárida, respectivamente. Las vibraciones en el infrarrojo de la paligorskita no se observaron debido al traslape con las señales del quitosano. La presencia de los nitratos generó en todos los espectros analizados la señal intensa a 1384 cm<sup>-1</sup> que corresponde al estiramiento simétrico del grupo NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. El análisis de infrarrojo mostró que la presencia de la arcilla y el KNO<sub>3</sub> no produjo cambios estructurales en la matriz de quitosano, puesto que no se encontró ausencia o disminución en la intensidad de las bandas del polímero. Estos resultados son congruentes con los reportados por Santos y col. [14] que sugieren que las interacciones entre el quitosano y el KNO<sub>3</sub> son físicas y no químicas. De igual forma, este resultado concuerda con los obtenidos por Messa y col. [6, 143] que indican que el quitosano cargado positivamente (-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) puede interactuar con aniones como fosfatos, sulfatos y nitratos a través de interacciones electrostáticas.

### **3.3.6 Liberación controlada de fertilizantes (nitrógeno y potasio) en microesferas híbridas de quitosano**

#### **3.3.6.1 Selección de las microesferas híbridas QUI/Pal/KNO<sub>3</sub> para la liberación controlada de fertilizantes**

Las pruebas de liberación de nitrato y potasio se basaron en los resultados del diseño experimental factorial (sección 3.3.4), tomando en cuenta el rendimiento, contenido de nitrato y potasio capturado, el tamaño de partícula y la morfología de las microesferas híbridas.

Respecto al rendimiento de microesferas híbridas de quitosano, reportado en la sección 3.3.4.1, se encontró en un intervalo de 68 y 75%. La cantidad de nitrato capturado en las microesferas se encontró en el intervalo de 34 y 55% (sección 3.3.4.2), y no mostró cambios significativos al agregar la paligorskita o el KNO<sub>3</sub>.

Respecto al contenido de potasio capturado en las microesferas (sección 3.3.4.3), se obtuvieron eficiencias en el intervalo de 55 y 84%; además se encontró que el contenido de potasio capturado más alto corresponde a la menor cantidad del principio activo agregado durante la obtención de las microesferas híbridas (50 mg de KNO<sub>3</sub>).

Los tamaños de partícula obtenidos (sección 3.3.4.4/3.3.5.1) se encontraron en el intervalo de 170 a 302 μm; este parámetro aumentó en las microesferas híbridas preparadas con 100 y 200 mg de KNO<sub>3</sub> y los niveles de arcilla evaluados. La morfología de las microesferas preparadas con KNO<sub>3</sub> y paligorskita (sección 3.3.5.2) mostraron que a bajos contenidos del principio activo (50 mg) se generan esferas individuales y con baja presencia de cristales en su superficie; aunque el aumento en la cantidad del principio activo produjo microesferas con una superficie saturada de

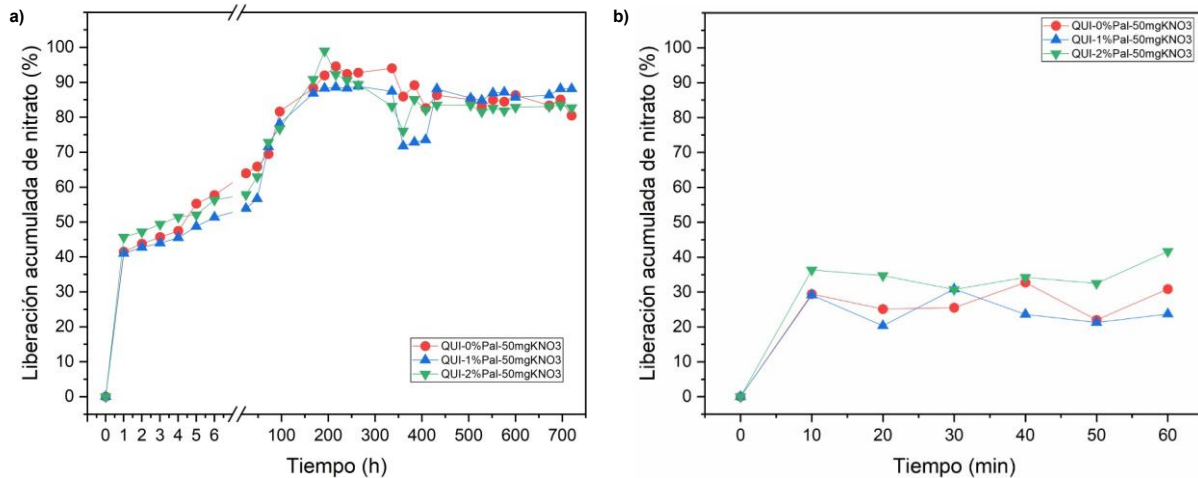
cristales de  $\text{KNO}_3$ . Los resultados de difracción de rayos X (sección 3.3.5.3) demostraron la presencia de la paligorskita en las microesferas preparadas con todos los niveles evaluados del principio activo. De acuerdo con los resultados anteriores se eligieron los sistemas 0%Pal-50mg  $\text{KNO}_3$ , 1%Pal-50mg $\text{KNO}_3$  y 2%Pal-50mg $\text{KNO}_3$  para las pruebas de liberación controlada de nitrato y potasio. La presencia superficial mínima del principio activo observada bajo estas condiciones puede disminuir la magnitud de la liberación de tipo ráfaga de los nitratos y el potasio; siendo esta una característica importante en la aplicación de las mismas.

### **3.3.6.2 Liberación de nitratos en microesferas híbridas QUI/Pal/ $\text{KNO}_3$**

La figura 3.39 muestra las curvas de liberación de nitrato en las microesferas híbridas de quitosano con fertilizante capturado (sección 2.6). La figura 3.39a muestra la liberación de nitrato durante 30 días. En la primera hora del experimento las microesferas de 0%Pal-50mg $\text{KNO}_3$  y 1%Pal-50mg $\text{KNO}_3$  liberaron el 41% del nitrato encapsulado, y el 45% para las esferas con 2%Pal-50mg $\text{KNO}_3$ , asociado a los cristales del principio activo presentes en la superficie de las microesferas (liberación ráfaga). Durante las horas subsecuentes, hasta las 24 h de liberación, se observa la liberación fickeana del nitrato de la superficie de las esferas. Posterior a las 24 h de liberación el hinchamiento de la matriz polimérica dio lugar a la liberación creciente del nitrato hasta alcanzar la máxima liberación para las esferas de 0%Pal-50mg $\text{KNO}_3$  del 94.58% a las 216 h (9 días), del 88.84% para 1%Pal-50mg $\text{KNO}_3$  a las 264 h (11 días) y del 99% para 2%Pal-50mg  $\text{KNO}_3$  a las 192 h (8 días). Después de haber alcanzado la máxima liberación de nitrato, dicho comportamiento se estabilizó hasta las 336 h (14 días) para las formulaciones de 0%Pal-50mg  $\text{KNO}_3$  y 1%Pal-50mg $\text{KNO}_3$ . Posteriormente a las 336 h, las curvas presentaron una disminución de la cantidad de nitrato liberado al medio acuoso hasta las 504 h (21 días) y manteniéndose estable hasta las 720 h (30 días). Es muy probable que el hinchamiento de las microesferas haya promovido la reabsorción de los nitratos presentes en el medio.

Los perfiles de liberación de nitratos de la figura 3.39b corresponden a la liberación tipo ráfaga; para ello, se monitoreó la liberación durante la primera hora de la prueba con una segunda alícuota de microesferas. En los primeros 10 min se produjo una liberación inicial del 29% para las microesferas 0%Pal-50mg $\text{KNO}_3$ ) y 1%Pal-50mg $\text{KNO}_3$  y de 36% en las microesferas 2%Pal-50 mg $\text{KNO}_3$ , que corresponden a la liberación del nitrato de la superficie de las microesferas. Posterior a los 10 min se presentó una reducción de la velocidad de liberación en todas las microesferas evaluadas; las microesferas de 0%Pal-50mg $\text{KNO}_3$  se mantuvieron en el intervalo de 22 y 31% alcanzando 31% a los 60 min. Las microesferas 1%Pal-50mg $\text{KNO}_3$  se mantuvieron en el intervalo de 21 y 31% con un máximo de 23% a los 60 min, cuyo valor obtenido fue menor

comparado con las microesferas 0%Pal-50mgKNO<sub>3</sub> y las microesferas 2%Pal-50mgKNO<sub>3</sub> mantuvieron una liberación de nitratos en el intervalo de 30 y 42%, con una liberación máxima del 42% a los 60 min, que fue el mayor valor alcanzado entre los tres tipos de microesferas.



**Figura 3.39.** Liberación en un medio acuoso de nitrato capturado en microesferas híbridas QUI/Pal/KNO<sub>3</sub>.

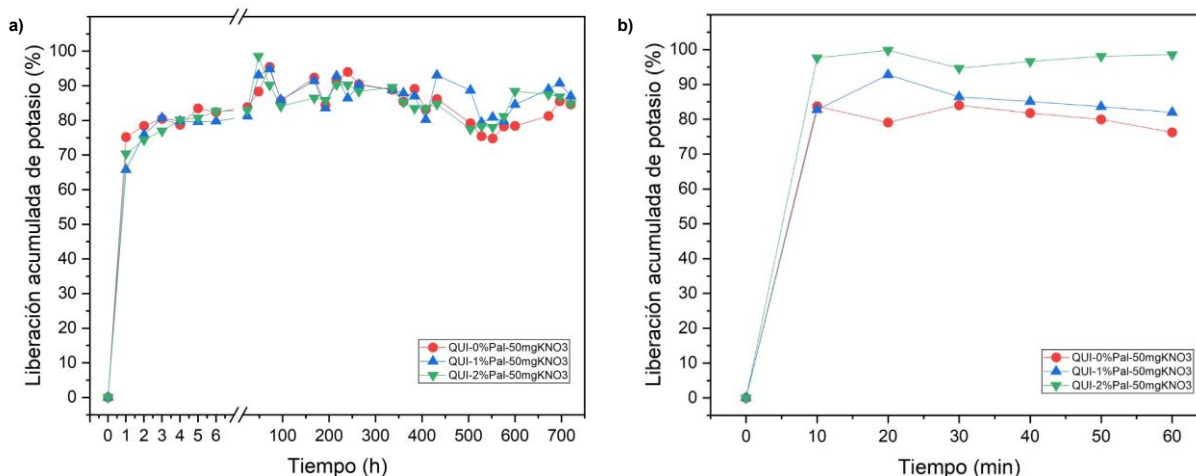
Los perfiles de liberación del nitrato capturado en las tres microesferas (0%Pal-50mgKNO<sub>3</sub>, 1%Pal-50mgKNO<sub>3</sub>, 2%Pal-50mgKNO<sub>3</sub>) son muy similares; la interacción entre el quitosano y los aniones de nitrato se da a través de los grupos amino protonados del quitosano y los aniones del nitrato, lo que hace posible el desarrollo de sistemas de liberación controlada de fertilizantes, como ha sido reportado por Messa y col. [6].

Los perfiles de liberación de nitratos durante los primeros 60 min mostraron que las microesferas 0%Pal-50mgKNO<sub>3</sub> y 1%Pal-50mgKNO<sub>3</sub> fueron similares; las microesferas 2%Pal-50mgKNO<sub>3</sub> mostraron una liberación de nitratos un tanto mayor en el mismo intervalo. La disminución en la liberación de nitratos con el 1% de arcilla es atribuible a que las arcillas aumentaron la tortuosidad del camino de liberación. La mayor tasa de liberación de nitratos de las microesferas 2%Pal-50 mgKNO<sub>3</sub> es atribuible a la aglomeración de las arcillas, lo que disminuye la tortuosidad del camino de liberación o a una mayor interacción entre los grupos Si-OH de la paligorskita con los grupos amino protonados del quitosano, compitiendo con los grupos nitrato, lo que genera una interacción iónica débil entre el NO<sub>3</sub><sup>-</sup> y el quitosano, como ha sugerido Santos y col. [14]. La liberación de nitratos durante los primeros 60 min es coherente con los resultados encontrados en las pruebas de liberación a 30 días.

### 3.3.6.3 Liberación de potasio en microesferas híbridas QUI/Pal/KNO<sub>3</sub>

La figura 3.40 muestra las curvas de liberación del potasio capturado en microesferas híbridas de quitosano. La figura 3.340a muestra la liberación de nitratos durante 30 días. En la primera hora de liberación, las microesferas de 0%Pal-50mgKNO<sub>3</sub>, 1%Pal-50mgKNO<sub>3</sub> y 2%Pal-50mgKNO<sub>3</sub> presentaron una liberación de potasio del 75, 65 y 70%, respectivamente, atribuido a la liberación ráfaga del principio activo de la superficie de las microesferas. Durante las siguientes horas, hasta las 48 h (2 días) se alcanzó una liberación máxima del potasio para las microesferas 2%Pal-50 mgKNO<sub>3</sub> del 98.53% y para 0%Pal-50mgKNO<sub>3</sub> y 1%Pal-50mgKNO<sub>3</sub> a las 72 h (3 días), del 95 y 94%, respectivamente. Después de las 72h, la liberación de potasio los sistemas evaluados presentaron oscilaciones, que podrían deberse a la ralentización en la velocidad de liberación del potasio. Después de las 300 h se observa una disminución en el contenido de potasio en el sobrenadante líquido, esto puede deberse a que el hinchamiento de las esferas revierte el proceso y se inicie la reabsorción del potasio. La liberación de potasio aumentó a partir de las 552 h y se mantuvo por encima del 80% hasta las 720 h (30d). Las curvas de liberación de potasio presentaron un comportamiento similar en el intervalo de medición, sin presentar diferencias evidentes entre las microesferas híbridas de quitosano evaluadas.

Los perfiles de liberación de potasio de la figura 3.40b corresponden a los primeros 60 min de la liberación del potasio medidos en una segunda alícuota de las microesferas estudiadas. Se liberó el 83% del potasio en las microesferas 0%Pal-50mgKNO<sub>3</sub> y 1%Pal-50mgKNO<sub>3</sub>, y el 97% del potasio en las microesferas 2%Pal-50mgKNO<sub>3</sub> durante los primeros 10 minutos, atribuidos al potasio anclado superficialmente en las microesferas. La liberación de potasio de las microesferas 0%Pal-50mgKNO<sub>3</sub> y 1%Pal-50mgKNO<sub>3</sub> presentaron una estabilización y un comportamiento similar decreciente de la tasa de liberación. La alta tasa de liberación de potasio es atribuible a que las interacciones electrostáticas de repulsión entre los iones de potasio y los grupos amino del quitosano son mayores que las interacciones de atracción por intercambio catiónico entre el potasio y la paligorskita.



**Figura 3.40.** Ensayos de liberación de potasio en microesferas híbridas QUI/Pal/ $KNO_3$  en un medio acuoso.

La liberación de potasio ráfaga en la primera hora experimental de las microesferas híbridas de quitosano seleccionadas fue atribuida a la presencia superficial del principio activo (microscopía electrónica, sección 3.3.5.2). Se ha estudiado que el quitosano presenta una repulsión electrostática hacia especies catiónicas como el potasio, lo que promueve la rápida liberación del principio activo durante los primeros 60 min de iniciadas las pruebas de liberación (figura 3.40b), como lo ha reportado Messa y col. [143]. Los perfiles de liberación de potasio en los sistemas evaluados demuestran que la liberación controlada del potasio es posible gracias a la capacidad de intercambio catiónico de la paligorskita con el  $K^+$ . La liberación de potasio durante los primeros 60 min no es coherente con los resultados encontrados en las pruebas de liberación a 30 días, esto puede deberse a que se trata de una alícuota de microesferas diferente; sin embargo, confirma la liberación ráfaga y que esta ocurre muy temprano dentro de la primera hora de inmersión.

### 3.3.7 Liberación controlada de fertilizantes (nitrógeno y potasio) en microesferas híbridas de quitosano

Las curvas de liberación del principio activo ( $NO_3^-$  o  $K^+$ ) en microesferas híbridas de quitosano (figura 3.40) fueron modeladas con la ecuación 3.1 que corresponde a la solución de la segunda ley de Fick para la difusión de un fluido en una dirección a través de un material en masa [144]:

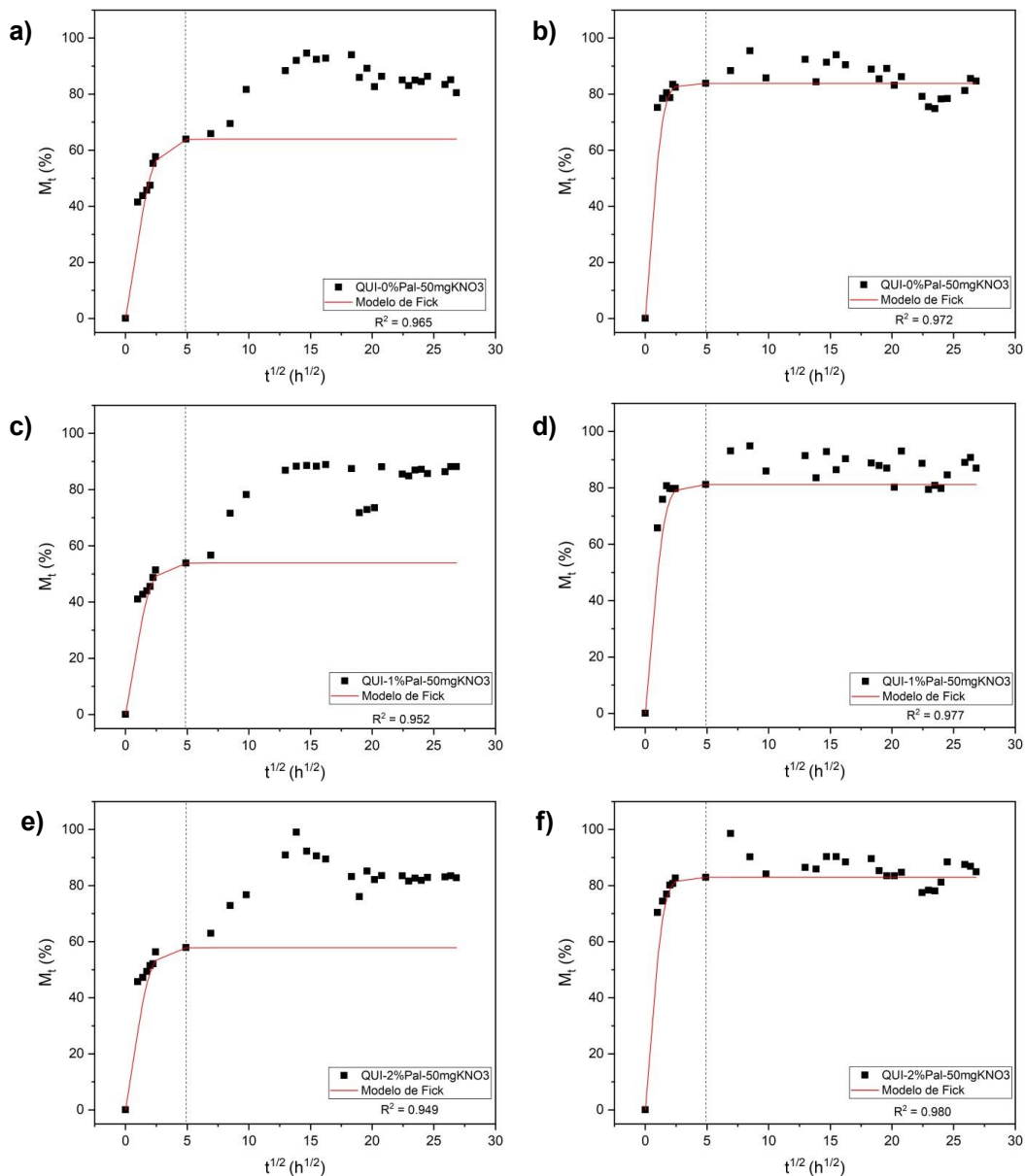
$$M_t(\%) = M_m * \left\{ 1 - e \left[ -7.3 \left( \frac{D \cdot t}{L^2} \right)^{0.75} \right] \right\} \quad (3.1)$$

donde  $M_t$  es el porcentaje de  $\text{NO}_3^-$  o  $\text{K}^+$  al tiempo  $t$ ,  $M_m$  es el porcentaje de saturación de  $\text{NO}_3^-$  o  $\text{K}^+$  liberado,  $D$  es el coeficiente de difusión (en  $\text{mm}^2/\text{h}$ ),  $L$  es el radio de las microesferas (en  $\text{mm}$ ) y  $t$  es el tiempo de liberación.

La figura 3.41 muestra las curvas representativas del porcentaje de  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{K}^+$  liberado contra la raíz cuadrada del tiempo de inmersión de las microesferas híbridas de quitosano ajustadas al modelo de Fick. Los coeficientes de correlación ( $R^2$ ) obtenidos en el intervalo de 0.94 y 0.98 indican que el modelo de Fick describe apropiadamente las etapas iniciales de la liberación del principio activo ( $\text{NO}_3^-$  y  $\text{K}^+$ ). La liberación de  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{K}^+$  desde las microesferas híbridas 0% Pal-50 mg  $\text{KNO}_3$ , 1% Pal-50mg $\text{KNO}_3$ , y 2%Pal-50mg $\text{KNO}_3$  presentaron un comportamiento de liberación tipo Fickeana durante la etapa inicial del proceso de liberación. La liberación del  $\text{NO}_3^-$  (figura 3.41a, c y e) presentó un comportamiento Fickeano hasta las  $4.89 \text{ h}^{1/2}$  (24 h) de haberse iniciado la inmersión; posteriormente se observa una segunda etapa de liberación de  $\text{NO}_3^-$  que no se ajusta al modelo de Fick. La primera etapa de liberación Fickeana está relacionada a la difusión superficial del  $\text{NO}_3^-$  impulsada por una diferencia de concentración de  $\text{NO}_3^-$  entre el medio de liberación acuoso y los alrededores de la superficie de las microesferas; la segunda etapa puede estar relacionada a efectos de hinchamiento de la matriz de quitosano y la relajación del polímero.

El  $\text{K}^+$  (figura 3.41b, d y f) presentó una etapa inicial de liberación Fickeana hasta las  $2.23 \text{ h}^{1/2}$  (5 h),  $2 \text{ h}^{1/2}$  (4 h) y  $2.44 \text{ h}^{1/2}$  (6 h) para las microesferas híbridas 0%Pal-50mg $\text{KNO}_3$ , 1%Pal-50mg  $\text{KNO}_3$ , y 2%Pal-50mg $\text{KNO}_3$ , respectivamente. Posteriormente, una segunda etapa de liberación de  $\text{K}^+$  se ajustó al modelo de Fick. La etapa inicial de liberación Fickeana está relacionada a la difusión superficial del  $\text{K}^+$  impulsada por una diferencia de concentración de  $\text{K}^+$  entre el medio de liberación acuoso y los alrededores de la superficie de las esferas; la segunda etapa podría relacionarse a los efectos del hinchamiento y relajación de la matriz polimérica sobre la liberación de  $\text{K}^+$ .





**Figura 3.41.** Curvas de liberación de  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{K}^+$  vs la raíz cuadrada del tiempo de inmersión de microsferas de QUI híbridas ajustadas al modelo de Fick. a) QUI-0%Pal-50mg $\text{KNO}_3$  ( $\text{NO}_3^-$  liberado), b) QUI-0%Pal-50mg $\text{KNO}_3$  ( $\text{K}^+$  liberado), c) QUI-1%Pal-50 mg $\text{KNO}_3$  ( $\text{NO}_3^-$  liberado), d) QUI-1%Pal-50mg $\text{KNO}_3$  ( $\text{K}^+$  liberado), e) QUI-2%Pal-50mg $\text{KNO}_3$  ( $\text{NO}_3^-$  liberado) y f) QUI-2%Pal-50mg  $\text{KNO}_3$  ( $\text{K}^+$  liberado). La línea punteada es el tiempo en el que la liberación de  $\text{NO}_3^-/\text{K}^+$  alcanza su saturación.

La saturación de  $\text{NO}_3^-$  se seleccionó en base a los resultados experimentales en el intervalo de 53 a 63% y los coeficientes de difusión se calcularon al comienzo del proceso de liberación de  $\text{NO}_3^-$  (regresión lineal de la parte inicial y lineal de la curva - Anexo 1) y se encuentran el intervalo de 28 a 39  $\text{mm}^2/\text{h}$  (tabla 3.17); D aumentó con el contenido de arcilla dando lugar a la liberación ráfaga del  $\text{NO}_3^-$  en las etapas iniciales del proceso de liberación (figura 3.39 y 3.41).

**Tabla 3.17.** Liberación saturada de  $\text{NO}_3^-$  y coeficiente de difusión de microesferas híbridas de quitosano.

Microesferas	Saturación de $\text{NO}_3^-$ $M_m$ (%)	Coficiente de difusión $D$ ( $\times 10^{-05}$ $\text{mm}^2/\text{h}$ )	Coficiente de correlación $R^2$
QUI-0%Pal-50mg $\text{KNO}_3$	$63.95 \pm 12.6$	$28.9 \pm 3.86$	0.965
QUI-1%Pal-50mg $\text{KNO}_3$	$53.87 \pm 4.17$	$39.25 \pm 5.63$	0.952
QUI-2%Pal-50mg $\text{KNO}_3$	$57.87 \pm 2.83$	$32.46 \pm 0.30$	0.949

La saturación de  $\text{K}^+$  se seleccionó en base a los resultados experimentales en el intervalo de 81 a 83% y los coeficientes de difusión se calcularon al comienzo del proceso de liberación de  $\text{K}^+$  (regresión lineal de la parte inicial y lineal de la curva - Anexo 1) y se encuentran en el intervalo de 59 a 74  $\text{mm}^2/\text{h}$  (tabla 3.18). El coeficiente de difusión decrece conforme aumenta el contenido de arcilla; la presencia de la paligorskita favorece el intercambio catiónico con el  $\text{K}^+$ , contrarrestando las repulsiones electrostáticas entre el quitosano y el  $\text{K}^+$ , en consecuencia, la velocidad de liberación de  $\text{K}^+$  disminuye (figura 3.40 y 3.41).

**Tabla 3.18.** Liberación saturada de  $\text{K}^+$  y coeficiente de difusión de microesferas híbridas de quitosano.

Microesferas	Saturación de $\text{K}^+$ $M_m$ (%)	Coficiente de difusión $D$ ( $\times 10^{-05}$ $\text{mm}^2/\text{h}$ )	Coficiente de correlación $R^2$
QUI-0%Pal-50mg $\text{KNO}_3$	$83.85 \pm 22.87$	$74.17 \pm 10.75$	0.972
QUI-1%Pal-50mg $\text{KNO}_3$	$81.19 \pm 8.00$	$67.14 \pm 9.85$	0.977
QUI-2%Pal-50mg $\text{KNO}_3$	$82.96 \pm 2.04$	$59.89 \pm 9.66$	0.980

El modelado de la cinética de liberación de  $\text{NO}_3^-$  mostró un comportamiento Fickeano en las etapas iniciales de la liberación, con etapas posteriores que presentaron comportamientos no Fickeanos que podrían ajustarse con modelos que consideren el hinchamiento y relajación del polímero a tiempos largos. Sin embargo, en el caso de la liberación de  $\text{K}^+$  se puede observar que a altos tiempos la liberación no se aleja demasiado del comportamiento Fickeano, lo cual sugiere que el potasio se encuentra principalmente en la superficie de las esferas o muy cerca de esta.

## CONCLUSIONES

Se produjeron exitosamente microesferas poliméricas mediante métodos de emulsión; las esferas de alginato producidas por emulsión y gelificación iónica mostraron un intervalo de tamaño promedio menor a 100  $\mu\text{m}$  y un estado gelificado, su potencial aplicación como sistema de liberación de fertilizantes requiere optimizar el método de obtención.

Las microesferas híbridas de PLA preparadas con  $\text{KNO}_3$  y Paligorskita por el método de emulsión y evaporación del solvente presentaron rendimientos altos del 75-93%, morfología esférica, intervalos de tamaño entre 150-240  $\mu\text{m}$ , eficiencias de captura de nitrato y potasio en intervalos de 1.7-3% y 18-28% respectivamente; estos últimos, atribuidos al intercambio catiónico con la arcilla. La presencia del  $\text{KNO}_3$  y paligorskita en las microesferas indujo la formación de poros que redujeron la eficiencia de captura, ya que el principio activo presenta una alta solubilidad con la fase acuosa de la emulsión y la paligorskita migró hacia la interface acuosa-orgánica modificando el proceso de evaporación del solvente.

La liberación controlada de fertilizantes a partir de microesferas híbridas de quitosano podrían ser una alternativa viable para la sustitución de los métodos tradicionales de administración de fertilizantes en cultivos estratégicos. Se demostró que la cantidad de  $\text{KNO}_3$  utilizada durante el proceso de preparación de las microesferas híbridas de quitosano fue el principal factor que afectó el tamaño promedio y distribución de tamaño de partícula, la morfología de las microesferas y la eficiencia de captura de los iones de nitrato y potasio. Las pruebas de liberación de fertilizantes mostraron una liberación ráfaga inicial de entre 40-45% de nitratos, seguida de una liberación Fickeana y su posterior liberación sostenida durante 30 días. El potasio experimentó una liberación inicial del 65-75% de tipo ráfaga, seguido de una fase de estabilización, con una posterior liberación sostenida durante 30 días.

La liberación de nitrato se encontró gobernada por las interacciones entre los grupos amino protonados del quitosano, los aniones nitrato y la paligorskita. La liberación de potasio se encontró gobernada principalmente por interacciones iónicas entre la paligorskita y el catión potasio. La liberación tipo Fick del potasio sugiere que estos cationes se encuentran principalmente en la superficie de las esferas o muy cerca de estas.

## RECOMENDACIONES

Con base en los resultados obtenidos, y con el fin de la obtención de un sistema de liberación de fertilizantes viable técnica y económicamente, se recomienda lo siguiente:

- Optimizar las condiciones de procesamiento de las esferas de alginato de sodio, con el fin de obtener un intervalo de tamaño de partícula reducido, rendimientos altos, altas eficiencias de atrapamiento de nitrato y potasio y liberación controlada por el contenido de paligorskita.
- Modificar las condiciones de procesamiento de las esferas de PLA para disminuir la formación de poros y la generación de especies protonadas en la estructura química del poli(ácido láctico) para lograr altas eficiencias de captura de nitratos. Así como mejorar la dispersión de la paligorskita en la matriz y evaluar su efecto mediante ensayos de liberación de fertilizantes.
- Estudiar el efecto de cantidades de  $\text{KNO}_3$  menores a 50 mg y concentraciones de paligorskita mayores al 2% sobre la morfología superficial, la eficiencia de captura de nitratos y potasio en microesferas híbridas de quitosano y su comportamiento de liberación controlada de ambos iones.

## REFERENCIAS

- [1] S.M. Sandhya, L.F. Fraceto, Y.X. Yang, H.B. Singh, en *Emerging Trends in Agri-Nanotechnology: Fundamental and Applied Aspects*, H.B. Singh, S. Mishra, L.F. Fraceto, R. de Lima, Eds.; CAB International, UK, 2018, Vol. 1, 1-9.
- [2] B.R. dos Santos, F.B. Bacalhau, T. dos S. Pereira, C.F. Souza, R. Faez. Chitosan-Montmorillonite microspheres: A sustainable fertilizer delivery system, *Carbohydr. Polym.* 127, 340–346, 2015.
- [3] Food and Agriculture Organization of the United Nations, *FAO statistical yearbook 2013: World food and agriculture*. 2013. Disponible en <http://site.ebrary.com/id/10815970>. (Accedido 8 Junio, 2021).
- [4] X. Zhang, E.A. Davidson, D.L. Mauzerall, T.D. Searchinger, P. Dumas, Y. Shen. Managing nitrogen for sustainable development, *Nature* 528, 51–59, 2015.
- [5] N. Kottegoda, I. Munaweera, N. Adassooriya, V. Karunaratne. A green slow-release fertilizer composition based on urea-modified hydroxyapatite nanoparticles encapsulated wood, *Curr. Sci.* 101, 73–78, 2011.
- [6] L.L. Messa, C.F. Souza, R. Faez. Spray-dried potassium nitrate-containing chitosan/montmorillonite microparticles as potential enhanced efficiency fertilizer, *Polym. Test.* 81,106196, 2020.
- [7] K. Mikula, G. Izydorczyk, D. Skrzypczak, M. Mironiuk, K. Moustakas, A. Witek-Krowiak, K. Chojnacka. Controlled release micronutrient fertilizers for precision agriculture – A review, *Sci. Total Environ.* 712, 136365, 2020.
- [8] D. França, L.L. Messa, C.F. Souza, R. Faez, en *Polymers for Agri-Food Applications*, T.J. Gutiérrez, Ed.; Springer International Publishing, Cham, 2019, Vol. 1, 29–44.
- [9] V.L.N. Nunes, R.L. Mulvaney, R.B. Cantarutti, F.G. Pinto, J. Tronto. Improving Nitrate Fertilization by Encapsulating Zn-Al Layered Double Hydroxides in Alginate Beads, *Nitrogen* 1, 125–136, 2020.
- [10] Y. Li, J. Dai, D. Cao, Y. Ma, L. Zhen, F. Chang. Preparation of pesticide microspheres based on polylactic acid: optimized by response surface methodology, *IOP Conf. Ser.: Mater. Sci. Eng.* 711, 012026, 2020.
- [11] N.R. Kildeeva, P.A. Perminov, L.V. Vladimirov, V.V. Novikov, S.N. Mikhailov. About mechanism of chitosan cross-linking with glutaraldehyde, *Russ. J. Bioorganic Chem.* 35, 360 – 369, 2009.

- [12] Y. Yahia, F. García-Villén, A. Djelad, L.S. Belaroui, R. Sánchez-Espejo, M. Sassi, A. López-Galindo, C. Viseras. Crosslinked palygorskite-chitosan beads as diclofenac carriers, *Appl. Clay Sci.* 180, 105169, 2019.
- [13] W. Ramos-Torres, R. Borges-Argáez, P.I. González-Chi. Nanostructured chitosan-palygorskite hybrid microspheres for controlled delivery of thymol, *Mater. Res. Express* 8, 105010, 2021.
- [14] T. dos Santos Pereira, D. França, C.F. Souza, R. Faez. Chitosan-Sugarcane Bagasse Microspheres as Fertilizer Delivery: On/Off Water Availability System, *J. Polym. Environ.* 28, 2977–2987, 2020.
- [15] H. Kiiski, H.W. Scherer, K. Mengel, G. Kluge, K. Severinn, en *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Wiley-VCH, Ed.; Wiley-VCH, Weinheim, 2016, 1-30.
- [16] UNIDO, en *Fertilizer Manual*, UNIDO, International Fertilizer Development Center, Eds.; Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1998, 1-18.
- [17] S. Dubey, V. Jhelum, P.K. Patanjali. Controlled release agrochemicals formulations: A review, *J. Sci. Ind. Res.* 70, 105–112, 2011.
- [18] C.T. Huynh, D.S. Lee, en *Encyclopedia of Polymeric Nanomaterials*, S. Kobayashi, K. Müllen, Eds.; Springer, Berlin, 2015, 439-449.
- [19] G. Raimondi, C. Maucieri, A. Toffanin, G. Renella, M. Borin. Smart fertilizers: What should we mean and where should we go?, *Ital. J. Agron.* 16, 1794, 2021.
- [20] M.Y. Naz, S.A. Sulaiman. Slow-release coating remedy for nitrogen loss from conventional urea: a review, *J. Control. Release* 225, 109–120, 2016.
- [21] S. Tiwari, A. Patel, N. Pandey, A. Raju, M. Singh, S.M. Prasad, en *Sustainable Solutions for Elemental Deficiency and Excess in Crop Plants*, K. Mishra, P.K. Tandon, S. Srivastava, Eds.; Springer Singapore, Singapore, 2020, 19-52.
- [22] M. Hawkesford, W. Horst, T. Kichey, H. Lambers, J. Schjoerring, I.S. Møller, P. White, en *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants*, P. Marschner, Ed.; Academic Press, Australia, 2012, 135-189.
- [23] T. Näsholm, K. Kielland, U. Ganeteg. Uptake of organic nitrogen by plants, *New Phytol.* 182, 31–48, 2009.
- [24] A.J. Miller, M.D. Cramer. Root Nitrogen Acquisition and Assimilation, *Plant Soil* 274, 1-36, 2005.
- [25] M.E. Conti. Dinámica de la liberación y fijación de potasio en el suelo, *Informaciones Agronómicas del Cono Sur. INFOPOS* 8, 25-37, 2000.

- [26] K. Prajapati. The importance of potassium in plant growth – a review, *Indian J. Plant Sci.* 1, 177-186, 2012.
- [27] G. Rehm, M. Schmitt, Potassium for crop production. 2018. Disponible en <https://extension.umn.edu/phosphorus-and-potassium/potassium-crop-production>. (Accedido 22 Noviembre, 2022).
- [28] International Plant Nutrition Institute, Nutrient Source Specifics. 2019. Disponible en <http://www.ipni.net/publication/nss-es.nsf/0/E33AED1504ADCE3D85257BBA0059BEAE/%24FILE/NSS-ES-11.pdf?OpenAgent&d=NSS-ES-11&f=NSS-ES-11.pdf>. (Accedido 22 Noviembre, 2022).
- [29] M.O. Díaz, F.J. Londoño, Diferencias en el uso de nitrato de potasio y sulfato de potasio. 2013. Disponible en [https://www.researchgate.net/publication/260201854\\_DIFERENCIAS\\_EN\\_EL\\_USO\\_DE\\_NITRATO\\_DE\\_POTASIO\\_Y\\_SULFATO\\_DE\\_POTASIO](https://www.researchgate.net/publication/260201854_DIFERENCIAS_EN_EL_USO_DE_NITRATO_DE_POTASIO_Y_SULFATO_DE_POTASIO). (Accedido 22 Noviembre, 2022).
- [30] E.R. Kenawy, D.C. Sherrington, A. Akelah. Controlled release of agrochemical molecules chemically bound to polymers, *Eur. Polym. J.* 28, 841-862, 1992.
- [31] A.D. Halvorson, C.S. Snyder, A.D. Blaylock, S.J. Del Grosso. Enhanced-efficiency nitrogen fertilizers: Potential role in nitrous oxide emission mitigation, *Agron. J.* 106, 715-722, 2014.
- [32] A. Shaviv, S. Raban, E. Zaidel. Modeling Controlled Nutrient Release from Polymer Coated Fertilizers: Diffusion Release from Single Granules, *Environ. Sci. Technol.* 37, 2251–2256, 2003.
- [33] J. Chen, S. Lü, Z. Zhang, X. Zhao, X. Li, P. Ning, M. Liu. Environmentally friendly fertilizers: A review of materials used and their effects on the environment, *Sci. Total Environ.* 613, 829-839, 2018.
- [34] J. Mudrić, S. Ibrić, J. Đuriš. Microencapsulation methods for plants biologically active compounds: A review, *Lekovite Sirovine* 38, 62-67, 2018.
- [35] M. Lengyel, N. Kállai-Szabó, V. Antal, A.J. Laki, I. Antal. Microparticles, Microspheres, and Microcapsules for Advanced Drug Delivery, *Sci. Pharm.* 87, 20, 2019.
- [36] S. Matiacevich, C. Saez, en *Una mirada multidisciplinaria*, Facultad Tecnológica, Ed.; Universidad de Santiago de Chile, Chile, 2019, Vol. 1, 97-109.

- [37] T. Sinha, P. Bhagwatwar, C. Krishnamoorthy, R. Chidambaram, en *Polymers for Agri-Food Applications*, T.J, Gutierrez, Ed.; Springer International Publishing, Cham, 2019, 5-28.
- [38] B. Hack, H. Egger, J. Uhlemann, M. Henriet, W. Wirth, A.W.P. Vermeer, D.G. Duff. Advanced Agrochemical Formulations through Encapsulation Strategies?, *Chem. Eng. Tech.* 84, 223-234, 2012.
- [39] S. Pedroso-Santana, N. Fleitas-Salazar. Ionotropic gelation method in the synthesis of nanoparticles/microparticles for biomedical purposes, *Polym. Int.* 69, 443-447, 2020.
- [40] E.N. Koukaras, S.A. Papadimitriou, D.N. Bikiaris, G.E. Froudakis. Insight on the Formation of Chitosan Nanoparticles through Ionotropic Gelation with Tripolyphosphate, *Mol. Pharm.* 9, 2856-2862, 2012.
- [41] T.K. Giri, en *Nanoarchitectonics for Smart Delivery and Drug Targeting*, A. M. Holban, A. M. Grumezescu, Eds.; Elsevier, UK, 2016, Vol.1, 119-141.
- [42] J.S. Patil, M.V. Kamalapur, S.C. Marapur, D.V. Kadam. Ionotropic gelation and polyelectrolyte complexation: the novel techniques to design hydrogel particulate sustained, modulated drug delivery system: a review, *Dig. J. Nanomater. Biostructures* 5, 241-248, 2010.
- [43] P. Patil, D. Chavanke, M. Wagh. A review on ionotropic gelation method: Novel approach for controlled gastroretentive gelspheres, *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 4, 27-32, 2012.
- [44] N.T. Uyen, Z.A. Hamid, N.X. Tram, N. Ahmad. Fabrication of alginate microspheres for drug delivery: A review, *Int. J. Biol. Macromol.* 153, 1035-1046, 2020.
- [45] L.L. Lee, N. Niknafs, R.D. Hancocks, I.T. Norton. Emulsification: Mechanistic understanding, *Trends Food Sci. Technol.* 31, 72-78, 2013.
- [46] S.N. Kale, S.L. Deore. Emulsion Micro Emulsion and Nano Emulsion: A Review, *Sys. Rev. Pharm.* 8, 39-47, 2016.
- [47] N.T. Thanh Uyen, Z.A. Abdul Hamid, L.A. Thi, N.B. Ahmad. Synthesis and characterization of curcumin loaded alginate microspheres for drug delivery, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 58, 101796, 2020.
- [48] H. Song, W. Yu, M. Gao, X. Liu, X. Ma. Microencapsulated probiotics using emulsification technique coupled with internal or external gelation process, *Carbohydr. Polym.* 96, 181-189, 2013.
- [49] M. Li, O. Rouaud, D. Poncelet. Microencapsulation by solvent evaporation: State of the art for process engineering approaches, *Int. J. Pharm.* 363, 26–39, 2008.



- [50] M. G. Nava-Arzaluz, E. Piñón-Segundo, A. Ganem-Rondero, D. Lechuga-Ballesteros. Single Emulsion-Solvent Evaporation Technique and Modifications for the Preparation of Pharmaceutical Polymeric Nanoparticles, *Recent Pat. Drug Deliv. Formul.* 6, 209–223, 2012.
- [51] J.W. Vanderhoff, M.S. El-Aasser, J. Ugelstad. U.S. Patent 4 177 177, 1979.
- [52] P.B. O'Donnell, J.W. McGinity. Preparation of microspheres by the solvent evaporation technique, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 28, 25-42, 1997.
- [53] G. Subedi, A.K. Shrestha, S. Shakya. Study of Effect of Different Factors in Formulation of Micro and Nanospheres with Solvent Evaporation Technique, *Open Pharm. Sci. J.* 3, 182-195, 2016.
- [54] I.H.T. Guideline, Impurities: Guideline for residual solvents Q3C (R8), Current Step 4. 2021. Disponible en [https://database.ich.org/sites/default/files/ICH\\_Q3C-R8\\_Guideline\\_Step4\\_2021\\_0422.pdf](https://database.ich.org/sites/default/files/ICH_Q3C-R8_Guideline_Step4_2021_0422.pdf). (Accedido 11 Noviembre, 2022).
- [55] C. Pinto Reis, R.J. Neufeld, A.J. Ribeiro, F. Veiga. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles, *Nanomed.: Nanotechnol. Biol. Med.* 2, 8-21, 2006.
- [56] H.-J. Huang, W.-K. Yuan, X.D. Chen, Microencapsulation Based on Emulsification for Producing Pharmaceutical Products: A Literature Review, *Dev. Chem. Eng. Min. Process.* 14, 515-544, 2008.
- [57] R.K. Farag, S. Hani, en *Reactive and Functional Polymers*, T.J. Gutiérrez Ed.; Springer International Publishing, Cham, 2020, Vol. 2, 91-116.
- [58] J.A. Ko, H.J. Park, S.J. Hwang, J.B. Park, J.S. Lee. Preparation and characterization of chitosan microparticles intended for controlled drug delivery, *Int. J. Pharm.* 249, 165–174, 2002.
- [59] R. Ramachandran, D. Jung, A.M. Spokoyny. Cross-linking dots on metal oxides, *NPG Asia Mater.* 11, 19, 2019.
- [60] F.L. Mi, S.S. Shyu, S.T. Lee, T.B. Wong, Kinetic study of chitosan-tripolyphosphate complex reaction and acid-resistive properties of the chitosan-tripolyphosphate gel beads prepared by in-liquid curing method, *J. Polym. Sci. B Polym. Phys.* 37, 1551-1564, 1999.
- [61] T. Zhao, T. Feng, Application of modified chitosan microspheres for nitrate and phosphate adsorption from aqueous solution, *RSC Adv.* 6, 90878–90886, 2016.

- [62] V.L. Gonçalves, M.C.M. Laranjeira, V.T. Fávere, R.C. Pedrosa. Effect of crosslinking agents on chitosan microspheres in controlled release of diclofenac sodium, *Polímeros: Ciência e Tecnologia* 15, 6-12, 2005.
- [63] U.S. Elesini, R. Urbas, en *Printing on Polymers*, Elsevier, Massachusetts, 2016, 389-396.
- [64] Y.H. Wong, H.Y. Tan, A. Kasbollah, B.J.J. Abdullah, M.N.M. Shah, C.H. Yeong. Biodegradable Samarium-153-labelled microspheres for hepatic radioembolization: preparation, characterization and radiolabelling evaluation after neutron activation, *J. Phys.: Conf. Ser.* 1248, 012066, 2019.
- [65] D.J. McHugh. A guide to the seaweed industry, *FAO, Fish. Tech. Pap.* 441, 39-49, 2003.
- [66] K.I. Draget, en *Handbook of Hydrocolloids*, G.O. Phillips, P.A. Williams, Eds.; Elsevier, Cambridge, 2009, 807–828.
- [67] G. Hernández-Carmona, Y.E. Rodríguez-Montesinos, D.L. Arvizu-Higuera, R. Reyes-Tisnado, J.I. Murillo-Álvarez, M. Muñoz-Ochoa. Avances tecnológicos en la producción de alginatos en México, *Ingeniería Investigación y Tecnología* 13, 155-168, 2012.
- [68] S.H. Ching, N. Bansal, B. Bhandari, Alginate gel particles—A review of production techniques and physical properties, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 57, 1133–1152, 2017.
- [69] R. Auras, B. Harte, S. Selke. An Overview of Polylactides as Packaging Materials, *Macromol. Biosci.* 4, 835–864, 2004.
- [70] A. Södergård, M. Stolt, en *Poly(Lactic Acid)*, R.A. Auras, L. Lim, S.E.M. Selke, H. Tsuji, Eds.; Wiley, USA, 2010, 27-37.
- [71] X. Jiang, Y. Luo, X. Tian, D. Huang, N. Reddy, Y. Yang, en *Poly(Lactic Acid)*, R.A. Auras, L. Lim, S.E.M. Selke, H. Tsuji, Eds.; Wiley, USA, 2010, 67-82.
- [72] L. Avérous, en *Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources*, M. N. Belgacem, A. Gandini, Eds.; Elsevier, UK, 2008, 443-450.
- [73] A. Hiraishi, en *Poly(Lactic Acid)*, R.A. Auras, L. Lim, S.E.M. Selke, H. Tsuji, Eds.; Wiley, USA, 2010, 477–486.
- [74] C. Muzzarelli, R.A.A. Muzzarelli. Natural and artificial chitosan–inorganic composites, *J. Inorg. Biochem.* 92, 89–94, 2002.
- [75] K. Molvinger, F. Quignard, D. Brunel, M. Boissière, J.M. Devoisselle. Porous Chitosan-Silica Hybrid Microspheres as a Potential Catalyst, *Chem. Mater.* 16, 3367–3372, 2004.
- [76] G.A.F. Roberts, en *Chitin Chemistry*, Red Globe Press London, UK, 1992, 1-53.
- [77] N. Morin-Crini, E. Lichtfouse, G. Torri, G. Crini, en *Sustainable Agriculture Reviews* 35, G. Crini, E. Lichtfouse, Eds.; Springer International Publishing, Cham, 2019, 49-123.

- [78] C. Lárez. Quitina y quitosano: materiales del pasado para el presente y el futuro, *Avances En Química*. 1, 15-21, 2006.
- [79] M. Rinaudo, Chitin and chitosan: Properties and applications, *Prog. Polym. Sci.* 31, 603-632, 2006.
- [80] J. Berger, M. Reist, J.M. Mayer, O. Felt, N.A. Peppas, R. Gurny. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 57, 19-34, 2004.
- [81] Z. Mármol, G. Páez, M. Rincón, K. Araujo, C. Aiello, C. Chandler, E. Gutiérrez. Quitina y Quitosano polímeros amigables. Una revisión de sus aplicaciones, *Revista Tecnocientífica URU* 1, 53-58, 2011.
- [82] V.R. Sinha, A.K. Singla, S. Wadhawan, R. Kaushik, R. Kumria, K. Bansal, S. Dhawan. Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs, *Int. J. Pharm.* 274, 1-33, 2004.
- [83] F.S. Tenório, T.L. Amaral, A.M.I. dos Santos, M. Silva, A.P. Lemes, D.B. Tada. Chitosan hydrogel covalently crosslinked by gold nanoparticle: Eliminating the use of toxic crosslinkers, *J. Appl. Polym. Sci.* 138, 49819, 2021.
- [84] O.A.C. Monteiro, C. Airoldi. Some studies of crosslinking chitosan-glutaraldehyde interaction in a homogeneous system, *Int. J. Biol. Macromol.* 26, 119-128, 1999.
- [85] S.A. Agnihotri, N.N. Mallikarjuna, T.M. Aminabhavi. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery, *J. Control. Release* 100, 5-28, 2004.
- [86] M.Z. Albanna, T.H. Bou-Akl, O. Blowytsky, H.L. Walters, H.W.T. Matthew. Chitosan fibers with improved biological and mechanical properties for tissue engineering applications, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 20, 217-226, 2013.
- [87] J. Núñez, en *Fundamentos de edafología*, Editorial Universidad Estatal a Distancia (EUED), Costa Rica, San José, 1981, 35-58.
- [88] UHU. Clase VIII: Silicatos, *Museo Virtual de Mineralogía*, 2018. Disponible en <https://www.uhu.es/museovirtualdemineralogia/galerias/clase8.html>. (Accedido 06 Marzo, 2023).
- [89] H. Strunz, E. Nickel. Silicates Classification, Mineralogy database. 2014, Disponible en <http://www.webmineral.com/strunz.shtml>. (Accedido 22 Noviembre, 2022).
- [90] R. Whitlow, en *Fundamentos de mecánica de suelos*, Compañía Editorial Continental, UK, 1994, 1-17.
- [91] I. Bernal, H. Cabezas, C. Espitia, J. Mojica, J. Quintero, R. Bernal. Análisis próximo de arcillas para cerámica, *Rev. Acad. Colomb. Cienc.* 27, 569–578, 2003.

- [92] S. Barakan, V. Aghazadeh. The advantages of clay mineral modification methods for enhancing adsorption efficiency in wastewater treatment: a review, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 28, 2572–2599, 2021.
- [93] F. Uddin. Clays, Nanoclays, and Montmorillonite Minerals, *Metall. Mater. Trans. A* 39, 2804–2814, 2008.
- [94] S. Marchuk, The Dynamics of Potassium in some Australian soils, PhD Thesis, The University of Adelaide, Australia, 2016.
- [95] H.H. Murray, en *Developments in Clay Science*, H. H. Murray, Ed.; Elsevier, USA, 2006, Vol. 2, 7-31.
- [96] A. Al-Futaisi, A. Jamrah, R. Al-Hanai. Aspects of cationic dye molecule adsorption to palygorskite, *Desalination* 214, 327–342, 2007.
- [97] G.A. Soberanis-Monforte, J.L. Gordillo-Rubio, P.I. González-Chi. Influence of Chemically Treated Palygorskite Over the Rheological Behavior of Polypropylene Nanocomposites, *Ingeniería Investigación y Tecnología* 16, 491–501, 2015.
- [98] R.L. Frost, G.A. Cash, J.T. Kloprogge. ‘Rocky Mountain leather’, sepiolite and attapulgite—an infrared emission spectroscopic study, *Vib. Spectrosc.* 16, 173–184, 1998.
- [99] M.F. Brigatti, E. Galan, B.K.G. Theng, en *Developments in Clay Science*, F. Bergaya, B.K.G. Theng, G. Lagaly, Eds.; Elsevier, UK, 2006, Vol. 1, 19-86.
- [100] X. Tian, N. Tian, Y. Nie, W. Luo, Y. Wang, en *Handbook of Ecomaterials*, L.M.T. Martínez, O.V. Kharissova, B.I. Kharisov, Eds.; Springer International Publishing, Cham, 2017, 1-37.
- [101] W. Yan, D. Liu, D. Tan, P. Yuan, M. Chen. FTIR spectroscopy study of the structure changes of palygorskite under heating, *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 97, 1052–1057, 2012.
- [102] J.J. Ramsden, *Nanotechnology An Introduction*, Elsevier, UK, Oxford, 2011, 15-34.
- [103] J.J. Ramsden, *Nanotechnology An Introduction*, Elsevier, UK, Oxford, 2011, 101-124.
- [104] E.I. Akpan, X. Shen, B. Wetzel, K. Friedrich, en *Polymer Composites with Functionalized Nanoparticles*, K. Pielichowski, T.M. Majka, Eds.; Elsevier, UK, 2019, 47-83.
- [105] D. Huang, Y. Zheng, Z. Zhang, Q. Quan, X. Qiang. Synergistic effect of hydrophilic palygorskite and hydrophobic zein particles on the properties of chitosan films, *Mater. Des.* 185, 108229, 2020. (2020).

- [106] X.H. Zhou, Q.H. Liu, G.Q. Ying, Y.D. Cui. Chlorpyrifos-Loaded Attapulгите/Sodium Alginate Hybrid Microsphere and its Release Properties, *Adv. Mater. Res.* 557–559, 1528–1532, 2012.
- [107] G.F. de Castro, E.M. Mattiello, J.A. Ferreira, L. Zotarelli, J. Tronto. Synthesis, characterization and agronomic use of alginate microspheres containing layered double hydroxides intercalated with borate, *New J. Chem.* 44, 10066–10075, 2020.
- [108] W. Prus-Walendziak, J. Kozłowska. Design of Sodium Alginate/Gelatin-Based Emulsion Film Fused with Polylactide Microparticles Charged with Plant Extract, *Materials (Basel)*. 14, 745, 2021.
- [109] Y. Wang, C. Li, Y. Wang, Y. Zhang, X. Li. Compound pesticide controlled release system based on the mixture of poly(butylene succinate) and PLA, *J. Microencapsul.* 35, 494-503, 2018.
- [110] J.L. Gordillo, Obtención de nanopartículas de fuentes regionales para su uso como refuerzo de materiales compuestos Termoplásticos, MSc Thesis, Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C, México, 2010.
- [111] S. Dhawan, A.K. Singla, V.R. Sinha. Evaluation of mucoadhesive properties of chitosan microspheres prepared by different methods, *AAPS PharmSciTech* 5, 122-128, 2004.
- [112] GLOBE Argentina. Protocolo de nitratos - 1, *Hidrología*, 2005. Disponible en [http://www.globeargentina.org/guia\\_del\\_maestro\\_web/hidrologia/protdenitratos.pdf](http://www.globeargentina.org/guia_del_maestro_web/hidrologia/protdenitratos.pdf). (Accedido 06 Marzo, 2023).
- [113] A.C. Edwards, P.S. Hooda, Y. Cook. Determination of Nitrate in Water Containing Dissolved Organic Carbon by Ultraviolet Spectroscopy, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 80, 49-59, 2001.
- [114] W. Bao, J. Zhou, J. Luo, D. Wu. PLGA microspheres with high drug loading and high encapsulation efficiency prepared by a novel solvent evaporation technique, *J. Microencapsul.* 23, 471–479, 2006.
- [115] S.M. Dourado, E.S. Nunes, R.P. Marques, L.S. Rossino, F.J. Quites, J.R. Siqueira, J.A. Moreto. Controlled release behavior of sulfentrazone herbicide encapsulated in Ca-ALG microparticles: preparation, characterization, mathematical modeling and release tests in field trial weed control, *J. Mater. Sci.* 52, 9491–9507, 2017.
- [116] A.R. Chandrasekaran, C.Y. Jia, C.S. Theng, T. Muniandy, S. Muralidharan, S.A. Dhanaraj. In vitro studies and evaluation of metformin marketed tablets-Malaysia, *J. Appl. Pharm. Sci.* 1, 214-217, 2011.

- [117] D. Yan, B. Zeng, Y. Han, H. Dai, J. Liu, Y. Sun, F. Li. Preparation and laser powder bed fusion of composite microspheres consisting of poly(lactic acid) and nanohydroxyapatite, *Addit. Manuf.* **34**, 101305, 2020.
- [118] C.P. Fuentes, Diseño y evaluación de un nuevo sistema de liberación controlada de pramipexol para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, MSc Thesis, Universidad de Concepción, Chile, 2017.
- [119] S. Rajkumar, B.D. Kevadiya, H.C. Bajaj. Montmorillonite/Poly (L-Lactide) microcomposite spheres as reservoirs of antidepressant drugs and their controlled release property, *Asian J. Pharm. Sci.* **10**, 452-458, 2015.
- [120] R.R. Pérez, Estudio de la estructura celular y de las propiedades de absorción de agua en espumas de Polipropileno reforzadas con Paligorskita, MSc Thesis, Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C, México, 2013.
- [121] E. Torres-López, Capacidad de adsorción del herbicida paraquat en nano-arcillas de paligorskita modificadas con compuestos catiónicos orgánicos, MSc Thesis, Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C, México, 2018.
- [122] M. Liu, M. Pu, H. Ma. Preparation, structure and thermal properties of polylactide/sepiolite nanocomposites with and without organic modifiers, *Compos. Sci. Technol.* **72**, 1508–1514, 2012.
- [123] R. Bodmeier, J.W. McGinity. Polylactic acid microspheres containing quinidine base and quinidine sulphate prepared by the solvent evaporation technique. I. Methods and morphology, *J. Microencapsul.* **4**, 279–288, 1987.
- [124] E.B. Denkbasi, M. Odabasi. Chitosan Microspheres and Sponges: Preparation and Characterization, *J. Appl. Polym. Sci.* **76**, 1637–1643, 2000.
- [125] K. Patel, M. Patel. Preparation and evaluation of chitosan microspheres containing nicorandil, *Int. J. Pharm. Investig.* **4**, 32–37, 2014.
- [126] S.F. Wang, L. Shen, Y.J. Tong, L. Chen, I.Y. Phang, P.Q. Lim, T.X. Liu. Biopolymer chitosan/montmorillonite nanocomposites: Preparation and characterization, *Polym. Degrad. Stab.* **90**, 123–131, 2005.
- [127] K.C. Xavier, M. do S. dos Santos, M.R. Santos, M.E. Oliveira, M.W. Carvalho, J.A. Osajima, E.C. da Silva. Effects of acid treatment on the clay palygorskite: XRD, surface area, morphological and chemical composition, *Mater. Res.* **17**, 3-8, 2014.
- [128] N. Dabra, J.S. Hundal, K.C. Sekhar, A. Nautiyal, R. Nath. Ferroelectric Phase Stability Studies in Spray Deposited  $\text{KNO}_3$ :PVA Composite Films, *J. Am. Ceram. Soc.* **92**, 834–838, 2009.

- [129] S.M. Silva, C.R. Braga, M.V. Fook, C.M. Raposo, L.H. Carvalho, E.L. Canedo, en *Infrared Spectroscopy - Materials Science, Engineering and Technology*, T. Theophanides Ed.; Intech, Croatia, 2012, 43-62.
- [130] B. Li, C.L. Shan, Q. Zhou, Y. Fang, Y.L. Wang, F. Xu, L.R. Han, M. Ibrahim, L.B. Guo, G.L. Xie, G.C. Sun. Synthesis, Characterization, and Antibacterial Activity of Cross-Linked Chitosan-Glutaraldehyde, *Mar. Drugs* 11, 1534–1552, 2013.
- [131] S. Tripathi, G.K. Mehrotra, P.K. Dutta. Physicochemical and bioactivity of cross-linked chitosan–PVA film for food packaging applications, *Int. J. Biol. Macromol.* 45, 372–376, 2009.
- [132] Q. Yuan, J. Shah, S. Hein, R.D. Misra. Controlled and extended drug release behavior of chitosan-based nanoparticle carrier, *Acta Biomater.* 6, 1140–1148, 2010.
- [133] J. Lin, L. Fan, R. Miao, X. Le, S. Chen, X. Zhou. Enhancing catalytic performance of laccase via immobilization on chitosan/CeO<sub>2</sub> microspheres, *Int. J. Biol. Macromol.* 78, 1–8, 2015.
- [134] J. Madejová. Baseline Studies of the Clay Minerals Society Source Clays: Infrared Methods, *Clays Clay Miner.* 49, 410–432, 2001.
- [135] D.A. McKeown, J.E. Post, E.S. Etz. Vibrational analysis of palygorskite and sepiolite, *Clays Clay Miner.* 50, 667–680, 2002.
- [136] H. Cheng, J. Yang, R.L. Frost, Z. Wu. Infrared transmission and emission spectroscopic study of selected Chinese palygorskites, *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 83, 518–524, 2011.
- [137] R.L. Frost, O.B. Locos, H. Ruan, J.T. Kloprogge. Near-infrared and mid-infrared spectroscopic study of sepiolites and palygorskites, *Vib. Spectrosc.* 27, 1–13, 2001.
- [138] J. de L. Souza, C.G. Chiaregato, R. Faez. Green Composite Based on PHB and Montmorillonite for KNO<sub>3</sub> and NPK Delivery System, *J. Polym. Environ.* 26, 670–679, 2018.
- [139] F.A. Miller, C.H. Wilkins. Infrared Spectra and Characteristic Frequencies of Inorganic Ions, *Anal. Chem.* 24, 1253–1294, 1952.
- [140] R.K. Khanna, J. Lingscheid, J.C. Decius. Infra-red absorption spectra of potassium nitrate in phases I, II and III, *Spectrochim. Acta* 20, 1109–1116, 1964.
- [141] R.A. Nyquist, R.O. Kagel, en *Handbook of Infrared and Raman Spectra of Inorganic Compounds and Organic Salts*, Academic Press, UK, London, 1971, 1-18.
- [142] I. Nakagawa, J.L. Walter. Optically Active Crystal Vibrations of the Alkali-Metal Nitrates, *J. Chem. Phys.* 51, 1389–1397, 1969.

- [143] L.L. Messa, R. Faez. Spray-dried chitosan/nanocellulose microparticles: synergistic effects for the sustained release of NPK fertilizer, *Cellulose* 27, 10077–10093, 2020.
- [144] C.-H. Shen, G.S. Springer. Moisture Absorption and Desorption of Composite Materials, *J. Compos. Mater.* 10, 2-20, 1976.



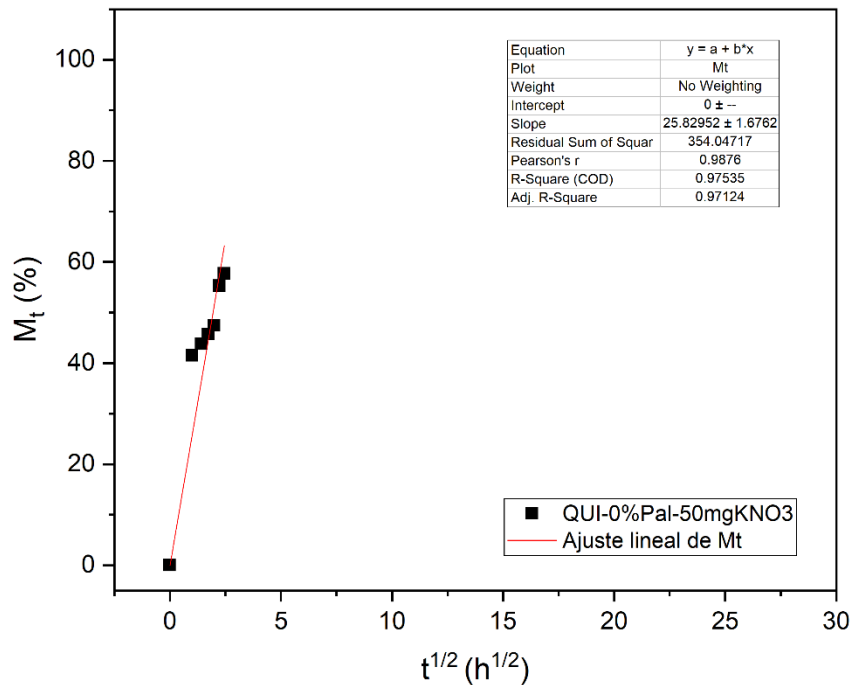
## ANEXOS

### Anexo 1. Coeficiente de difusión

La ecuación A1 propuesta por Shein y Springer [143] se utilizó para calcular el coeficiente de difusión al comienzo del proceso de liberación del principio activo ( $\text{NO}_3^-$  o  $\text{K}^+$ ), correspondiente a la parte lineal de las curvas de liberación de  $\text{NO}_3^-$  o  $\text{K}^+$ :

$$D = \pi \left( \frac{L}{4M_m} \right)^2 \left( \frac{M_2 - M_1}{\sqrt{t_2} - \sqrt{t_1}} \right)^2 \quad (\text{A1})$$

donde  $D$  es el coeficiente de difusión ( $\text{mm}^2/\text{h}$ ),  $L$  es el radio de las microesferas,  $M_m$  es el porcentaje de saturación de  $\text{NO}_3^-$  o  $\text{K}^+$  liberado,  $M_1$  y  $M_2$  son los porcentajes de  $\text{NO}_3^-$  o  $\text{K}^+$  liberado de la región lineal de la gráfica (al comienzo del proceso de liberación) en los tiempos  $t_1$  y  $t_2$ , respectivamente. La expresión  $(M_2 - M_1)/(\sqrt{t_2} - \sqrt{t_1})$  es la pendiente de la parte lineal inicial de la curva de liberación de  $\text{NO}_3^-$  o  $\text{K}^+$  vs la raíz cuadrada del tiempo de inmersión de las microesferas; esta pendiente se calculó mediante la regresión lineal de los datos experimentales de esta región de la curva (figura A1).



**Figura A1.** Regresión lineal de la curva de liberación de  $\text{NO}_3^-$  vs la raíz cuadrada del tiempo de inmersión de microesferas de QUI-0%Pal-50mgKNO<sub>3</sub> al comienzo del proceso de liberación.