



**Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.**

**Posgrado en Materiales Poliméricos**

Estudio de la liberación controlada de aminoácidos  
capturados en microesferas híbridas de matriz polimérica  
y nano-arcillas de paligorskita

**Tesis que presenta**

M. en C. Enrique Torres López

**En opción al título de**

Doctor en Ciencias  
(Materiales Poliméricos)

**Mérida, Yucatán, México**

**Noviembre 2024**

## DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en las secciones de: Materiales y Métodos, 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 Federal de Protección a 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 se registrarán, en todo caso, por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley Federal de Protección a la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

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

  
M. en C. Enrique Torres López

*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 Enrique Torres López titulado **Estudio de la liberación controlada de aminoácidos capturados en microesferas híbridas de matriz polimérica y nano-arcillas de paligorskita**, fue realizado en la Unidad de Materiales, en la línea de investigación 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 Chi perteneciente al Programa de Posgrado en Materiales Poliméricos de este Centro y la codirección de la Dra. Ileana de la Caridad Echevarría Machado de la Unidad de Biología Integrativa de este Centro.

Atentamente



---

Dr. José Luis Hernández Stefanoni  
Director de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 21 de noviembre de 2024

## AGRADECIMIENTOS

Al **CONAHCYT** por la beca otorgada (número 738312) para la realización de este proyecto.

Al **Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. (CICY)** por darme las facilidades de poder trabajar en sus instalaciones.

A mi director de tesis el **Dr. Pedro Iván González Chi** por la confianza brindada al dejarme participar en uno de sus proyectos de investigación; por su guía, consejos y por brindarme su amistad a lo largo de estos años.

A mi codirectora de tesis la **Dra. Ileana Echevarría Machado** por su asesoría y por el apoyo brindado durante la realización de este proyecto; su ayuda, dirección y consejos sobre cualquier duda que tenía, así como el permitirme trabajar en su laboratorio en la Unidad de Biología Integrativa.

A mis tutores de tesis el **Dr. José Manuel Cervantes Uc** y el **Dr. Felipe Barrera Méndez** por su importante labor de apoyarme cada semestre con sus valiosos consejos, observaciones y correcciones que permitieron obtener una mejor y sólida tesis.

A mis revisores la **Dra. Ingrid Mayanin Rodríguez Buenfil** y el **Dr. Ángel de Jesús Montes Luna** por sus valiosos consejos durante la revisión de esta tesis.

A los **Dres. Jorge Uribe, Fernando Hernández, Rolando Ríos y Alex Valadez** por fomentar y apoyar mi formación como Doctor en Ciencias al compartir sus conocimientos en clase.

A los técnicos de la Unidad de Materiales, **M.C. César Martín Barrera** por su apoyo técnico en la realización de este proyecto, a la **Q.I. Rossana Faride Vargas Coronado** por su ayuda con la capacitación del Analizador de Partícula Coulter® y el Espectrofotómetro UV-Visible, al **M.E.R. Santiago Duarte Aranda** por su ayuda en las pruebas de caracterización SEM y a la **M.C. María Verónica Moreno Chulim** por su apoyo en la facilitación de material y equipo en laboratorio.

A los técnicos de la Unidad de Biología Integrativa, **M.C. Miriam Monforte González**, por su ayuda en las pruebas de Espectrofotometría UV y la toma de fotografías en las pruebas *in vitro*, y a la **M.C. María de Fátima Medina Lara** por su apoyo en la estadística de las pruebas *in vitro* y su ayuda en el laboratorio.

A la **Dra. Daniella Esperanza Pacheco Catalán** y al **M.C. José Martín Baas López** de la Unidad de Energías Renovables del CICY por su ayuda en la realización de las pruebas de EDX.

Al **Dr. Rubén Rangel Pérez Matú** por su apoyo en el modelado matemático de las cinéticas de liberación.

A **M.C. Dayron Otero Rodríguez** por su ayuda en la preparación del fertilizante Hoagland para la germinación de semillas en las pruebas *in vitro*.

A mis amigos **Alejandra Valdez, Gissel Carreón, Fernando Palma, Felipe Rodríguez y Manuel Xool**, por su compañía y buenos deseos durante esta etapa.

## DEDICATORIA

A mi querida hermana **Beatriz Torres Lopez (QEPD)** que ahora es ese ángel que cuida y guía mis pasos.

A las personas más importantes de mi vida, mis amados padres **Lorenza López Vázquez** y **Leonardo Torres Núñez** y mi amada hermana **Ma. Guadalupe Torres López** por su apoyo incondicional desde el momento que decidí emprender este camino, este triunfo se lo dedico a Ustedes.

A **Fernando Gaucin** por todo el apoyo y ayuda que me ha brindado durante todo este tiempo, por siempre estar ahí cuando lo necesito y siempre alentarme a seguir adelante y no rendirme.

A mis tíos y primos por siempre darme palabras de aliento las cuales fueron de gran ayuda durante este tiempo.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

|  |     |
|--|-----|
| RESUMEN .....  | xi  |
| ABSTRACT .....   | xii |
| INTRODUCCION .....   | 1   |
| Justificación .....  | 2   |
| Propuesta de solución .....                                      | 2   |
| Hipótesis .....  | 3   |
| Objetivo general .....   | 3   |
| Objetivos específicos .....                                      | 3   |
| Capítulo 1   |     |
| 1. ANTECEDENTES .....  | 5   |
| 1.1. Polímeros .....   | 5   |
| 1.1.1. Clasificación de polímeros .....                          | 5   |
| 1.2. Biopolímeros .....  | 5   |
| 1.2.1. Quitosano (QUI) .....                                     | 6   |
| 1.2.2. Polietilenglicol (PEG) .....                              | 7   |
| 1.2.3. Alginato (ALG) .....                                      | 7   |
| 1.2.4. Poli(ácido láctico) (PLA) .....                           | 8   |
| 1.2.5. Cera de abeja (CAB) .....                                 | 9   |
| 1.3. Microesferas .....  | 9   |
| 1.3.1. Microesferas híbridas .....                               | 10  |
| 1.4. Métodos empleados para la elaboración de microesferas ..... | 10  |
| 1.4.1. Método de separación de fases .....                       | 11  |
| 1.4.2. Método de evaporación/extracción de solvente .....        | 11  |
| 1.4.3. Método de secado por aspersion .....                      | 12  |
| 1.4.4. Método por polimerización .....                           | 12  |
| 1.5. Paligorskita (Pal) .....                                    | 12  |
| 1.5.1. Estructura de la paligorskita .....                       | 13  |
| 1.5.2. Composición química de la paligorskita .....              | 13  |
| 1.6. Aminoácidos .....   | 14  |

|                   |  |           |
|-------------------|--|-----------|
| <b>1.6.1.</b>     | <b>Aminoácidos en las plantas</b>  | <b>15</b> |
| <b>1.6.1.1.</b>   | <b>Glicina (Gly)</b>   | <b>16</b> |
| <b>1.6.1.2.</b>   | <b>Ácido Glutámico (Glu)</b>   | <b>17</b> |
| <b>1.7.</b>       | <b>Métodos químicos para la determinación de la presencia de aminoácidos</b>   | <b>17</b> |
| <b>1.7.1.</b>     | <b>Método de reacción con ninhidrina</b>   | <b>18</b> |
| <b>1.8.</b>       | <b>Sistemas de liberación controlada en la agricultura</b>   | <b>19</b> |
| <b>1.8.1.</b>     | <b>Uso de sistemas de liberación controlada en plantas</b>   | <b>19</b> |
| <b>1.9.</b>       | <b>Modelos cinéticos para la liberación controlada de un principio activo</b>  | <b>21</b> |
| <b>1.9.1.</b>     | <b>Modelo de Orden Cero</b>  | <b>21</b> |
| <b>1.9.2.</b>     | <b>Modelo de Primer Orden</b>  | <b>21</b> |
| <b>1.9.3.</b>     | <b>Modelo Aproximación (Segunda Ley de Fick)</b>   | <b>22</b> |
| <b>1.9.4.</b>     | <b>Modelo de Higuchi</b>   | <b>22</b> |
| <b>1.9.5.</b>     | <b>Modelo de Korsmeyer-Peppas</b>  | <b>23</b> |
| <b>1.9.6.</b>     | <b>Modelo Multi-etapas</b>   | <b>23</b> |
| <b>1.10.</b>      | <b>Fitotoxicidad</b>   | <b>24</b> |
| <b>1.10.1.</b>    | <b>Condiciones que pueden generar fitotoxicidad en las plantas</b>   | <b>24</b> |
| <b>Capítulo 2</b> |  |           |
| <b>2.</b>         | <b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>  | <b>27</b> |
| <b>2.1.</b>       | <b>Materiales</b>  | <b>27</b> |
| <b>2.2.</b>       | <b>Métodos preliminares para la preparación de las microesferas de QUI, PEG, ALG, PLA y CAB y su caracterización morfológica</b> | <b>27</b> |
| <b>2.2.1.</b>     | <b>Metodología para la obtención de las microesferas de QUI</b>  | <b>28</b> |
| <b>2.2.2.</b>     | <b>Metodología para la obtención de las microesferas de PEG</b>  | <b>28</b> |
| <b>2.2.3.</b>     | <b>Metodología para la obtención de las microesferas de ALG</b>  | <b>29</b> |
| <b>2.2.4.</b>     | <b>Metodología para la obtención de las microesferas de PLA</b>  | <b>30</b> |
| <b>2.2.5.</b>     | <b>Metodología para la obtención de las microesferas de CAB</b>  | <b>30</b> |
| <b>2.2.6.</b>     | <b>Caracterización morfológica de las microesferas de QUI, PEG, ALG, PLA y CAB</b>   | <b>31</b> |
| <b>2.3.</b>       | <b>Métodos optimizados para preparación de las microesferas de QUI y PLA</b>   | <b>31</b> |
| <b>2.3.1.</b>     | <b>Metodología para la obtención de las microesferas híbridas de QUI</b>   | <b>32</b> |
| <b>2.3.2.</b>     | <b>Metodología para la obtención de las microesferas híbridas de PLA</b>   | <b>32</b> |

|                 |   |    |
|-----------------|---|----|
| <b>2.4.</b>     | Caracterización fisicoquímica de las microesferas de QUI y PLA .....  | 33 |
| <b>2.4.1.</b>   | Microscopia electrónica de barrido (SEM) .....  | 33 |
| <b>2.4.2.</b>   | Tamaño de partícula por el método Coulter® (TP) .....   | 34 |
| <b>2.4.3.</b>   | Porcentaje de hinchamiento y absorción de agua (PH y PA) .....  | 35 |
| <b>2.4.4.</b>   | Fase cristalina de la Paligorskita por Difracción de Rayos X (XRD) .....  | 35 |
| <b>2.4.5.</b>   | Determinación cualitativa y cuantitativa de los aminoácidos Gly y Glu en las<br>microesferas de QUI y PLA .....   | 36 |
| <b>2.4.5.1.</b> | Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR) de Gly y Glu<br>.....  | 36 |
| <b>2.4.5.2.</b> | Espectrofotometría UV-visible de Gly y Glu por el método de reacción con<br>ninhidrina .....  | 36 |
| <b>2.5.</b>     | Cinética de liberación de los aminoácidos Gly y Glu y Modelado matemático ..  | 37 |
| <b>2.5.1.</b>   | Cinética de liberación controlada de los aminoácidos Gly y Glu en microesferas<br>de QUI y PLA .....  | 37 |
| <b>2.5.2.</b>   | Metodología para el modelado matemático de la cinética de liberación de los<br>aminoácidos Gly y Glu contenidos en las microesferas de QUI y PLA .....                      | 38 |
| <b>2.5.2.1.</b> | Solución al modelo de Aproximación a la Segunda Ley de Fick en una<br>dimensión .....   | 38 |
| <b>2.5.2.2.</b> | Solución al modelo Multi-etapas .....   | 39 |
| <b>2.6.</b>     | Pruebas de fitotoxicidad in vitro de las microesferas de QUI y PLA/germinación<br>de semillas .....   | 40 |
| <b>2.6.1.</b>   | Germinación de semillas en presencia de microesferas de QUI/Pal y PLA/Pal<br>cargadas con los aminoácidos Gly y Glu .....   | 40 |
| <b>2.6.2.</b>   | Elongación radicular de las plántulas de chile habanero cultivadas en presencia<br>de las microesferas de QUI/Pal y PLA/Pal cargadas con los aminoácidos Gly y<br>Glu ..... | 41 |
| <b>2.6.3.</b>   | Peso fresco de biomasa de plántulas de chile habanero crecidas en presencia de<br>microesferas de QUI/Pal y PLA/Pal cargadas con los aminoácidos Gly y Glu<br>.....         | 41 |
| Capítulo 3      |   |    |
| <b>3.</b>       | RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....  | 43 |

|                |  |    |
|----------------|--|----|
| <b>3.1.</b>    | Resultados de las pruebas preliminares de microesferas de QUI, PEG, ALG, PLA, CAB y QUI/Pal, PEG/Pal, ALG/Pal, PLA/Pal y CAB/Pal ..... | 44 |
| <b>3.1.1.</b>  | Microscopía óptica de microesferas de QUI y QUI/Pal .....  | 44 |
| <b>3.1.2.</b>  | Distribución de tamaño de partícula de microesferas de QUI y QUI/Pal .....   | 44 |
| <b>3.1.3.</b>  | Microscopía óptica de microesferas de PEG y PEG/Pal .....  | 45 |
| <b>3.1.4.</b>  | Distribución de tamaño de partícula de microesferas de PEG y PEG/Pal .....   | 46 |
| <b>3.1.5.</b>  | Microscopía óptica de microesferas de ALG y ALG/Pal .....  | 46 |
| <b>3.1.6.</b>  | Distribución de tamaño de partícula de microesferas de ALG y ALG/Pal .....   | 47 |
| <b>3.1.7.</b>  | Microscopía óptica de microesferas de PLA y PLA/Pal .....  | 48 |
| <b>3.1.8.</b>  | Distribución de tamaño de partícula de microesferas de PLA y PLA/Pal .....   | 48 |
| <b>3.1.9.</b>  | Microscopía óptica de microesferas de CAB y CAB/Pal .....  | 49 |
| <b>3.1.10.</b> | Distribución de tamaño de partícula de microesferas de CAB y CAB/Pal .....   | 49 |
| <b>3.2.</b>    | Caracterización fisicoquímica de microesferas de QUI y PLA e híbridas con Pal y cargadas con los aminoácidos Gly y Glu .....           | 50 |
| <b>3.2.1.</b>  | Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) de las microesferas de QUI, QUI/Pal y QUI/Pal con Gly y Glu .....                             | 51 |
| <b>3.2.2.</b>  | Tamaño de Partícula Coulter (TP) de las microesferas de QUI, QUI/Pal y QUI/Pal con Gly y Glu .....                                     | 54 |
| <b>3.2.3.</b>  | Porcentaje de hinchamiento (PH) de las microesferas de QUI, QUI/Pal y QUI/Pal con Gly y Glu .....                                      | 55 |
| <b>3.2.4.</b>  | Difracción de rayos X (XRD) de las microesferas de QUI, QUI/Pal y QUI/Pal con Gly y Glu .....  | 56 |
| <b>3.2.5.</b>  | Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) de las microesferas de PLA, PLA/Pal y PLA/Pal con Gly y Glu .....                             | 57 |
| <b>3.2.6.</b>  | Tamaño de Partícula Coulter (TP) de las microesferas de PLA, PLA/Pal y PLA/Pal con Gly y Glu .....                                     | 60 |
| <b>3.2.7.</b>  | Porcentaje de absorción de agua (PA) de las microesferas de PLA, PLA/Pal y PLA/Pal con Gly y Glu .....                                 | 61 |
| <b>3.2.8.</b>  | Difracción de rayos X (XRD) de las microesferas de PLA, PLA/Pal y PLA/Pal con Gly y Glu .....  | 62 |

|               |   |    |
|---------------|---|----|
| <b>3.3.</b>   | Identificación de la presencia de los aminoácidos en las microesferas de QUI y PLA .....  | 63 |
| <b>3.3.1.</b> | Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR) de las microesferas de QUI y QUI/Pal con Gly y Glu .....   | 64 |
| <b>3.3.2.</b> | Determinación cualitativa y cuantitativa de los aminoácidos Gly y Glu capturados en microesferas de QUI y QUI/Pal por UV-visible .....  | 65 |
| <b>3.3.3.</b> | Determinación cualitativa y cuantitativa de los aminoácidos Gly y Glu capturados en microesferas de PLA y PLA/Pal por UV-visible .....  | 66 |
| <b>3.4.</b>   | Cinética de liberación de los aminoácidos Gly y Glu en microesferas de QUI y PLA y su Modelado matemático .....   | 67 |
| <b>3.4.1.</b> | Cinética de liberación de los aminoácidos Gly y Glu en las microesferas de QUI y QUI/Pal .....  | 67 |
| <b>3.4.2.</b> | Modelado matemático de la cinética de liberación de los aminoácidos Gly y Glu en las microesferas de QUI y QUI/Pal .....  | 69 |
| <b>3.4.3.</b> | Cinética de liberación de los aminoácidos Gly y Glu en las microesferas de PLA y PLA/Pal .....  | 71 |
| <b>3.4.4.</b> | Modelado matemático de la cinética de liberación de los aminoácidos Gly y Glu en las microesferas de PLA y PLA/Pal .....  | 73 |
| <b>3.5.</b>   | Fitotoxicidad de las microesferas de QUI y PLA con 2.5% de Pal y cargadas con los aminoácidos Gly y Glu .....   | 76 |
| <b>3.5.1.</b> | Efecto de la presencia de microesferas de QUI/Pal y PLA/Pal cargadas con los aminoácidos Gly y Glu sobre la germinación de semillas de chile habanero .....                     | 76 |
| <b>3.5.2.</b> | Efecto de la presencia de microesferas de QUI/Pal y PLA/Pal cargadas con los aminoácidos Gly y Glu sobre la biomasa de plántulas de chile habanero y elongación radicular ..... | 78 |
|               | CONCLUSIONES .....  | 82 |
|               | REFERENCIAS .....   | 84 |
|               | ANEXOS .....  | 96 |

## ÍNDICE DE TABLAS

|                 |   |     |
|-----------------|---|-----|
| <b>Tabla 1.</b> | Composición química de la paligorskita [47] .....   | 14  |
| <b>Tabla 2.</b> | Aminoácidos esenciales y no esenciales [52] .....   | 15  |
| <b>Tabla 3.</b> | Aminoácidos y su función en las plantas [55] .....  | 15  |
| <b>Tabla 4.</b> | Parámetros experimentales de la cinética de liberación de los aminoácidos Gly y Glu en microesferas de QUI y QUI/Pal .....  | 69  |
| <b>Tabla 5.</b> | Valores de ajuste para el modelo cinético Multi-etapas en la cinética de liberación de los aminoácidos Gly y Glu en microesferas de QUI y QUI/Pal .....   | 71  |
| <b>Tabla 6.</b> | Parámetros experimentales de la cinética de liberación de los aminoácidos Gly y Glu en microesferas de PLA y PLA/Pal .....  | 73  |
| <b>Tabla 7.</b> | Valores de ajuste para el modelo cinético Multi-etapas en la cinética de liberación de los aminoácidos Gly y Glu en microesferas de PLA y PLA/Pal .....   | 75  |
| <b>Tabla 8</b>  | Dosis (cantidad (g) de microesferas de QUI y PLA en g por pocillo) aplicadas durante el estudio <i>in vitro</i> de germinación de semillas .....  | 77  |
| <b>Tabla 9</b>  | Efecto de la presencia de las microesferas de QUI/Pal y PLA/Pal sobre la producción de biomasa en plántulas de chile habanero. Se presenta el valor promedio de 5 plántulas $\pm$ desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas (Tukey, $P < 0.001$ ) ..... | 78  |
| <b>Tabla 10</b> | Diluciones a utilizar para la preparación de la curva estándar .....  | 98  |
| <b>Tabla 11</b> | Preparación de la solución Hoagland usando Stocks .....   | 100 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|                   |  |    |
|-------------------|--|----|
| <b>Figura 1.</b>  | Clasificación de biopolímeros .....  | 6  |
| <b>Figura 2.</b>  | Estructura química del quitosano (QUI) .....   | 6  |
| <b>Figura 3.</b>  | Estructura química del Polietilenglicol (PEG) .....  | 7  |
| <b>Figura 4.</b>  | Estructura química del Alginato, a) ácido D-manurónico y b) ácido L-glucorónico (ALG) .....  | 8  |
| <b>Figura 5.</b>  | Estructura química del poli(ácido láctico) (PLA) .....   | 8  |
| <b>Figura 6.</b>  | Estructura general de la cera de abeja (CAB) .....   | 9  |
| <b>Figura 7.</b>  | Estructura general de una microesfera .....  | 10 |
| <b>Figura 8.</b>  | Métodos empleados para la elaboración de microesferas .....  | 11 |
| <b>Figura 9.</b>  | Estructura de la paligorskita [45] .....   | 13 |
| <b>Figura 10.</b> | Estructura general de los aminoácidos .....  | 14 |
| <b>Figura 11.</b> | Estructura química de la glicina (Gly) .....   | 17 |
| <b>Figura 12.</b> | Estructura química del ácido glutámico (Glu) .....   | 17 |
| <b>Figura 13.</b> | Esquema de la reacción de ninhidrina con aminoácidos .....   | 18 |
| <b>Figura 14.</b> | Número de patentes sobre sistemas de liberación controlada de agroquímicos solicitadas en los últimos 20 años (1997-2017) y países responsables del mayor ingreso de dichas solicitudes [66] ..... | 19 |
| <b>Figura 15.</b> | Mecanismos de aplicación de a) ingredientes activos convencionales y b) sistemas de liberación controlada .....  | 20 |
| <b>Figura 16.</b> | Comparación de procesos de liberación a) liberación convencional y b) liberación controlada .....  | 20 |
| <b>Figura 17.</b> | Síntomas de fitotoxicidad en hojas de Soja .....   | 24 |
| <b>Figura 18.</b> | Microesferas obtenidas durante las pruebas preliminares: QUI, PEG, ALG, PLA y CAB e híbridas con 5 y 10% de Paligorskita .....   | 43 |
| <b>Figura 19.</b> | Micrografías ópticas de microesferas de a) QUI, b) QUI/Pal5% y c) QUI/Pal10% en amplificación de 10x .....   | 44 |
| <b>Figura 20.</b> | Histogramas de distribución Anderson-Darling de tamaño de microesferas de a) QUI, b) QUI/Pal5% y c) QUI/Pal10% .....   | 45 |

|                   |   |    |
|-------------------|---|----|
| <b>Figura 21.</b> | Micrografías ópticas de microesferas de a) PEG, b) PEG/Pal5% y c) PEG/Pal10% en amplificación de 10x .....  | 45 |
| <b>Figura 22.</b> | Histogramas de distribución Anderson-Darling de tamaño de microesferas de a) PEG, b) PEG/Pal5% y c) PEG/Pal10% .....  | 46 |
| <b>Figura 23.</b> | Micrografías ópticas de microesferas de a) ALG, b) ALG/Pal5% y c) ALG/Pal10% en amplificación de 10x .....  | 47 |
| <b>Figura 24.</b> | Histogramas de distribución Anderson-Darling de tamaño de microesferas de a) ALG, b) ALG/Pal5% y c) ALG/Pal10% .....  | 47 |
| <b>Figura 25.</b> | Micrografías ópticas de microesferas de a) PLA, b) PLA/Pal5% y c) PLA/Pal10% en amplificación de 10x .....  | 48 |
| <b>Figura 26.</b> | Histogramas de distribución Anderson-Darling de tamaño de microesferas de a) PLA, b) PLA/Pal5% y c) PLA/Pal10% .....  | 48 |
| <b>Figura 27.</b> | Micrografías ópticas de microesferas de a) CAB, b) CAB/Pal5% y c) CAB/Pal10% en amplificación de 10x .....  | 49 |
| <b>Figura 28.</b> | Histogramas de distribución Anderson-Darling de tamaño de microesferas de a) CAB, b) CAB/Pal5% y c) CAB/Pal10% .....  | 50 |
| <b>Figura 29.</b> | Microesferas de QUI y PLA con Paligorskita (Pal) y los aminoácidos Glicina (Gly) y Ácido Glutámico (Glu) obtenidas y caracterizadas .....   | 51 |
| <b>Figura 30.</b> | Micrografías SEM de las microesferas de a) QUI, b) QUI/Pal1% y c) QUI/Pal2.5% en amplificaciones de 50, 250 y 5,000x .....  | 52 |
| <b>Figura 31.</b> | Micrografías SEM de las microesferas de a) QUI-Gly, b) QUI/Pal1%-Gly y c) QUI/Pal2.5%-Gly en amplificaciones de 50, 250 y 5,000x .....  | 53 |
| <b>Figura 32.</b> | Micrografías SEM de las microesferas de a) QUI-Glu, b) QUI/Pal1%-Glu y c) QUI/Pal2.5%-Glu en amplificaciones de 50, 250 y 5,000x .....  | 54 |
| <b>Figura 33.</b> | Histogramas de distribución de tamaños de partículas de a) QUI, b) QUI/Pal1%, c) QUI/Pal2.5%, d) QUI-Gly, e) QUI/Pal1%-Gly, f) QUI/Pal2.5%-Gly, g) QUI-Glu, h) QUI/Pal1%-Glu e i) QUI/Pal2.5%-Glu ..... | 55 |
| <b>Figura 34.</b> | Porcentaje de hinchamiento en microesferas de a) QUI, b) QUI/Pal1%, c) QUI/Pal2.5%, d) QUI-Gly, e) QUI/Pal1%-Gly, f) QUI/Pal2.5%-Gly, g) QUI-Glu, h) QUI/Pal1%-Glu e i) QUI/Pal2.5%-Glu .....           | 56 |

**Figura 35.** Difractogramas de rayos X de a) Paligorskita y de microesferas de b) QUI, c) QUI/Pal1%, d) QUI/Pal2.5%, e) QUI/Pal1%-Gly, f) QUI/Pal2.5%-Gly, g) QUI/Pal1%-Glu y h) QUI/Pal2.5%-Glu ..... 57

**Figura 36.** Micrográficas de microesferas de a) PLA, b) PLA/Pal1% y c) PLA/Pal2.5% en ampliificaciones de 50, 250 y 5,000x ..... 58

**Figura 37.** Micrográficas de microesferas de a) PLA-Gly, b) PLA/Pal1%-Gly y c) PLA/Pal2.5%-Gly en ampliificaciones de 50, 250 y 5,000x ..... 59

**Figura 38.** Micrográficas de microesferas de a) PLA-Glu, b) PLA/Pal1%-Glu y c) PLA/Pal2.5%-Glu en ampliificaciones de 50, 250 y 5,000x ..... 60

**Figura 39.** Histogramas de distribución de tamaños de partículas de a) PLA, b) PLA/Pal1%, c) PLA/Pal2.5%, d) PLA-Gly, e) PLA/Pal1%-Gly, f) PLA/Pal2.5%-Gly, g) PLA-Glu, h) PLA/Pal1%-Glu e i) PLA/Pal2.5%-Glu ..... 61

**Figura 40.** Porcentaje de absorción de agua en microesferas de a) PLA, b) PLA/Pal1%, c) PLA/Pal2.5%, d) PLA-Gly, e) PLA/Pal1%-Gly, f) PLA/Pal2.5%-Gly, g) PLA-Glu, h) PLA/Pal1%-Glu e i) PLA/Pal2.5%-Glu ..... 62

**Figura 41.** Difractogramas de rayos X de a) Paligorskita y de microesferas de b) PLA, c) PLA/Pal1%, d) PLA/Pal2.5%, e) PLA/Pal1%-Gly, f) PLA/Pal2.5%-Gly, g) PLA/Pal1%-Glu y h) PLA/Pal2.5%-Glu ..... 63

**Figura 42.** Espectros de FTIR de a) Glicina y microesferas de b) QUI, c) QUI-Gly, d) QUI/Pal1%-Gly y e) QUI/Pal2.5%-Gly ..... 64

**Figura 43.** Espectros FTIR de a) Ácido Glutámico y microesferas de b) QUI, c) QUI-Glu, d) QUI/Pal1%-Glu y e) QUI/Pal2.5%-Glu ..... 65

**Figura 44.** Cantidad de aminoácidos capturados (%) en microesferas de a) QUI-Gly, b) QUI/Pal1%-Gly, c) QUI/Pal2.5%-Gly, d) QUI-Glu, e) QUI/Pal1%-Glu y f) QUI/Pal2.5%-Glu ..... 66

**Figura 45.** Cantidad de aminoácidos capturados (%) en microesferas de a) PLA-Gly, b) PLA/Pal1%-Gly, c) PLA/Pal2.5%-Gly, d) PLA-Glu, e) PLA/Pal1%-Glu y f) PLA/Pal2.5%-Glu ..... 67

**Figura 46.** Cinética de liberación de los aminoácidos a) Gly y b) Glu en microesferas de QUI, QUI/Pal 1% y QUI/Pal 2.5% ..... 68

**Figura 47.** Cinéticas de liberación de los aminoácidos Gly y Glu en microesferas de a) QUI-Gly, b) QUI/Pal1%-Gly, c) QUI/Pal2.5%-Gly, d) QUI-Glu, e) QUI/Pal1%-Glu y f) QUI/Pal2.5%-Glu ajustadas a los modelos matemáticos de la Aproximación a la Segunda Ley de Fick y Multi-etapas ..... 70

**Figura 48.** Cinética de liberación de los aminoácidos a) Gly y b) Glu en microesferas de PLA, PLA/Pal 1% y PLA/Pal 2.5% ..... 72

**Figura 49** Cinéticas de liberación de los aminoácidos Gly y Glu en microesferas de a) PLA-Gly, b) PLA/Pal1%-Gly, c) PLA/Pal2.5%-Gly, d) PLA-Glu, e) PLA/Pal1%-Glu y f) PLA/Pal2.5%-Glu ajustadas a los modelos matemáticos de la Aproximación a la Segunda Ley de Fick y Multi-etapas ..... 74

**Figura 50.** Porcentaje (%) de germinación de semillas de chile habanero (día 15) en ausencia (Blanco) o presencia de microesferas de a) PLA/Pal2.5%-Gly, b) PLA/Pal2.5%-Glu, c) QUI/Pal2.5%-Gly y d) QUI/Pal2.5%-Glu cargadas con los aminoácidos Gly y Glu ..... 77

**Figura 51** Parte aérea (hojas) de plántulas de chile habanero a) blanco y en presencia de b) Dosis1-PLA/Pal2.5-Gly, c) Dosis2-PLA/Pal2.5-Gly, d) Dosis1-QUI/Pal2.5%-Gly, e) Dosis2-QUI/Pal2.5%-Gly, f) Dosis1-PLA/Pal2.5-Glu, g) Dosis2-PLA/Pal2.5-Glu, h) Dosis1-QUI/Pal2.5%-Gly e i) Dosis2-QUI/Pal2.5%-Gly ..... 80

**Figura 52** Elongación radículas de plántulas de chile habanero a) blanco y en presencia de b) Dosis1-PLA/Pal2.5-Gly, c) Dosis2-PLA/Pal2.5-Gly, d) Dosis1-QUI/Pal2.5%-Gly, e) Dosis2-QUI/Pal2.5%-Gly, f) Dosis1-PLA/Pal2.5-Glu, g) Dosis2-PLA/Pal2.5-Glu, h) Dosis1-QUI/Pal2.5%-Gly e i) Dosis2-QUI/Pal2.5%-Gly ..... 81

**Figura 53** Esquema representativo de pruebas de germinación ..... 100

## RESUMEN

La presente Tesis Doctoral se basó en el desarrollo y estudio de microesferas híbridas de matriz polimérica/paligorskita (Pal) para ser empleadas como sistemas de liberación controlada de los aminoácidos glicina (Gly) y ácido glutámico (Glu). Se realizaron pruebas preliminares para la obtención de microesferas de diferentes matrices poliméricas como: quitosano (QUI), polietilenglicol (PEG), alginato (ALG), poli(ácido láctico) (PLA) y cera de abeja (CAB) con diferentes porcentajes de Pal (5 y 10% p/p) utilizando diferentes métodos de obtención, los resultados de estas pruebas preliminares demostraron que para el estudio, las mejores microesferas eran las de QUI y PLA que presentaron buena compatibilidad con la Pal, la mejor reproducibilidad y rendimiento de producción, una morfología esférica y su tamaño de partícula estaba dentro del intervalo de tamaños deseado (50 a 600  $\mu\text{m}$ ). También a estos resultados se concluyó que era recomendable disminuir los porcentajes de Pal a 1 y 2.5% p/p y que los aminoácidos podían ser capturados *in situ* durante la preparación de las microesferas.

Las microesferas híbridas de QUI y PLA con Pal y cargadas con los aminoácidos presentaron morfologías esféricas, tamaños promedio dentro del rango deseado (50 a 600  $\mu\text{m}$ ). Además, se comprobó por XRD la presencia de la Pal en las microesferas ya que presentaban un a banda en  $8.4^\circ$  que corresponde a la estructura cristalina de los enlaces Si-O-Si de la Pal. Los porcentajes de aminoácido capturado por las microesferas de QUI fue de un 63% y las de PLA solo llegaron a un 27%. El estudio y modelado de la cinética de liberación demostró que la liberación de los aminoácidos se lleva a cabo por un proceso de difusión a través de los poros presentes en las microesferas y que es influenciado por la presencia de la Pal.

Las pruebas de fitotoxicidad *in vitro* determinaron que las microesferas híbridas de QUI/Pal y PLA/Pal cargadas con los aminoácidos Gly y Glu no causan un efecto fitotóxico, ya que las semillas de chile habanero (*Capsicum chinense*) puestas en contacto con estas microesferas presentaron un alto porcentaje de germinación, así como una gran producción de biomasa y elongación radicular; esto demostró que los aminoácidos liberados por las microesferas fueron aprovechados y asimilados por las plantas.

## ABSTRACT

The present Doctoral Thesis was based on the development and study of hybrid microspheres of polymeric matrix/palygorskite (Pal) to be used as controlled release systems of the amino acids glycine (Gly) and glutamic acid (Glu). Preliminary tests were carried out to obtain microspheres from different methods and different polymer matrices such as: chitosan (QUI), polyethylene glycol (PEG), alginate (ALG), poly(lactic acid) (PLA) and beeswax (CAB) with different percentages of Pal (5 and 10% w/w), the results from the preliminary tests showed that the best microspheres for the present study were QUI and PLA since they presented good compatibility with Pal, high production reproducibility and yield, spherical morphology and a particle size within the selected range (50 to 600  $\mu\text{m}$ ). These results also suggested that the Pal content should be reduced to 1 and 2.5% w/w and the amino acids could be captured in situ during the preparation of the microspheres.

The hybrid microspheres of QUI or PLA with Pal and loaded with amino acids presented spherical morphologies, average sizes within the selected range (50 to 600  $\mu\text{m}$ ). Furthermore, the presence of Pal in the microspheres was verified by XRD since they presented a band at  $8.4^\circ$  that corresponds to the crystalline structure of the Si-O-Si bonds of Pal. The percentage of amino acid captured by the QUI microspheres was 63% and the PLA microspheres only reached 27%. The study and modeling of the release kinetics demonstrated that the release of the amino acids is carried out by diffusion through the pores present in the microspheres and the release kinetics is influenced by the presence of Pal.

The in vitro phytotoxicity tests demonstrated that the hybrid microspheres of QUI/Pal and PLA/Pal loaded with the amino acids Gly and Glu do not cause any phytotoxic effect, since the habanero chili seeds (*Capsicum chinense*) placed in contact with these microspheres presented a high germination percentage, as well as great biomass production and root elongation; This demonstrated that the amino acids released by the microspheres were well used and assimilated by the plants.

## INTRODUCCIÓN

Los polímeros han ganado terreno como herramienta de soporte para la liberación controlada de medicamentos o agentes activos que se encuentran en una determinada formulación [1]. Para este fin, muchas formulaciones han sido desarrolladas a base de polímeros debido a sus buenas propiedades físicas y estructurales, algunas de éstas son: buena protección ambiental, soporte y mejora de la estabilidad de la formulación, buena procesabilidad, carácter hidrofílico o hidrofóbico según el requerimiento, la liberación rápida o controlada de un ingrediente activo, la mejora de la biodisponibilidad y finalmente, su uso seguro [2].

Morfológicamente, el polímero puede ser la matriz de un material compuesto o puede ser la cubierta o recubrimiento del agente activo [3]. Los polímeros que se utilizan como matriz en el proceso de la liberación controlada son considerados como excipientes, ya que éstos son inactivos en las formulaciones y solo sirven como vehículo para dar consistencia y estabilidad al ingrediente activo, entre otras funciones [4].

Trabajos recientes han recurrido a la encapsulación de aminoácidos para administrarlos en las dosis adecuadas y sin degradación. Una dosificación adecuada es de suma importancia ya que si se genera una aplicación en exceso pueden llegar a tener repercusiones tóxicas para algunas células vegetales, viéndose afectados tejidos, raíces y hojas [5], así mismo un exceso de estos puede generar una competencia con otros nutrientes esenciales para las plantas disminuyendo su disponibilidad [6]. La aplicación convencional de aminoácidos, se ve afectada principalmente por la degradación, durante este proceso los aminoácidos pierden el grupo amino y la cadena carbonada restante [7] lo que impide que estos sean aprovechados y asimilados de una forma correcta por las plantas, por lo cual el uso de matrices poliméricas sirve como una barrera que ayuda a disminuir la degradación de estos compuestos.

Los aminoácidos constituyen los elementos básicos de la estructura primaria de las proteínas y muchos de ellos son clave en diferentes procesos biológicos, por lo que administrarlos en las dosis adecuadas es de vital importancia para lograr un óptimo estado de salud en las plantas [8]. La importancia fisiológica de los aminoácidos para las

plantas ha sido ampliamente discutida [9]. Por ejemplo, los aminoácidos están íntimamente relacionados con los mecanismos de regulación del desarrollo vegetal; algunas hormonas vegetales regulan sus niveles endógenos y su función biológica al conjugarse covalentemente a aminoácidos o, en otros casos, los aminoácidos son precursores de su biosíntesis, lo que demuestra el importante papel que juega la aplicación de los aminoácidos como fertilizantes [10], ya que son requeridos en etapas críticas del desarrollo de las plantas, así como en situaciones de estrés abiótico.

### **Justificación**

El beneficio de la aplicación de aminoácidos en cultivos genera un significativo ahorro de energía para la planta, al ser una fuente de nitrógeno reducida. Esta energía puede ser desviada hacia procesos de crecimiento, reflejándose en un mayor vigor y tolerancia ante situaciones de estrés y, en última instancia, en la mejora de la calidad y rendimiento de un cultivo.

El uso de microesferas como contenedores de sustancias valiosas ha sido una alternativa muy utilizada en los últimos años, debido a la facilidad con la que pueden ser obtenidas y a que durante su proceso de manufactura se pueden generar características que mejoran sus propiedades y aplicaciones. La incorporación de nano-refuerzos a estos sistemas aumenta el tiempo de liberación de los ingredientes activos atrapados; las arcillas son un material altamente utilizado como nano-refuerzo de matrices poliméricas debido a la compatibilidad matriz-arcilla.

### **Propuesta de solución**

Elaborar microesferas híbridas de matriz polimérica nano-estructuradas con nano-arcillas de paligorskita para ser empleadas como sistemas de captura y liberación controlada de aminoácidos, necesarios para el crecimiento de plantas.

## **Hipótesis**

La presencia de la arcilla de paligorskita en una microesfera híbrida de matriz polimérica modifica el proceso de difusión de un aminoácido; este efecto puede ser utilizado como un mecanismo para la liberación controlada de aminoácidos.

## **Objetivo general**

Desarrollar y caracterizar microesferas híbridas de matriz polimérica, estructuradas con nano-arcillas de paligorskita, para ser utilizadas como sistemas de liberación controlada de aminoácidos (glicina y ácido glutámico) importantes en la regulación del crecimiento de plantas.

## **Objetivos específicos**

- Obtener microesferas híbridas de diferentes matrices poliméricas nano-estructuradas con paligorskita y determinar los mejores sistemas de estudio.
- Determinar el método de captura de los aminoácidos en las diferentes microesferas seleccionadas.
- Caracterizar físico-químicamente las microesferas mediante las técnicas de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM), Tamaño de partícula (TP), Porcentaje de hinchamiento y absorción de agua (PH y PA) y Difracción de rayos X (XRD).
- Determinar cualitativa y cuantitativamente la presencia de los aminoácidos glicina (Gly) y ácido glutámico (Glu) en las microesferas mediante Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR) y Espectrofotometría UV-Visible.
- Modelar matemáticamente la cinética de liberación de los aminoácidos Gly y Glu en las microesferas.
- Determinar la fitotoxicidad de las microesferas en la germinación de semillas de chile habanero (*Capsicum chinense*) mediante un ensayo *in vitro*.

# **Capítulo 1**

## **ANTECEDENTES**

# 1. ANTECEDENTES

## 1.1. Polímeros

Los polímeros son macromoléculas (generalmente orgánicas) formadas por la unión de una o más unidades simples llamadas monómeros; éstos forman largas cadenas que se atraen entre sí por fuerzas de Van der Waals, puentes de hidrógeno o interacciones hidrofóbicas [11]. El almidón, celulosa, la seda y el ácido desoxirribonucleico (ADN) son ejemplos de polímeros naturales, y el nylon, el polietileno y la baquelita, de polímeros sintéticos [12].

### 1.1.1. Clasificación de polímeros

Existen varias formas posibles de clasificar los polímeros, sin que sean excluyentes entre sí [13]:

- **Polímeros naturales:** En la naturaleza existen muchos polímeros, por ejemplo, las proteínas, los ácidos nucleicos, el hule, la lignina, etc.
- **Polímeros semisintéticos:** Se obtienen por transformación de polímeros naturales. Por ejemplo, la nitrocelulosa, el caucho vulcanizado, etc.
- **Polímeros sintéticos:** Los polímeros sintéticos obtienen a partir de derivados del petróleo. Por ejemplo, el nylon, el poliestireno (PS), etc.

## 1.2. Biopolímeros

Los biopolímeros son macromoléculas naturales obtenidas a partir de biomasa; son cadenas o secuencias de unidades monoméricas, en muchos casos son lineales o suelen ser cerradas, ramificadas o incluso reticuladas [14]. Una característica de los biopolímeros es que la mayoría de ellos son esencialmente heteropolímeros, porque pueden contener una variedad de unidades monoméricas [15]. La relevancia biológica de un biopolímero se basa en última instancia en la secuencia de los monómeros, es decir, la estructura primaria [16].

Los biopolímeros se pueden clasificar según su función (figura 1). Los más importantes del mercado son divididos en tres subgrupos: los basados en recursos

renovables (almidón y celulosa), los biodegradables basados en monómeros bioderivados (aceites vegetales y ácido láctico) y los sintetizados por microorganismos (polihidroxiclcanoatos - PHA) [17].

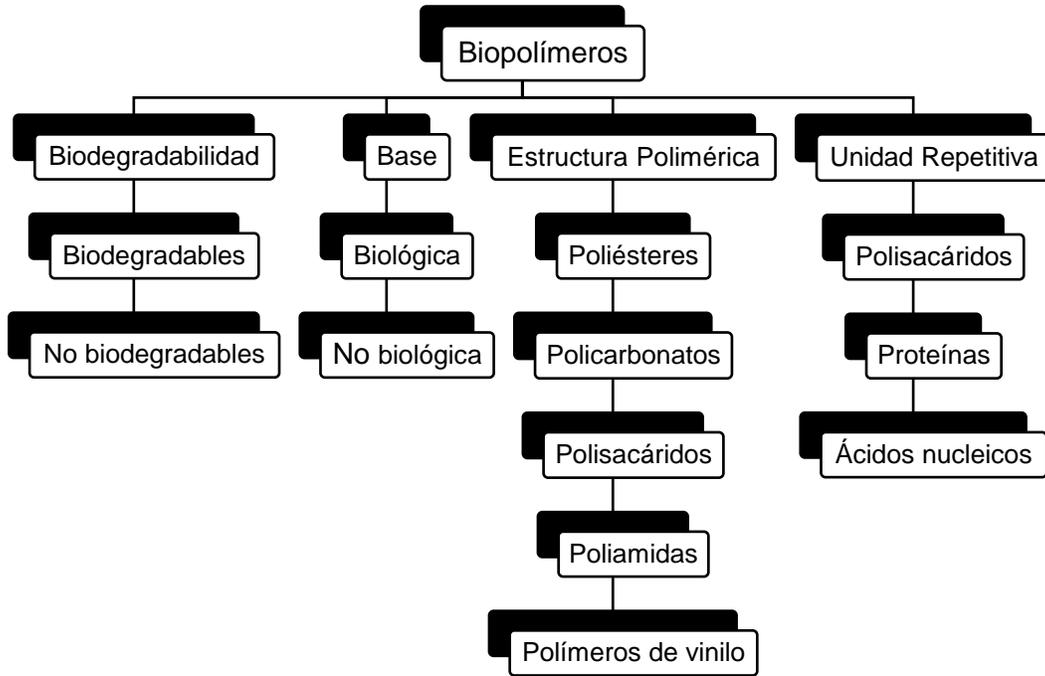


Figura 1. Clasificación de biopolímeros [17].

### 1.2.1. Quitosano (QUI)

El quitosano, es un biopolímero de aminopolisacáridos, compuesto por unidades distribuidas aleatoriamente de  $\beta$ -(1-4) D-glucosamina (unidad desacetilada) y N-acetil-D-glucosamina (unidad acetilada) (figura 2). Se encuentra en estado natural en las paredes celulares de algunos hongos; sin embargo, su principal fuente de producción es la hidrólisis de la quitina en medio alcalino, usualmente con hidróxido de sodio o de potasio, a altas temperaturas [18].

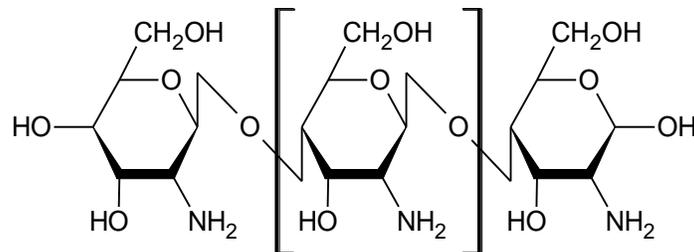
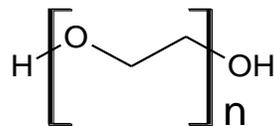


Figura 2. Estructura química del quitosano (QUI).

Este polímero es soluble en medios ácidos o en soluciones neutras, es un bioadhesivo y puede adherirse a superficies cargadas negativamente tales como las membranas de mucosas; debido a esta propiedad física, permite el transporte de principios activos polares a través de las superficies epiteliales, siendo además biocompatible, biodegradable y no tóxico para las células de los mamíferos [19].

### 1.2.2. Polietilenglicol (PEG)

El polietilenglicol es un poliéter neutro con una estructura química (figura 3) relativamente sencilla y con propiedades únicas que pueden ser aprovechadas en diferentes campos de la ciencia de los materiales. Este polímero es soluble tanto en solventes polares como no polares y ha llamado mucho el interés de las áreas biomédicas y biotecnológicas por ser un transportador de proteínas, por no presentar inmunogenicidad y no ser antigénico [20].

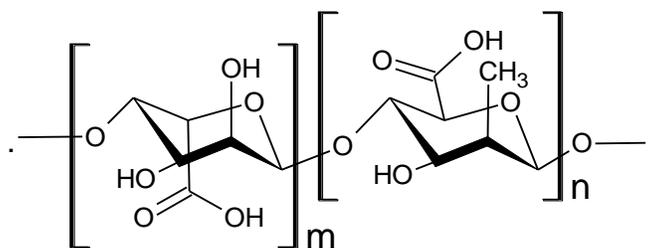


**Figura 3.** Estructura química del Polietilenglicol (PEG).

El polietilenglicol se produce por la interacción de óxido de etileno con agua, etilenglicol u oligómeros de etilenglicol. La reacción requiere catalizadores ácidos o básicos, y se prefiere sintetizarlo a partir del etilenglicol o sus oligómeros ya que esto permite obtener polímeros con baja polidispersidad. La longitud de la cadena polimérica depende de la proporción de reactantes [21].

### 1.2.3. Alginato (ALG)

Los alginatos (ALGs) son sales del ácido algínico, que es un polisacárido complejo (biopolímero) obtenido por reacción alcalina de las algas pardas, especialmente de las especies pertenecientes a las familias Phaeophyceae (feofitas) y Rhodophyceae (rodofitas). Está compuesto por el ácido D-manurónico y el ácido L-glucorónico con enlaces  $\beta$ -1,4 (figura 4) [22].

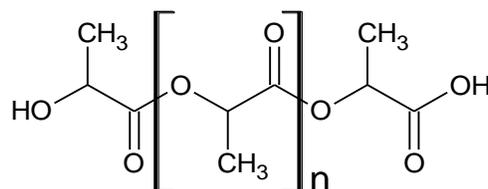


**Figura 4.** Estructura química del Alginato, a) ácido D-manurónico y b) ácido L-glucorónico (ALG).

Los ALGs están constituidos por dos unidades monoméricas, el ácido  $\beta$ -D-manurónico (M) y el ácido glucosídico  $\beta$  (1-4) y secuencias GG, GM, unidos por enlaces glucosídicos  $\alpha$  (1-4). La cadena polimérica constituyente del ácido alginico y sus sales se componen de tres tipos de bloques, los bloques G que contienen sólo unidades derivadas del ácido L-glucorónico, los bloques M los cuales se componen de ácido D-manurónico y las regiones MG compuestas de unidades alternadas de ambos ácidos [23].

#### 1.2.4. Poli(ácido láctico) (PLA)

El poli (ácido láctico) (PLA) es un biopolímero termoplástico cuya molécula precursora es el ácido láctico (figura 5). Debido a su biodegradabilidad, propiedades de barrera y biocompatibilidad, este biopolímero ha encontrado numerosas aplicaciones ya que presenta una amplia e inusual variedad de propiedades que pueden lograrse manipulando sus fases amorfa y cristalina mediante la mezcla de los isómeros D(-) y L(+), los pesos moleculares, y la copolimerización [24].



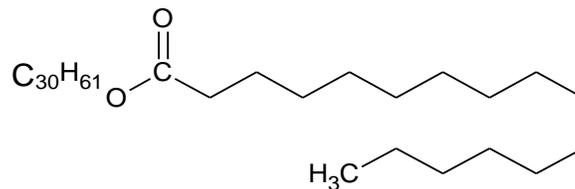
**Figura 5.** Estructura química del poli (ácido láctico) (PLA).

El PLA es uno de los biopolímeros con más auge como matriz en sistemas de liberación, esto debido a sus excelentes propiedades de resistencia mecánica, su buena biodegradabilidad y fácil procesamiento. Estas características lo hacen un material que

puede aplicarse ampliamente en diferentes ramas, como lo son medicina, área textil, de embalaje, y en la agricultura [25, 26].

### 1.2.5. Cera de abeja (CAB)

La cera de abeja (CAB) es un producto graso segregado, en forma de pequeñas escamas redondeadas, en las cuatro glándulas ventrales que tienen las abejas en la parte inferior de su abdomen y que la utilizan para construir sus panales. La cera de abeja se sintetiza mediante la reducción de azúcares de origen alimenticio. Para que esta transformación ocurra es imprescindible la presencia de ciertos componentes que están en el polen, como son grasas, enzimas, etc., que actúan como iniciadores y catalizadores de diversas reacciones químicas [27].

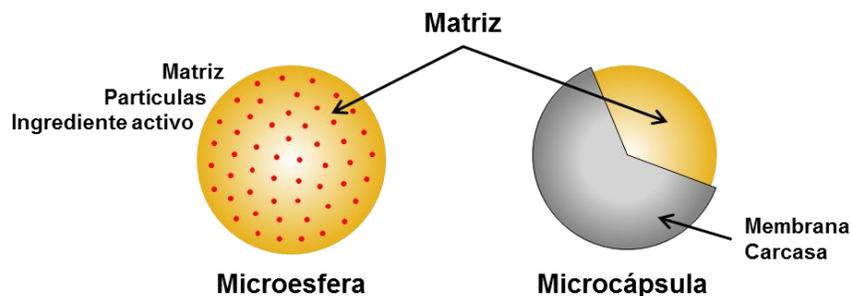


**Figura 6.** Estructura general de la cera de abeja (CAB).

La CAB está constituida de ésteres de ácidos grasos saturados e insaturados de cadena larga (14 a 36 carbonos) con alcoholes alifáticos monohidroxílicos de elevada masa molecular (12 a 40 carbonos) (figura 6); es decir, son moléculas que se obtienen por esterificación, que, en el caso de las ceras, la esterificación ocurre entre un ácido graso y un alcohol monovalente lineal de cadena larga [28].

### 1.3. Microesferas

Una microesfera es una superficie esférica con un centro sólido, estos sistemas pueden ser semipermeables [29]. Las microesferas pueden atrapar y liberar sustancias a velocidades controladas bajo condiciones específicas, y pueden proteger al producto atrapado de la luz y el oxígeno (figura 7) [30].



**Figura 7.** Estructura general de una microesfera.

Los procesos mediante los cuales las microesferas pueden atrapar agentes activos se dividen en dos; los procesos químicos incluyen las técnicas de coacervación, co-cristalización, polimerización interfacial, gelificación iónica, incompatibilidad polimérica, atrapamiento por liposomas e inclusión molecular y los procesos físicos incluyen las técnicas de absorción pasiva, secado por aspersion, liofilización y extrusión [31, 32].

### 1.3.1. Microesferas híbridas

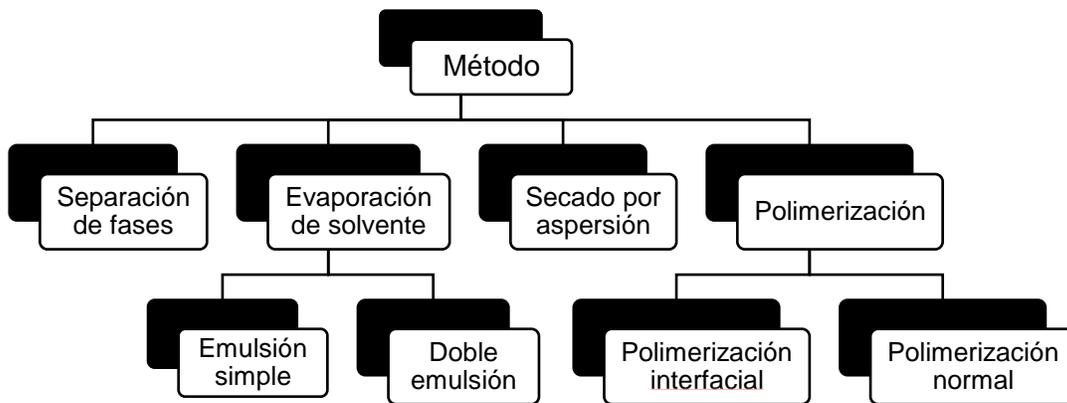
Las microesferas de composición híbrida están compuestas por un material orgánico y un material inorgánico en distintas proporciones, la combinación de dichos materiales da como resultado un material compuesto que posee ventajas sobre sus componentes orgánicos e inorgánicos. Las interacciones entre estas dos partes juegan un papel fundamental en las propiedades de estos materiales [33].

Las microesferas híbridas se caracterizan por poseer una alta área superficial y dependiendo de las condiciones de síntesis, se puede controlar el tamaño promedio y la distribución de tamaño, su superficie puede ser adaptada químicamente (funcionalización) [34]. Las microesferas híbridas se han utilizado en campos como la catálisis, protección de macromoléculas biológicamente activas, ingredientes activos, péptidos, pigmentos y en la remoción de contaminantes [35].

### 1.4. Métodos empleados para la elaboración de microesferas

Existen varios métodos para la preparación de diferentes formulaciones de microesferas (figura 8), la selección del más adecuado depende principalmente de las características físico-químicas del polímero y las características del ingrediente activo a

capturar, tomando en cuenta diferentes requerimientos como son: rendimiento, eficiencia y reproducibilidad [36].



**Figura 8.** Métodos empleados para la elaboración de microesferas.

#### **1.4.1. Método de separación de fases**

Es un método no acuoso y utilizado fundamentalmente para ingredientes activos solubles en agua; consiste en disolver el polímero en un solvente orgánico y el ingrediente activo en agua; una emulsión se obtiene por la adición de la solución acuosa a la solución orgánica. Un primer no-solvente se adiciona lentamente al sistema, formándose las microgotas de coacervado, las cuales son muy blandas, lo que hace necesario la adición de una mayor cantidad de un segundo no-solvente para estabilizarlas y obtener las microesferas [37, 38].

#### **1.4.2. Método de evaporación/extracción de solvente**

Este método incluye todos los procesos en los que se ve involucrada la eliminación de un solvente en el que está disuelto el polímero, ya sea por evaporación o por extracción. En todos los casos se forma previamente una emulsión durante el proceso de formación y, dependiendo de la naturaleza de su fase continua mayoritaria, se clasificarán en técnicas de evaporación/extracción del solvente en fase acuosa o en fase oleosa [39].

### **1.4.3. Método de secado por aspersión**

Este método se basa en el secado de una niebla del polímero y el ingrediente activo. Dependiendo de la forma de eliminar el solvente (por evaporación o enfriamiento de la solución), se denomina secado por aspersión o congelación por aspersión. En el caso del secado por aspersión, el polímero puede ser disuelto en solución acuosa [40] o en un disolvente orgánico volátil [41] y el ingrediente activo se dispersa en la solución del polímero. La atomización conduce a la formación de pequeñas gotas a partir de la cual se evapora instantáneamente el medio donde fueron disueltos el polímero e ingrediente activo conduciendo a la formación de microesferas [42].

### **1.4.4. Método por polimerización**

Este método se lleva a cabo calentando el monómero o mezcla de monómeros con el ingrediente activo en forma de dispersión de gotas en una fase continua; las gotas también pueden contener un iniciador y otros aditivos [43]. La polimerización en emulsión se diferencia de la polimerización en suspensión debido a la presencia de un iniciador en la fase acuosa. La polimerización en suspensión se puede realizar a menor temperatura, ya que la fase externa continua es normalmente agua a través de la cual el calor se puede disipar fácilmente [44]

## **1.5. Paligorskita (Pal)**

La paligorskita es un aluminosilicato de magnesio, hidroxilado e hidratado, con hábito de aspecto asbestiforme (mineral que crece en un agregado fibroso) [45], es decir, esta arcilla tiene la particularidad de ser un mineral no laminar sino más bien acicular, es decir, presenta una forma de microfibras con un diámetro entre 10 y 70 nm [46].

Las propiedades físico-químicas de la paligorskita dependen en gran medida de su pequeño tamaño de partícula y de la porosidad de su estructura; siendo un mineral fibroso cuenta con un área superficial entre 100 y 200 m<sup>2</sup>/g, aunque se ha reportado áreas teóricas estimadas de hasta 900 m<sup>2</sup>/g [47].

### 1.5.1. Estructura de la paligorskita

La estructura de la paligorskita (Figura 9) puede describirse como el agrupamiento de unidades octaédricas y tetraédricas de silicatos (2:1) que forman canales con dimensiones de 6.2 y 3.6 Å. Las capas tetraédricas en la paligorskita son continuas, aunque distribuidas en forma de bandas 2:1 que se unen entre sí, a través de uniones Si-O-Si mediante los oxígenos basales de los tetraedros [48].

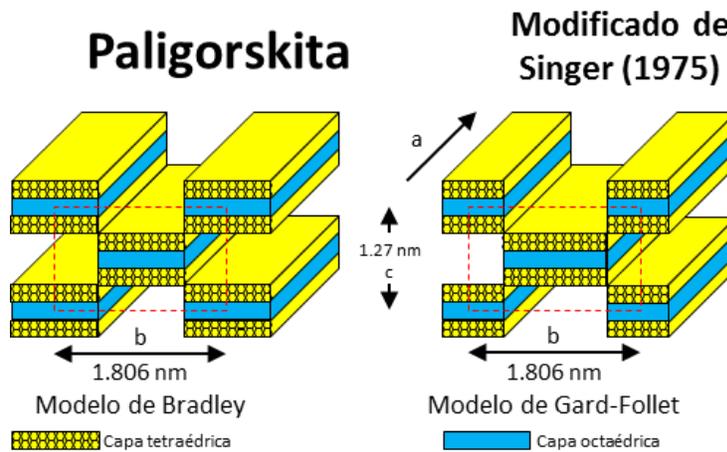


Figura 9. Estructura de la paligorskita [49].

La estructura de esta arcilla puede considerarse como polidispersa, tiene un tamaño efectivo de poro de unos 30 nm, con mesoporos de 2 a 8 nm y microporos de 2 nm; la superficie específica de los canales internos y poros constituyen el 50 % de su superficie total. La paligorskita es clasificada como un filosilicato por su lámina bidimensional tetraédrica continua; cada lámina está conectada a la siguiente mediante la inversión de los tetraedros de  $\text{SiO}_4$  a lo largo de uniones de Si-O-Si cada 5 posiciones [50].

### 1.5.2. Composición química de la paligorskita

La arcilla de paligorskita está compuesta principalmente de óxido de silicio (sílice), aluminio y magnesio hidroxilado e hidratado, teniendo un fórmula química idealizada:  $\text{Si}_8\text{O}_{20}(\text{Al}_2\text{Mg}_{22})(\text{OH})_2 \cdot (\text{OH}_2)_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ . En la tabla 1 se presenta la composición química teórica de la paligorskita.

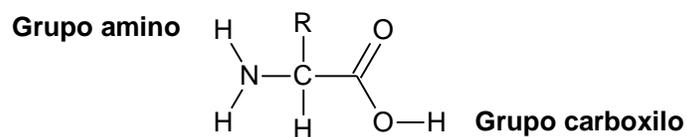
**Tabla 1.** Composición química de la paligorskita [51].

| Elemento                       | Cantidad (%) |
|--------------------------------|--------------|
| SiO <sub>2</sub>               | 55.95        |
| Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> | 9.60         |
| MgO                            | 9.90         |
| Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> | 6.20         |
| K <sub>2</sub> O               | 1.30         |
| Na <sub>2</sub> O              | 0.40         |
| CaO                            | 2.15         |
| MnO                            | 0.30         |
| TiO <sub>2</sub>               | 0.50         |
| H <sub>2</sub> O               | 11.10        |

Las hojas tetraédricas de la paligorskita presentan sustitución de algunos átomos de Si por Al, sin embargo, la sustitución más importante tiene lugar en la porción octaédrica, en la cual tres átomos de Mg reemplazan a dos de Al sin que se produzca déficit de carga [52]. Sin embargo, las sustituciones parciales de Al por Si generan que la parte octaédrica tenga una carga positiva [53].

## 1.6. Aminoácidos

Desde el punto de vista químico, los aminoácidos son ácidos orgánicos con un grupo amino en posición alfa. Según esta definición, los cuatro sustituyentes característicos del carbono alfa (C<sub>α</sub>) en un aminoácido son el grupo amino, el grupo carboxilo, un átomo de hidrógeno y una cadena lateral, que se representa como R (figura 10) [54].



**Figura 10.** Estructura general de los aminoácidos.

Los elementos químicos clave de un aminoácido son carbono (C), hidrógeno (H), oxígeno (O) y nitrógeno (N), aunque otros elementos pueden encontrarse en las cadenas laterales de ciertos aminoácidos. Se conocen unos 500 aminoácidos naturales (aunque solo 20 forman parte de las proteínas, tabla 2) y se clasifican de muchas maneras; una de ellas es según la ubicación de los grupos funcionales estructurales centrales:

aminoácidos alfa-( $\alpha$ -), beta-( $\beta$ -), gamma-( $\gamma$ -) o delta-( $\delta$ -). Otras clasificaciones se relacionan con la polaridad, el nivel de pH y el tipo de grupo de cadena lateral (alifático, acíclico, aromático, con hidroxilo o azufre, etc.) [55].

**Tabla 2.** Aminoácidos esenciales y no esenciales [56].

| Clasificación | Aminoácidos        | Clasificación           | Aminoácidos             |
|---------------|--------------------|-------------------------|-------------------------|
| Esenciales    | • Histidina (His)  | No esenciales           | • Glutamina (Gln)       |
|               | • Isoleucina (Ile) |                         | • Alanina (Ala)         |
|               | • Leucina (Leu)    |                         | • Arginina (Arg)        |
|               | • Lisina (Lys)     |                         | • Glicina (Gly)         |
|               | • Metionina (Met)  |                         | • Cisteína (Cys)        |
|               | • Fenilamina (phe) |                         | • Prolina (Pro)         |
|               | • Triptófano (Trp) |                         | • Serina (Ser)          |
|               | • Valina (Val)     |                         | • Tirosina (Tyr)        |
|               | • Treonina (Thr)   |                         | • Ácido aspártico (Asp) |
|               |                    | • Ácido glutámico (Glu) |                         |
|               |                    | • Asparagina (Asn)      |                         |

### 1.6.1. Aminoácidos en las plantas

Los aminoácidos cumplen una serie de funciones primordiales en las plantas (tabla 3), principalmente para ayudarlas a superar situaciones de estrés y situaciones de gran actividad metabólica como las que se producen en las fases de brotación, floración, fructificación, etc. [57]. Además de participar en las funciones metabólicas, estos compuestos mejoran el proceso de respiración y fotosíntesis [58].

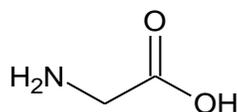
**Tabla 3.** Aminoácidos y su función en las plantas [59].

| Clasificación | Aminoácido | Función en las plantas   |
|---------------|------------|--|
| Esenciales    | Isoleucina | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Mejora los tejidos de la planta</li> <li>• Síntesis de clorofila</li> <li>• Producción de energía</li> </ul>              |
|               | Leucina    | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ayuda en la fecundación</li> <li>• Mejora la calidad del fruto</li> <li>• Mecanismo de resistencia</li> </ul>             |
|               | Lisina     | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ayuda al mecanismo de resistencia</li> <li>• Fuente de nitrógeno</li> <li>• Resistencia a situaciones adversas</li> </ul> |
|               | Metionina  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Incrementa producción de cultivo</li> <li>• Favorece crecimiento radical</li> <li>• Asimilación de nitratos</li> </ul>    |

|                      |                 |  |
|----------------------|-----------------|--|
|                      | Fenilalanina    | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Precursor de alcaloides</li> <li>• Ayuda la pigmentación de la planta</li> </ul>  |
|                      | Treonina        | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ayuda al crecimiento de la planta</li> <li>• Ayuda al metabolismo celular</li> <li>• Fuente de energía para la planta</li> </ul>  |
|                      | Triptófano      | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Precursor de alcaloides</li> </ul>  |
|                      | Valina          | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Mecanismo de resistencia</li> <li>• Promueve a germinación de semillas</li> </ul>   |
|                      | Histidina       | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Protege a la planta de radiación</li> <li>• Biosíntesis de triptófano</li> </ul>  |
| <b>No esenciales</b> | Alanina         | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Potencia la síntesis de la clorofila</li> <li>• Aumenta la actividad fotosintética</li> </ul>   |
|                      | Tirosina        | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Precursor de alcaloides</li> <li>• Provee energía a la planta</li> </ul>  |
|                      | Aspartato       | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Procesos metabólicos de la planta</li> </ul>  |
|                      | Cisteína        | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Acción antifúngica</li> <li>• Resistencia condiciones abióticas</li> </ul>  |
|                      | Ácido Glutámico | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Precursor de otros aminoácidos</li> <li>• Estimula el crecimiento de hojas</li> <li>• Mecanismos de resistencia</li> <li>• Aumenta el poder germinativo</li> <li>• Estimula el crecimiento de raíces</li> </ul> |
|                      | Glutamina       | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Asimilación de nitrógeno</li> </ul>   |
|                      | Glicina         | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Interviene en la síntesis de proteínas</li> <li>• Pilar estructural de la clorofila</li> <li>• Favorece la formación de brotes</li> <li>• Formación del tejido foliar</li> </ul>                                |
|                      | Prolina         | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Equilibrio hídrico de la planta</li> <li>• Aumenta la germinación</li> <li>• Mantiene la fotosíntesis</li> </ul>  |
|                      | Serina          | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ayuda al mecanismo de resistencia</li> </ul>  |
|                      | Asparagina      | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Transporte de nitrógeno</li> </ul>  |
|                      | Arginina        | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Estimula el crecimiento de raíces</li> <li>• Mejora la asimilación de nutrientes</li> <li>• Precursor de auxinas</li> </ul>   |

### 1.6.1.1. Glicina (Gly)

La glicina es el aminoácido, de los 20 proteicos, con la estructura más simple de todos (figura 11). Este tiene un solo átomo de hidrógeno como cadena lateral, tiene la apariencia de un sólido cristalino incoloro y de sabor dulce, y es el único aminoácido proteinógeno aquiral (sitio donde es posible tener dos configuraciones diferentes). Por su dimensión molecular compacta (cadena lateral mínima de un solo átomo de hidrógeno), este aminoácido puede estar en entornos hidrofílicos o hidrofóbicos [60].

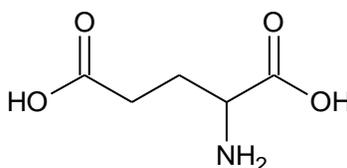


**Figura 11.** Estructura química de la glicina.

Como molécula bifuncional, la glicina reacciona con muchas sustancias, sus reacciones se pueden clasificar en centradas en el N y centradas en el carboxilato. La función principal de la glicina es ser un aminoácido precursor de proteínas, la mayoría de éstas incorporan pequeñas cantidades de glicina [61].

### 1.6.1.2. Ácido glutámico (Glu)

El ácido glutámico es uno de los 20 aminoácidos más abundantes en la naturaleza, la figura 12 presenta su estructura química. El ácido glutámico puede existir en forma de glutamato libre o unido con otros aminoácidos formando péptidos. Las proteínas animales pueden contener del 11 al 20% en peso de ácido glutámico, mientras que las proteínas vegetales alcanzan hasta el 40% en peso; por lo tanto, el ácido glutámico se encuentra en gran variedad de alimentos [62].



**Figura 12.** Estructura química del ácido glutámico.

El metabolismo del ácido glutámico en las plantas es de gran importancia, ya que este aminoácido es una molécula central para la síntesis de otros aminoácidos; por ejemplo, tanto la estructura carbonada, como el grupo amino son la base para la síntesis de otros aminoácidos como la arginina y prolina, además el grupo amino del ácido glutámico está involucrado en la asimilación de amonio en las plantas [63].

## 1.7. Métodos químicos para la determinación de la presencia de aminoácidos

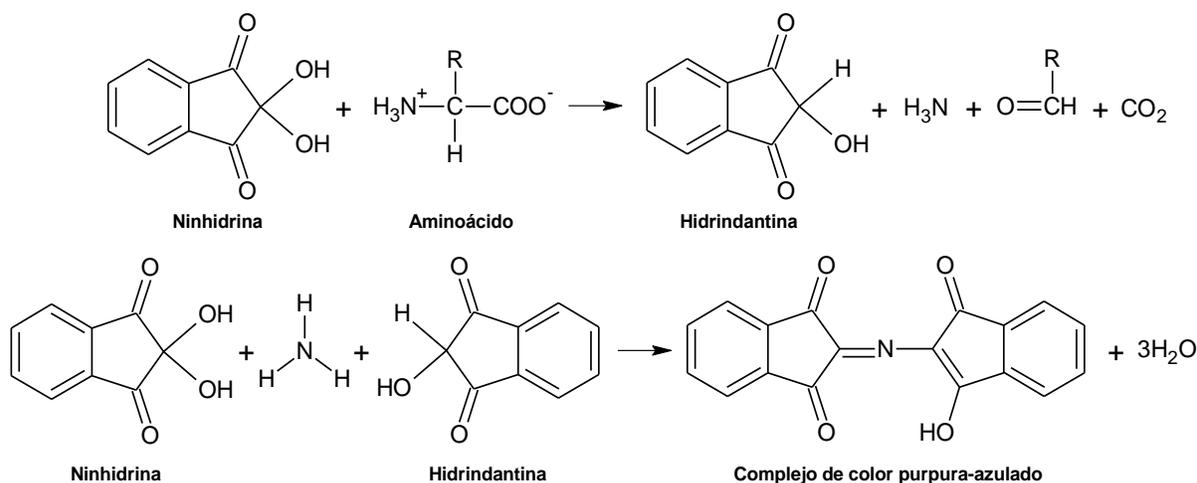
Existen diferentes métodos para la determinación cualitativa o cuantitativa de aminoácidos; algunos suelen ser muy generales, pero es posible discriminar entre los diferentes tipos de estos compuestos. Cada uno de estos métodos utiliza reactivos que

reaccionan con los aminoácidos de manera específica, generando características específicas necesarias para su detección [64].

Los diversos métodos van desde la determinación del grupo amino libre (método de la ninhidrina), la detección de los núcleos aromáticos (reacción xantoproteica), hasta los métodos de cromatógrafos (HPLC) que son capaces de detectar la presencia de estos aminoácidos en cantidades pequeñas [65, 66].

### 1.7.1. Método de reacción con ninhidrina

La ninhidrina (hidrato de tricetohidrindilideno) reacciona con los aminoácidos en medio ácido (pH 3-4) y en caliente, produciendo amoníaco, dióxido de carbono y un complejo de color púrpura-azulado (dicetohidrindilideno) (figura 13). Este compuesto de color púrpura azulado absorbe a una longitud de onda de 570 nm, siendo la cantidad de aminoácido presente en la muestra, proporcional a la intensidad del color púrpura azulado [67].

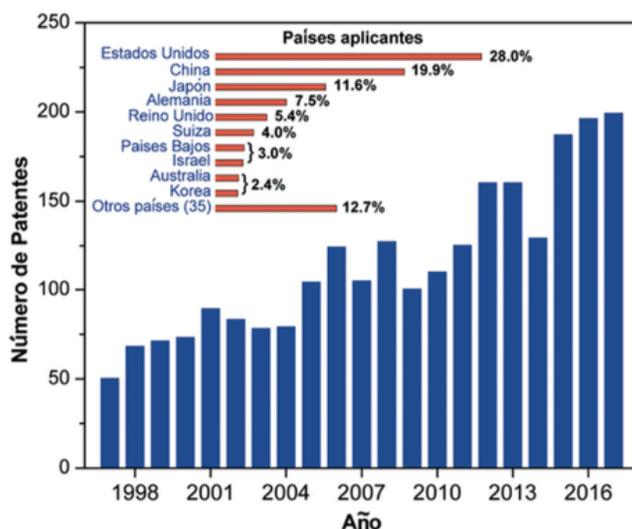


**Figura 13.** Esquema de la reacción de ninhidrina con aminoácidos.

La mayoría de los aminoácidos reaccionan con la ninhidrina en dos etapas: durante la primera la ninhidrina provoca la descarboxilación oxidativa de los aminoácidos produciendo amoníaco y hidrindantina, y en la segunda etapa el amoníaco se combina con una molécula de hidrindantina y otra molécula de ninhidrina formándose el complejo púrpura [68].

## 1.8. Sistemas de liberación controlada en la agricultura

Los sistemas de liberación controlada son principalmente utilizados en el campo de la farmacología; sin embargo, con la alta demanda en la industria de la agricultura (figura 14) se ha empezado a implementar este tipo de sistemas con el fin de reducir el uso de grandes cantidades de nutrientes y agroquímicos en las plantas. Este tipo de sistemas se encarga de dosificar y administrar el ingrediente activo con el fin de tener menores pérdidas, principalmente por degradación [69].



**Figura 14:** Número de patentes sobre sistemas de liberación controlada de agro-químicos solicitadas en los últimos 20 años (1997-2017), y países responsables del mayor ingreso de dichas solicitudes [70].

Las ventajas de los sistemas de liberación controlada se dan principalmente en la reducción de la pérdida de los ingredientes activos, logrando aprovechar estos al máximo, y generando de forma gradual un incremento de los rendimientos y eficiencias de la producción agrícola [71]. Por tanto, este tipo de sistemas abre nuevos campos de desarrollo en la agricultura además de mitigar los difíciles problemas de contaminación en suelos por el uso excesivo de agroquímicos [72].

### 1.8.1. Uso de sistemas de liberación controlada en plantas

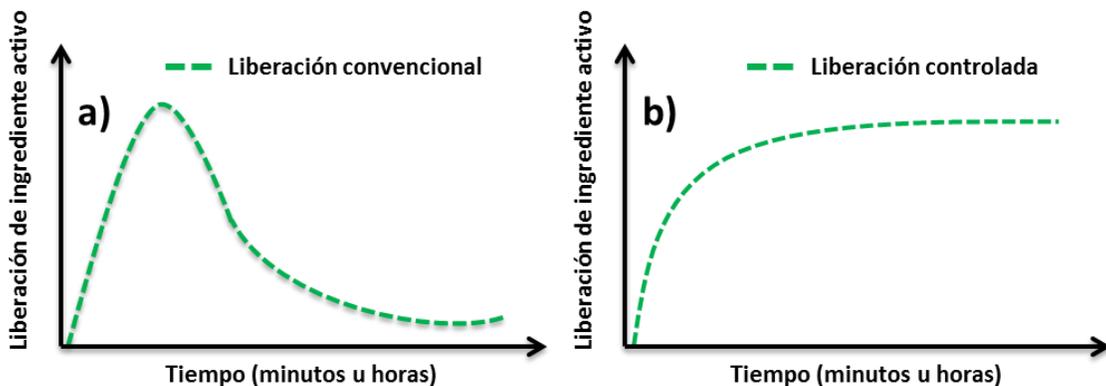
Los ingredientes activos de las formulaciones convencionales para la nutrición en plantas son generalmente mezclados con sustancias inertes que proveen mayor seguridad en su manejo y aplicación. Sin embargo, el ingrediente activo es liberado

inmediatamente, siendo este el principal problema en estas formulaciones, produciéndose una rápida pérdida por degradación o lixiviación del principio activo, por lo cual se han implementado sistemas que permiten una liberación controlada (figura 15) [73].



**Figura 15.** Mecanismos de aplicación de a) ingredientes activos convencionales y b) uso de sistemas de liberación controlada.

Los mecanismos de liberación para la nutrición en plantas de los productos convencionales suelen ser de forma rápida, generando pérdidas del ingrediente activo en un 30 o 70% [74]. Por eso el uso de los sistemas de liberación controlada en la agricultura ha estado en auge la última década, ya que en comparación con los nutrientes líquidos su liberación es controlada provocando así menores pérdidas y mayor aprovechamiento del ingrediente activo (figura 16), además de disminuir un problema recurrente con el excesivo uso de agroquímicos [75].



**Figura 16.** Comparación de procesos de liberación a) liberación convencional y b) liberación controlada.

## 1.9. Modelos cinéticos para la liberación controlada de un principio activo

Los perfiles de liberación en una cinética pueden ser analizados con la implementación de varios modelos cinéticos, como lo son de orden cero, primer orden, Fick, Higuchi, Korsmeyer-Peppas y Multi-etapas [76]. Estos modelos coadyuban al entendimiento de la cinética de liberación de un ingrediente activo.

### 1.9.1. Modelo de Orden Cero

Este modelo es el más utilizado, ayudando a describir el mecanismo de liberación del ingrediente activo en sistemas donde el proceso es constante durante un periodo de tiempo, asumiendo que la superficie de la matriz polimérica que contiene el ingrediente activo permanece sin cambios considerables durante la liberación [77]. Este modelo está dado por la ecuación 1:

$$Q_t = Q_0 + K_0 t \quad (1)$$

Donde:

$Q_t$  es la cantidad del ingrediente activo disuelto en el tiempo  $t$

$Q_0$  es la cantidad de ingrediente activo inicial (la mayoría de las veces  $Q_0=0$ )

$K_0$  es la constante de liberación

### 1.9.2. Modelo de Primer Orden

Este modelo es usado en los sistemas de liberación controlada para describir los procesos de absorción y liberación de algunos ingredientes activos en matrices porosas, asumiendo que la velocidad de liberación depende de la concentración del ingrediente activo [78], este modelo está dado por la ecuación 2:

$$\text{Log} C_t = \text{Log} C_0 - \frac{k_1}{2.303} t \quad (2)$$

Donde:

$C_t$  es la cantidad de fármaco remanente al tiempo  $t$

$C_0$  es la cantidad inicial de ingrediente activo en la solución

$k_1$  es la constante de liberación de primer orden

### 1.9.3. Modelo Aproximación (Segunda ley de Fick)

Este modelo se utiliza para predecir como la concentración del principio activo varía con respecto al tiempo [79] durante su difusión; asume que la velocidad de difusión de una sustancia a través de la matriz que lo contiene es directamente proporcional a la superficie de absorción y al gradiente de concentración de este. Durante un estudio de liberación en partículas se utiliza este modelo (ecuación 3) para explicar el comportamiento de difusión de un fluido en una dirección a través de una matriz porosa [80].

$$M_F(\%) = M_m * \left\{ 1 - e^{\left[ -7.3 \left( \frac{D \cdot t}{L^2} \right)^{0.75} \right]} \right\} \quad (3)$$

Donde:

$M_F$  es el porcentaje de ingrediente activo al tiempo  $t$

$M_m$  es el porcentaje de ingrediente activo liberado

$D$  es el coeficiente de difusión en ( $\text{mm}^2/\text{h}$ )

$L$  es el radio de las microesferas

### 1.9.4. Modelo de Higuchi

Este modelo asume que la difusión del ingrediente activo se da en una sola dimensión, aseverando que la disolución e hinchamiento de la matriz es despreciable y que la velocidad de difusión es constante [81]; es uno de los modelos más utilizados en los procesos de liberación de principios activos que son semi solubles o muy solubles en medios acuosos [82]. Este modelo está dado por la ecuación 4:

$$Q_t = k_H t^{\frac{1}{2}} \quad (4)$$

Donde:

$Q_t$  es la cantidad del ingrediente activo disuelto en el tiempo

$t$  es el tiempo

$k_H$  es la constante de disolución de Higuchi

### 1.9.5. Modelo de Korsmeyer-Peppas

Este modelo es utilizado para describir el mecanismo de liberación de un principio activo en un sistema que presenta erosión o disolución de la matriz que lo contiene, así mismo, ha sido implementado para analizar la parte fickiana y no fickiana en procesos de liberación en sistemas poliméricos que pueden o no hincharse [83], este modelo está dado por la ecuación 5:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_r t^n \quad (5)$$

Donde:

$M_t/M_\infty$  corresponde a la fracción del ingrediente activo liberado al tiempo  $t$

$k_r$  es la constante de liberación

$n$  corresponde al exponente del coeficiente de difusión

### 1.9.6. Modelo Multi-etapas

Este modelo fue propuesto para describir principalmente los procesos de difusión en partículas con forma esférica que presentan un tipo de difusión anómala (no-fickiana), en la cual se observan dos fenómenos diferentes [84]. Un proceso de liberación en dos etapas tiene un proceso rápido de difusión que se rige por la segunda ley de Fick (difusión fickiana), y un proceso de difusión lenta que es resultado de la relajación de la matriz que contiene un principio activo (difusión no fickiana) [85]. Este modelo está dado por la ecuación

$$M_t = M_F(t) + \sum_{n=1}^N C_n M_R(t; \beta) \quad (6)$$

Donde:

$M_t$  es la cantidad de ingrediente activo liberado al tiempo  $t$  de la parte no-Fickiana

$M_F$  es la cantidad de ingrediente activo liberado al tiempo  $t$  de la parte Fickiana

$C_n$  es una constante

$M_R$  es la parte no-Fickiana de la liberación del ingrediente activo

$\beta$  es el inverso del tiempo de relajación

## 1.10. Fitotoxicidad

La fitotoxicidad es la expresión fenológica que se produce por una afección metabólica en las plantas generada por factores físico-químicos, bióticos o abióticos. Estas afecciones pueden producirse en distintos órganos de la planta (figura 17) y suelen manifestarse en una serie de diferentes síntomas, siendo principalmente observables en las hojas, presentándose como quemazón o clorosis en las puntas y las consecuencias de estas afecciones pueden generar un retraso en el desarrollo de la planta hasta la pérdida de la misma [86].



**Figura 17.** Síntomas de fitotoxicidad en hojas de Soja.

Este término se utiliza para describir el grado tóxico que puede causar un desorden fisiológico en las plantas, viéndose reflejado en el aspecto, desarrollo, vigor y productividad de éstas [87]. Esto puede ser causado por diversos factores, principalmente por el uso de compuestos químicos, altas dosis de pesticidas, acumulación de metales pesados, niveles altos de hidratación, salinidad, etc. [88].

### 1.10.1. Condiciones que pueden generar fitotoxicidad en las plantas

**Condiciones de la planta:** Generalmente las plantas al verse bajo los efectos de estrés biótico producen especies reactivas de oxígeno (ERO); éstas se consideran como una de las principales señalizaciones de estrés en las plantas. Los efectos producidos pueden desencadenar en reacciones bioquímicas que producirán una serie de afecciones en las plantas, mostrando así síntomas visibles de fitotoxicidad [89].

**Condiciones del suelo:** Una de las principales causas que generan problemas de daño o estrés en las plantas es el uso excesivo de productos agrícolas en los suelos, los cuales producen efectos fitotóxicos por la toxicidad del producto acumulándose en los tejidos de la planta [90].

**Condiciones ambientales:** Por lo general, la mayoría de los factores ambientales, como las altas y bajas temperaturas, lluvias excesivas, radiación solar, etc., generan condiciones de estrés en las plantas, dañando los componentes de ciertas células que inactiva sus funciones, generando cierto daño de fitotoxicidad [91].

## **Capítulo 2**

# **MATERIALES Y MÉTODOS**

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Materiales

#### Matrices poliméricas

- Quitosano (QUI): grado industrial con peso molecular de 220,000 kDa y grado de desacetilación superior al 80% suministrado por Vepinsa.
- Polietilenglicol (PEG): Grado reactivo con peso molecular 3600-4400 g/mol de la marca Sigma Aldrich.
- Alginato de sodio (ALG): grado alimenticio de la marca Deiman.
- Poli (ácido láctico) (PLA): grado extrusión con un peso molecular de 170,000 g/mol suministrado por Natureworks LLC.
- Cera de abeja refinada (CAB): 90% de pureza suministrada por Acofarma.

#### Aminoácidos

- Glicina (Gly) - 99% de pureza marca Sigma Aldrich.
- Ácido glutámico (Glu) - 99% de pureza marca Sigma Aldrich.

#### Nano-arcillas

- Paligorskita (Pal): recolectada en una cantera a cielo abierto en las afueras de la ciudad de Ticul en el estado de Yucatán.

### 2.2. Métodos preliminares para la preparación de las microesferas de QUI, PEG, ALG, PLA y CAB y su caracterización morfológica por microscopía

Las microesferas (matriz polimérica) y las microesferas híbridas (matriz polimérica/nano-arcillas) fueron preparadas con las metodologías que describen a continuación. En el caso de las microesferas híbridas, la paligorskita (Pal) purificada (anexo I) se agregó durante la disolución de la matriz polimérica, en cada uno de los sistemas se utilizaron porcentajes de 0, 5 y 10% (p/p) de arcilla con respecto al peso de la matriz polimérica.

### **2.2.1. Metodología para la obtención de las microesferas de QUI**

El método fue desarrollado por Tanoo *et al.* [92], modificado por Dhawan *et al.* [93] y se basa en la formación de una emulsión de agua en aceite (w/o):

- Una mezcla de 0.5 g de quitosano con 5 y 10% de Pal (p/p) se disolvió en 10 ml de una solución acuosa de ácido acético glacial al 2 % (v/v).
- La mezcla se mantuvo en agitación constante a 1500 rpm a temperatura ambiente, hasta obtener una buena homogenización.
- Se mezclaron 40 ml de parafina líquida y 57 mg del emulsificante Span80 y se agitaron durante 30 min a 500 rpm.
- Posteriormente, la mezcla de quitosano y aminoácidos fue agregada a la mezcla de parafina/Span80 y se mantuvo en agitación constante a 2000 rpm durante un tiempo de 30 min.
- Una vez que transcurrió el tiempo, se agregaron 950 µl del agente entrecruzante (glutaraldehído) a la mezcla y se mantuvo en agitación a 2000 rpm durante 3 h manteniendo una temperatura constante de 60 °C.
- Una vez que se formaron las microesferas de QUI se realizaron tres lavados con hexano de 10 ml para eliminar la parafina.
- Posteriormente fueron secadas en una estufa de convección a una temperatura de 80 °C te durante 24 h.

### **2.2.2. Metodología para la obtención de las microesferas de PEG**

Las microesferas de polietilenglicol se prepararon con el método de evaporación de solvente en emulsión de aceite en agua [94].

- 2 g de polietilenglicol y 5 y 10% de Pal (p/p) fueron mezclados en 10 ml de cloroformo (triclorometano).
- Esta solución orgánica fue añadida a 100 ml de una solución acuosa de alcohol polivinílico (PVA) al 0.1% (p/v), a 5 °C.
- La mezcla se puso en agitación magnética a 4500 rpm durante 5 min a 5 °C para generar una emulsión de aceite en agua.

- La emulsión obtenida se añadió en 200 ml de solución acuosa de PVA al 0.1% (p/v).
- La mezcla a temperatura ambiente fue puesta en agitación magnética constante de 500 rpm durante 24 h para evaporar el cloroformo.
- Las microesferas fueron separadas por centrifugación y se les realizó un lavado por triplicado con agua destilada.
- Las microesferas se pusieron a secar a temperatura ambiente y se almacenaron a 5 °C hasta su uso.

### **2.2.3. Metodología para la obtención de las microesferas de ALG**

Las microesferas de alginato se prepararon mediante la técnica de emulsificación/gelificación [95].

- Se disolvieron 1 g de alginato y 5 y 10% de Pal (p/p) en 30 ml de agua destilada y se mantuvo en agitación magnética a 1000 rpm durante 1 h a una temperatura de 60° C.
- Se preparó una mezcla de 65 ml de parafina líquida y 1.4 ml del emulsificante Span80 y se mantuvo una agitación a 500 rpm hasta obtener una buena homogenización.
- La mezcla de Parafina/Spamn80 se agregó a la solución de alginato para formar una emulsión, la cual se mantuvo en agitación constante a 1000 rpm durante 1 h a una temperatura de 60° C.
- Transcurrido este tiempo se agregaron 13 ml de parafina que contenían 0.5 ml de ácido acético glacial y se mantuvo la agitación y temperatura del paso anterior durante 30 min.
- Se preparó una solución con 1 g cloruro de calcio en 50 ml de agua destilada; posteriormente, esta solución se vertió en la emulsión y se agitó para precipitar las microesferas de alginato.
- Las microesferas fueron lavadas en dos ocasiones con éter de petróleo y posteriormente se realizó una serie de lavados con agua destilada.

- Las microesferas se pusieron en agua destilada ya que requieren estar hidratadas hasta su uso.

#### **2.2.4. Metodología para la obtención de las microesferas de PLA**

Las microesferas de poli(ácido láctico) se prepararon según la metodología propuesta por Cohen *et al.* [96] usando el método de doble emulsión con evaporación de solvente:

- Se disolvió 1 g de PLA junto con 5 y 10% de Pal (p/p), respectivamente, en 15 ml de diclorometano manteniendo una agitación constante de 500 rpm a temperatura ambiente.
- Se preparó una solución de poli(alcohol vinílico), disolviendo 0.9 g en 90 ml de agua destilada.
- Transcurrido este tiempo, la mezcla de PLA con Pal fue agregada a la solución de PVA y se puso en agitación de 2000 rpm a temperatura ambiente durante 4 h.
- Posteriormente se detuvo la agitación y la mezcla se dejó en una campana de extracción durante 24 h para evaporar el diclorometano.
- Una vez eliminado por completo el diclorometano se realizó una serie de lavados a las microesferas con agua destilada.
- Las microesferas se recuperaron mediante filtración con bomba de vacío y fueron puestas a secar en una estufa de convección a 80 °C durante 24 h.

#### **2.2.5. Metodología para la obtención de las microesferas de CAB**

Para la obtención de las microesferas de cera de abeja se utilizó la técnica de emulsión de aceite en agua [97]:

- Se preparó una solución de lauril sulfato de sodio al 0.02 % (p/v) en agua desionizada, manteniéndose en agitación magnética a 1000 rpm a una temperatura de 80° C.
- En un crisol se colocaron 2 g de cera de abeja y 0.05 g de alcohol estearílico.
- Posteriormente, se puso a baño maría hasta que la cera y el alcohol se fundieran por completo.

- Una vez fundidos se mantuvieron en agitación constante a 100 rpm durante 30 min.
- Transcurrido el tiempo se agregaron el 5 y 10% de Pal (p/p) y se mantuvo en agitación hasta obtener una mezcla homogénea.
- Una vez que se obtuvo una mezcla homogénea, la fase fundida se añadió a la solución de lauril sulfato de sodio y se mantuvo una agitación constante a 1000 rpm durante 1 h a 80 °C para generar una emulsión.
- Una vez transcurrido el tiempo de agitación de la emulsión, se agregaron 100 ml de agua destilada a 4 °C para producir un choque térmico y obtener las microesferas.
- Después de que la emulsión se estabilizó a temperatura ambiente, las microesferas fueron recuperadas por filtración al vacío en un papel filtro.
- Las microesferas obtenidas fueron lavadas tres veces con agua destilada para eliminar los restos de los componentes de la emulsión.
- Una vez lavadas se pusieron a secar durante 24 h a temperatura ambiente.

### **2.2.6. Caracterización morfológica de las microesferas de QUI, PEG, ALG, PLA y CAB**

Microscopía óptica (MO) fue empleada para la caracterización morfológica de las diversas microesferas obtenidas durante las pruebas iniciales con el fin de verificar si cumplen con los parámetros de morfología esférica y distribución de tamaño deseado.

- Se colocó una pequeña muestra de microesferas en un portaobjetos y se adicionó una gota de parafina líquida.
- El portaobjetos se colocó en la plataforma del microscopio para la observación de las microesferas.
- Se tomaron micrografías con ampliaciones de 10 y 20x.
- Para determinar la distribución de tamaños en las micrografías se realizó un análisis de imágenes con los programas Image-ProPlus y Minitab19.

### **2.3. Métodos optimizados para la preparación de las microesferas de QUI y PLA**

Las microesferas (matriz polimérica) y microesferas híbridas (matriz polimérica/nano-arcillas/aminoácido) fueron preparadas con las metodologías que se

describen a continuación. En el caso de las microesferas híbridas, la paligorskita (Pal) y los aminoácidos Glicina (Gly) y ácido glutámico (Glu) fueron agregados durante la disolución de la matriz polimérica, en cada sistema se utilizaron porcentajes de 0, 1 y 2.5% (p/p) nano-arcillas con respecto al peso de la matriz polimérica y 100 mg de cada uno de los aminoácidos.

### **2.3.1. Metodología para la obtención de las microesferas híbridas de QUI**

El método fue desarrollado por Tanoo *et al.* [92], modificado por Dhawan *et al.* [93] y se basa en la formación de una emulsión de agua en aceite (w/o):

- Se disolvieron 0.5 g de quitosano con 1 y 2.5% de Pal (p/p) y 100 mg del aminoácido Gly y/o Glu en 10 ml de una solución acuosa de ácido acético glacial al 2 % (v/v) y se mantuvieron en agitación constante a 3000 rpm a temperatura ambiente, hasta obtener una buena homogenización.
- Se mezclaron 40 ml de parafina líquida y 57 mg del emulsificante Span80 y se agitaron durante 15 min a 1000 rpm.
- Posteriormente, la mezcla de quitosano y aminoácidos fue agregada a la mezcla de parafina/Span80 y se mantuvo en agitación constante a 2000 rpm durante un tiempo de 15 min.
- Una vez que transcurrió el tiempo, se agregaron 950 µl del agente entrecruzante (glutaraldehído) a la mezcla y se mantuvo en agitación a 2000 rpm durante 3 h manteniendo una temperatura constante de 60 °C.
- Después de formadas las microesferas de QUI se realizaron cinco lavados con hexano de 10 ml para eliminar la parafina.
- Posteriormente fueron secadas en una estufa de convección a una temperatura de 80 °C te durante 24 h.

### **2.3.2. Metodología para la obtención de las microesferas híbridas de PLA**

Las microesferas de PLA se prepararon según la metodología propuesta por Cohen *et al.* [96], usando el método de doble emulsión con evaporación de solvente:

- Se disolvieron 100 mg de los aminoácidos Gly y/o Glu en 10 ml de agua destilada manteniendo una agitación constante a 500 rpm hasta obtener una buena homogenización.
- Se disolvió 1 g de PLA en 15 ml de diclorometano manteniendo una agitación constante de 1000 rpm a temperatura ambiente.
- Se preparó una solución de poli(alcohol vinílico), disolviendo 0.9 g en 90 ml de agua destilada.
- La solución de aminoácidos fue agregada a la mezcla de PLA y se mantuvo en agitación durante 20 min a temperatura ambiente.
- Transcurrido este tiempo, la mezcla de PLA con los aminoácidos Gly y/o Glu fue agregada a la solución de PVA y se puso en agitación de 2500 rpm a temperatura ambiente durante 1 h.
- Transcurrido este tiempo se detuvo la agitación y la mezcla se dejó en una campana de extracción durante 16 h para evaporar el diclorometano.
- Una vez eliminado por completo el diclorometano se realizaron dos lavados a las microesferas con agua destilada.
- Las microesferas se recuperaron mediante decantación y fueron puestas a secar en una estufa de convección a 80 °C durante 24 h.

## **2.4. Caracterización fisicoquímica de las microesferas de QUI y PLA**

La caracterización fisicoquímica de las microesferas de QUI y PLA se realizó con microscopía electrónica de barrido (SEM), tamaño de partícula Coulter (TP), grado de hinchamiento (GH) y difracción de rayos X (XRD).

### **2.4.1. Microscopía electrónica de barrido (SEM)**

Las micrografías SEM muestran la forma esférica de las microesferas y el estado de su superficie.

- Aproximadamente 10 mg de cada una de las microesferas a analizar fueron secados a una temperatura de 100 °C durante 24 h y se almacenaron en un desecador.

- Aproximadamente 2 mg de las microesferas secas se depositaron sobre un portamuestra circular con cinta adhesiva doble cara de carbono.
- El portamuestras se introdujo en la cámara sputering y se depositó un recubrimiento de 1-100 nm de oro, para asegurar una buena conductividad.
- El portamuestras se coloca en la cámara de observación del microscopio JEOL modelo JSM-6360 LV.
- El voltaje utilizado fue de 20,000 V y una distancia focal de 3 mm, el detector es de silicio dopado con litio.
- Las micrografías se generaron a ampliaciones de 10,000 y 20,000x.

#### **2.4.2. Tamaño de partícula por el método Coulter® (TP).**

El tamaño de partícula de las microesferas se obtuvo con la técnica de medición Coulter. De esta forma se determinó si el tamaño de las diferentes microesferas estaba dentro del intervalo de 50 a 500  $\mu\text{m}$ .

- Se agregaron 12 ml de etanol al 75% en la celdilla Coulter hasta cubrir los lentes laterales y fue cerrada herméticamente.
- La celdilla se colocó en el analizador de partícula Coulter® LS100Q, y fue iniciada la agitación hasta alcanzar la máxima potencia, una vez alcanzada, el equipo fue calibrado hasta alcanzar una oscuración de 7 a 11%.
- La celdilla se retiró y se colocaron en la celdilla aproximadamente de 10 a 20 mg de las microesferas a analizar.
- Posteriormente se agitó la celdilla a máxima potencia hasta lograr una buena dispersión de las microesferas.
- Una vez conseguida una buena dispersión se colocó la celda con la muestra en el equipo, se esperó a que se estabilice y se alcance de 7 a 11 % de oscuración.
- Una vez alcanzado este intervalo de oscuración se corrió la muestra por triplicado con un tiempo de prueba de 60 s cada una, y en un intervalo de tamaños de partícula de 0.375 a 948.2  $\mu\text{m}$ .
- Una vez finalizado el tiempo de prueba, se calculó el promedio de las tres corridas para obtener la distribución de tamaños de partícula de las microesferas.

### **2.4.3. Porcentaje de hinchamiento y absorción de agua (PH y PA)**

El grado de hinchamiento y absorción de agua de las microesferas se midió con la técnica de inmersión en agua y etanol propuesta por Nunthanid *et al.* [98].

- 100 mg de las microesferas se secaron durante 24 h a una temperatura de 100 °C para eliminar toda la humedad presente.
- Los 100 mg de las microesferas secas se pusieron en viales herméticos y se agregó 10 ml de etanol al 70% a una temperatura de 35 °C y se dejaron reposar durante 24 h.
- Transcurrido este tiempo, las microesferas son recuperadas y el exceso de etanol se eliminó con papel secante e inmediatamente se pesaron.
- Posteriormente las microesferas se secaron a 100 °C durante 24 h en un horno de convección y se pesan nuevamente.

### **2.4.4. Fase cristalina de la Paligorskita por difracción de rayos X (XRD)**

Esta técnica se utilizó para determinar la presencia de la Paligorskita en las microesferas de QUI y PLA mediante la identificación de la fase cristalina de las arcillas.

- Se secaron aproximadamente 200 mg de las microesferas en una estufa de convección a 100 °C durante 24 h.
- Las microesferas se depositaron en viales herméticos y se almacenaron en un desecador para evitar que captaran humedad.
- Posteriormente las microesferas fueron maceradas en un mortero de ágata hasta obtener un polvo fino homogéneo.
- Las microesferas maceradas se colocaron en el portamuestras de aluminio del difractómetro y se realizó un barrido de  $2\theta$  de 3 a 60° a un paso de 0.02° en un lapso de 1.5 s en un difractómetro D2 Phaser Marca BRUKER equipado con un ánodo CuK $\alpha$ .

#### **2.4.5. Determinación cualitativa y cuantitativa de los aminoácidos Gly y Glu en las microesferas de QUI y PLA**

La presencia cualitativa y cuantitativa de los aminoácidos Gly y Glu en las microesferas de QUI y PLA se determinó con las técnicas de espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) y espectrofotometría UV-visible.

##### **2.4.5.1. Espectrofotometría Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR) de Gly y Glu**

La presencia de los aminoácidos Gly y Glu en las microesferas híbridas se realizó mediante la identificación de los diferentes grupos funcionales de éstos.

- 10 mg de cada una de las microesferas fueron secados en una estufa de convección durante 24 h a una temperatura de 100 °C.
- 100 mg de KBr y 0.1 mg de microesferas se mezclaron y maceraron en un mortero de ágata hasta obtener un polvo fino.
- La mezcla macerada se colocó en un pastillador y fue prensada durante 7 min con una presión de 3 Ton.
- Las pastillas resultantes fueron puestas a secar en una estufa de convección a una temperatura de 100 °C durante 24 h.
- Transcurrido el tiempo de secado las pastillas se colocaron en un desecador con el fin de que no absorban humedad.
- Posteriormente cada una de las pastillas fueron introducidas en el espectrofotómetro Thermo Scientific modelo Nicolet 8700 y se realizaron 100 barridos con una resolución de 4 cm<sup>-1</sup>.

##### **2.4.5.2. Espectrofotometría UV-visible de Gly y Glu por el método de reacción con ninhidrina**

La cantidad de aminoácido capturado en las microesferas fue determinada por Espectrofotometría UV-visible utilizando la metodología por Yemm *et al.* [99] mediante la reacción de los aminoácidos con el reactivo ninhidrina.

- 100 mg de microesferas se colocaron en tubos eppendorf y se les agregó 1 ml de etanol al 70%.

- Cada tubo se agitó con un vortex y se dejó reposar por 1 h.
- Posteriormente, los tubos fueron centrifugados durante 30 min a 14,000 rpm a temperatura ambiente.
- Se tomaron alícuotas de 200  $\mu$ l del sobrenadante y se colocaron en tubos de ensayo de 10 ml, cada tubo se completó con agua destilada hasta alcanzar un volumen final de 1 ml y se agitaron en un vortex.
- A cada uno de los tubos preparados se les agregó 1 ml de la solución final de ninhidrina (anexo II) y se agitaron en un vortex.
- Los tubos se colocaron en una gradilla y fueron puestos a baño maría a una temperatura de 90 °C durante 30 min.
- Transcurrido este tiempo se retiraron del baño maría y se dejaron enfriar durante 5 min. Posteriormente se les agregó 2.5 ml de una solución de alcohol isopropílico al 50% y se agitaron en un vortex.
- Una vez que se homogenizó cada tubo se dejaron enfriar a temperatura ambiente durante 15 min.
- Se tomaron alícuotas de 3 ml y se colocaron en una celdilla de cuarzo para leerse en un espectrofotómetro UV-visible Thermo Spectronic GENESYS 10UV a una longitud de 570 nm.
- Para la cuantificación se utilizó una curva, usando al glutamato como estándar.

## **2.5. Cinética de liberación de los aminoácidos Gly y Glu y modelado matemático**

Con el fin de establecer los mecanismos que rigen el proceso de liberación (difusión) de los aminoácidos en las microesferas se realizaron pruebas de cinética de liberación controlada y los datos obtenidos fueron ajustados a modelos matemáticos.

### **2.5.1. Cinética de liberación controlada de los aminoácidos Gly y Glu en microesferas de QUI y PLA**

La cinética de liberación de los aminoácidos Gly y Glu atrapados en las microesferas de QUI y PLA se realizó midiendo la cantidad de los aminoácidos liberados con respecto al tiempo.

- Microesferas de QUI: se colocaron 100 mg de microesferas en una bolsa de té vacía previamente esterilizada y se colocó en un reactor que contiene 50 ml de agua destilada a temperatura ambiente.
- Microesferas de PLA: se colocaron 100 mg de microesferas en un reactor que contiene 50 ml de agua destilada a temperatura ambiente.
- Cada reactor fue tapado herméticamente para evitar algún tipo de contaminación que pudiera alterar la muestra.
- Para la cinética se tomaron alícuotas de 2 ml cada 10 min durante la primera hora de remojo, posteriormente cada hora hasta un periodo de 6 h y finalmente cada 24, 72, 96 y 144 h.
- Las alícuotas de los reactores con microesferas de QUI fueron centrifugadas a 14,000 rpm durante 10 min.
- Para las alícuotas de los reactores con microesferas de PLA se omitió el paso anterior.
- Cada una de las muestras (alícuotas) fue analizada por UV-visible con el método de la ninhidrina (sección 2.4.5.2).

## **2.5.2. Metodología para el modelado matemático de la cinética de liberación de los aminoácidos Gly y Glu contenidos en las microesferas de QUI y PLA**

Los modelos matemáticos de la Segunda Ley de Fick [80] y Multi-etapas [85] fueron ajustados a los datos experimentales de la cinética de liberación de los aminoácidos Gly y Glu capturados en las microesferas QUI y PLA.

### **2.5.2.1. Solución al modelo de Aproximación a la Segunda Ley de Fick en una dimensión.**

Para la solución al modelo de Aproximación a la Segunda Ley de Fick se calcularon los coeficientes de difusión de liberación de los aminoácidos, los cuales corresponden a la parte lineal de la cinética, para ello se utilizó la ecuación 7, la cual fue propuesta por Shen *et al.* [100].

$$D = \pi \left( \frac{l}{4M_m} \right)^2 \left( \frac{M_2 - M_1}{\sqrt{t_2} - \sqrt{t_1}} \right)^2 \quad (7)$$

Donde  $D$  es el coeficiente de difusión ( $\text{mm}^2/\text{h}$ ),  $l$  es el espesor de las microesferas,  $M_m$  es el porcentaje de saturación (%) y  $M_1$  y  $M_2$  son los porcentajes de liberación en los tiempos  $t_1$  y  $t_2$  respectivamente.

El porcentaje de saturación  $M_m$  se obtiene del punto máximo de equilibrio en la gráfica de la cinética, una vez obtenidos los coeficientes de difusión y porcentajes de saturación, estos fueron sustituidos en la ecuación 3.

### 2.5.2.2. Solución al modelo Multi-etapas

Para el modelo Multi-etapas se necesita calcular la parte no fickiana de la cinética de liberación, para lo cual se utilizó la ecuación 8:

$$C(\pm l, t) = \left[ C_0 + \sum_{i=1}^N C_i (1 - e^{-\beta_i t}) \right] \quad (8)$$

Donde  $C$  es la concentración del aminoácido liberado en función del tiempo y del espesor de las microesferas, considerando parámetros viscoelásticos como el tiempo de relajación y el potencial químico,  $C_0$  es una constante,  $C_i$  es el punto de equilibrio de la concentración con el potencial químico y  $\beta$  es la inversa del tiempo de relajación.

Para resolver la ecuación 8 se utilizó la condición inicial  $C(z, 0) = 0$ ,  $-l \leq z \leq l$  y la condición de frontera  $C(\pm l, t) = (1 - e^{-\beta_n t})$ ; la solución se expresó como:

$$M_R(t; \beta) = 2l * \left\{ -\frac{8}{\pi^2} \sum_{n=0}^{\infty} \frac{1 - \exp(-\beta t) \sqrt{\frac{D}{\beta l^2}} \tan \sqrt{\frac{\beta l^2}{D}} - \exp \left\{ -\left[ \frac{(2n+1)\pi}{2} \right]^2 t^* \right\}}{(2n+1)^2 \left\{ 1 - (2n+1)^2 \left[ \frac{D\pi^2}{(4\beta l^2)} \right] \right\}} \right\} \quad (9)$$

Donde  $M_R$  corresponde al porcentaje de liberación no fickiano del aminoácido en un tiempo de liberación  $t$ . Los valores estimados de  $M_R$  para  $\beta$  se usaron los propuestos por Cai *et al.* [101] ( $1/10$ ,  $1/50$ ,  $1/100$ ,  $1/500$ ,  $1/1000$ ,  $1/5000$  y  $1/10000 \text{ h}^{-1}$ ).

Finalmente, los valores de la parte fickiana y no fickiana de la cinética de liberación de los aminoácidos se sustituyeron en la ecuación 6 (sección 1.9.6), y los datos obtenidos fueron analizados y graficados en el programa OriginPro 8.5.

## **2.6. Pruebas de fitotoxicidad *in vitro* de las microesferas de QUI y PLA/germinación de semillas, producción de biomasa y elongación radicular**

La fitotoxicidad de las microesferas cargadas con los aminoácidos fue determinada mediante el estudio *in vitro* de la germinación de semillas, producción de biomasa y elongación radicular en plántulas de chile habanero (*Capsicum chinense*).

### **2.6.1. Germinación de semillas en presencia de microesferas QUI/Pal y PLA/Pal cargadas con los aminoácidos Gly y Glu)**

Para observar si las microesferas de QUI y PLA tienen un efecto fitotóxico, se realizó un estudio de germinación *in vitro* de semillas de chile habanero en presencia microesferas de QUI y PLA, de la siguiente forma:

- En cada pocillo de una charola de germinación (15 pocillos por charola) se colocaron 94.5 g de vermiculita como sustrato, mezclado previamente con 1.5 % (Dosis 1) y 3 % (Dosis 2) p/p de microesferas. Cada pocillo se humedeció al 100% con 45 ml de agua destilada.
- En cada pocillo se colocaron dos semillas previamente desinfectadas (anexo IV) (30 semillas por tipo de microesfera, sección 3.5) a una profundidad de 4 mm y se taparon completamente con la vermiculita.
- Las charolas de germinación fueron cubiertas para evitar el paso de la luz y fueron colocadas en un cuarto de cultivo a una temperatura de 25-27 °C.
- Al quinto día, las charolas de cultivo fueron descubiertas y puestas en charolas de drenaje a las cuales se les agregó 800 ml de agua destilada.
- A los días 5, 12 y 29 se agregó 800 ml de agua destilada a cada charola de drenaje.
- En los días 19, 21 y 36 las plántulas fueron fertilizadas con una solución Hoagland (anexo V), agregando 20 ml de la solución a cada pocillo.
- Se calculó el porcentaje de germinación total en cada condición.

### **2.6.2. Elongación radical de las plántulas de chile habanero cultivadas en presencia de las microesferas QUI/Pal y PLA/Pal cargadas con los aminoácidos Gly y Glu)**

La elongación radical de las plántulas de chile habanero puede ser un directo efecto de los aminoácidos presentes en las microesferas:

- Cinco plántulas que crecieron con cada tipo de microesferas, como se describió anteriormente, fueron extraídas de las charolas de cultivo con cuidado para no dañar las raíces.
- Las plántulas fueron colocadas en cajas Petri con agua destilada con el fin de quitar la vermiculita remanente de las raíces.
- Una vez que las raíces de las plántulas estuvieron completamente libres de vermiculita se colocaron en cajas de Petri con agua corriente tratando de que las raíces estén completamente distribuidas.
- Por último, se tomaron fotos de las raíces y de la parte aérea (hojas) de las plántulas con una cámara Nikon modelo coolpix P7000.

### **2.6.3. Peso fresco de biomasa de plántulas de chile habanero crecidas en presencia de las microesferas de QUI y PLA con Pal cargadas con los aminoácidos Gly y Glu**

La producción de biomasa (parte aérea y radical) está directamente relacionada con el peso fresco de las plántulas.

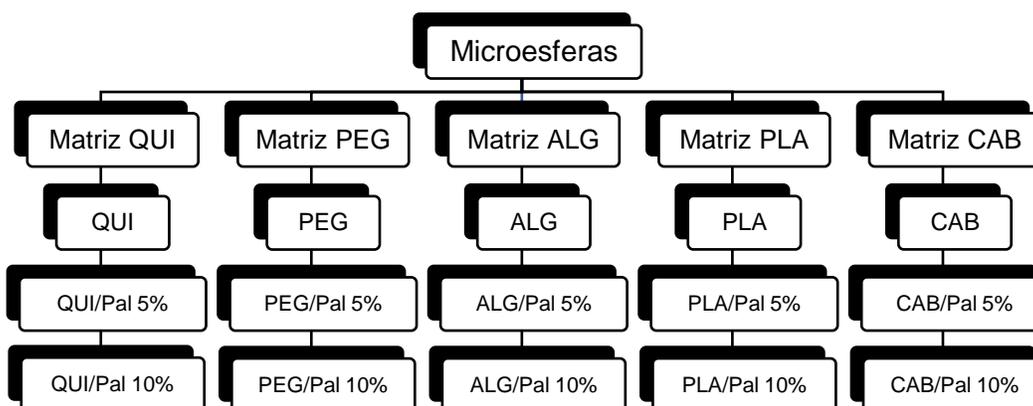
- Para el estudio se usaron cinco plántulas por cada tipo de microesfera.
- Las plántulas previamente lavadas y libres de vermiculita fueron secadas con papel secante.
- Una vez secas, las plántulas fueron divididas en parte aérea (tallo y hojas) y parte radical (raíz).
- Cada parte (aérea y radical) fue pesada individual y en conjunto en una balanza analítica, obteniendo el peso fresco aéreo y radical.

## **Capítulo 3**

# **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los métodos empleados para la obtención de microesferas de QUI, PEG, ALG, PLA y CAB (con porcentajes de Pal: 5 y 10% p/p) fueron evaluados con una serie de pruebas preliminares con el fin de determinar si eran aptos para generar microesferas con una morfología y distribución de tamaño adecuados. La figura 18 presenta las microesferas que fueron obtenidas durante las pruebas preliminares con cada uno de los métodos de obtención utilizados.



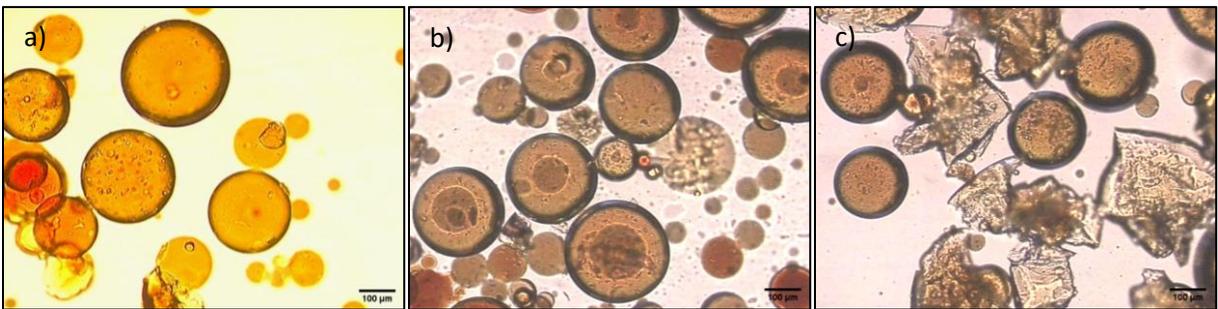
**QUI** - Matriz polimérica de Quitosano con 0% de paligorskita  
**QUI/Pal 5%** - Matriz polimérica de Quitosano con 5% de paligorskita  
**QUI/Pal 10%** - Matriz polimérica de Quitosano con 10% de paligorskita  
**PEG** - Matriz polimérica de Polietilenglicol con 0% de paligorskita  
**PEG/Pal5%** - Matriz polimérica de Polietilenglicol con 5% de paligorskita  
**PEG/Pal10%** - Matriz polimérica de Polietilenglicol con 10% de paligorskita  
**ALG** - Matriz polimérica de Alginato con 0% de paligorskita  
**ALG/Pal5%** - Matriz polimérica de Alginato con 5% de paligorskita  
**ALG/Pal10%** - Matriz polimérica de Alginato con 10% de paligorskita  
**PLA** - Matriz polimérica de Poli(ácido láctico) con 0% de paligorskita  
**PLA/Pal5%** - Matriz polimérica de Poli(ácido láctico) con 5% de paligorskita  
**PLA/Pal10%** - Matriz polimérica de Poli(ácido láctico) con 10% de paligorskita  
**CAB** - Matriz polimérica de Cera de abeja con 0% de paligorskita  
**CAB/Pal5%** - Matriz polimérica de Cera de abeja con 5% de paligorskita  
**CAB/Pal10%** - Matriz polimérica de Cera de abeja con 10% de paligorskita

**Figura 18.** Microesferas obtenidas durante las pruebas preliminares: QUI, PEG, ALG, PLA y CAB e híbridas con 0, 5 y 10% de paligorskita.

### 3.1. Resultados de las pruebas preliminares de microesferas de QUI, PEG, ALG, PLA, CAB y QUI/Pal, PEG/Pal, ALG/Pal, PLA/Pal y CAB/Pal

#### 3.1.1. Microscopía óptica de microesferas de QUI y QUI/Pal

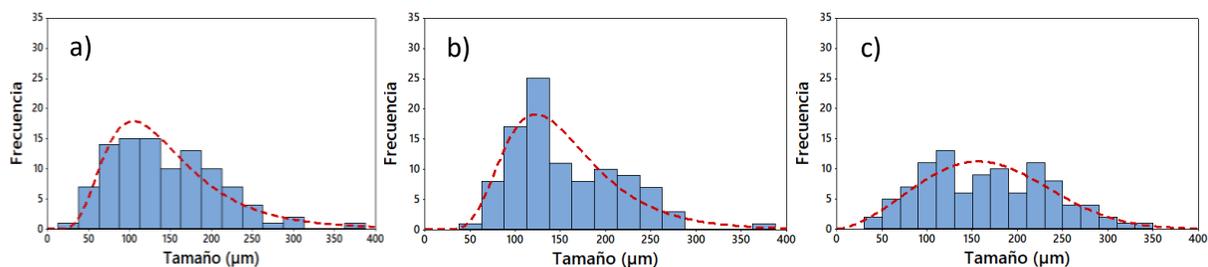
La figura 19a presenta las microesferas de QUI, que tuvieron una morfología esférica bien definida. La figura 19b muestra las microesferas de QUI/Pal5%, donde se puede observar que de igual manera presentan una morfología esférica, indicando que la adición de 5 % de PAL no afectó el proceso de formación y que hay una buena interacción entre la matriz y la Pal. Las microesferas de QUI/Pal10% (figura 19c) presentaron una alta fragilidad, ya que éstas tienden a romperse o deformarse, sugiriendo que un mayor contenido de arcilla (10%) afecta el proceso de obtención, causando fragilidad en las microesferas.



**Figura 19.** Micrografías ópticas de microesferas de a) QUI, b) QUI/Pal5% y c) QUI/Pal10%, en amplificación de 10x.

#### 3.1.2. Distribución de tamaño de partícula de microesferas de QUI y QUI/Pal

La figura 20 muestra los histogramas de distribución de tamaño de las microesferas de a) QUI, b) QUI/Pal5% y c) QUI/Pal10%. Las microesferas de QUI (figura 20a) presentaron tamaños de partícula entre 33 y 381  $\mu\text{m}$  (promedio 141  $\mu\text{m}$ ), las microesferas de QUI/Pal5% (figura 20b) están entre 51 a 396  $\mu\text{m}$  (promedio 133  $\mu\text{m}$ ), lo que indica que la adición de 5 % de arcilla ayuda a obtener una mejor distribución de tamaño en comparación con las microesferas sin nano-arcillas, y las microesferas de QUI/Pal10% (figura 20c) presentan tamaños de 38 a 334  $\mu\text{m}$  (promedio 150  $\mu\text{m}$ ). Se observa que la adición de 10 % de arcilla afecta negativamente el tamaño de partícula y su distribución durante el proceso de elaboración.

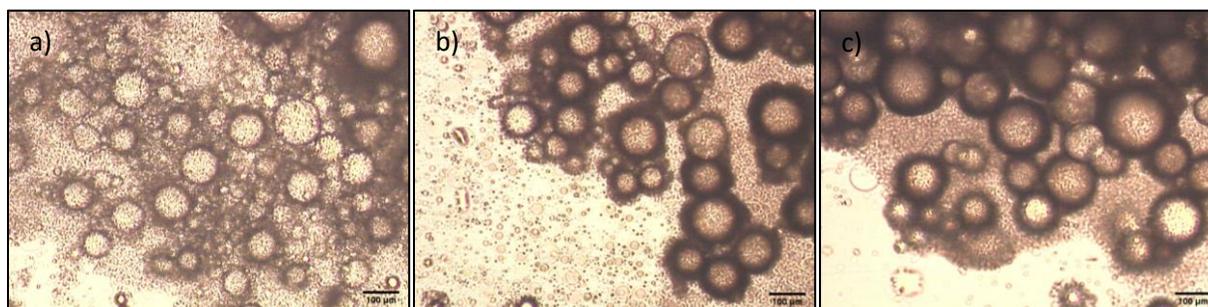


**Figura 20.** Histogramas de distribución Anderson-Darling de tamaño de microesferas de a) QUI, b) QUI/Pal5% y c) QUI/Pal10%.

El método de emulsión de agua en aceite es uno de los más utilizados para la obtención de microesferas de QUI, este método fue utilizado por *Kimna et al.* [102] para obtener microesferas de QUI con montmorillonita, sus pruebas arrojaron satisfactoriamente microesferas híbridas con morfología esférica y tamaño uniforme, sin embargo al igual que nuestras microesferas al agregar altos porcentajes de la arcilla estas tendían a romperse, causando un alto grado de fragilidad, recomendándose disminuir el porcentaje de la montmorillonita.

### 3.1.3. Microscopía óptica de microesferas de PEG y PEG/Pal

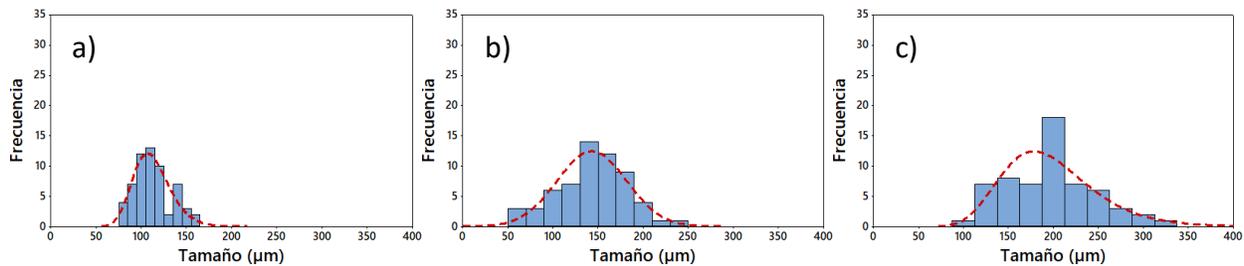
La figura 21a corresponde a las microesferas PEG, las cuales presentaron una morfología esférica y de diferentes tamaños, validando el método que se empleó para obtenerlas. La figura 21b corresponde a PEG/Pal 5%, se observa una morfología esférica con cierta tendencia al incremento en sus tamaños, en comparación con las microesferas PEG. La figura 21c corresponde a PEG/Pal 10%, las cuales siguieron manteniendo su forma esférica y un incremento de tamaño.



**Figura 21.** Micrográficas ópticas de microesferas de a) PEG, b) PEG/Pal5% y c) PEG/Pal10%, con amplificación de 10x.

### 3.1.4. Distribución de tamaño de partícula de microesferas de PEG y PEG/Pal

La distribución de tamaños de las microesferas PEG (figura 22a) muestra que tiene tamaños que van de 75 a 160  $\mu\text{m}$  (promedio 112  $\mu\text{m}$ ), PEG/Pal5% (figura 22b) presenta tamaños de 62 a 237  $\mu\text{m}$  (promedio 143  $\mu\text{m}$ ) y las microesferas PEG/Pal10% (figura 22c) tienen tamaños que van de 103 a 326  $\mu\text{m}$  (promedio 197  $\mu\text{m}$ ). En los histogramas se puede apreciar el incremento del tamaño de las microesferas y una mejor dispersión de los tamaños conforme el porcentaje de Pal es mayor.

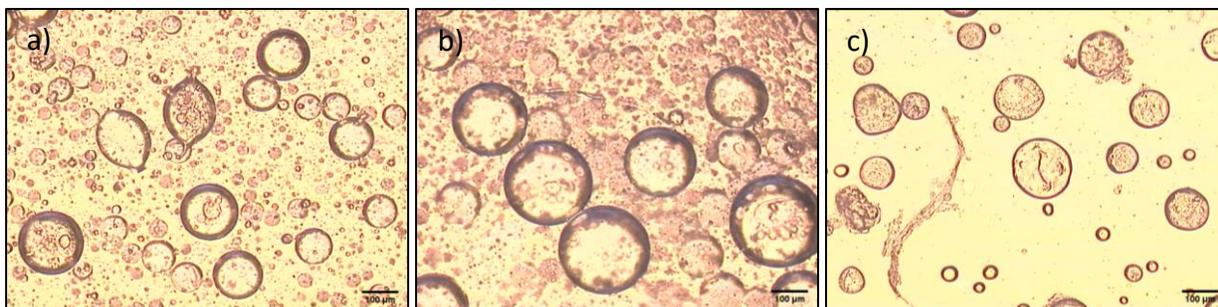


**Figura 22.** Histogramas de distribución Anderson-Darling de tamaño de microesferas de a) PEG, b) PEG/Pal5% y c) PEG/Pal10%.

La obtención de microesferas de PEG por el método de evaporación de solvente en emulsión de aceite en agua es uno de los que presenta mayor complicación, con este método logramos obtener microesferas con morfologías bien definidas sin embargo se presentaron una serie de desventajas que generaron mermas en la producción, investigaciones sobre el uso de este método han concluido que la formación de las microesferas depende principalmente del peso molecular del polímero y que este tiene una serie de desventajas como lo son una baja reproducibilidad, pérdidas de matriz polimérica y que los procesos de recuperación de las microesferas conlleva tiempos largos [103, 104].

### 3.1.5. Microscopía óptica de microesferas de ALG y ALG/Pal

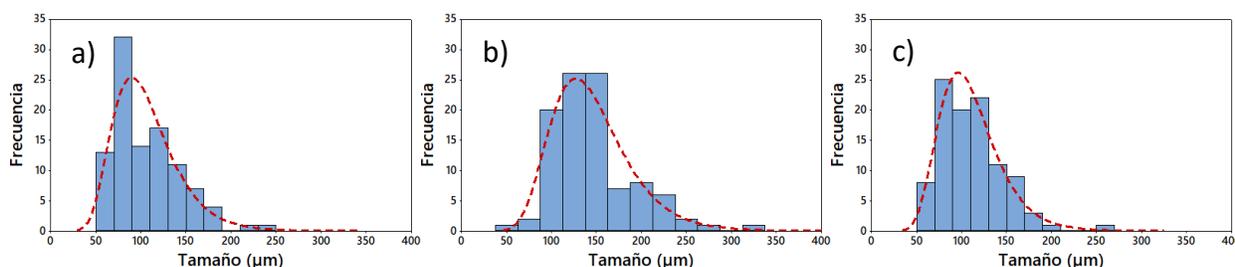
La figura 23a muestra que se obtuvieron microesferas de ALG con forma esférica de diferentes tamaños. La figura 23b presenta las microesferas ALG/Pal 5% que siguen teniendo una forma esférica y aumentan su tamaño respecto a ALG. La figura 23c muestra las microesferas ALG/Pal 10% que presentan una morfología y disminución de tamaño irregulares, causado por el mayor contenido de nano-arcillas agregado durante la preparación de las microesferas, afectando su morfología y tamaño.



**Figura 23.** Micrografías ópticas de microsferas de a) ALG, b) ALG/Pal5% y c) ALG/Pal10%, en amplificación de 10x.

### 3.1.6. Distribución de tamaño de partícula de microsferas de ALG y ALG/Pal

La figura 24 muestra la distribución de tamaños de las microsferas de a) ALG, b) ALG/Pal5% y c) ALG/Pal10%. Las microsferas ALG tienen tamaños de 61 a 273  $\mu\text{m}$  (promedio 145  $\mu\text{m}$ ), las ALG/Pal5%, de 52 a 259  $\mu\text{m}$  (promedio 129  $\mu\text{m}$ ) y las microsferas ALG/Pal 10% de 54 a 215  $\mu\text{m}$  (promedio 106  $\mu\text{m}$ ). Estas últimas disminuyen su tamaño en comparación con ALG y ALG/Pal 5%; el alto contenido de Pal, presenta una mala interacción con la matriz afectando su morfología y tamaño.

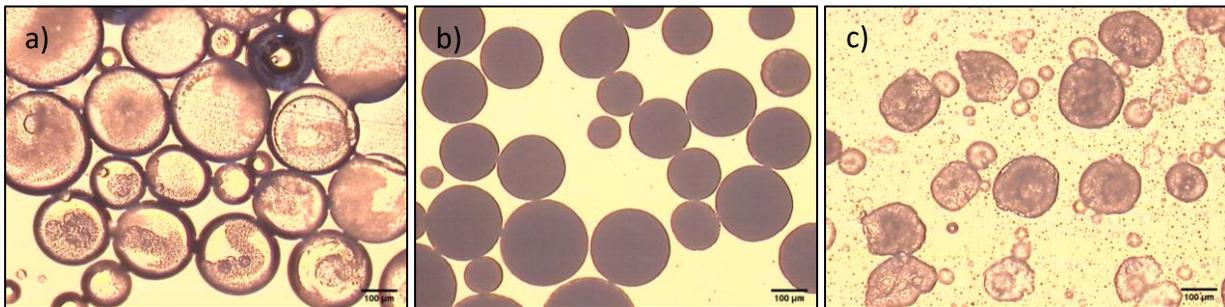


**Figura 24.** Histogramas de distribución Anderson-Darling de tamaño de microsferas de a) ALG, b) ALG/Pal5% y c) ALG/Pal10%.

Las microsferas de ALG obtenidas por el método de gelificación iónica, presentaron buenas características como morfologías esféricas y una buena distribución de tamaño, sin embargo, la principal desventaja que presentaron fue que se tenían que mantener hidratadas para no colapsar, *Uyen et al.* [105] obtuvieron microsferas por este método, reportando microsferas con formas esférica y una buena interacción con la arcilla montmorillonita, sin embargo el principal inconveniente fue la mala distribución de tamaños que se conseguían.

### 3.1.7. Microscopía óptica de microesferas de PLA y PLA/Pal

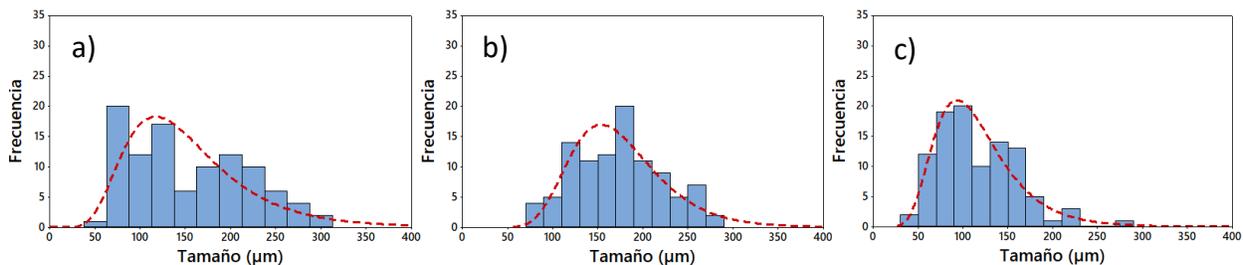
La figura 25a muestra que las microesferas PLA presentan una morfología esférica bien definida, al igual que PLA/Pal 5% (figura 25b), indicando que la presencia de la nano-arcilla no altera el proceso de formación de las microesferas y que existe una buena interacción entre los componentes. La figura 9c presenta las microesferas PLA/Pal 10%, se observa que pierden su morfología esférica con formas y tamaños irregulares, lo que indica que la mayor cantidad de nano-arcillas altera la formación de las microesferas.



**Figura 25.** Micrografías ópticas de microesferas de a) PLA, b) PLA/Pal5% y c) PLA/Pal10%, en amplificación de 10x.

### 3.1.8. Distribución de tamaño de partícula de PLA y PLA/Pal

La distribución de tamaños correspondientes a las microesferas de PLA (figura 26a) presenta tamaños de 62 a 293 µm (promedio 153 µm), las microesferas PLA/Pal 5% (figura 26b) de 81 a 281 µm (promedio 174 µm) presentando una mejor distribución de tamaño lo que indica una buena interacción entre sus componentes, y las microesferas PLA/Pal 10% (figura 26c) de 44 a 216 µm (promedio 114 µm), observando una disminución considerable en el tamaño promedio de partícula. Esto indica que la adición de una mayor cantidad de nano-arcillas afecta su tamaño.

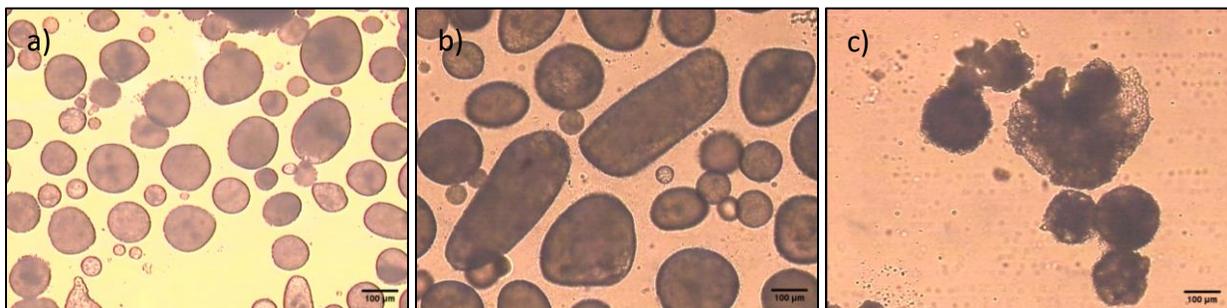


**Figura 26.** Histogramas de distribución Anderson-Darling de tamaño de microesferas de a) PLA, b) PLA/Pal5% y c) PLA/Pal10%.

Las microesferas obtenidas por el método de doble emulsión con evaporación de solvente presentaron características similares a las obtenidas en el estudio reportado por Brito et al. [106], los cuales obtuvieron microesferas con morfología esférica, una amplia distribución de tamaños y observaron que la presencia del mineral arcilloso no causó ningún efecto adverso en la formación, este método es uno de los más utilizados para la obtención de microesferas de PLA.

### 3.1.9. Microscopía óptica de microesferas de CAB y CAB/Pal

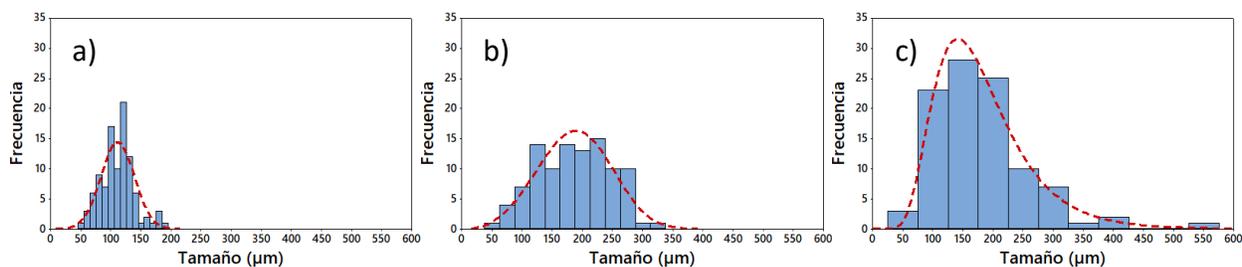
Las microesferas de cera de abeja, CAB (figura 27a) tienen una morfología esférica y tamaño constante. En la figura 27b, se observa que CAB/Pal 5% tiene una morfología esférica e irregular y las microesferas que contienen un 10% de Pal (figura 27c) muestran morfologías completamente irregulares, lo que indica que la adición de nano-arcillas a los sistemas de CAB puede afectar el proceso de formación de las microesferas. Este resultado puede ser debido a que no se presenta una buena interacción entre sus componentes, generando microesferas con morfologías completamente irregulares y tamaños muy grandes.



**Figura 27.** Micrografías ópticas de microesferas de a) CAB, b) CAB/Pal5% y c) CAB/Pal10%, en amplificación de 10x.

### 3.1.10. Distribución de tamaño de partícula de microesferas de CAB y CAB/Pal

La distribución de tamaños de partícula de las microesferas CAB (figura 28a) muestra que tiene tamaños de 54 a 198  $\mu\text{m}$  (promedio 111  $\mu\text{m}$ ) y las microesferas CAB/Pal5% y CAB/Pal10% (figura 28b y c) con tamaños de 46 a 334 y 25 a 570  $\mu\text{m}$  (promedio 187  $\mu\text{m}$ ). Se puede observar que la presencia de las nano-arcillas hace que los tamaños de partícula aumenten considerablemente y existe una mejor distribución de tamaños de partícula en comparación con el sistema sin las nano-arcillas.



**Figura 28.** Histogramas de distribución Anderson-Darling de tamaño de microesferas de a) CAB, b) CAB/Pal5% y c) CAB/Pal10%.

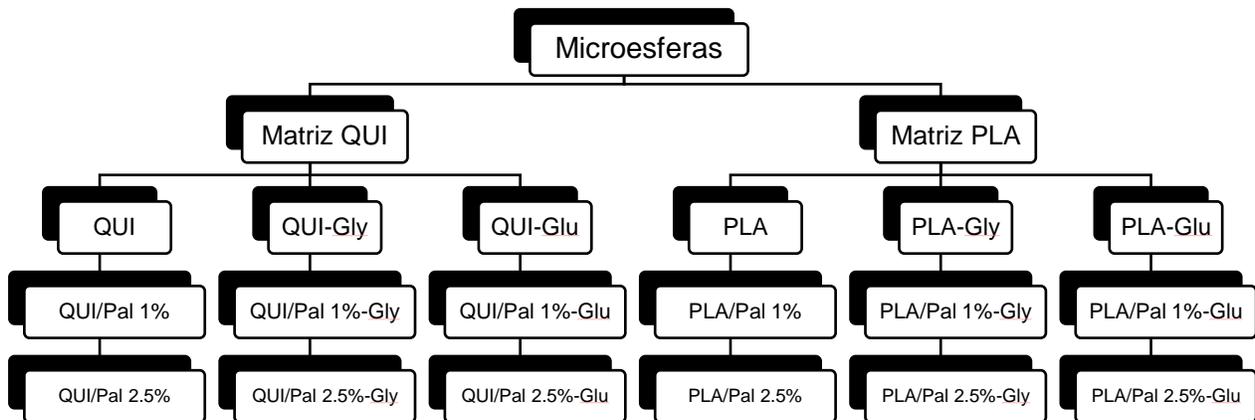
Con el método de emulsión de aceite en agua se logró obtener microesferas de CAB sin embargo este fue descartado, ya que las microesferas que se obtuvieron presentaban morfologías completamente irregulares y tamaños que se encontraban fuera del deseado, así mismo se observó que la adición de la Pal afectaba completamente el proceso de obtención, este método ha sido uno de los más resientes para la obtención de microesferas, *Parisa et al.* [107] obtuvieron microesferas de CAB, reportando largos tiempos de obtención de hasta 48 h, morfologías irregulares y gran pérdida de matriz durante el proceso, además de tamaños superiores a los 900  $\mu\text{m}$ .

Con base a los resultados obtenidos durante las pruebas preliminares, como la compatibilidad de la matriz con la nano-arcilla de Pal, el tiempo de obtención, la reproducibilidad del método, el alto rendimiento de producción, la morfología esférica y tamaño promedio de partícula entre 50 a 600  $\mu\text{m}$ , se concluye que las mejores matrices y métodos de obtención de las microesferas fueron: matriz de QUI con el método de emulsión de agua en aceite (w/o) y la matriz de PLA con el método de doble emulsión con evaporación de solvente. Así mismo, se concluyó que altos contenidos de Pal (mayores a 5% p/p) provocaba dificultades para obtener morfologías esféricas definidas y tamaños que se encontraran dentro del intervalo deseado, por lo cual se decidió trabajar con porcentajes de arcilla menores a 5% (1 y 2.5% p/p.).

### **3.2. Caracterización fisicoquímica de microesferas de QUI y PLA e híbridas con Pal y cargadas con loa aminoácidos Gly y Glu**

Las microesferas de QUI y PLA fueron preparadas con porcentajes bajos de Pal (1 y 2.5% p/p), y cargadas con los aminoácidos Gly y Glu, y fueron caracterizadas

fisicoquímicamente. La figura 29 presenta las microesferas que fueron obtenidas y caracterizadas.



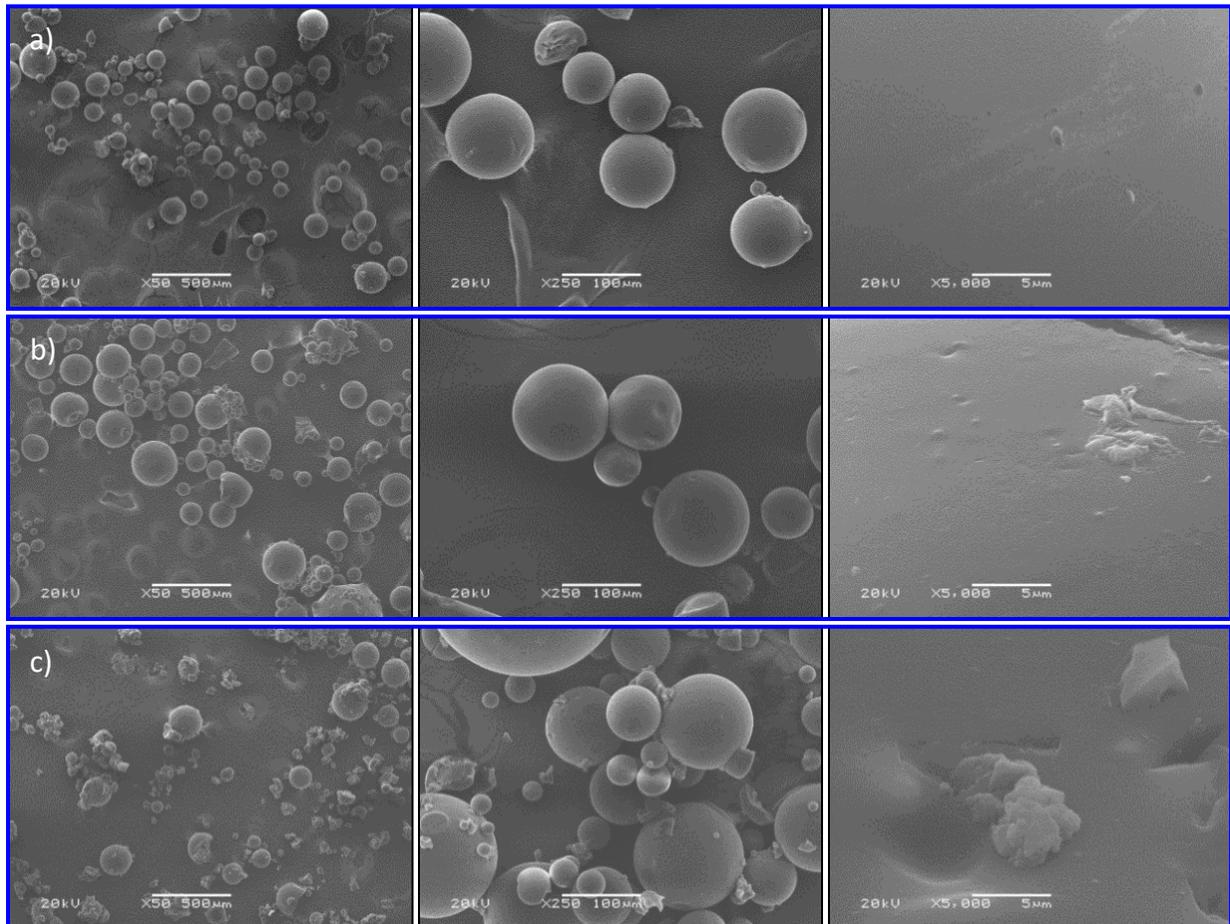
- QUI** - Matriz polimérica de Quitosano con 0% de paligorskita.
- QUI/Pal 1%** - Matriz polimérica de Quitosano con 1% de paligorskita.
- QUI/Pal 2.5%** - Matriz polimérica de Quitosano con 2.5% de paligorskita.
- QUI-Gly** - Matriz polimérica de Quitosano con 0% de paligorskita y con el aminoácido Glicina.
- QUI/Pal 1%-Gly** - Matriz polimérica de Quitosano con 1% de paligorskita y con el aminoácido Glicina.
- QUI/Pal 2.5%-Gly** - Matriz polimérica de Quitosano con 2.5% de paligorskita y con el aminoácido Glicina.
- QUI-Glu** - Matriz polimérica de Quitosano con 0% de paligorskita y con el aminoácido Ácido Glutámico.
- QUI/Pal 1%-Glu** - Matriz polimérica de Quitosano con 1% de paligorskita y con el aminoácido Ácido Glutámico.
- QUI/Pal 2.5%-Glu** - Matriz polimérica de Quitosano con 2.5% de paligorskita y con el aminoácido Ácido Glutámico.
- PLA** - Matriz polimérica de Poli(ácido láctico) con 0% de paligorskita.
- PLA/Pal 1%** - Matriz polimérica de Poli(ácido láctico) con 1% de paligorskita.
- PLA/Pal 2.5%** - Matriz polimérica de Poli(ácido láctico) con 2.5% de paligorskita.
- PLA-Gly** - Matriz polimérica de Poli(ácido láctico) con 0% de paligorskita y con el aminoácido Glicina.
- PLA/Pal 1%-Gly** - Matriz polimérica de Poli(ácido láctico) con 1% de paligorskita y con el aminoácido Glicina.
- PLA/Pal 2.5%-Gly** - Matriz polimérica de Poli(ácido láctico) con 2.5% de paligorskita y con el aminoácido Glicina.
- PLA-Glu** - Matriz polimérica de Poli(ácido láctico) con 0% de paligorskita y con el aminoácido Ácido Glutámico.
- PLA/Pal 1%-Glu** - Matriz polimérica de Poli(ácido láctico) con 1% de paligorskita y con el aminoácido Ácido Glutámico.
- PLA/Pal 2.5%-Glu** - Matriz polimérica de Poli(ácido láctico) con 2.5% de paligorskita y con el aminoácido Ácido Glutámico.

**Figura 29.** Microesferas de QUI y PLA con Paligorskita (Pal) y los aminoácidos Glicina (Gly) y Ácido Glutámico (Glu) obtenidas y caracterizadas.

### 3.2.1. Microscopia Electrónica de Barrido (SEM) de las microesferas de QUI, QUI/Pal y QUI/Pal con Gly y Glu

La figura 30 muestra las micrografías SEM 50, 250 y 5,000x de las microesferas de QUI y QUI con 1 y 2.5% de Pal. La figura 30a corresponde a las micrografías de QUI que presentan una morfología esférica con superficies lisas; la figura 30b corresponde a las microesferas de QUI/Pal 1%, estas mantienen su forma esférica aun después de la adición de la Pal y al igual que las microesferas de solo QUI presentan una superficie sin poros o grietas. Por último, la figura 30c corresponde a las microesferas de QUI/Pal 2.5% las cuales también mantienen morfologías esféricas con una superficie completamente lisa, demostrando que se generó una buena interacción de la matriz polimérica con las

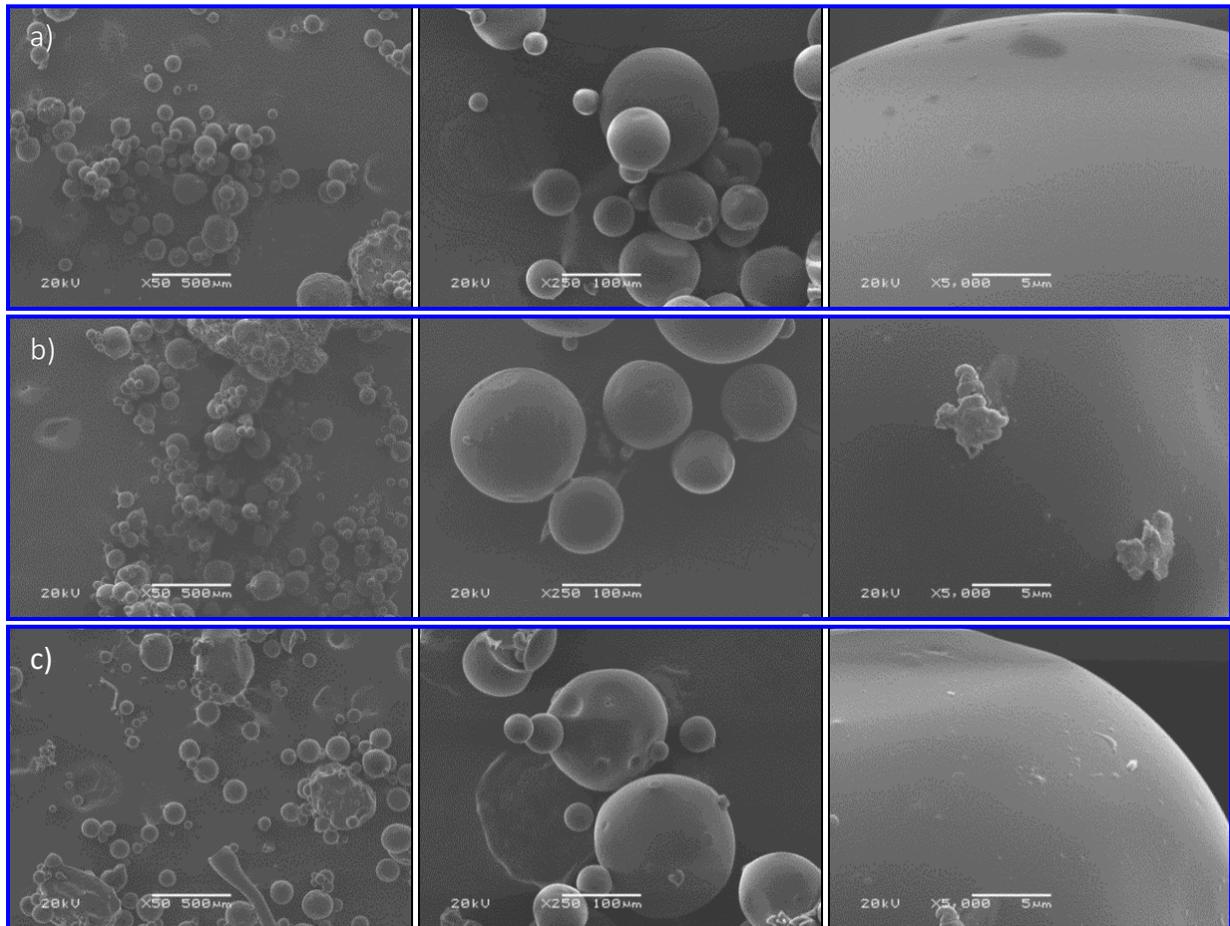
nano-arcillas de Pal. En este caso, las micrografías demuestran que la adición de la Pal durante el proceso de emulsión no genera efectos considerables en las microesferas, por tanto, esta no altera el proceso de formación de las microesferas ya que presentan una buena morfología.



**Figura 30.** Micrografías SEM de las microesferas de a) QUI, b) QUI/Pal 1% y c) QUI/Pal 2.5% en ampliaciones de 50, 250 y 5,000x.

La figura 31 muestra las micrografías SEM 50, 250 y 5,000x de QUI y QUI/Pal con el aminoácido Gly. La figura 31a corresponde a las microesferas QUI-Gly que presentan una morfología esférica con superficies lisas; la figura 31b corresponde a QUI/Pal 1%-Gly, mantienen su forma esférica aun con la adición del aminoácido. A 5,000x se aprecian residuos de QUI, en la superficie de la microesfera, son parte de la matriz que no se entrecruza, la figura 31c muestra las microesferas QUI/Pal 2.5%-Gly; se aprecian morfologías irregulares, sin perder la forma esférica al 100%. La adición del aminoácido

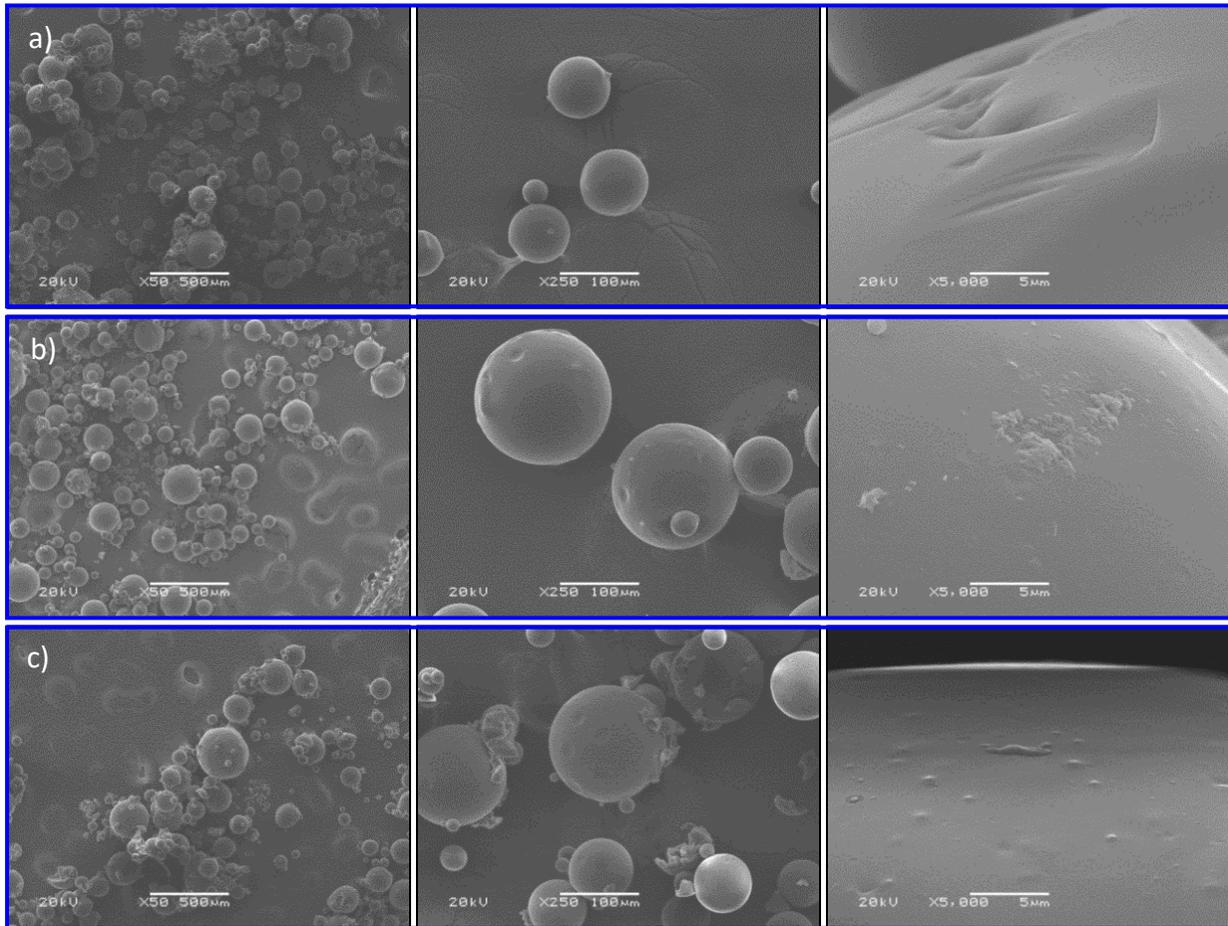
Gly no alteró la morfología de las esferas durante el proceso de obtención, *Maia et al.* [108], ha reportado que la presencia de moléculas orgánicas como aminoácidos o proteínas en matrices poliméricas no genera un cambio morfológico en la producción de microesferas, ni altera el proceso de esferificación.



**Figura 31.** Micrografías de microesferas de a) QUI-Gly, b) QUI/Pal1%-Gly y c) QUI/Pal2.5%-Gly en ampliaciones de 50, 250 y 5,000x.

La figura 32 muestra las micrografías SEM 50, 250 y 5,000x de QUI, y QUI/Pal con el aminoácido Glu. La figura 16a muestra las microesferas QUI-Glu, las cuales tienen formas esféricas bien definidas con ligeras irregularidades en su superficie; la figura 32b corresponde a las microesferas QUI/Pal 1%-Glu en las cuales podemos observar que siguen manteniendo su forma esférica sin presentar cambios en su superficie. Por último, la figura 32c presenta las micrografías de las microesferas QUI/Pal 2.5%-Glu que mantienen una forma perfectamente esférica con superficies lisas; al igual que las

microesferas con el aminoácido Gly, las micrografías muestran que la adición del aminoácido no generó grandes cambios morfológicos en las microesferas.

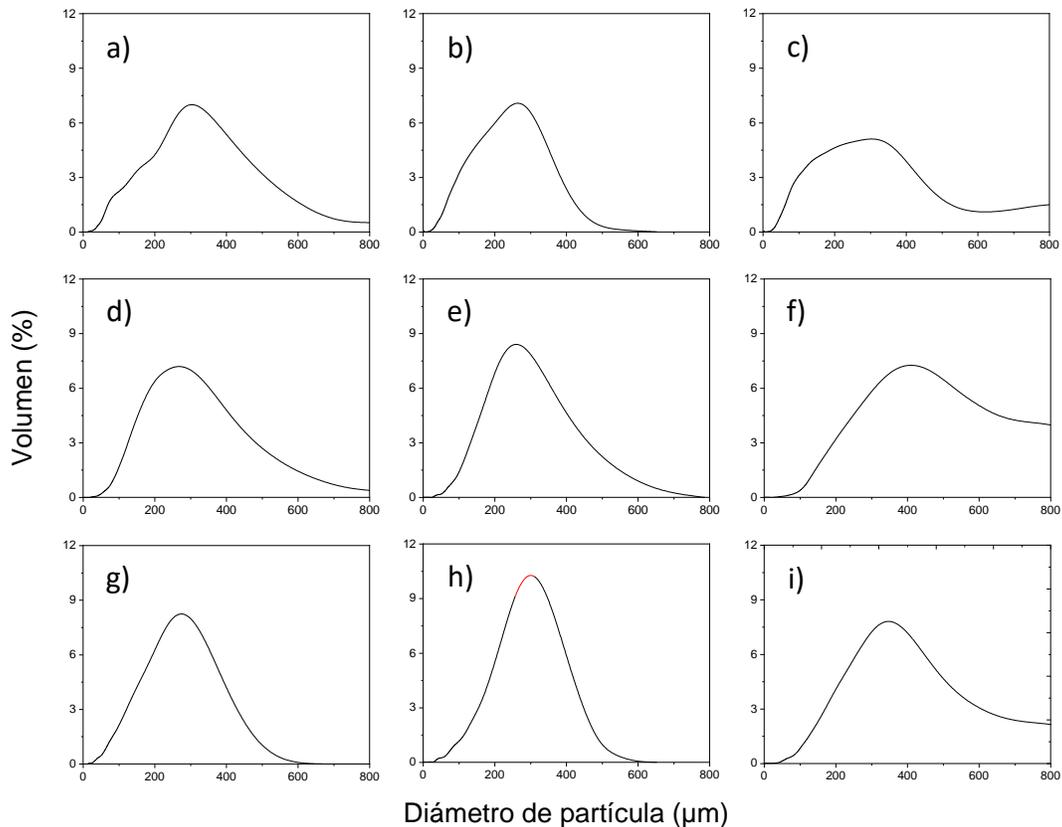


**Figura 32.** Micrografías de microesferas de a) QUI-Glu, b) QUI/Pal1%-Glu y c) QUI/Pal2.5%-Glu en amplificaciones de 50, 250 y 5,000x.

### 3.2.2. Tamaño de Partícula Coulter (TP) de las microesferas de QUI, QUI/Pal y QUI/Pal con Gly y Glu

Los histogramas de distribución de tamaño de las microesferas de QUI con Pal y con los aminoácidos Gly y Glu se presentan en la figura 33. Las microesferas que no contienen aminoácidos presentan tamaños promedios de 307, 309 y 258  $\mu\text{m}$  (figura 33a, b y c), las que contiene el aminoácido Gly cuentan con tamaños promedio de 259, 257 y 409  $\mu\text{m}$  (figura 33d, e y f) y las que contiene el aminoácido Glu con promedios de 257, 302 y 347  $\mu\text{m}$  (figura 33g, h e i). Se aprecian tres patrones distintos, primero, las microesferas que no contienen Pal presentan tamaños dentro de un intervalo similar.

Segundo, las microesferas que contienen 1% de Pal presentan una mejor distribución de tamaños, a causa de la buena integración y distribución de la Pal en la mezcla, y tercero, las microesferas con 2.5% de Pal presentan los mayores tamaños que incluso se salen del intervalo medible del instrumento. La mayor cantidad de Pal en la mezcla genera un incremento de la viscosidad, perjudicando la agitación, generando aglomerados y esferas de gran tamaño, este fenómeno no solo se ha observado en microesferas de QUI, sino también en microesferas de ALG, en las cuales al añadir un alto porcentaje de arcilla genera una mayor viscosidad en la emulsión [109], alterando no solo el tamaño de las microesferas, sino también su morfología, ya que las arcillas tienden a aglomerarse.

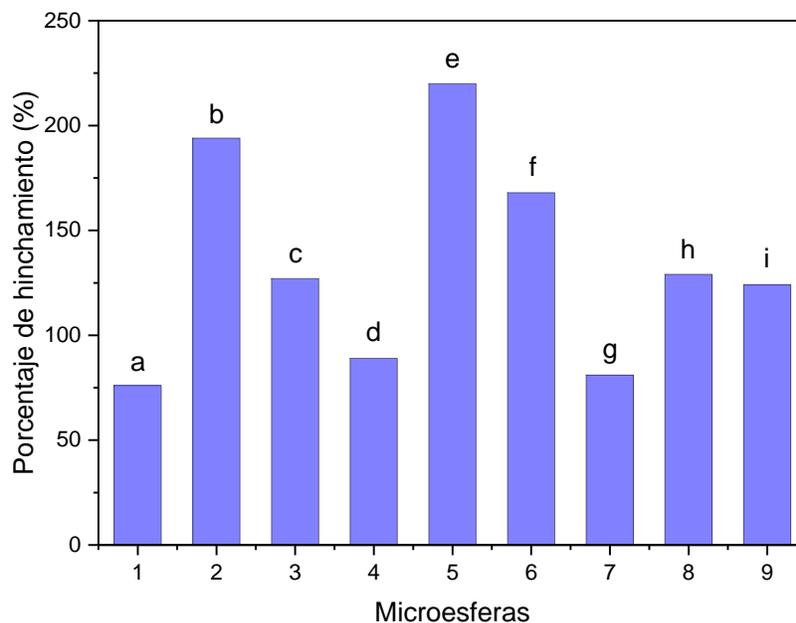


**Figura 33.** Histogramas de distribución de tamaños de partículas de a) QUI, b) QUI/Pal1%, c) QUI/Pal2.5%, d) QUI-Gly, e) QUI/Pal1%-Gly, f) QUI/Pal2.5%-Gly, g) QUI-Glu, h) QUI/Pal1%-Glu e i) QUI/Pal2.5%-Glu

### 3.2.3. Porcentaje de hinchamiento (PH) de las microesferas de QUI, QUI/Pal y QUI/Pal con Gly y Glu

La figura 34a, d y g presenta los porcentajes de hinchamiento (PH) de las microesferas de QUI y presentan el menor PH con 76, 89 y 81%. Las microesferas de la

figura 34b, e y h, que contienen 1% de Pal presentan PH de hasta en un 220% (e), siendo las que presentan mayor afinidad con el agua, los altos porcentajes de hinchamiento en las microesferas con 1% de Pal eran de esperarse debido principalmente al carácter hidrofílico del mineral [110] y que al generarse una buena dispersión en la matriz polimérica existe una mayor superficie de contacto [111]. Por último, la figura 34c, f, e i muestra el PH de las microesferas que contienen 2.5% de Pal de 127, 168 y 124% respectivamente, valores más bajos respecto a los de 1% de Pal. Esto es atribuible a que la Pal se aglomera, lo que genera una mala dispersión de la Pal en la matriz reduciendo el área disponible para la absorción del agua [112].

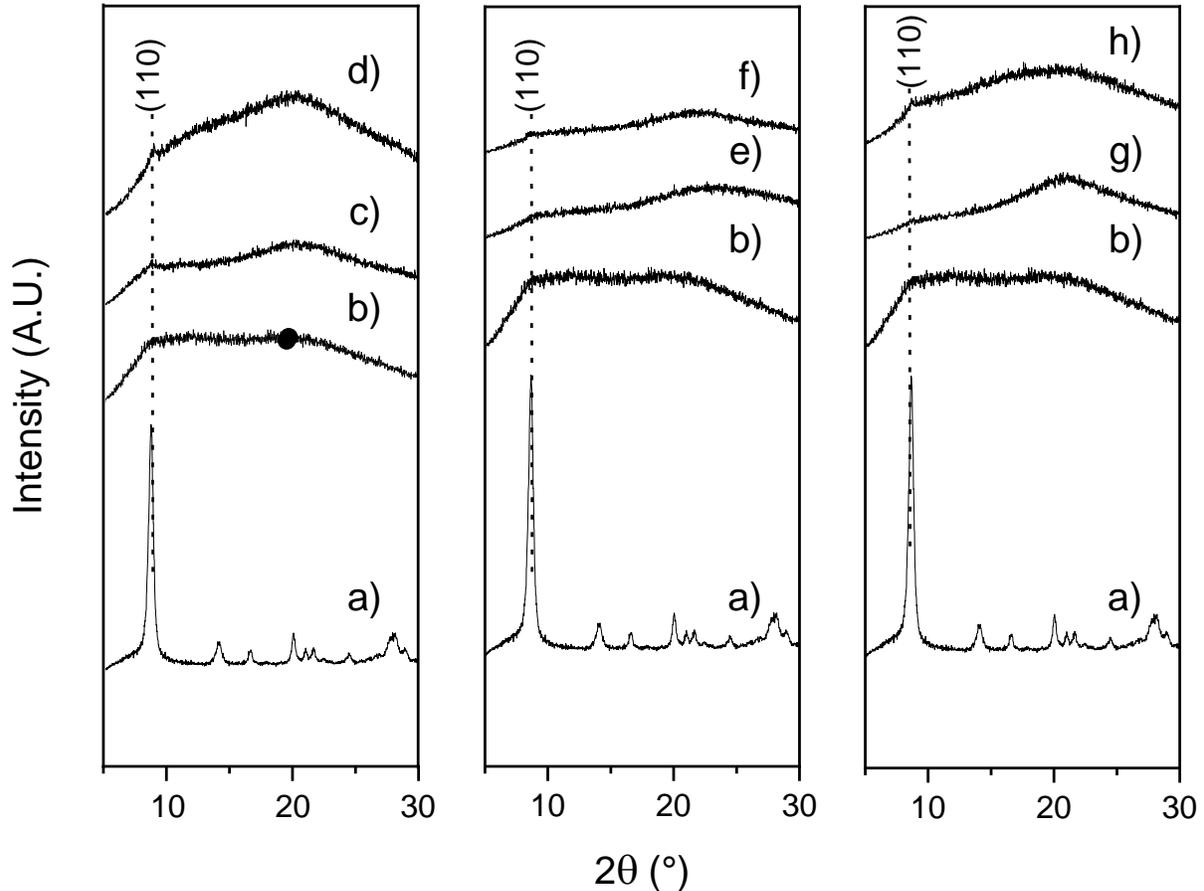


**Figura 34.** Porcentaje de hinchamiento en microesferas de a) QUI, b) QUI/Pal1%, c) QUI/Pal2.5%, d) QUI-Gly, e) QUI/Pal1%-Gly, f) QUI/Pal2.5%-Gly, g) QUI-Glu, h) QUI/Pal1%-Glu e i) QUI/Pal2.5%-Glu.

### 3.2.4. Difracción de Rayos X (XRD) de las microesferas de QUI, QUI/Pal y QUI/Pal con Gly y Glu

La figura 35 corresponde a los difractogramas de las microesferas QUI; el difractograma a) corresponde a la Pal, y presenta el pico intenso en  $2\theta = 8.4^\circ$  que corresponde al espacio basal entre los planos (110) de la estructura cristalina de la arcilla (Si-O-Si) con una distancia interplanar,  $d_{110} = 1.054$  [113]; el difractograma b) corresponde a la matriz QUI, donde podemos observar el patrón amorfo característico de este polímero [114]. Los difractogramas, c, d, e, f, g y h, son las microesferas de QUI

que contienen 1 y 2.5% de Pal. Se puede apreciar un pico en  $8.4^\circ$  que corresponde a la estructura cristalina de los enlaces Si-O-Si de la Pal, lo cual corrobora la presencia de la arcilla en las microesferas.

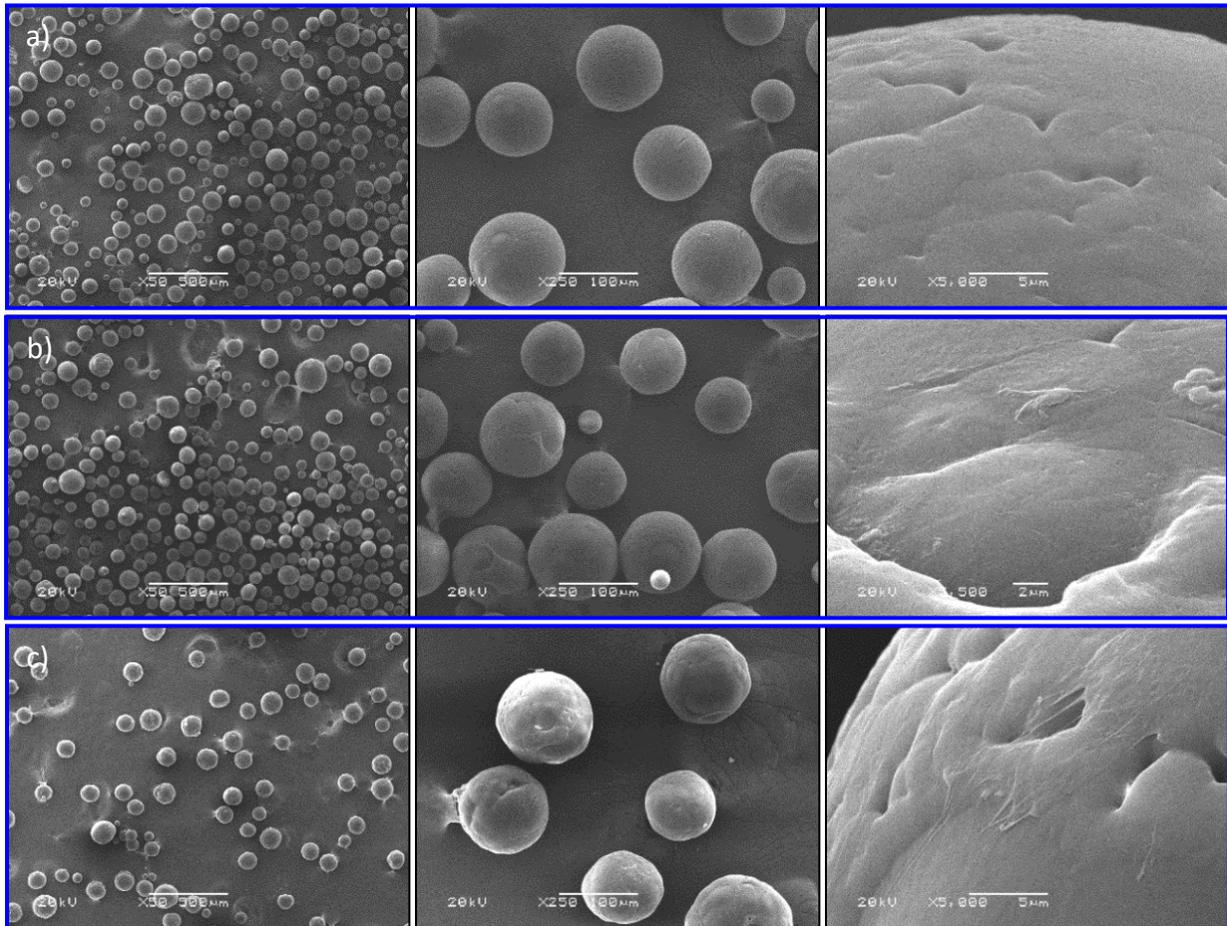


**Figura 35.** Difractogramas de rayos X de a) Paligorskita y de microesferas de b) QUI, c) QUI/Pal1%, d) QUI/Pal2.5%, e) QUI/Pal1%-Gly, f) QUI/Pal2.5%-Gly, g) QUI/Pal1%-Glu y h) QUI/Pal2.5%-Glu.

### 3.2.5. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) de las microesferas de PLA, PLA/Pal y PLA/Pal con Gly y Glu

La figura 36 corresponde a las micrografías SEM de las microesferas de PLA con amplificaciones de 50, 250 y 5,000x, la figura 36a corresponde a las microesferas de PLA, donde se aprecia que tienen formas esféricas bien definidas (250x). La figura 36b corresponde a las microesferas de PLA/Pal 1% las cuales tienen formas esféricas irregulares, así mismo se puede observar la presencia de la arcilla de paligorskita en la superficie de las microesferas (5,000x). La figura 36c corresponde a las microesferas de PLA/Pal 2.5% mostrando formas esféricas con superficies irregulares, de igual forma en

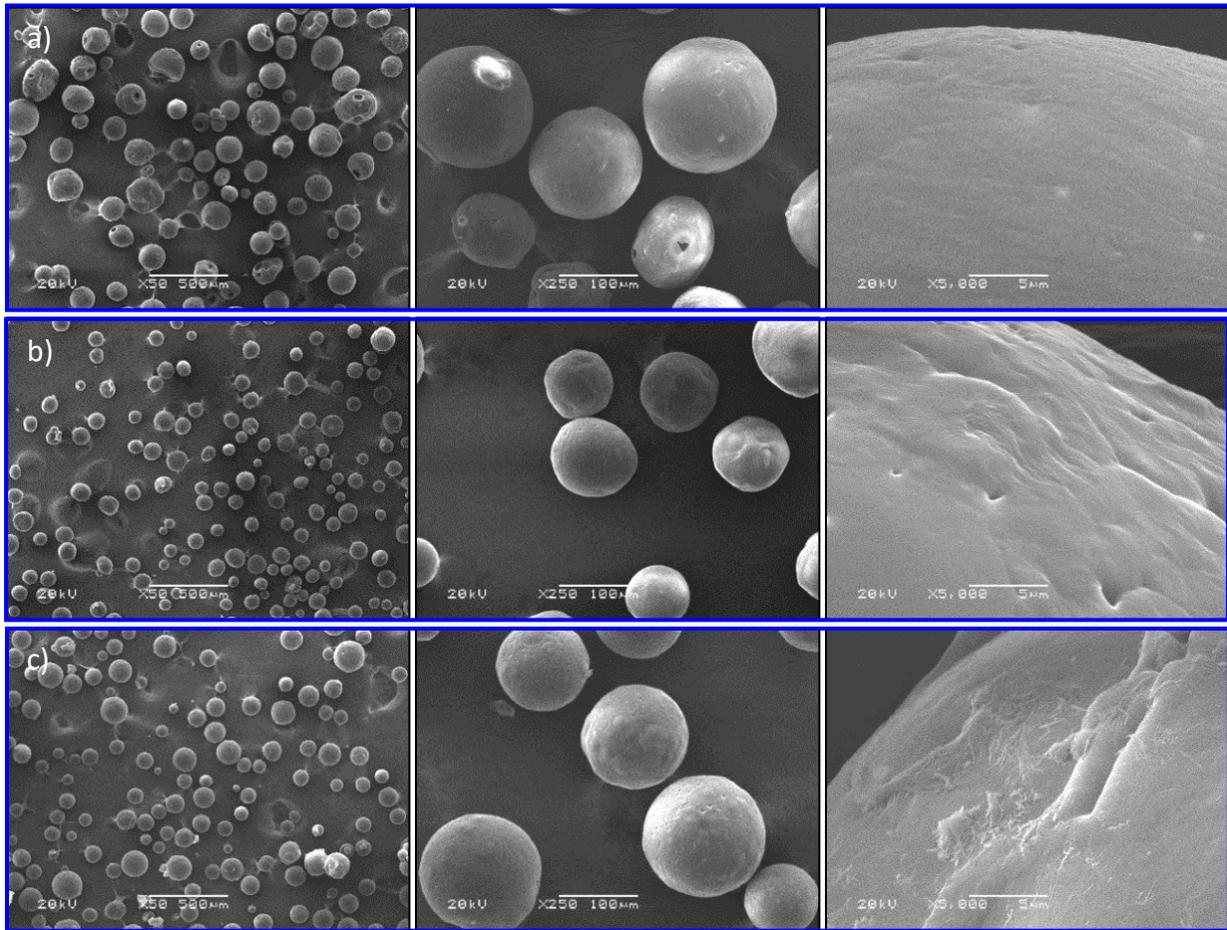
ellas se puede apreciar la presencia de la arcilla y que su superficie no es lisa sino irregular (5,000x).



**Figura 36.** Micrografías de microsferas de a) PLA, b) PLA/Pal1% y c) PLA/Pal2.5% en ampliaciones de 50, 250 y 5,000x.

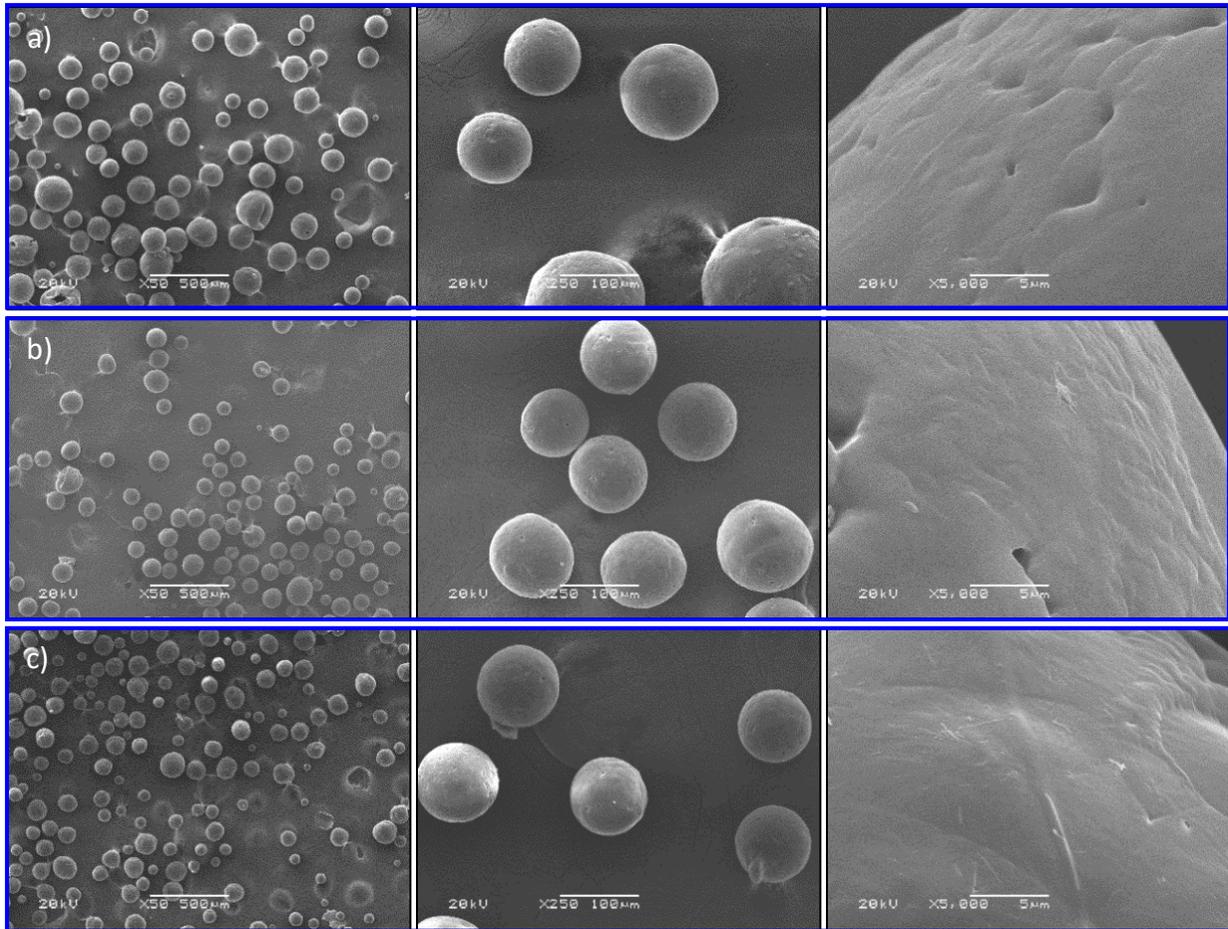
Las micrografías SEM de la figura 37 muestra las microsferas de PLA y PLA/Pal con el aminoácido Gly; la figura 37a corresponde a las microsferas de PLA-Gly que tienen una morfología esférica con una superficie ligeramente irregular. La figura 37b presenta las microsferas de PLA/Pal 1%-Gly, se observa que conservan su forma esférica, y se puede apreciar la presencia de arcilla en su superficie (5,000x). Las microsferas de PLA/Pal 2.5%-Gly de la figura 37c, presentan formas esféricas con superficies irregulares, y se puede apreciar notoriamente la presencia de las arcillas en la superficie de las microsferas (5,000x). En estos sistemas podemos corroborar que la

adición del aminoácido Gly no afectó el proceso de obtención de las microesferas ya que su morfología es homogénea.



**Figura 37.** Micrografías de microesferas de a) PLA-Gly, b) PLA/Pal1%-Gly y c) PLA/Pal2.5%-Gly en ampliaciones de 50, 250 y 5,000x.

La figura 38 presenta las micrografías 50, 250 y 5,000x de las microesferas de PLA y PLA/Pal con el aminoácido Glu. La figura 38a presenta las micrografías de las microesferas de PLA-Glu, las cuales conservan su morfología esférica bien definida aun después de la adición del aminoácido. La figura 38b corresponde a las microesferas de PLA/Pal 1%-Glu, las cuales presentan de igual manera una morfología esférica bien definida y se puede observar la presencia de la arcilla en su superficie (5,000x). Las microesferas de PLA/Pal 2.5%-Glu de la figura 38c cumplen con una morfología y una superficie casi perfecta, y al igual que en la figura 38b se observa la presencia de la arcilla en la superficie de la microesfera.



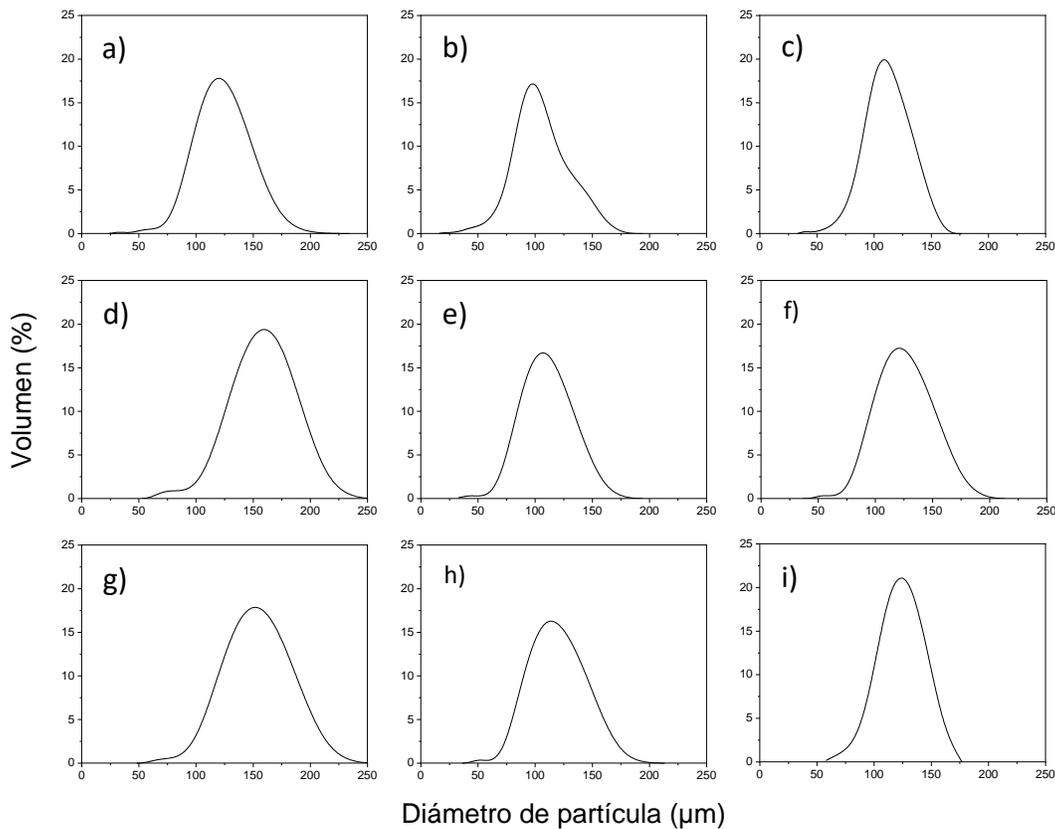
**Figura 38.** Micrografías de microesferas de a) PLA-Glu, b) PLA/Pal1%-Glu y c) PLA/Pal2.5%-Glu en ampliificaciones de 50, 250 y 5,000x.

Al igual que en las microesferas de QUI, las micrografías de las microesferas de PLA muestran que la presencia de la de Pal (1 y 2.5%) y los aminoácidos (Gly y Glu) no generaron cambios significativos en la morfología de las microesferas o algún tipo de alteración al proceso de esferificación.

### 3.2.6. Tamaño de Partícula Coulter® (TP) de las microesferas de PLA, PLA/Pal y PLA/Pal con Gly y Glu

La figura 39 muestra la distribución de tamaños de las microesferas de PLA, con Pal y los aminoácidos Gly y Glu. Las figuras 39a, b y c corresponden a las microesferas de PLA, PLA/Pal 1% y PLA/Pal 2.5% las cuales presentan tamaños promedio de 121, 101 y 110  $\mu\text{m}$ , las microesferas que contienen el aminoácido Gly (figura 39d, e y f) presentaron promedios de 159, 111 y 121  $\mu\text{m}$  respectivamente y, por último, las

microesferas con el aminoácido Glu presentan un tamaño promedio de 146, 114 y 129  $\mu\text{m}$ . El tamaño de las microesferas de PLA depende del proceso de agitación [115], en este caso, se observó que el grupo de microesferas que no contenían Pal presentaron los mayores tamaños (figura 39a, d y g) en comparación con las microesferas que contenían Pal (figura 39b, c, e, f, h e i); esto ocurrió debido a que al agregar la Pal a la emulsión se generó un proceso de nucleación termodinámica más rápida, lo que promovió la disminución de los tamaños promedio de las microesferas [116].

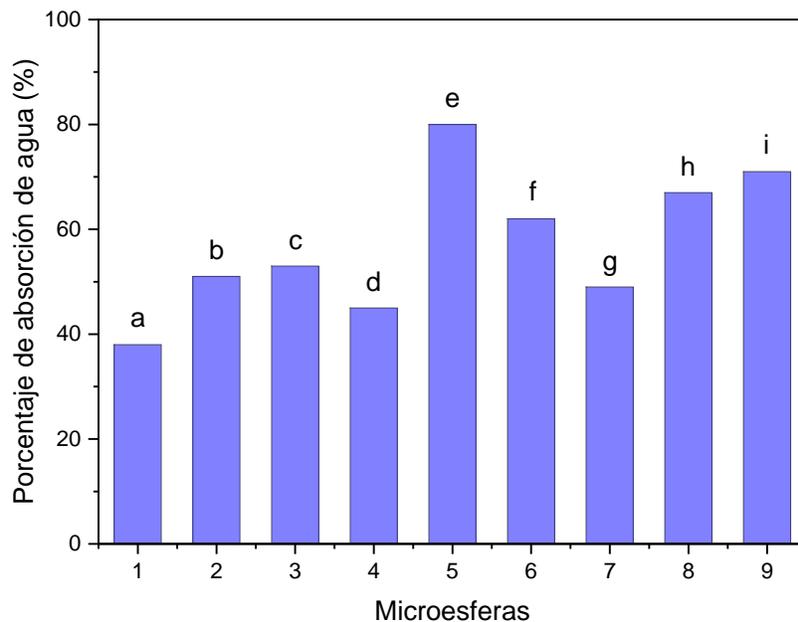


**Figura 39.** Histogramas de distribución de tamaños de partículas de a) PLA, b) PLA/Pal1%, c) PLA/Pal2.5%, d) PLA-Gly, e) PLA/Pal1%-Gly, f) PLA/Pal2.5%-Gly, g) PLA-Glu, h) PLA/Pal1%-Glu e i) PLA/Pal2.5%-Glu

### 3.2.7. Porcentaje de absorción de agua (PA) de las microesferas de PLA, PLA/Pal y PLA/Pal con Gly y Glu

La figura 40 corresponde a los porcentajes de absorción de agua (PA) en las microesferas de PLA, las cuales muestran que no lograron alcanzar el 100% de absorción. Las microesferas sin Pal presentaron los menores PA (a-38%, d-45% y g-49%). Las microesferas que contienen 1% de Pal (figura 40b, e y h) fueron las que

alcanzaron un mayor PA con 51, 80 y 67%, respectivamente y las microesferas que contienen 2.5% de Pal (figura 40c, f e i) presentaron PA de 53, 62, y 71%. Las microesferas que contienen 1% de Pal tienen la mejor distribución de la arcilla, por lo cual existe una mejor interacción con el agua provocando así un mayor PA. El carácter hidrofóbico del PLA genera complicaciones en la interacción con moléculas solubles en medios acuosos [117], sin embargo, se ha demostrado que la adición de nanoarcillas genera un ambiente favorable con medios acuosos asíéndolo capaz de generar una interacción con moléculas de agua [118], esto se observa en nuestros resultados mostrándonos mayores porcentajes de absorción de agua en las microesferas que contenían Pal.

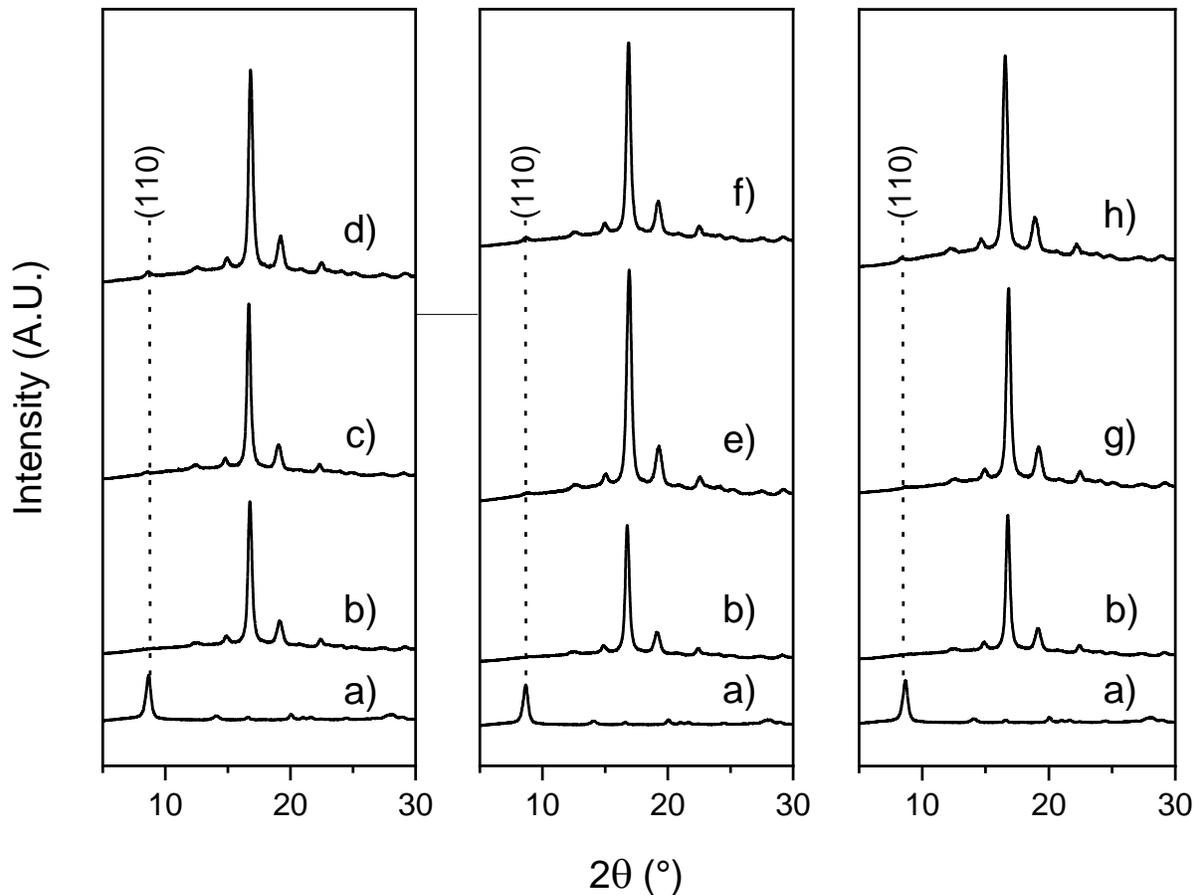


**Figura 40.** Porcentaje de absorción de agua en microesferas de a) PLA, b) PLA/Pal1%, c) PLA/Pal2.5%, d) PLA-Gly, e) PLA/Pal1%-Gly, f) PLA/Pal2.5%-Gly, g) PLA-Glu, h) PLA/Pal1%-Glu e i) PLA/Pal2.5%-Glu.

### 3.2.8. Difracción de Rayos X (XRD) de las microesferas de PLA, PLA/Pal y PLA/Pal con Gly y Glu

La figura 41 presenta los difractogramas XRD de la Pal, se observa en  $8.4^\circ$  el pico con mayor intensidad que es adjudicado a la estructura cristalina de los enlaces Si-O-Si de la Pal [119]. El difractograma de la matriz polimérica de PLA presenta los picos característicos de la estructura cristalina de este polímero:  $14.8$ ,  $16.6$ , y  $22^\circ$  que corresponden al plano de la lactida (110), (200) y (203) de la forma  $\alpha$  de los cristales del

PLA [120, 121]. Los difractogramas de las microesferas híbridas que contienen 1 y 2.5% de Pal presentan un leve pico en  $8.4^\circ$  que corresponde al espacio basal entre los planos (110) de la estructura cristalina de la Pal [113]. La mayor intensidad de esta banda la presentan las microesferas con 2.5% de Pal, lo que corrobora su presencia, tal y como se observó en la sección (3.2.5), comprobando así que la adición de la arcilla no afecta la estructura cristalina de la matriz polimérica.



**Figura 41.** Difractogramas de rayos X de a) Paligorskita y de microesferas de b) PLA, c) PLA/Pal1%, d) PLA/Pal2.5%, e) PLA/Pal1%-Gly, f) PLA/Pal2.5%-Gly, g) PLA/Pal1%-Glu y h) PLA/Pal2.5%-Glu.

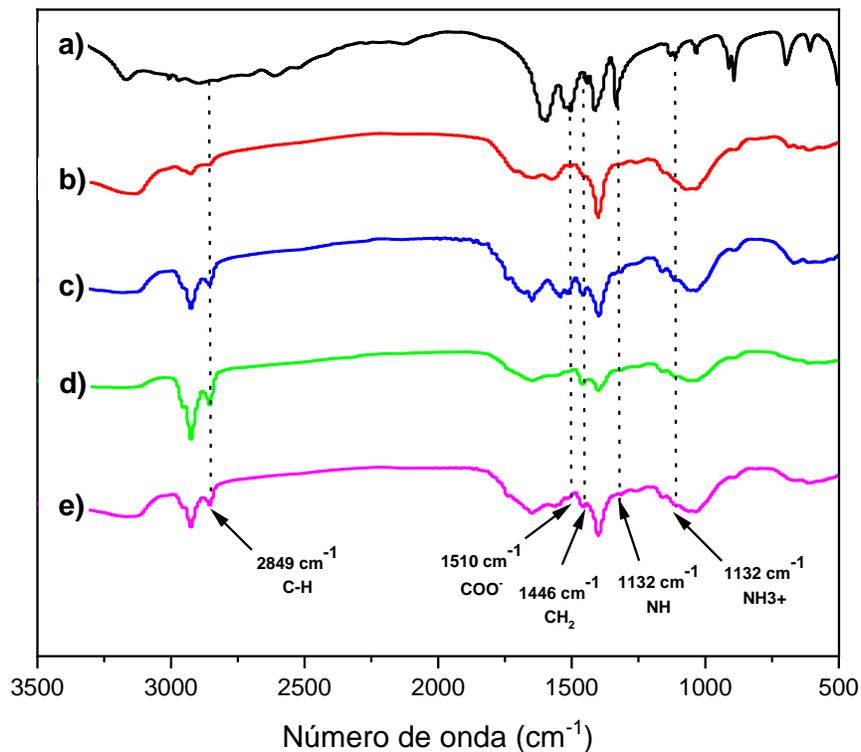
### 3.3. Identificación de la presencia de los aminoácidos en las microesferas de QUI y PLA

Las microesferas cargadas con los aminoácidos Gly y Glu (QUI, QUI/Pal1%, QUI/Pal2.5%, PLA, PLA/Pal1%, y PLA/Pal2.5%,) fueron sometidas a pruebas de espectrofotometría (FTIR y UV-Visible) para la identificación de los aminoácidos en la

estructura de las microesferas. La prueba de FTIR fue omitida para las microesferas de PLA debido al traslape y bajas intensidades de las bandas correspondientes.

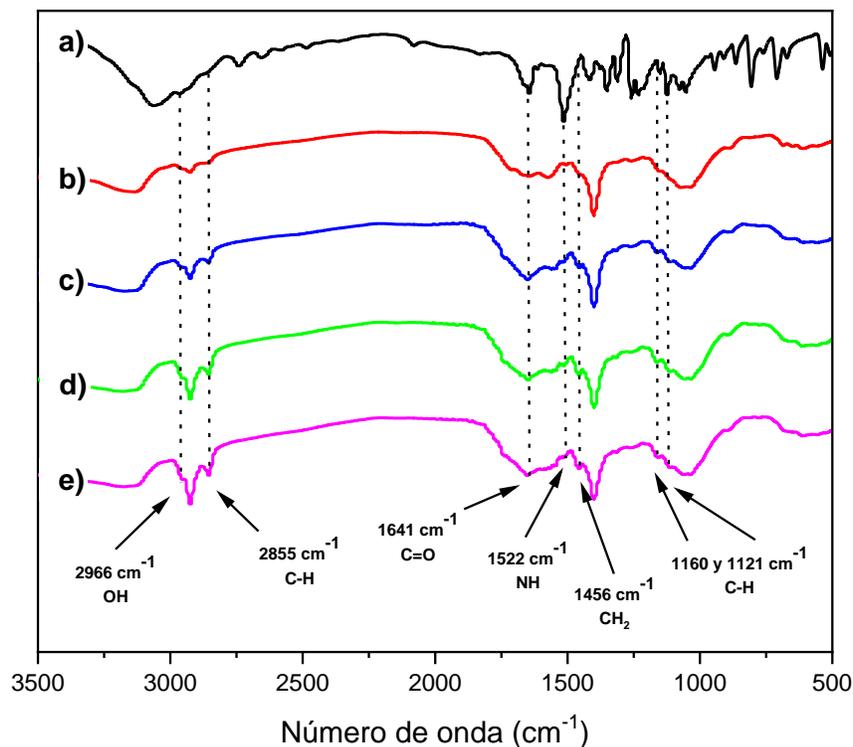
### 3.3.1. Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR) de las microesferas QUI y QUI/Pal con Gly y Glu

Los espectros FTIR de las microesferas de QUI/Pal con el aminoácido Gly se presentan en la figura 42 y corresponden a) Glicina, b) QUI, c) QUI-Gly, d) QUI/Pal1%-Gly y e) QUI/Pal2.5%-Gly. Se observa a  $2849\text{ cm}^{-1}$  la banda del estiramiento del enlace C-H, la cual se intensifica en las microesferas que contienen el aminoácido, la banda en  $1510\text{ cm}^{-1}$  es atribuida al modo de estiramiento asimétrico y simétrico del grupo  $\text{COO}^-$  de la glicina [122], la banda en  $1446\text{ cm}^{-1}$  corresponde a las vibraciones por flexión y torsión del  $\text{CH}_2$  de la glicina, en  $1132\text{ cm}^{-1}$  se observa un pequeño hombro que es atribuible a la vibración asimétrica del grupo amino de la glicina y la banda en  $1114\text{ cm}^{-1}$  se ha reportado que puede ser una combinación de la torsión y flexión del grupo  $\text{NH}_3^+$  producido por la interacción del quitosano y el aminoácido [123].



**Figura 42.** Espectros FTIR de a) Glicina y microesferas de b) QUI, c) QUI-Gly, d) QUI/Pal1%-Gly y e) QUI/Pal2.5%-Gly.

La figura 43 muestra los espectros FTIR del aminoácido a) Glu y las microesferas b) QUI, c) QUI-Glu, d) QUI/Pal1%-Glu y e) QUI/Pal2.5%-Glu, respectivamente. La banda situada en  $2966\text{ cm}^{-1}$  se asigna al grupo OH axial del QUI y Glu, a  $2855\text{ cm}^{-1}$  se presenta la banda de estiramiento del enlace C-H, la banda que aparece en  $1641\text{ cm}^{-1}$  presenta una mayor intensidad en las esferas que contienen Glu (c, d y e) es atribuida a la vibración de estiramiento de C=O del grupo dimmer COOH o a las vibraciones asimétricas del grupo C=O del COO<sup>-</sup> que son específicos para el aminoácido Glu [124], en  $1521\text{ cm}^{-1}$  observamos la banda que corresponde a la vibración de estiramiento de NH del grupo amino del Glu, la presencia de la banda en  $1452\text{ cm}^{-1}$  y las bandas en  $1160$  y  $1121\text{ cm}^{-1}$  son asignadas a las vibraciones de los enlaces CH<sub>2</sub> y C-H.

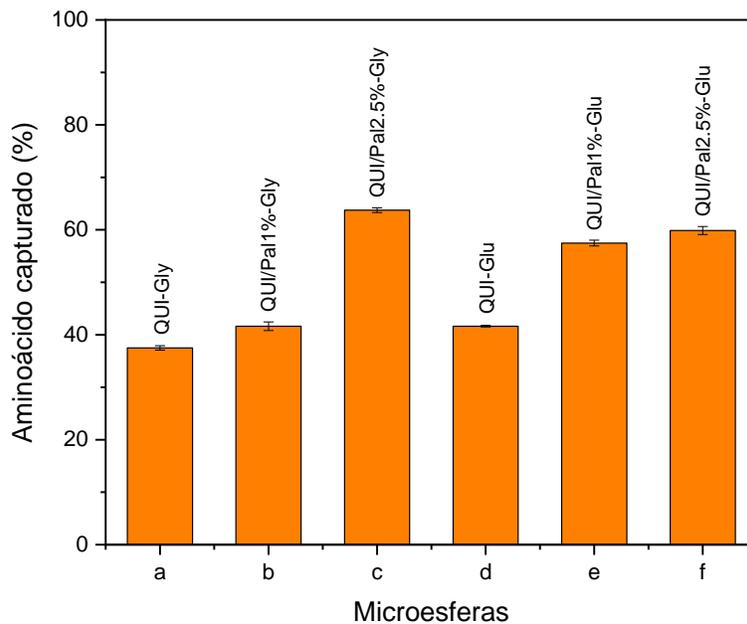


**Figura 43.** Espectros FTIR de a) Ácido Glutámico y microesferas de b) QUI, c) QUI-Glu, d) QUI/Pal1%-Glu y e) QUI/Pal2.5%-Glu.

### 3.3.2. Determinación cualitativa y cuantitativa de los aminoácidos Gly y Glu capturados en microesferas de QUI y QUI/Pal por UV-visible

La figura 44 presenta el porcentaje de los aminoácidos Gly y Glu capturados en las microesferas de QUI y QUI/Pal. Las microesferas QUI (figura 44a y d) muestran

valores de captura de aminoácidos Gly y Glu de 34 a 40% respectivamente; las microesferas de QUI/Pal 1% (figura 44b y e) muestran un incremento de los aminoácidos capturados, aunque es mínimo para Gly, por otro lado, Glu presentó un porcentaje de captura de 57%. El mayor porcentaje de captura para ambos aminoácidos lo presentan las microesferas de QUI/Pal 2.5% (figura 44c y f) logrando capturar 63% (Gly) y 59% (Glu), respectivamente. Estas microesferas lograron capturar altos porcentajes de aminoácidos debido a los tres grupos reactivos presentes en el QUI (un grupo amino y dos grupos hidroxilo) [125] los cuales generan un buen ambiente de interacción con la Pal y los grupos funcionales presentes en los aminoácidos, además de que estos, por su tamaño molecular pueden adentrarse en las capas internas del mineral [126].

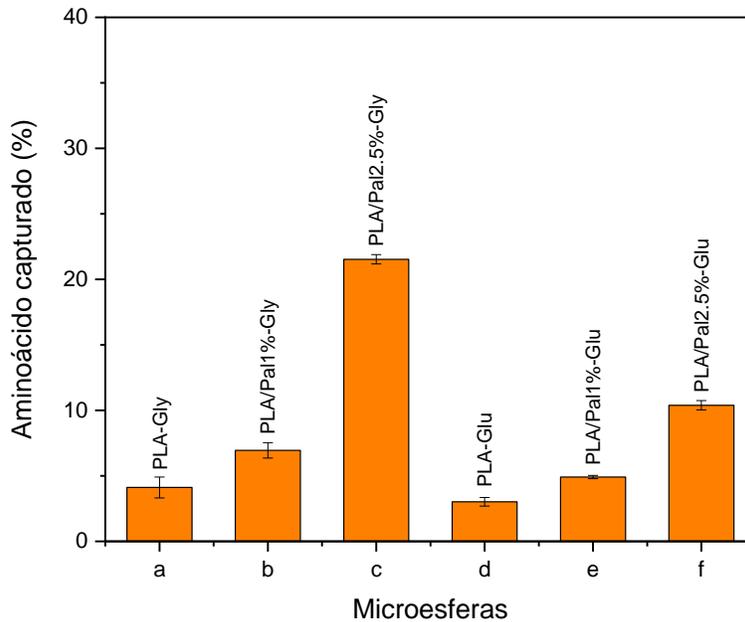


**Figura 44.** Cantidad de aminoácidos capturados (%) en microesferas de a) QUI-Gly, b) QUI/Pal1%-Gly, c) QUI/Pal2.5%-Gly, d) QUI-Glu, e) QUI/Pal1%-Glu y f) QUI/Pal2.5%-Glu.

### 3.3.3. Determinación cualitativa y cuantitativa de los aminoácidos Gly y Glu capturados en microesferas de PLA y PLA/Pal por UV-Visible.

La figura 45 presenta la cantidad de aminoácido (Gly y Glu) capturados en las diferentes microesferas. Las de PLA (figura 45a y d) presentan un bajo contenido de los aminoácidos (ambos por debajo del 5%). Las microesferas con 1% de Pal (figura 45b y e) presentan un ligero incremento del contenido de los aminoácidos, pero aún bajo, no alcanzan ni un 10%. El mayor porcentaje de los aminoácidos capturados corresponde a

las microesferas con 2.5 % de Pal (figura 45c y f); el porcentaje más alto corresponde al aminoácido Gly (figura 45c), logrando capturar un 21%. La adición de la Pal a la matriz de PLA, genera una interacción entre los grupos silanol (Si-OH) de la Pal y los grupos éster (R-COO-R) del PLA [127], adicional a la gran área superficial y la capacidad de Pal de absorber moléculas pequeñas [128], lo que contribuye a una mejor interacción con el aminoácido Gly.



**Figura 45.** Cantidad de aminoácidos capturados (%) en microesferas de a) PLA-Gly, b) PLA/Pal1%-Gly, c) PLA/Pal2.5%-Gly, d) PLA-Glu, e) PLA/Pal1%-Glu y f) PLA/Pal2.5%-Glu.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio concuerdan con los obtenidos por varios autores como *Luo et al.* [129] e *Ibrahim et al.* [130]; en ambos trabajos se prepararon microesferas híbridas de QUI y ALG/PLA nano-reforzadas con arcillas de montmorillonita para la captura de medicamentos, observándose que la presencia del mineral aumentó considerablemente la cantidad del medicamento capturado.

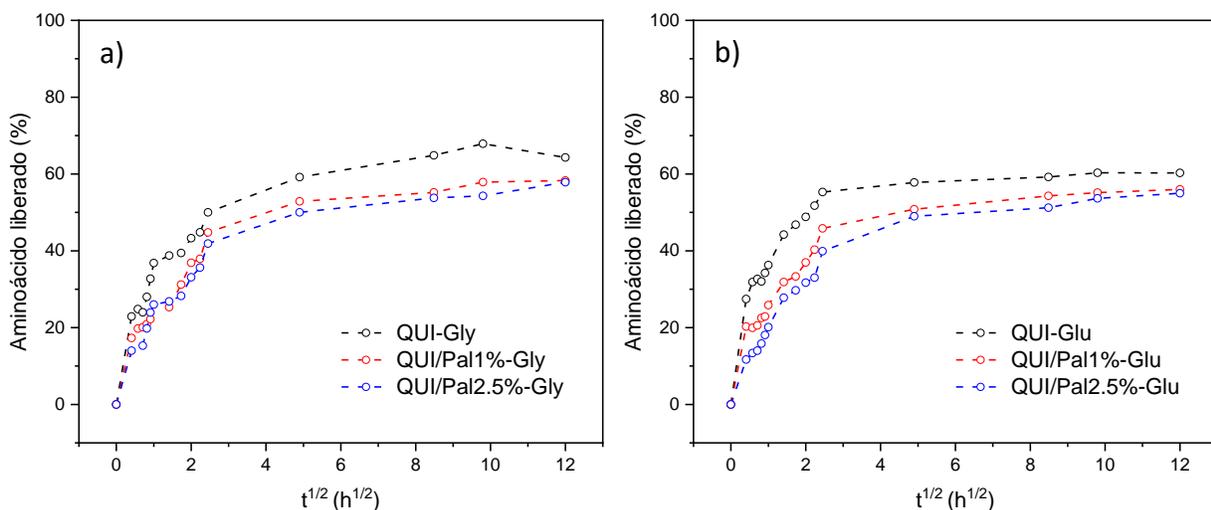
### 3.4. Cinéticas de liberación de los aminoácidos Gly y Glu en microesferas de QUI y PLA y su modelado matemático

#### 3.4.1. Cinética de liberación de los aminoácidos Gly y Glu en las microesferas de QUI y QUI/Pal

La figura 46 muestra la cinética de liberación de los aminoácidos Gly y Glu capturados en microesferas de QUI y QUI/Pal. Las microesferas de QUI (figura 46a y b)

presentan perfiles de liberación similares; la mayor cantidad de aminoácido fue liberado a las 6 horas de estudio, con un 50% para Gly y un 55% para Glu. La liberación del aminoácido Gly en las microesferas QUI/Pal1 % y QUI/Pal 2.5% (figura (46a) muestra perfiles casi idénticos, pero con valores menores a los de QUI (40 y 41%, respectivamente). Las microesferas que contenían el aminoácido Glu presentaron porcentajes de liberación de 45% para QUI/Pal 1% Pal y 39% para QUI/Pal 2.5%, siendo esta última la microesfera con el menor porcentaje de liberación a las 6 horas de estudio.

Las cinéticas de liberación demuestran que la presencia de la Pal en las microesferas juega un papel importante no solo en la alta captura del aminoácido, sino también en su retención y control de su liberación, ya que las microesferas que contienen la Pal muestran perfiles de liberación lentos y graduales en comparación con las microesferas de solo matriz polimérica, estos resultados son similares a los reportados por *Igartua et al.* [131] donde observaron que la presencia de la arcilla laponita en sus microesferas híbridas de alginato también aumentó los tiempos de liberación de las proteínas capturadas debido a la interacción molecular con la arcilla. Así mismo, se observa que el proceso de liberación del aminoácido tiende a continuar fuera del período de medición usado, por lo que se recomienda ampliar este período.



**Figura 46.** Cinética de liberación de los aminoácidos a) Gly y b) Glu en microesferas de QUI, QUI/Pal1% y QUI/Pal2.5%.

Los valores experimentales que se obtuvieron de la cinética de liberación de los aminoácidos y que son requeridos para el ajuste de los modelos matemáticos se

presentan en la tabla 4. El punto de saturación  $M_m$  corresponde al punto máximo de equilibrio termodinámico y el coeficiente de difusión  $D$  es la pendiente de la sección lineal de la cinética de liberación.

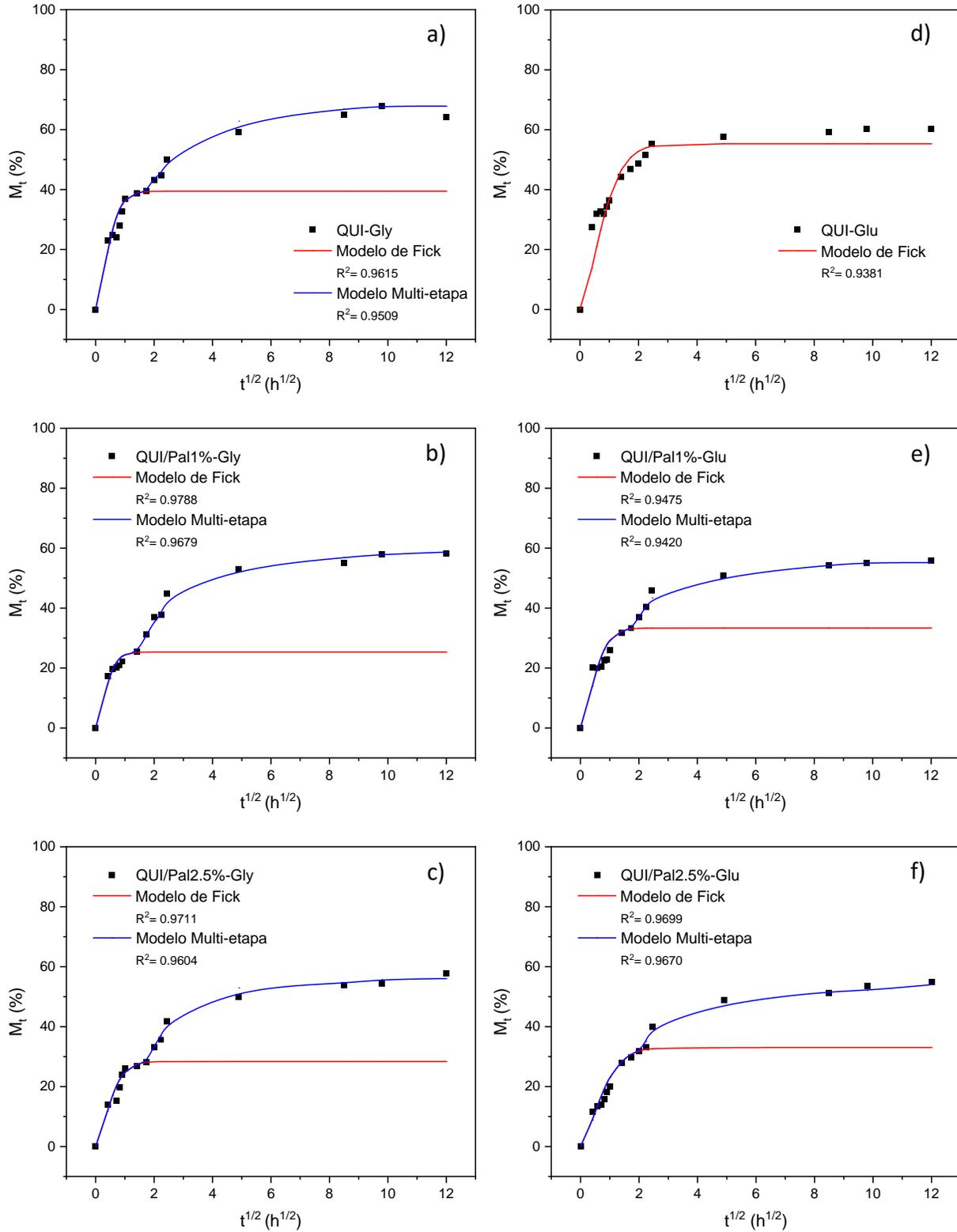
**Tabla 4.** Parámetros experimentales de la cinética de entrega de los aminoácidos Gly y Glu en microesferas de QUI y QUI/Pal.

| Microesferas (Formulación) | Saturación $M_m$ (%) | Coefficiente de difusión, $D$ (mm <sup>2</sup> /h) | Coefficiente de correlación ( $R^2$ ) |
|----------------------------|----------------------|--|---------------------------------------|
| QUI-Gly                    | 39.41±1.38           | 1.01E-3  | 0.9615                                |
| QUI/Pal 1%-Gly             | 25.32±0.92           | 1.46E-3  | 0.9788                                |
| QUI/Pal 2.5%-Gly           | 28.34±1.06           | 7.82E-4  | 0.9711                                |
| QUI-Glu                    | 55.30±2.61           | 2.93E-4  | 0.9361                                |
| QUI/Pal 1%-Glu             | 33.32±0.14           | 7.41E-4  | 0.9475                                |
| QUI/Pal 2.5%-Glu           | 33.02±2.85           | 3.77E-4  | 0.9699                                |

### 3.4.2. Modelado matemático de la cinética de liberación de los aminoácidos Gly y Glu en las microesferas de QUI y QUI/Pal

La figura 47a, b y c muestra los porcentajes de liberación del aminoácido Gly versus la raíz cuadrada del tiempo de permanencia en el medio acuoso. Se observa que el proceso de liberación se realizó en dos etapas, la primera de tipo fickiana presentándose durante las primeras horas de estudio y una segunda etapa de tipo no fickiana presentada durante las últimas horas del estudio. Los coeficientes de correlación obtenidos (tabla 4) indican que los resultados experimentales lograron ajustarse satisfactoriamente al modelo de aproximación a la Segunda Ley de Fick durante la primera etapa de liberación, que corresponde a un fenómeno de difusión superficial y en las primeras capas internas de las microesferas, dado a la diferencia de concentración del aminoácido entre el medio de prueba y las microesferas [132].

La segunda etapa de liberación corresponde a un comportamiento de tipo no fickiano, estos datos experimentales se ajustaron al modelo multi-etapas obteniéndose coeficientes de correlación (tabla 5) que mostraron un buen ajuste con el modelo. Este comportamiento no fickiano se debe principalmente al hinchamiento y relajación de la matriz de QUI que como se menciona en la sección 3.2.3 es capaz de absorber altos porcentajes de agua.



**Figura 47.** Cinéticas de liberación de los aminoácidos Gly y Glu en microesferas de a) PLA-Gly, b) PLA/Pal1%-Gly, c) PLA/Pal2.5%-Gly, d) PLA-Glu, e) PLA/Pal1%-Glu y f) PLA/Pal2.5%-Glu ajustadas a los modelos matemáticos de la Aproximación a la Segunda Ley de Fick y Multi-etapas.

La figura 47d, e y f corresponde a las cinéticas de liberación del aminoácido Glu ajustadas a los modelos matemáticos. Como se puede observar en este caso las microesferas de QUI (figura 47d) presentaron un proceso de liberación tipo fickiano con un coeficiente de correlación de 0.9361 (tabla 4) indicando que estas microesferas solo capturaron el aminoácido Glu en su superficie y primeras capas exteriores, lo que propició una liberación rápida. Al igual que con el aminoácido Gly (figura 47a, b y c) las microesferas QUI/Pal 1% y QUI/Pal 2.5% con el aminoácido Glu (figura 47e y f) presentaron dos etapas de liberación (fickiana y no fickiana), las cuales lograron ser ajustadas a los modelos matemáticos seleccionados, presentando buenos coeficientes de correlación (tabla 4 y 5). Estas dos etapas están principalmente relacionadas con el hinchamiento de las microesferas durante los primeros tiempos del estudio (parte fickiana) y la relajación de la matriz, una vez alcanzado su mayor grado de hinchamiento (parte no fickiana) [133].

**Tabla 5.** Valores de ajuste para el modelo cinético Multi-etapas en la cinética de liberación de los aminoácidos Gly y Glu en microesferas de QUI y QUI/Pal.

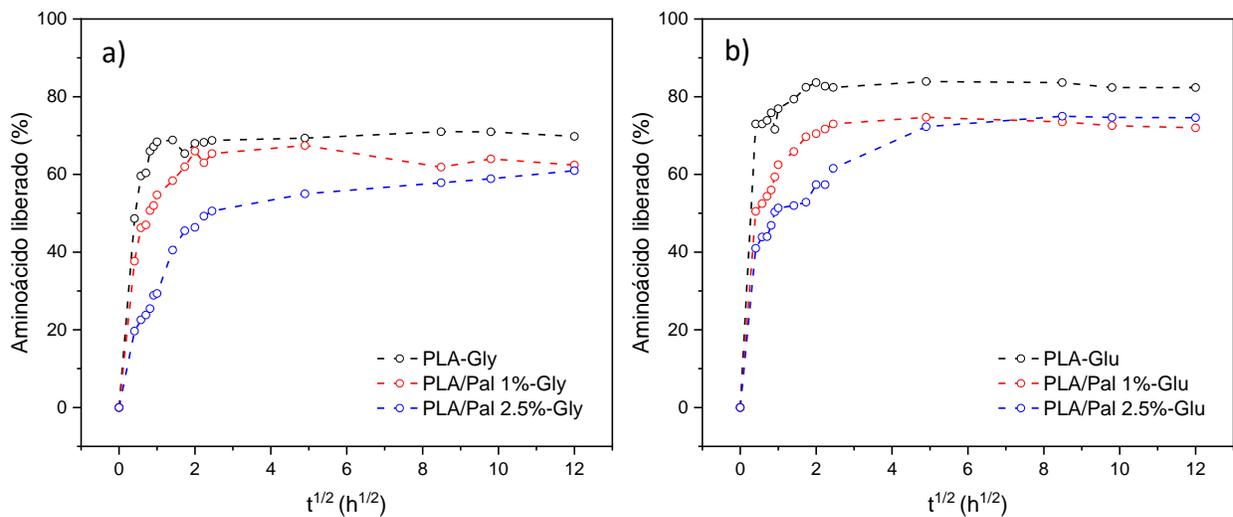
| Microesferas<br>(Formulación) | Modelo Multi-etapas |  |
|-------------------------------|---------------------|--|
|                               | $\beta_n$           | Coefficiente de Correlación<br>( $R^2$ ) |
|                               | 1/10                |  |
| QUI-Gly                       | 1/20                | 0.9509                                   |
| QUI/Pal1%-Gly                 | 1/50                | 0.9679                                   |
| QUI/Pal2.5%-Gly               | 1/100               | 0.9604                                   |
| QUI/Pal1%-Glu                 | 1/500               | 0.9420                                   |
| QUI/Pal 2.5%-Glu              | 1/1000              | 0.9670                                   |
|                               | 1/5000              |  |
|                               | 1/10000             |  |

$\beta_n$  el inverso del tiempo de relajación en  $h^{-1}$  sugerido por Cai and Weitsman [101]

### 3.4.3. Cinética de liberación de los aminoácidos Gly y Glu en las microesferas de PLA y PLA/Pal

La figura 48 muestra la cinética de liberación de los aminoácidos en cada una de las microesferas obtenidas. Las de PLA con Gly y Glu (figura 48a y b) presentaron un comportamiento similar, se observa una liberación casi lineal liberando un 48 y 72 % del aminoácido en los primeros minutos del estudio, indicando que el aminoácido se encontraba casi en su totalidad en la superficie de las microesferas. Las microesferas que contienen 1 % de Pal, muestran una liberación con una tendencia progresiva, liberando un 54 y 62 % en la primera hora del estudio, alcanzando su máxima liberación

en un tiempo de 72 h para ambos aminoácidos, lo que demuestra que la adición de la Pal retrasa la liberación de los aminoácidos, no solo los que se encuentran en la superficie de las microesferas, sino también los alojados en las primeras capas de esta. Finalmente, las microesferas con 2.5% de Pal presentaron una liberación lenta y gradual, durante la primera hora se liberó un 29 y 51% respectivamente (figura 48a Gly y 48b Glu). Estos resultados demuestran que la adición de Pal ayuda a una mayor retención de los aminoácidos, prolongando el tiempo en que éstos son liberados. Para interpretar este fenómeno los datos obtenidos en la cinética de liberación se ajustaron al modelo de Aproximación a la Segunda ley de Fick [80] y al modelo Multi-etapas [85] el cual contempla la parte fickiana y no fickiana de un proceso de liberación.



**Figura 48.** Cinética de liberación de los aminoácidos a) Gly y b) Glu en microesferas de PLA, PLA/Pal 1% y PLA/Pal 2.5%.

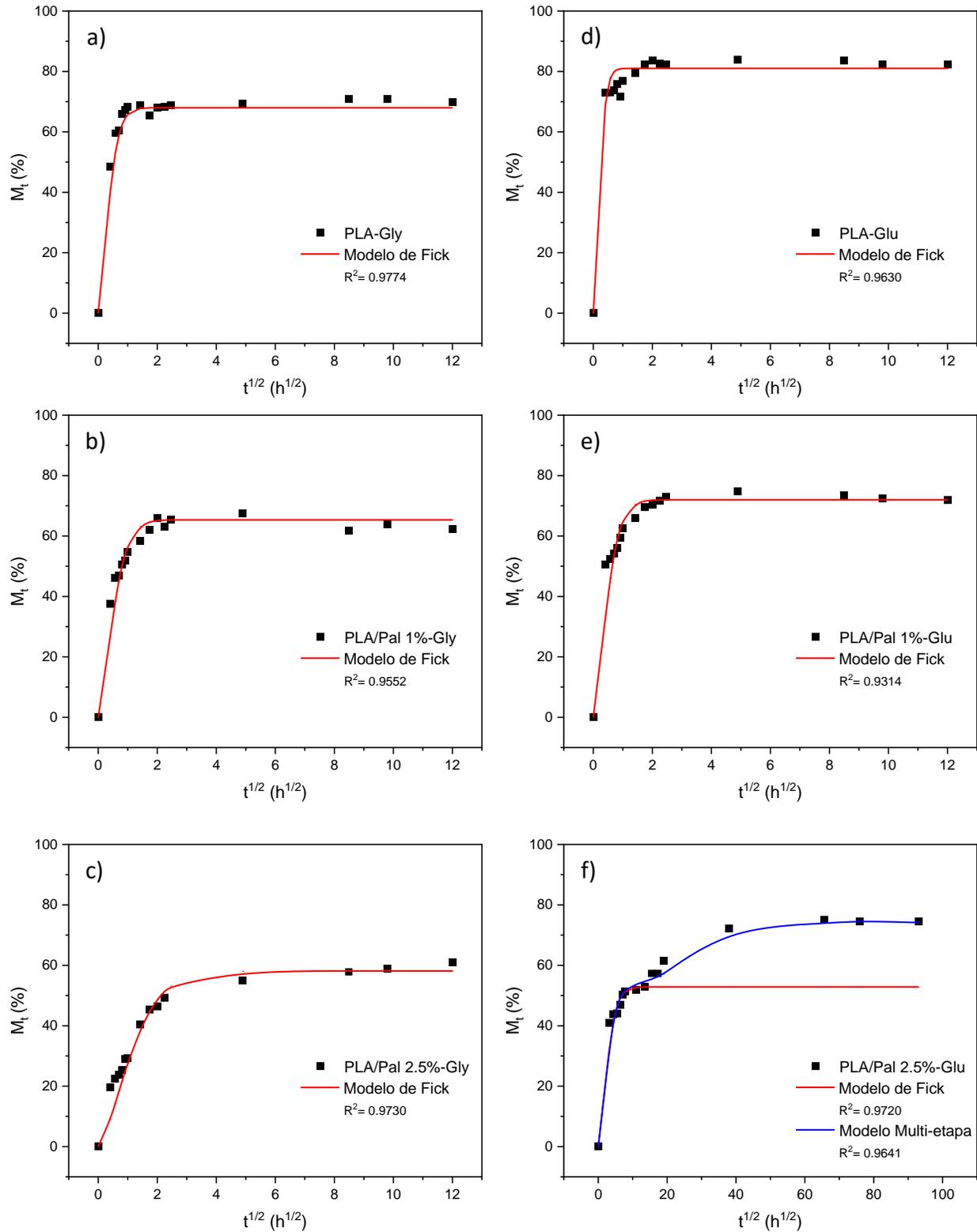
Utilizando los datos de la figura 48, se calcularon los parámetros necesarios para modelar la cinética de liberación de los aminoácidos Gly y Glu (Tabla 6). El punto de saturación ( $M_m$ ) corresponde al punto máximo de equilibrio termodinámico de las curvas cinéticas de liberación y el coeficiente de difusión ( $D$ ) es la pendiente de la sección lineal inicial de las curvas cinéticas de liberación con base en la ecuación 7.

**Tabla 6.** Parámetros experimentales de la cinética de entrega de los aminoácidos Gly y Glu en microesferas de PLA y PLA/Pal.

| Microesferas (Formulación) | Saturación $M_m$ (%) | Coefficiente de difusión, $D$ (mm <sup>2</sup> /h) | Coefficiente de correlación ( $R^2$ ) |
|----------------------------|----------------------|--|---------------------------------------|
| PLA-Gly                    | 69.96 ± 0.75         | 2.10E-03   | 0.9774                                |
| PLA/Pal1%-Gly              | 65.34 ± 2.11         | 5.54E-04   | 0.9552                                |
| PLA/Pal2.5%-Gly            | 58.13 ± 2.83         | 1.43E-04   | 0.9730                                |
| PLA-Glu                    | 81 ± 2.92            | 5.31E-03   | 0.9630                                |
| PLA/Pal1%-Glu              | 71.99 ± 2.70         | 6.73E-04   | 0.9314                                |
| PLA/Pal2.5%-Glu            | 52.85 ± 1.74         | 1.57E-03   | 0.9720                                |

### 3.4.4. Modelado matemático de la cinética de liberación de los aminoácidos Gly y Glu en las microesferas de PLA y PLA/Pal

La Figura 49 muestra los porcentajes de liberación de los aminoácidos Gly y Glu versus la raíz cuadrada del tiempo de contacto de las microesferas con el medio de liberación. Estos datos se ajustaron al modelo matemático de la aproximación a la Segunda Ley de Fick. Las Figuras 49a, b y c corresponden a las microesferas PLA-Gly, PLA/Pal1%-Gly y PLA/Pal2.5%-Gly, respectivamente; los coeficientes de correlación (tabla 6) nos permiten afirmar que en estos tres casos el modelo (comportamiento fickiano) se logra ajustar a los datos experimentales. En este caso, el modelo propuesto describe el proceso de difusión del aminoácido, indicando que la mayor liberación tuvo lugar en las primeras etapas del estudio; en consecuencia, la mayor cantidad del aminoácido se encontró en la superficie y primeras capas de las microesferas, siendo más notorio en las microesferas PLA-Gly (figura 49a) que presentan una liberación en ráfaga [134]. Las microesferas PLA/Pal 1%-Gly y PLA/Pal 2.5%-Gly (figura 49b y c) mostraron que el proceso de liberación de los aminoácidos se vuelve más lento y gradual a medida que pasa el tiempo; demostrando que la presencia de la Pal modifica el proceso de difusión del aminoácido.



**Figura 49.** Cinéticas de liberación de los aminoácidos Gly y Glu en las microsferas de a) PLA-Gly, b) PLA/Pal1%-Gly, c) PLA/Pal2.5%-Gly, d) PLA-Glu, e) PLA/Pal1%-Glu y f) PLA/Pal2.5%-Glu ajustadas a los modelos matemáticos de la Aproximación a la Segunda Ley de Fick y Multi-etapas.

La cinética de liberación del aminoácido Glu se muestran en la figura 49d, e y f, los datos experimentales correspondientes a las microesferas de PLA-Glu y PLA/Pal 1%-Glu lograron ajustarse al modelo que utiliza la Segunda ley de Fick (figura 49d y e), proporcionando valores de coeficiente de correlación aceptables (tabla 4). Este modelo logró ajustarse a la sección inicial de la cinética de las microesferas de PLA/Pal 2.5%-Glu (figura 49f) que describe el proceso de difusión de este aminoácido durante los primeros tiempos de contacto con el medio. Posteriormente a estos tiempos se observa una segunda etapa de liberación, la cual fue ajustada a un modelo Multi-etapas, arrojando un buen coeficiente de correlación de 0.9641 (tabla 7), demostrando que una mayor presencia de Pal modifica el proceso de liberación. Esta segunda etapa de liberación está relacionada con los efectos de hidratación de la Pal [135] y la relajación de la matriz [101].

**Tabla 7.** Valores de ajuste para el modelo cinético Multi-etapas en la cinética de liberación de los aminoácidos Gly y Glu en microesferas de PLA y PLA/Pal.

| Modelo Multi-etapas        |           |                                       |
|----------------------------|-----------|---------------------------------------|
| Microesferas (Formulación) | $\beta_n$ | Coefficiente de Correlación ( $R^2$ ) |
| PLA/Pal 2.5%-Glu           | 1/10      | 0.9641                                |
|                            | 1/20      |                                       |
|                            | 1/50      |                                       |
|                            | 1/100     |                                       |
|                            | 1/500     |                                       |
|                            | 1/1000    |                                       |
|                            | 1/5000    |                                       |
|                            | 1/10000   |                                       |

$\beta_n$  el inverso del tiempo de relajación en  $h^{-1}$  sugerido por Cai and Weitsman [101]

La información obtenida muestra que el proceso de difusión del aminoácido Glu se ve afectado por la presencia de Pal, presentándose una segunda etapa de liberación anómala [136] (no fickiana). Si el contenido de arcilla de las microesferas es lo suficientemente alto, la interacción de Glu con la arcilla y la relajación del PLA son factores que inducen una cinética de liberación más compleja.

La paligorskita presente en las microesferas híbridas juega un papel importante en el proceso de liberación, lo que indica que la presencia del mineral modificó el proceso de difusión, comprobando así la hipótesis planteada.

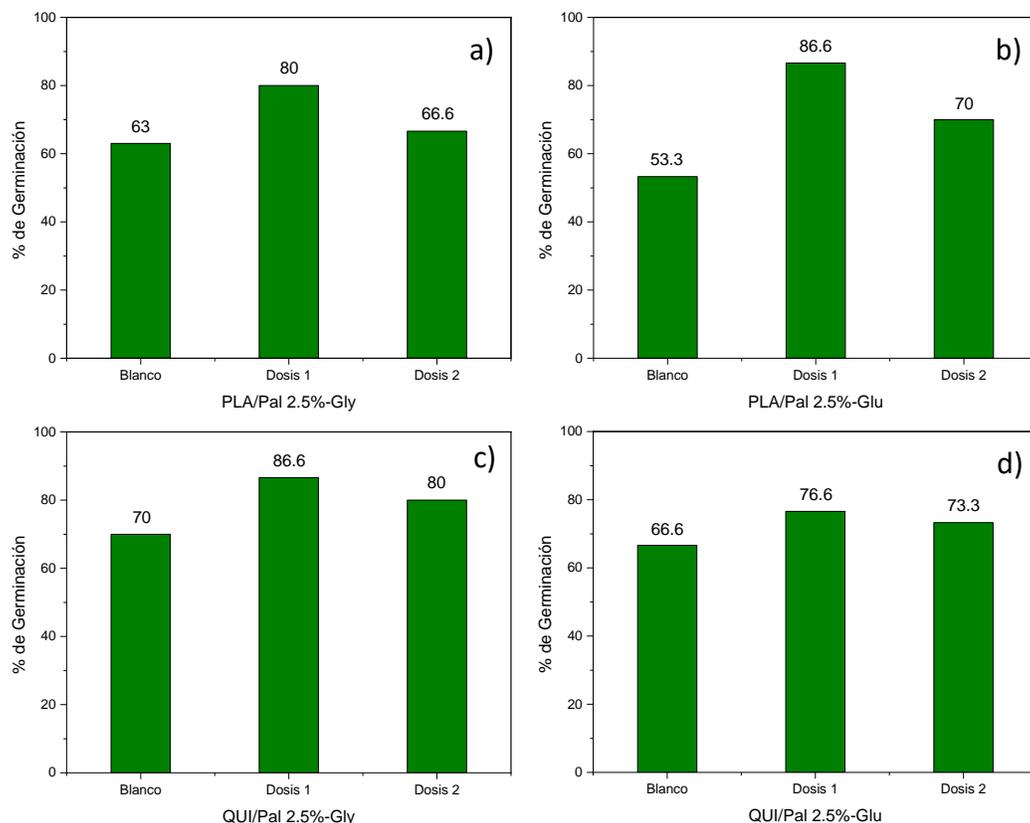
El modelado matemático de los datos de liberación experimental (figuras 47 y 49) pudo describir la difusión molecular de los aminoácidos a través de la matriz de las microesferas [137]. La entrega de los aminoácidos desde las microesferas implicó un proceso de absorción y desorción a través de una difusión molecular [138], mecanismo dado por la buena interacción entre la matriz polimérica/nano-arcilla/aminoácidos.

### **3.5. Fitotoxicidad de las microesferas de QUI y PLA con 2.5% de Pal y cargadas con los aminoácidos Gly y Glu**

Las microesferas seleccionadas para el estudio de fitotoxicidad *in vitro* son las de QUI y PLA con 2.5% de Pal cargadas con los aminoácidos Gly y Glu; los resultados cuantitativos de aminoácido capturado (secciones 3.3.2 y 3.3.3) demuestran que estas microesferas fueron las que lograron capturar el mayor porcentaje de aminoácidos. El estudio fitotóxico se basó en pruebas de germinación de semillas de chile habanero (*Capsicum chinense*), producción de biomasa (plántulas) y elongación radicular.

#### **3.5.1. Efecto de la presencia de microesferas de QUI/Pal y PLA/Pal cargadas con los aminoácidos Gly y Glu sobre la germinación de semillas de chile habanero**

La figura 50 muestra los porcentajes de germinación totales de las semillas de chile habanero, evaluados al día 15 después de la siembra de las semillas, en presencia de 1.5% (dosis 1) y 3% (dosis 2) (p/p) de las microesferas de PLA/Pal2.5%-Gly, PLA/Pal2.5%-Glu, QUI/Pal2.5%-Gly y QUI/Pal2.5%-Glu, con respecto al peso del sustrato de vermiculita usado (tabla 8). Los menores porcentaje de germinación fueron obtenidos para aquellas semillas que no estuvieron en contacto con las microesferas (blanco), los cuales fluctuaron entre 53.3 y 70%. Los porcentajes de germinación más altos (76.6 a 86.6%) se observaron en las semillas que estuvieron en presencia de la dosis 1 de microesferas, tanto de PLA como de QUI, indicando que los aminoácidos liberados por las microesferas en dosis más pequeñas lograron ser aprovechados y asimilados de una mejor forma, lo que generó mayores porcentajes de germinación en comparación con el blanco.



**Figura 50.** Porcentaje (%) de germinación de semillas de chile habanero (día 15) en ausencia (Blanco) o presencia de microesferas de a) PLA/Pal2.5%-Gly, b) PLA/Pal2.5%-Glu, c) QUI/Pal2.5%-Gly y d) QUI/Pal2.5%-Glu cargadas con los aminoácidos Gly y Glu.

Para el caso de las semillas que estaban en presencia de la dosis 2 (3% p/p de microesferas) se presentaron porcentajes menores de germinación en comparación con la dosis 1 (66.6 a 80%). En algunos casos una dosis alta de aminoácidos en las plantas puede provocar que estos no puedan ser asimilados y aprovechados correctamente ocasionando problemas adversos sobre la germinación, el principal siendo una disminución en la producción de energía necesaria dificultando su papel nutricional durante el proceso de germinación [139]. Un efecto tóxico de las matrices a concentraciones mayores no debe ser descartado.

**Tabla 8.** Dosis (cantidad (g) de microesferas de QUI y PLA en g por pocillo) aplicadas durante el estudio *in vitro* de germinación de semillas.

| Microesferas de QUI |             |             | Microesferas de PLA |             |             |
|---------------------|-------------|-------------|---------------------|-------------|-------------|
| Microesferas        | Dosis 1 (g) | Dosis 2 (g) | Microesferas        | Dosis 1 (g) | Dosis 2 (g) |
| QUI/Pal2.5%-Gly     | 0.35        | 0.7         | PLA/Pal2.5%-Gly     | 0.7         | 1.4         |
| QUI/Pal2.5%-Glu     | 0.35        | 0.7         | PLA/Pal2.5%-Glu     | 0.7         | 1.4         |

La cantidad de microesferas de PLA es el doble ya que capturaron aproximadamente un 50% menos que QUI

### 3.5.2. Efecto de la presencia de microesferas de QUI/Pal y PLA/Pal cargadas con los aminoácidos Gly y Glu sobre la biomasa de plántulas de chile habanero y elongación radicular

El peso fresco de las partes aérea y radical fue calculado a los 42 días después de que ocurrió la germinación y se presentan en la tabla 9, observándose que la menor producción de biomasa se dio en las plántulas que no se cultivaron en presencia de las microesferas. En las plántulas cultivadas en presencia de la dosis 1 de microesferas de QUI/Pal con Gly y Glu se observó un aumento en casi un 100% del peso total en comparación con el blanco; sin embargo, al aumentar la cantidad de microesferas (dosis 2) se observó una disminución aproximada del 25% de peso con Gly, en presencia del aminoácido Glu prácticamente la producción de biomasa fue la misma que con el blanco.

Este fenómeno se observó de igual manera en las plántulas cultivadas en las microesferas de PLA/Pal (dosis 1 y 2), presentando un aumento de casi un 70% con el aminoácido Gly con respecto al blanco, la menor producción de biomasa la presentaron las plántulas en presencia de la dosis 2 de PLA/Pal y el aminoácido Glu presentando un aumento casi del 1%. Estos resultados son novedosos y el efecto de estos tratamientos sobre el metabolismo de las plantas debe ser abordado, especialmente la producción de proteínas y fitohormonas [140], las cuales se encargan de proporcionar energía y sustancias reguladoras del crecimiento en las plantas [141].

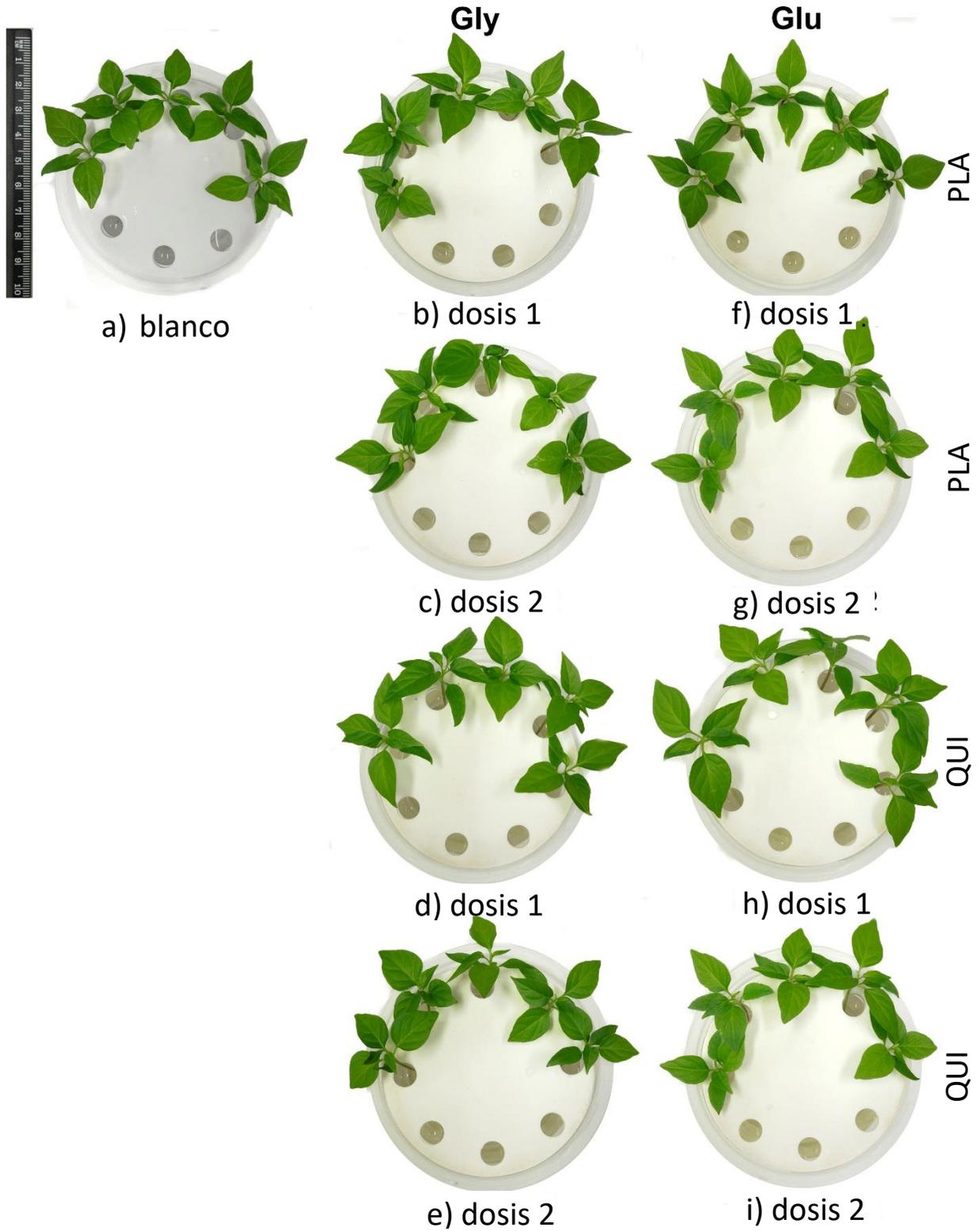
**Tabla 9.** Efecto de la presencia de las microesferas de QUI/Pal y PLA/Pal sobre la producción de biomasa en plántulas de chile habanero. Se presenta el valor promedio de 5 plántulas  $\pm$  desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas (Tukey,  $P < 0.001$ ).

| Peso fresco (g) de plántulas |       |                       |                        |           |
|------------------------------|-------|-----------------------|------------------------|-----------|
| Microesferas                 | Dosis | Peso aéreo (g)        | Peso raíz (g)          | Total (g) |
| Blanco                       |       | 0.1060 $\pm$ 0.0019c  | 0.0241 $\pm$ 0.0034e   | 0.1301    |
| QUI/Pal2.5%-Gly              | 1     | 0.1757 $\pm$ 0.0154a  | 0.0547 $\pm$ 0.0017a   | 0.2304    |
|                              | 2     | 0.1317 $\pm$ 0.0063bc | 0.0419 $\pm$ 0.0064bc  | 0.1736    |
| QUI/Pal2.5%-Glu              | 1     | 0.1602 $\pm$ 0.0093ab | 0.0568 $\pm$ 0.0041a   | 0.2170    |
|                              | 2     | 0.1093 $\pm$ 0.0043c  | 0.0305 $\pm$ 0.0003de  | 0.1398    |
| PLA/Pal2.5%-Gly              | 1     | 0.1560 $\pm$ 0.0270ab | 0.0361 $\pm$ 0.0045bcd | 0.1921    |
|                              | 2     | 0.1380 $\pm$ 0.0143bc | 0.0432 $\pm$ 0.0021b   | 0.1812    |
| PLA/Pal2.5%-Glu              | 1     | 0.1111 $\pm$ 0.0072c  | 0.0332 $\pm$ 0.0022cde | 0.1443    |
|                              | 2     | 0.1046 $\pm$ 0.0041c  | 0.0238 $\pm$ 0.0017e   | 0.1284    |

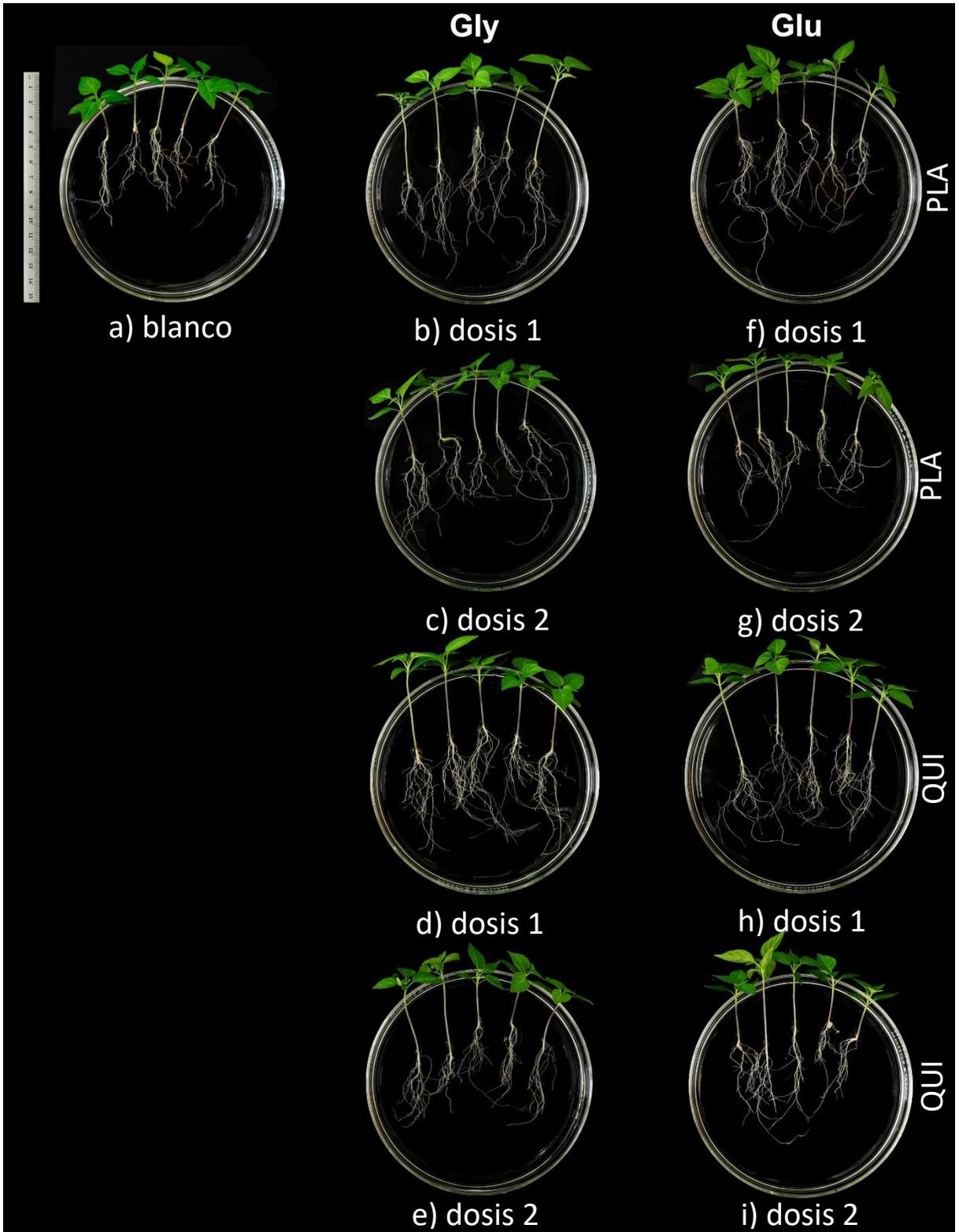
En la figura 51 se muestran las fotografías de la parte aérea de las plántulas cultivadas con las microesferas (blanco, dosis 1 y 2). Se observan partes aéreas con hojas de mayores tamaños en las plántulas creciendo en presencia de QUI/Pal y PLA/Pal con los aminoácidos. Esta figura indica que las plántulas creciendo en presencia de QUI/Pal y PLA/Pal y en presencia de ambos aminoácidos y con la dosis más baja ensayada parecen tener una mayor área foliar, lo cual puede sugerir una mayor actividad fotosintética y crecimiento de la plántula bajo estas condiciones, estudios realizados por *Nadeem et al.* [142] demostraron que la adición de bajas cantidades de nutrientes generó un mayor estímulo en plántulas de arroz y trigo en comparación con las altas dosis, lo cual respalda los resultados obtenidos en el presente estudio.

La elongación radical de las plántulas se presenta en la figura 52. En ella se puede observar que al igual que en la germinación de semillas y producción de biomasa, la mayor elongación se presenta en las plántulas con la dosis 1 de QUI/Pal y PLA/Pal (figura 53b, d, f y h) y para las plántulas con la dosis 2 de QUI/Pal y PLA/Pal presentaron tamaños de elongación menores (figura 53c, e, g e i). Todos los tratamientos utilizados (dosis 1 y 2) presentaron mayor elongación en comparación con el blanco (figura 52a) que presentó elongaciones de 4.4 a 5.7 cm. Esta figura muestra que las raíces de las plántulas tratadas con ambas matrices y aminoácidos, a la menor dosis utilizada, no sólo presentaron una mayor longitud sino también proliferación, indicando que estos tratamientos pueden estimular tanto procesos de crecimiento en longitud como formación de nuevas raíces. Estos eventos pueden traducirse en mayores superficies de absorción, permitiéndole a la planta una nutrición mineral más eficiente y reflejándose por lo tanto en mayor crecimiento en la parte aérea.

Los ensayos realizados probaron que las microesferas de QUI/Pal y PLA/Pal cargadas con los aminoácidos Gly y Glu no generan efectos fitotóxicos en las plantas, ya que se obtuvieron buenos porcentajes de germinación, producción de biomasa y una buena elongación de raíz. Más aún, a determinadas dosis pueden provocar un efecto estimulador sobre estos procesos.



**Figura 51.** Parte aérea (hojas) de plántulas de chile habanero a) blanco y en presencia de b) Dosis1-PLA/Pal2.5-Gly, c) Dosis2-PLA/Pal2.5-Gly, d) Dosis1-QUI/Pal2.5%-Gly, e) Dosis2-QUI/Pal2.5%-Gly, f) Dosis1-PLA/Pal2.5-Glu, g) Dosis2-PLA/Pal2.5-Glu, h) Dosis1-QUI/Pal2.5%-Gly e i) Dosis2-QUI/Pal2.5%-Gly.



**Figura 52.** Elongación radículas de plántulas de chile habanero a) blanco y en presencia de b) Dosis1-PLA/Pal2.5-Gly, c) Dosis2-PLA/Pal2.5-Gly, d) Dosis1-QUI/Pal2.5%-Gly, e) Dosis2-QUI/Pal2.5%-Gly, f) Dosis1-PLA/Pal2.5-Glu, g) Dosis2-PLA/Pal2.5-Glu, h) Dosis1-QUI/Pal2.5%-Gly e i) Dosis2-QUI/Pal2.5%-Gly.

## CONCLUSIONES

Las pruebas preliminares demostraron que cada uno de los métodos empleados produce microesferas satisfactoriamente, sin embargo, las mejores matrices fueron las de QUI y PLA, ya que las microesferas obtenidas de estas matrices presentaron mejores características en comparación con las otras tres (PEG, ALG y CAB) siendo la principal una buena interacción con la Pal.

Las microesferas híbridas que contenían 5 % de Pal mostraron buenas características morfológicas como formas esféricas y buena distribución de tamaño lo que indica que la Pal no afecta el proceso de producción ni de esferificación de las esferas. En el caso de las microesferas híbridas que contenían un 10% de Pal, presentaron morfologías deformes, disminución de tamaño y fragilidad, atribuible a la aglomeración de la arcilla en el interior de las esferas.

Las microesferas seleccionadas fueron las de QUI y PLA, ya que presentaron las mejores características morfológicas y fisicoquímicas y el contenido de Pal se redujo a 1 y 2.5% (p/p) para garantizar una buena morfología de las esferas y una buena dispersión de las arcillas en su interior.

Los resultados de la caracterización fisicoquímica de las microesferas de QUI y PLA con Pal y cargadas con Gly y Glu demostraron que la adición de la Pal y los aminoácidos no interfirieron con el proceso de formación de las microesferas: las micrográficas SEM muestran morfologías esféricas con distribuciones de tamaños de partícula dentro del intervalo deseado (50 a 600  $\mu\text{m}$ ), los difractogramas de XRD comprobaron la presencia de la Pal en las microesferas, y que esta al igual que Gly y Glu no afectaron la estructura cristalina de las matrices de QUI y PLA.

La cantidad de aminoácidos capturados en las microesferas está directamente relacionada con el porcentaje de hinchamiento (PH) y porcentaje de absorción de agua (PA) de las microesferas; mientras más altos sean PH y PA, mayor es la cantidad de aminoácido capturado. Por ejemplo, QUI capturó 63% de Gly y presentó 220% de absorción de agua a diferencia de PLA que capturó solo un 21% del aminoácido Gly, pero absorbió menos de 90% de agua.

El modelado matemático de las cinéticas de liberación demostró que el proceso de difusión de los aminoácidos en las microesferas de QUI y PLA es a través de los poros de las matrices. La nano-arcilla presente en las microesferas juega un papel importante durante el proceso de liberación, observándose que las microesferas que contenían 2.5% p/p de Pal capturaron una gran cantidad de los aminoácidos e hicieron que el proceso de liberación sea lento y gradual. La presencia del mineral modificó el proceso de difusión, comprobando la hipótesis planteada en la presente Tesis.

Finalmente, las pruebas de fitotoxicidad *in vitro* demostraron que las microesferas híbridas de QUI/Pal y PLA/Pal cargadas con los aminoácidos Gly y Glu no causan algún efecto tóxico en la germinación de semillas, lo que llevó a un alto porcentaje de germinación, una gran producción de biomasa en las plántulas cultivadas y una gran elongación radicular; esto demuestra que las microesferas cumplen su papel como sistemas de liberación controlada ofreciendo los aminoácidos a velocidades que permiten que sean gradualmente aprovechados y asimilados por las plántulas.

## REFERENCIAS

1. M. Noriega, A. Estrada. "Polímeros en industria farmacéutica y liberación controlada de medicamentos". *Journal Microbiology*. **9**, 78-79, 2017.
2. J. Vila, J. L. García. "Tecnología farmacéutica: Aspectos fundamentales de los sistemas farmacéuticos". *Journal Síntesis*. **1**, 234, 1997.
3. S. Kim, J. Kim, O. Joen, I. Kwon, K. Park. "Engineered polymers for advanced drug delivery". *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutic*. **71**, 420-430, 2009.
4. S.H. Masood. "Application of fused deposition modelling in controlled drug delivery devices". *Assembly Automation*. **27**, 215-221, 2007.
5. T. Mechthild. "Transporters for amino acids in plant cells: some functions and many unknowns". *Current Opinion in Plant Biology*. **15**(3), 315-321, 2012.
6. V.K. Tal. "Role of amino acids in plant responses to stresses". *Biologia Plantarum*. **45**(4), 481-487, 2002.
7. N. Torres, S. Comejo, L.A. Villegas, L. Noriega, G. Escondrills, A.R. Tovar. "Amino acid Catabolism: An Overlooked área of metabolism". *Nutrients*. **15**, 3378, 2023.
8. R. Montano, R. Zuaznabar, A. García., M. Viñals. "Fitomonas E: Bionutrientes derivado de la industria azucarera". *Investigaciones de los Derivados de Caña*. **3**, 14-21, 2007.
9. R. Bischoff, H. Schlüter. "Aminoácidos: química, funcionalidad y modificaciones postraduccionales no enzimáticas seleccionadas". *Journal of proteomics*. **78**, 2275-2296, 2012.
10. L. Taiz, E. Zeiger. "Plant Physiology". Redwood City. The Benjamín/Cumming Publish Company. 147-150, 1998.
11. P. Anbinder. "Caracterización, evaluación y aplicaciones de películas poliméricas activas". (Tesis de Grado) Facultad de Ciencias Exactas. La Plata España 2011.
12. F.W. Harris. "Introduction to Polymer Chemistry". *Journal of Chemical Education*. **58**, 837-843, 1981.
13. R. Rebelo, M. Fernández, R. Fanguero. "Biopolymers in Medical Implants". *Procedia Engineering: Advanced Materials*. **200**, 236-243, 2017.

14. C. Bastioli. "Biodegradable material for various applications". *Biopolymers: General Aspects and Special Applications*. *Steinbuechel*. **10**, 234-239, 2003.
15. N. Lucas, C. Bienaime, C. Belloy. "Polymer biodegradation: Mechanisms and estimation techniques - A review". *Chemosphere*. **73**, 429-442, 2008.
16. O. Vilpoux, L. Averous. "Technology, Use and Potentialities of Latin American Starchy Tubers". *Starch-based plastics*. 521-553, 2004.
17. M.M. Reddy, S. Vivekanandhan, M. Misra, S.K. Bhatia, A. Mohanty. "Biobased plastics and bionanocomposites: Current status and future opportunities". *Progress in Polymer Science* **38**, 5-13, 2013.
18. E.L. Johnson, Q. Peniston. "Utilisation of shellfish waste for chitin and chitosan production" *Chemistry Marine Food*. **19**, 415-422, 1982.
19. Y. Feng. "Preparation, characterization and antibacterial activity of water-soluble Ofumaryl-chitosan". *Carbohydrate Polymers*. **83**, 1169-1173, 2011.
20. M. Sedlak. "Recent Advances in Chemistry and Applications of Substituted Poly(ethylene glycol)". *Collect. Czech. Chem. C*. **70**, 269-291, 2005.
21. P. Lutz. "Structural properties of poly(ether) macro-monomer-based hydrogels". *Polym. Bull*. **58**, 161-171, 2007.
22. B. Muniswamy, G. Krishna, H.L. Sreenath. "Encapsulation techniques for producing synthetic seeds in coffee". *Indian Coffee*. **64**, 3-5, 2000.
23. M.J. Oliveira. "Estudio de la biosorción de Cu (II) por perlas de alginato de calcio". (Tesis de Grado) Universidad Nacional Mayor De San Marcos, Lima Perú. 2003.
24. C.L. Serna, S.A. Rodríguez, A. Alban. "Ácido Poliláctico (PLA): Propiedades y Aplicaciones". *Ingeniería y Competitividad*. **5**, 16-26, 2011.
25. J. Wang, W. Xu, S. Li, H. Qiu, Z. Li, C. Wang, X. Wang, J. Ding. "Polylactide-Cholesterol Stereocomplex Micelle Encapsulating Chemotherapeutic Agent for Improved Antitumor Efficacy and Safety". *Journal of Biomedical Nanotechnology*. **14**, 2102-2113, 2018.
26. I.R. Mustapa, R.A. Shanks, I. Kong. "Poly(lactic acid)-hemp-nanosilica hybrid composites: thermomechanical, thermal behavior and morphological properties". *International Journal of Automotive Engineering and Technologies*. **3**, 192-199, 2013.

27. J. Morgan, S. Townley, R. Smith. "Measurement of physical and mechanical properties of beeswax". *Materials Science and Technology*. **18**(463), 2002.
28. M. Maia, F.M. Núñez. "Authentication of beeswax (*Apis mellifera*) by high-temperature gas chromatography and chemometric analysis" *Food Chemistry*. **136**, 961-968, 2012.
29. J. Yáñez, J. Salazar, L. Chaires, J. Jiménez, M. Márquez, E. Ramos. "Aplicaciones biotecnológicas de la microencapsulación". *Revista Avance y Perspectiva*. **21**, 313-319, 2002.
30. J. Madene, J. Scher, S. Desobry. "Flavour encapsulation and controlled release a review". *International Journal of Food Science and Technology*. **4**, 1-21, 2006.
31. D.O. Santos. "Uso de la microencapsulación como mecanismo para la protección de prebióticos". (Tesis de Grado) Universidad Veracruzana, México. 2014.
32. M.C. Fuchs, C. Turchiuli, M. Bohin, M. Cuvelier, C. Ordonnaud, M. Peyrat, E. Dumoulin. "Encapsulation of oil in powder using spray drying and fluidized bed agglomeration". *Journal of Food Engineering*. **75**, 27-35, 2006.
33. L. Toledo, L. Jelinek, Y. Gordyatskaya, C. Campos, B. Urbano. "Synthesis of hybrid microspheres from zirconium butoxide and an ionic–non-ionic copolymer". *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. **546**, 91-98, 2018.
34. J. Zhang, H. Liu. "A novel approach to preparing polystyrene/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> multihollow microspheres with porous walls". *Colloid and Polymer Science*. **294**, 1755-1763, 2016.
35. J.H. Chen, C. Cheng, W. Chiu, C. Lee, N. Liang. "Synthesis of ZnO/polystyrene composites particles by Pickering emulsion polymerization". *European Polymer Journal*. **44**, 3271-3279, 2008.
36. T.L. Whateley "Biodegradable microspheres for controlled delivery", En: Whateley TL, ed. *Encapsulation and controlled release*, Reino Unido: Harwood Acad. 1993.
37. F. Gamisans, F. Lacoulonche, A. Chauvet, M. Espina, M. García, M. Egea. "Flurbiprofen-loaded nanospheres: analysis of the matrix structure by thermal methods". *Journal Pharm.* **8**, 37-38, 1999.
38. H. Okada. "One and tree month release injectable microspheres of the LH-RH superagonist leuprolerin acetate". *Journal Adv. Drug. Del Rev.* **28**, 43-47, 1997.

39. X. Wu, D. Wise, D. Trantolo, D. Altobelli, M. Yaszemski, D. Gresser, E. Schwart. "Preparation, characterization, and drug delivery applications of microspheres based on biodegradable lactic/glycolic acid polymers". *Encyclopedic handbook of biomaterials and bioengineering*. **60**, 1151, 1995.
40. J. García, N. Bada, O.D. López, A. Noriega, P.C. Caracciolo, G.A. Abraham, J.A. Ramon, C. Peniche. "Recubrimiento de microesferas de quitosana-ibuprofeno con un complejo interpolimerico pH dependiente". *Rev. Cuba. Farm.* **48**(4), 2014.
41. R.J. Linhardt, D. Flanagan, E. Schmitt, H. Wang. "Quantitative analysis of the monomer product formed on the hydrolysis of poly (ester) and poly (anhidrides)". *Journal Polym. Prepr.* **30**, 464-465, 1989.
42. B. Wichert, P. Rohdewald. "A new method for the preparation of drug containing polylactic acid microparticles without using organic solvent". *Journal Contr. Rel.* **14**, 269-273, 1990.
43. F. Maestrelli, M. Cirri, G. Corti, N. Mennini, P. Mura. "Development of enteric-coated calcium pectinate microspheres intended for colonic drug delivery". *Journal Pharm. Biopharm.* **69**, 508-518, 2008.
44. J. Ortiz, H. Pfeiffer. "Métodos de síntesis de microesferas poliméricas y su uso en el proceso de síntesis de materiales cerámicos micro-porosos" *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. **13**, 113-120, 2010.
45. J. Baltuille, J. Rivas, J. Vega, J. Zapardiel, C. Marchan. "Inventario Nacional de Arcillas Especiales (Paligorkita/Attapulgita, Sepiolita, Bentonita)", *Recursos Minerales. N°3. Instituto Geológico y Minero de España*. **63**, 2005.
46. A.K. Helmy, E.A. Ferreiro, S.G. Bussetti. "The surface energy of palygorskite". *Powder Technol.* **171**, 126-131, 2007.
47. J. Li, L. Yan, H. Li, W. Li, F. Zha, Z. Lei. "Underwater superoleophobic palygorskite coated meshes for efficient oil/water separation". *Journal of Materials Chemistry*. **3**, 14696-14702, 2015.
48. J. Xu., W. Wang., A. Wang. "Effect of squeeze, homogenization and freezing treatments on particle diameter and rheological properties of palygorskite". *Advanced powder Technology*. **24**, 968-977, 2014.

49. 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*. 1-37, 2017.
50. E. Garcia., M. Suárez. "On the chemical composition of sepiolite and palygorskite". *Clays and Clay Minerals*. **58**, 1-20, 2010.
51. E. Besoain. "Mineralogía de arcillas de suelos". Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. San José, Costa Rica. **4**, 1985.
52. K. Cornelius., S. Cornelius. "Manual de mineralogía"; **4**, 495-616, 1996.
53. S.P. Singh., L.Q. May., W.G. Harris. "Metal Interactions with Phosphatic Clay, Sorption and Desorption Behavior". *J. Environ. Qual.* **30**, 1961-1968, 2001.
54. Lehninger. "Principios de bioquímica". Omega, Barcelona. 2000.
55. T.M. Devlin. "Bioquímica 4ta edición". Reverté, Barcelona. 2004.
56. P. Li, K. Mai, J. Trushenski, G. Wu. "New developments in fish amino acid nutrition: towards functional and environmentally oriented aquafeeds". *Amino Acids*. **37**(1), 43-53, 2009.
57. G. Nan, Z. Shunan, X. Guahua. "Function, transport and regulation of amino acid: What is missing in rice?". *The Crop journal*. **9**(3), 530-542, 2021.
58. M. Trovato, D. Funck, G. Forlani, S. Okumoto, R. Amir. "Editorial: Amino acid in plants: Regulation and functions in development and stress defense". *Front. Plant Sci.* **12**, 2021.
59. N. Chávez, M. Gutiérrez. "Respuesta al estrés por calor en los cultivos. Aspectos moleculares, bioquímicos y fisiológicos". *Agronomía Mesoamericana*. **28**, 77-79, 2017.
60. A.E. Evins, S. Fitzgerald, L. Wine. "Placebo-controlled trial of glycine added to clozapine in schizophrenia". *Am. J. Psychiatry*. **157**, 826-828, 2000.
61. M.J. Betts, R.B. Russell. "Amino acid properties and consequences of substitutions". *Bioinformatics for Geneticists*. **217**, 296-298, 2003.
62. J.T. Brosnan, M. Brosnan. "Glutamate: a truly functional amino acid". *Amino Acids*. **45**, 413-418, 2013.
63. B.G. Forde, P.J. Lea. "Glutamate in plants: metabolism, regulation and signalin". *Journal of Experimental Botany*. **58**, 2339-2358, 2007.

64. P. Louisot. "Bioquímica Estructural", 2ª Ed. Editorial AC. 1982.
65. I. Smith, J.G. Feinberg. "Paper and Thin Layer Chromatography and Electrophoresis". London, England: Shandon Scientific Company, Inc.; 2nd Ed. Edición. 1965.
66. M.M. Bradford. "A rapid and sensitive method for the quantitative of microquantities of protein". *Anual Biochem.* **72**, 248, 1976.
67. S. Moore. "Amino acid analysis: aqueous dimethyl sulfoxide as solvent for the ninhydrin reaction". *Journal Biology Chem.* **243**, 6281-6283, 1968.
68. P. Roca, M.P. Roca, J. Oliver. "Bioquímica: técnicas y metodos". Editorial Hélice. 2003.
69. M.Y. Naz, S.A. Sulaiman. "Slow-release coating remedy for nitrogen loss from conventional urea". *J. Control. Release.* **225**, 109-120, 2016.
70. B. Hack, H. Egger, J. Uhlemann, M. Henriet, W. Wirth, A.W. Vermeer, D.G. Duff. "Advanced Agrochemical Formulations through Encapsulation Strategies?" *Chemie Ingenieur Technik.* **84**, 223-234, 2012.
71. P. Wang, E. Lombi, F.J. Kopittke. "Nanotechnology: A New Opportunity in Plant Sciences". *Trends Plant Sci.* **21**, 699-712, 2016.
72. FAO. Water for Sustainable Food and Agriculture Water for Sustainable Food and Agriculture. 2017.
73. A. Roy, S.K. Singh, J. Bajpai, A.K. Bajpai. "Controlled pesticide release from biodegradable polymers". *Central European Journal of Chemistry*, **12**(4), 453-469, 2014.
74. G. Suffredini, J.E. East, L.M. Levy. "New Applications of Nanotechnology for Neuroimaging". *American Journal of Neuroradiology.* **35**(7), 1246, 2018.
75. H. Singh, A. Anal. "Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery: a review". *Trends in Food Science and Technology.* **18**, 240-251, 2007.
76. S. Dash, P.N. Murthy, L. Nath, P. Chowdhury. "Kineting modeling on drug release from controlled drug delivery systems". *Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research.* **67**(3), 217-223, 2010.

77. G. Singhvi, M. Singh. "Review: in vitro drug release characterization models". *Journal of Pharmaceutical Studies and Research*. **2**, 77-84, 2011.
78. M.P. Padmaa, A.J. Preethy, C. Setty, G.C. Peter. "Release Kinetics-Concepts and applications". *Journal of Pharmacy Research & Technology*. **8**, 12-20, 2018.
79. F. Avilés, M. Aguilar. "Moisture absorption in foam-cored composite sandwich structures". *Polymer Composites*. **31**(4), 714-722, 2010.
80. B.C. Duncan, J.M. Urquhart, S. Roberts. "Review of measurement and modelling of permeation and diffusion in polymers". National Physical Laboratory Middlesex, UK. 2005.
81. T. Higuchi. "Mechanism of sustained-action medication. Theoretical analysis of rate of release of solid drug dispersed in solid matrices". *J. Pharm. Sci.* **52**(12), 1145-1149, 1963).
82. K.H. Ramteke, P.A. Dighe, A.R. Kharat, S.V. Patil. "Mathematical models of drug dissolution: A review". *Scholars Academic and Scientific Publisher*. **3**, 388-396, 2014.
83. R.W. Korsmeyer, R. Gurny, E. Doelker, P. Buri, N.A. Peppas. "Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers". *Journal of Pharmaceutics*. **15**, 25-35, 1983.
84. L.W. Cai, Y. Weitsman. "Non-Fickian moisture diffusion in polymeric composites". *Journal of composite materials*. **28**(2), 130-154, 1994.
85. R.R. Perez, F. Avilés, P.I. Gonzalez. "Water absorption kinetics of palygorskite nanoclay/polypropylene composite foams". *Polym. Bull.* 1-26, 2023.
86. C.H. Chaunew, J.L. Morel, J. Oudot. "Phytotoxicity and Plant Uptake of Fuel Oil Hydrocarbons". *Journal of Environmental Quality*. **26**, 1478-1483, 1997.
87. R. Sushma, K. Nilima, S. Vinay. "Uptake, translocation, transformation and physiological effects of nanoparticles in plants". *Archives of Agronomy and Soil Science*. **69**, 1579-1599, 2020.
88. A.M. Abd, E. Gendy, A. Assaeed, S.L. Al-Rowaily. "Phytotoxic Effects of Plant Essential Oils: A Systematic Review and Structure-Activity Relationship Based on Chemometric Analyses". *Plants (Basel)*. **10**, 36-41, 2020.
89. L.C. Corrales, M.M. Muños. "Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno". *Ciencias Biomédicas*. **10**, 1794-1798, 2012.

90. C.W. Martin. "Heavy Metals Trends in Floodplain Sediments and Valley Fill". *Catena*. **39**, 53-68, 2000.
91. L. Rivas, P. Hoyos, E. Amezquita. "Manejo y uso de los suelos en la altillanura". Colombia. CIAT. 2004.
92. M. Thanoo, B. Chithambara, C. Sunny, A. Jayakrishnan. "Cross-linked Chitosan Microspheres: Preparation and Evaluation as a Matrix for the Controlled Release of Pharmaceuticals". *Pharmacy and Pharmacology* **44**, 283-286, 1992.
93. S. Dhawan, A. K. Singla, V. R. Sinha, "Evaluation of Mucoadhesive Properties of Chitosan Microspheres Prepared by Different Methods", *AAPS Pharm. Sci. Tech.* **5**, 67, 2004.
94. E. Scott, M. Nichols, R. Kuntz, D. Elbert. "Modular scaffolds assembled around living cells poly(ethylene glycol) microspheres with macroporation via anon-cytotoxic porogen". *Acta Biomaterialia* **6**, 29-38, 2010.
95. A. C. Rodríguez, D. Chappetta, M. Szeliga, A. Fernández, C. Bregni. "Micropartículas de alginato conteniendo paracetamol". *Ars. Pharmaceutica* **44**, 332-342, 2003.
96. S. Cohen, T. Yoshioka, M. Luceralli. "Controlled delivery systems for proteins based on poly(lactic/glycolic acid) microspheres", *Pharm.* **8**, 713, 1991.
97. P. Swati. "Preparation and evaluation of tableted microspheres of ibuprofen encapsulated in beeswax". *B. Pharm.* Bombay College of Pharmacy, India. **55**, 2002.
98. J. Nunthanid, S. Puttipipatkachorn, K. Yamamoto, G.E. Peck. "Physical properties and molecular behavior of chitosan films", *Drug Dev. Ind. Pharm.* **27**, 143-157, 2001.
99. E. W. Yemm, E. C. Cocking. "The Determination of Amino Acids with Ninhydrin". *Analyst*, **80**, 209-213, 1955.
100. C.H. Shen, G.S. Springer. "Moisture Absorption and Desorption of Composite Materials". *Journal of Composite Materials*. **10**, 2-20, 1976.
101. L.W. Cai, Y. Weitsman. "Non-Fickian moisture diffusion in polymeric composites". *Journal of composite materials*. **28**(2), 130-154, 1998.
102. C. Kimna, S. Deger, S. Tamburasi, F. Tihminlioglu. "Chitosan/montmorillonite composite nanosphere for sustained antibiotic delivery at post-implantation bone infection treatment". *Biomed. Mater.* **14**(4), 44101, 2019.

103. J. Li, H. Zheng, E. Y. Xu, M. Moehwald, L. Chen, X. Zhang, S. Mao. "Inhalable PLGA microspheres: Tunable lung retention and systemic exposure via polyethylene glycol modification". *Acta Biomaterialia*. **123**, 325-334, 2021.
104. Z. Wang, Z. Lv, Q. Su, X. Lai, Z. Huang, K. Li, L. Deng, J. Li. "Polyethylene glycol crosslinked modified chitosan/halloysite nanotube composite aerogel microspheres for efficient adsorption of melanoidin" *International Journal of Biological Macromolecules*. **266**, 131013, 2024.
105. N. T. Uyen, A. Hamid, X. T. Tram, N. Ahmad. "Fabrication of alginate microspheres for drug delivery: A review" *International Journal of Biological Macromolecules*. **153**, 1035-1046, 2020.
106. L. Brito, M. Tabares. "PLA-Starch microparticles containing clays focusing controlled release of rifampicin". *Materials Science and Applications*. **13**(7), 137026, 2022.
107. S. Parisa. "Synthesis and Characterization of Nanoparticles Propolis Using Beeswax". *Iran. J. Chem. Chem. Eng.* **38**(2), 9-19, 2019.
108. M. T. Maia, D. N. Sena, G. B. Calais, T. Luna, M. Beppu, S. Vieira. "Effects of histidine modification of chitosan microparticles on metal ion adsorption" *Reactive and Functional polymers*. **154**, 104694, 2020.
109. H. Wang, C. Hou, Y. Bai. "Effect of Bentonite on the Structure and Performance of Sodium Alginate as Microsphere Carrier of Essential Oil" *Engineering Materials*. **905**, 271-276, 2022.
110. E.H. Torrelles, P.S. Anbinder, P.J. Peruzzo, J. Amalvy. "Preparación y caracterización de películas de quitosano modificadas con nanoarcillas". *Asociación Tecnológica Iberoamericana de Pinturas, Adhesivos y Tintas*. **34**, 6-15, 2015.
111. 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" *Materials & Design*. **185**, 108229, 2020.
112. R. Rusmin, B. Sarkar, R. Mukhopadhyay, T. Tsuzuki, Y. Liu, R. Naidu. "Facile one pot preparation of magnetic chitosan-palygorskite nanocomposite for efficient removal of lead from water" *Journal of Colloid and Interface Science*. **608**(1), 575-587, 2021.

113. 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.
114. D.M. Escobar, C.A. Urrea, M. Gutiérrez, P.A. Zapata. "Production of scaffold using chitosan extracted from crustaceans". *Rev. Ing. Biomed.* **5**(9), 20-25, 2011.
115. 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" *Mater. Sci. Eng.* **711**, 120-126, 2020.
116. A. Sanchez, F.L. Braghiroli, M.T. Izquierdo, J. Parmentier, A. Celzard, V. Fierro. "Synthesis and properties of carbon microspheres bases on tannin-sucrose mixtures treated in hydrothermal conditions". *Industrial Crops and Products.* **154**, 2020.
117. V. Luque-Agudo, A. M. Gallardo-Moreno, M. L. González-Martin. "Influence of solvent and substrate on hydrophobicity of PLA films" *Polymers.* **13**(24), 4289, 2021.
118. A. D'Anna, R. Arrigo, A. Frache. "Rheology, Morphology and Thermal Properties of a PLA/PHB/Clay Blend Nanocomposite: The Influence of Process Parameters". *Journal of Polymers and the Environment.* **30**, 102-113, 2021.
119. S. Jianshe, Y. Xujie, H. Qiaofeng, W. Xin, L. Lude. "Polyurethane Grafted Attapulgite as Novel Fillers for Nylon 6 Nanocomposites". *Journal of Wuhan University of Technology-Mater.* **26**, 615-619, 2011.
120. L. Su, J. Zou, S. Dong, N. Hao, H. Hu. "Influence of different  $\beta$ -nucleation agents on poly(lactic acid): structure, morphology, and dynamic mechanical behavior". *RSC Adv.* **7**, 55364-55370, 2017.
121. Y. Luo, Z. Lin, G. Guo. "Biodegradation Assessment of Poly (Lactic Acid) Filled with Functionalized Titania Nanoparticles (PLA/TiO<sub>2</sub>) under Compost Conditions". *Nanoscale Res. Lett.* **14**(1), 56, 2019.
122. N.A. Mohamed, A. Hamouda, S.A. kader, M. Khalil. "Removal of cadmium from aqueous solution using modified magnetic glycine modified cross-linked chitosan resin" *Journal of Aquatic Biology and Fisheries.* **25**(1), 555-570, 2021.
123. M. Rani, A. Agarwal, T. Maharana, Y.S. Negi. "A comparative study for interpenetrating polymeric network (IPN) of chitosan-amino acid beads for controlled drug release" *Journal of Pharmacy and Pharmacology.* **4**(2), 35-54, 2010.

124. M.A. El-Ghaffar, M.A. Akl, A.M. Kamel, M.S. Hashem. "Chitosan and its amino acids condensation adduct as reactive natural polymer supports for cellulase immobilization". *Carbohydrate Polymers*. **81**(3), 507-516, 2010.
125. M. Dash, F. Chiellini, R.M. Ottenbrite, E. Chiellini. (2011) "Chitosan-A Versatile Semi-Synthetic Polymer in Biomedical Applications". *Progress in Polymer Science*. **36**, 981-1014, 2011.
126. H. Paquet, J. Duplay, M.M. Valleron, G. Millot. Octahedral composition of individual particles in smectite-palygorskite and smectite-sepiolite assemblages. *Proc. Int. Clay Conf.* 73-77, 1987.
127. M. Liu, M. Pu, H. Ma. "Preparation, structure and thermal properties of polylactide/sepiolite nanocomposites with and without organic modifiers". *Sci. Technol.* **72**, 1508-1514, 2012.
128. W. Ramos, R. Borges, P.I. Gonzales. "Nanostructured chitosan-palygorskite hybrid microspheres for controlled delivery of thymol". *Mater. Res. Express*. **8**, 105-110, 2021.
129. Ch. Luo, Q. Yang, X. Lin, Ch. Qi. "Preparation and drug release property of tanshinone IIA loaded chitosan-montmorillonite microspheres". *International Journal of Biological Macromolecules*. **125**, 721-729, 2019.
130. E. Ibrahim, S. Ahmed, S. K. Taylor, V. M. Padilla-Gainza, K. Lozano. "Centrifugally spun alginate-poly(lactic acid) microbeads: A promising carrier for drug delivery and tissue engineering", *International Journal of Biological Macromolecules*. **220**, 674-682, 2022.
131. M. Igartua, R. M. Hernandez, E. Santos-Viscaino. "Laponite nanoclays for the sustained delivery of therapeutic proteins". *Eur. J. Pharm. Sci.* **201**, 106858, 2024
132. H. Ishii, M. Minegishi, B. Lavitpichayawong, T. Mitani. "Synthesis of chitosan-amino acid conjugates their use in heavy metal uptake". *Biol. Macromol.* **17**(1), 1995.
133. C. Salazar, A. Valderrama. "Release of anthocyanins from chitosan films cross-linked with sodium tripolyphosphate". *Rev. Soc. Quim.* **83**(1), 2017.
134. K. Liao, P. Li, G. Chen, X. Qiu. "Preparation and release properties of flupirolole-loaded microcapsules with core status of solid particles, solution droplets and oil suspending agent J. Macromol". *Sci. Part A Pure Appl. Chem.* **56**, 171-180, 2019.

- 135.** M.A. Meirelles, R. Barbosa, R.F. De Almeida, P.R. Machado, L. Perioli, C. Viseras, F.N. Raffin. "Biocomposite for prolonged release of water-soluble drugs". *Pharmaceutic*. **15**, 1722, 2023.
- 136.** S. Ganguly, T. Maity, S. Mondal, P. Das, N.C. Das. "Starch functionalized biodegradable semi-IPN as a pH-tunable controlled release platform for memantine". *Journal of Biological Macromolecules*. **95**, 185-198, 2017.
- 137.** H.B. Hopfenberg, A. Apicella, D.E. Saleeby. "Factors affecting water sorption in and solute release from glassy ethylene-vinyl alcohol copolymers". *Journal of Membrane Science*. **8**, 273-282, 1981.
- 138.** A.N. Ford, D.W. Pack, R.D. Braatz. "Mathematical modeling of drug delivery from autocatalytically degradable PLGA microspheres". *Journal of Controlled Release*. **165**(1), 29-37, 2013.
- 139.** R. Pascale, K. Yu-Haey, L. Fernand. "Amino acids in sedes and seedlings of the genus *Lens*". *Phytochemistry*. **58**(2), 281-289, 2001.
- 140.** Y. Jianchang, Z. Yujiao, J. Yi. "Amino acids in rice grains and their regulation by polyamines and phytohormones". *Journal Plants*. **11**(12), 2022.
- 141.** Y. Qingqing, Z. Dongsheng, L. Qiaoquan. "Connections between amino acid metabolisms in plants: Lysine as an example". *Plant Sci*. **11**, 326-331, 2020.
- 142.** F. Nadeem, M. Farooq. "Application of micronutrients in rice-wheat cropping systems of South Asia". *Rice Science*. **26**(6), 356-371, 2019.

## ANEXO I

### Lavado y purificación de la arcilla Paligorskita

#### Lavado de la arcilla de paligorskita

- A 30 g de arcilla en un vaso de precipitado de 500 ml, se le agregaron 400 ml de agua destilada y se agito durante 3 h; la mezcla se filtró en una malla del No.12 para eliminar el material pétreo y orgánico.
- La mezcla se colocó en tubos de centrifuga de 50 ml y se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 min, el sobrenadante se decantó y la arcilla se colocó en un vaso de precipitado de 500 ml.
- La arcilla se secó en una estufa de convección a 105 °C durante 25 h; la arcilla seca, se macero en un mortero y posteriormente fue molida en un molino de bolas marca Ball Mill J-BM1a 100 rpm durante 10 min.

#### Purificación de la arcilla de paligorskita

- 30 g de arcilla lavada se colocaron en un vaso de precipitado de 2 L y se añadió 200 ml de peróxido de hidrógeno al 30 % ( $H_2O_2$ ), se esperó hasta que cese el burbujeo y se añadieron 300 ml de agua oxigenada con al 13 % ( $H_2O_2$  de curación médica); se colocó el vaso de precipitado en una placa de calentamiento a 100 °C; se esperó hasta que se agotaron las burbujas antes de proseguir; se repitió el paso anterior hasta no observar cambio en la coloración del agua oxigenada añadida.
- Cuando esta condición se cumplió, se añadieron 3 ml de ácido acético glacial y se evaporo a sequedad el contenido del vaso, la arcilla se secó en una estufa de convección por 8 h a 100 °C.
- 240 ml de una solución de acetato de sodio al 1 M ajustada a un pH 5 con ácido acético se adiciono seguidos de 300 ml de agua desionizada y se agito por 3 h.
- La mezcla se transfirió a tubos de centrifuga de 50 ml y se centrifugaron a 1500 rpm por 10 min o hasta que el sobrenadante fue claro. Este se decantó y se añadieron 30 ml de agua destilada a los tubos de centrifuga, se agitaron y centrifugaron nuevamente a 1500 rpm por 10 min. El sedimento fue secado en una estufa de convección a 105 °C por 24 h.

## ANEXO II

### Preparación de soluciones Buffer de citratos (A) y ninhidrina (B) para la determinación de aminoácidos totales.

Para la solución final de reactivo ninhidrina se prepararon dos soluciones (A y B) las cuales se preparan de la siguiente forma:

#### Solución (A)

- Se preparan 50 ml de una solución acuosa de ácido cítrico al 0.4M y 50 ml de una solución acuosa de citrato de sodio al 0.4M.
- 10.25 ml de la solución de ácido cítrico se coloca en un matraz aforado y se agrega poco a poco la solución de citrato de sodio (~9 ml) hasta obtener un pH de 5 y se afora a 50 ml.
- Posteriormente se toman 25 ml de la mezcla de ácido cítrico y citrato de sodio y se disuelven 0.04 g de cloruro de estaño y se reserva esta solución para su posterior uso.

#### Solución B

- Se disolvieron 0.5 g de ninhidrina en 12.5 ml de 2-etoxietanol
- Para preparar la solución final de ninhidrina se mezclan a razón 1:1 las soluciones A y B de acuerdo a las cantidades necesarias.

## ANEXO III

### Curva estándar para la determinación de aminoácidos totales

La determinación de los aminoácidos totales en las microesferas requiere la siguiente metodología.

- El estándar de aminoácido (glutamato) se diluye a razón de 1 mg/ml (solución stock 1), esta solución se diluye adicionalmente a razón de 1:20 para obtener una concentración de 0.05 µg/µl (solución stock 2).
- Se preparan y etiquetan 11 tubos de ensayo y se les añade las cantidades de solución stock 2 y agua destilada de acuerdo a lo indicado en la tabla 10.

**Tabla 10.** Diluciones a utilizar para la preparación de la curva estándar.

| Numero de tubo | µl de stock 2 | µl de agua destilada | Volumen Final | Concentración final (µg/µl) |
|----------------|---------------|----------------------|---------------|-----------------------------|
| 0              | 0             | 1000                 | 1 ml          | 0                           |
| 1              | 100           | 900                  | 1 ml          | 0.005                       |
| 2              | 200           | 800                  | 1 ml          | 0.01                        |
| 3              | 300           | 700                  | 1 ml          | 0.015                       |
| 4              | 400           | 600                  | 1 ml          | 0.02                        |
| 5              | 500           | 500                  | 1 ml          | 0.025                       |
| 6              | 600           | 400                  | 1 ml          | 0.03                        |
| 7              | 700           | 300                  | 1 ml          | 0.035                       |
| 8              | 800           | 200                  | 1 ml          | 0.04                        |
| 9              | 900           | 100                  | 1 ml          | 0.045                       |
| 10             | 1000          | 0                    | 1 ml          | 0.05                        |

- A cada uno de los tubos se les agrega 1 ml de la solución final de ninhidrina (A + B, anexo II) y son agitados en un vortex.
- Los tubos se colocan en una gradilla y son puestos a baño maría hasta punto de ebullición durante 30 min.
- Transcurrido este tiempo de dejan enfriar y se les agrega 2.5 ml de una solución de alcohol isopropílico al 50% y se agitan en un vortex.
- Los tubos se dejan enfriar durante 15 min a temperatura ambiente.
- Ya completamente fríos, se toman alícuotas de 3 ml y se colocan en una celdilla de cuarzo y se miden en el espectrofotómetro UV-Visible a una longitud de onda de 570 nm.

## ANEXO IV

### Desinfección de semillas de chile habanero

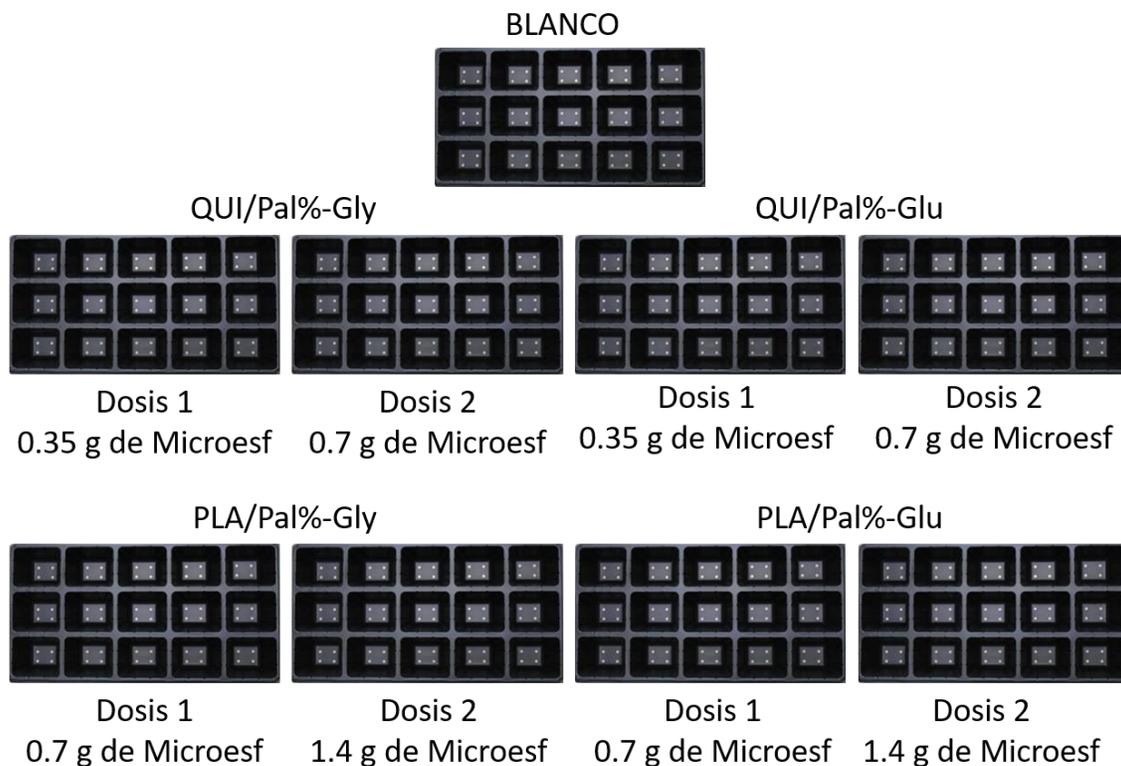
Para la prueba de fitotoxicidad las semillas de chile habanero se desinfectaron con la siguiente metodología:

- 500 semillas de chile habanero (*Capsicum chinense*) se colocan en un tubo falcón de 50 ml.
- En una probeta estéril de 50 ml se miden 40 ml de alcohol (80% v/v) y se completa a 50 ml con agua destilada estéril; la mezcla se vierte a un tubo falcón estéril, se tapó y se agita manualmente.
- 50 ml de una solución de hipoclorito de sodio comercial (6% i.a.) al 30% se prepara añadiendo una probeta 35 ml de agua destilada estéril y 15 ml de hipoclorito de sodio comercial, lo que se completa el volumen de 50 ml. La mezcla se vierte en un tubo falcón, se tapa y se agita manualmente.
- Al tubo con las 500 semillas se le vertió alcohol al 80 % hasta que sobrepasó el volumen de las semillas se tapó el tubo y se agita manualmente por 5 min, una vez transcurrido el tiempo se elimina el alcohol con ayuda de una micropipeta de 5 ml.
- Una vez retirado el alcohol, se enjuagan 5 veces las semillas con agua estéril; esta debe sobrepasar el volumen de las semillas y se agita manualmente por 30 s.
- Posteriormente se agrega la solución de hipoclorito de sodio hasta sobrepasar el volumen de las semillas y es agitada manualmente por 15 min; trascurrido este tiempo se retira el hipoclorito con ayuda de una micropipeta de 5 ml.
- Inmediatamente se realizan nuevamente 5 lavados con agua estéril para retirar el hipoclorito de sodio.
- Una vez completados todos los lavados se agrega agua destilada estéril hasta sobrepasar el volumen de las semillas, se tapa y se cubre con papel aluminio y se almacena a 4 °C durante 72 h.

## ANEXO V

### Dosis (Porcentaje de microesferas) añadidas durante el estudio *in vitro* de germinación de semillas de chile habanero (*Capsicum chinense*).

Para el estudio *in vitro* de germinación con microesferas de QUI y PLA con Pal (2.5%) cargadas con aminoácidos, se usaron dos dosis de aplicación (p/p de microesferas con respecto a la vermiculita por pocillo). La figura 53 presenta un esquema representativo de los tratamientos aplicados para la germinación de semillas de chile habanero.



**Figura 53.** Esquema representativo de pruebas de germinación.

## ANEXO VI

### Solución Hoagland 1/5 de fuerza iónica + micronutrientes.

La fertilización de las plántulas de chile habanero requiere una solución Hoagland de micro y macronutrientes, la cual es preparada de la siguiente forma:

- Para 3.6 L de agua destilada se le agregan las siguientes cantidades de stock (tabla 6):
  - 4.32 ml de stock (4H)
  - 2.88 ml de stock (5H)
  - 1.44 ml de stock (6H)
  - 720 µl de stock (7H)
  - 720 µl de stock (1H)
  - 720 µl de stock (2H)
  - 720 µl de stock (3H)
- Se agitación magnéticamente a 500 rpm durante 25 min a temperatura ambiente.
- Una vez que se homogeniza la solución, el pH se ajusta a 6.5.

**Tabla 11.** Preparación de la solución Hoagland usando Stocks.

|                 |  | Volumen solución final (mL) |                |                        |      |     |      |
|-----------------|--|-----------------------------|----------------|------------------------|------|-----|------|
|                 |  | 200                         | 1000           | 3000                   | 5000 |     |      |
| MICRONUTRIENTES |  |                             |                |                        |      |     |      |
| No. Frasco      | Sales  | Conc. Stock X*              | Conc. Final X* | µL de Stock/Sol. Final |      |     |      |
| 1H              | H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub><br>MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O<br>ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O<br>CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O<br>H <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> | 5000                        | 1              | 40                     | 200  | 600 | 1000 |
| 2H              | NiCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O   | 5000                        | 1              | 40                     | 200  | 600 | 1000 |
| 3H              | Fe-EDDHA   | 5000                        | 1              | 40                     | 200  | 600 | 1000 |
| MACRONUTRIENTES |  |                             |                |                        |      |     |      |
| No. Frasco      | Sales  | Conc. Stock mM              | Conc. Final mM | mL de Stock/Sol. Final |      |     |      |
| 4H              | KNO <sub>3</sub>   | 1000                        | 1.20           | 0.24                   | 1.2  | 3.6 | 6    |
| 5H              | Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O   | 1000                        | 0.80           | 0.16                   | 0.8  | 2.4 | 4    |
| 6H              | MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O   | 1000                        | 0.40           | 0.08                   | 0.4  | 1.2 | 2    |
| 7H              | NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>   | 1000                        | 0.20           | 0.04                   | 0.2  | 0.6 | 1    |

\*Veces concentrado  
Ajuste pH a 6.5 (NaOH – HCl)