

“Preparación de matrices biodegradables en forma de macroesferas con mezclas de polímeros para su potencial aplicación como fertilizantes y biofertilizantes de liberación controlada”

Tesis Doctoral

Autor: M.Sc. Jonás José Pérez Bravo

Directora: Dra. Nora François

Co-Directora: Dra. Cecilia Creus

**Grupo de Aplicaciones de Materiales Biocompatibles (FIUBA) –
Instituto de Tecnología en Polímeros y Nanotecnología (UBA-CONICET)
Laboratorio Bioquímica Vegetal y Microbiana (FCA-UNMDP)**

DEDICATORIA

A mis padres, Dalmaris y José

A mi abuela Dalila

A mi compañero Juan

A mis amigos Vero, Jesús y Fabiola

AGRADECIMIENTOS

Estas líneas servirán para expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas e instituciones que con su ayuda han colaborado en la realización del presente trabajo, a la Profesora Nora Francois y Cecilia Creus, directora y codirectora de esta investigación, por la orientación, la ayuda y el seguimiento. Quisiera hacer extensiva mi gratitud a mis compañeras del Grupo de Materiales de Aplicaciones Biocompatibles Valeria Debandi, Silvia Maioco, Sandra Menchaca y Gabriela Rivas por su camaradería y su colaboración. A mis compañeros de Balcarce por su buena predisposición en colaboraciones y su ayuda.

También quiero dar las gracias al ITPN por su colaboración en muchas de las técnicas de caracterización necesarias para la realización de la parte experimental de esta investigación.

A la Universidad de Buenos Aires por aceptarme en su seno científico y por la oportunidad que me brinda para ser docente universitario.

Al CONICET, por darme todas las facilidades para crecer profesionalmente, tanto con el Doctorado y ahora con el Post Doctorado donde se abre una nueva etapa para mí.

Un agradecimiento muy especial merece la comprensión, paciencia y el ánimo recibidos de mi familia y amigos. A todos ellos, muchas gracias.

RESUMEN

La presente Tesis estudia el desarrollo de un método simple, rápido y económico para producir un soporte polimérico que permite encapsular agentes químicos o microorganismos promotores del crecimiento vegetal con el objetivo de producir fertilizantes o biofertilizantes de liberación controlada. Los polímeros biodegradables de origen natural o sintético seleccionados son el quitosano, el almidón y el alcohol polivinílico.

El quitosano o las mezclas binarias de quitosano y almidón o, quitosano y alcohol polivinílico fueron capaces de formar matrices poliméricas en forma de macroesferas utilizando una solución acuosa de tripolifosfato de sodio seleccionado como agente entrecruzante. Por su naturaleza policatiónica, el quitosano puede formar un enlace iónico con el entrecruzante seleccionado en un amplio rango de pH. En particular se seleccionó un pH básico debido a que se genera un hidrogel con una densidad de entrecruzamiento baja que ayuda al material a tener un mayor hinchamiento que se encuentra asociado a una mayor carga de agente activo a encapsular.

Para analizar la estructura de los materiales preparados con distintos porcentajes de quitosano y tiempos de entrecruzamiento se utilizó: espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FITR) y resonancia magnética nuclear para sólidos (RMN CP-MAS). Se utilizarán la microscopía electrónica de barrido (SEM) y espectroscopía de energía dispersiva de rayos X (EDS) para analizar la morfología de las macroesferas obtenidas con las mezclas poliméricas y evaluar el contenido de fósforo. La estabilidad térmica de los materiales se estudiará usando calorimetría diferencial de barrido (DSC), análisis termogravimétrico (TGA) y su primera derivada (DTGA). La cristalinidad de los materiales se evaluará usando difracción de rayos X (XRD). Se determinó la cinética de hinchamiento para conocer la capacidad máxima de retención de agua de todas las matrices preparadas.

Se utilizó nitrato de potasio como fertilizante químico modelo y células de *Azospirillum brasilense* y *P. fluorescens* para producir los biofertilizantes. Los microorganismos seleccionados se cargaron solos o de manera conjunta. En el caso de los fertilizantes químicos preparados, se encontró que la cinética de liberación en agua se extendió durante 14 días alcanzando un porcentaje de liberación entre 70 y 98 % de la sal cargada según la matriz utilizada.

Se comprobó que las macroesferas seleccionadas para desarrollar los biofertilizantes pueden ser cargadas con medios conteniendo *Azospirillum brasilense* y/o *Pseudomonas fluorescens* y permanecer almacenadas durante un período de 12 meses mostrando aún altos títulos de ambos microorganismos viables (10^9 unidades formadoras de colonias.g⁻¹ de *A. brasilense* y 10^8 unidades formadoras de colonias.g⁻¹ de *P. fluorescens*).

En función de los resultados obtenidos durante el desarrollo de la presente Tesis se encontró que las macroesferas preparadas mostraron propiedades que las hacen adecuadas en la industria agroquímica para la fertilización química o biológica de liberación controlada.

ÍNDICE

	Página
PORTADA	1
DEDICATORIA	2
AGRADECIMIENTOS	3
RESUMEN	4
ÍNDICE	6
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABLAS	12
CAPÍTULO I	14
INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	14
INTRODUCCIÓN	15
OBJETIVOS	31
Objetivo General	31
Objetivos específicos	31
CAPÍTULO II	32
MATERIALES Y MÉTODOS	32
MATERIALES	33
MÉTODOS	34
Método de preparación de los materiales poliméricos	34
Preparación de los hidrogeles	34
Preparación de las macroesferas	34
Técnicas de caracterización	37
Análisis reológico dinámico	37
Microscopía electrónica de barrido (SEM) y espectroscopía de energía dispersiva de rayos X (EDS)	38
Difracción de rayos X (XRD)	39
Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)	39
Resonancia magnética nuclear (RMN)	40
Análisis térmico	40
Fracción soluble	41
Grado de hinchamiento de los materiales ("Swelling")	42
<i>Hinchamiento con agua desionizada</i>	42
<i>Hinchamiento con solución acuosa saturada de nitrato de potasio</i>	44
<i>Hinchamiento con la solución que contiene las bacterias promotoras del crecimiento vegetal</i>	44
<i>Supervivencia de los microorganismos</i>	45
<i>Ensayos de liberación del activo encapsulado</i>	46
<i>Fertilizante químico</i>	46
<i>Biofertilizante</i>	48
<i>Medio receptor: agua estéril</i>	48
<i>Medio receptor: suelo natural</i>	48

CAPÍTULO III		51
	CARACTERIZACIÓN DE LAS MACROESFERAS POLIMÉRICAS	51
	CARACTERIZACIÓN DE LAS MATRICES POLIMÉRICAS PREPARADAS CON CS/ST	52
	Reología dinámica	52
	Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)	54
	Espectroscopía de Energía Dispersiva (EDS)	57
	Fracción Soluble	59
	Resonancia Magnética Nuclear (RMN)	60
	Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)	62
	Difracción de rayos X (XRD)	65
	Termogravimetría (TGA)	68
	Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).	72
	Cinética de hinchamiento	75
	INFLUENCIA DEL PROCESO DE ESTERILIZACIÓN	78
	Resonancia Magnética Nuclear (RMN)	79
	Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)	80
	Grado de Hinchamiento en el equilibrio	81
	CARACTERIZACIÓN DE LAS MATRICES POLIMÉRICAS PREPARADAS CON CS/PVA	83
	Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)	83
	Espectroscopía de Energía Dispersiva (EDS).	84
	Fracción Soluble	85
	Difracción de rayos X (XRD)	85
	Termogravimetría (TGA)	87
	Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).	89
	Cinética de hinchamiento y mecanismo de transporte	91
CAPÍTULO IV		94
	MECANISMO DE LIBERACIÓN DEL FERTILIZANTE QUÍMICO EN LOS SISTEMAS CS Y CS/ST	95
	Incorporación de Nitrato de Potasio en las macroesferas	95
	Cinética de liberación del fertilizante	96
	MECANISMO DE LIBERACIÓN DE FERTILIZANTE QUÍMICO EN EL SISTEMA CS/PVA	100
	Incorporación de Nitrato de Potasio en las macroesferas	100
	Cinética de liberación del fertilizante	101
CAPÍTULO V		103
	PREPARACIÓN DEL FERTILIZANTE BIOLÓGICO Y MECANISMO DE LIBERACIÓN DE LAS BACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL	103

	MECANISMO DE LIBERACIÓN DE FERTILIZANTE BIOLÓGICO	104
	Micrografías SEM de los soportes con las bacterias inmovilizadas	104
	Supervivencia de los microorganismos encapsulados	105
	Liberación de los microorganismos en agua estéril	108
	Mecanismo de liberación de los microorganismos en agua estéril	111
	Liberación de las bacterias en suelo natural	112
	Sobrevida microbiana en las esferas aplicadas al suelo	113
	CONCLUSIONES	119
	PRODUCCIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA	121
	Congresos nacionales e internacionales	121
	Publicaciones Indexadas	121
	Producción Tecnológica	122
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	123

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1.1	Estructura química de la quitina y del quitosano	22
1.2	Diagrama de flujo simplificado para la obtención de quitosano a partir de quitina	23
1.3	Diagrama esquemático de la estructura de (a) la amilosa y (b) de la amilopectina	25
1.4	Estructura química del ségmero del PVA	26
1.5	Diagrama esquemático de la obtención del PVA	26
1.6	Estructura propuesta por Mi et al. para la interacción entre CS y STPP en: a) medio ácido y b) medio básico	28
1.7	Mecanismo de interacción del CS y el STPP a pH 8,6	29
3.1	Barrido de frecuencia a deformación constante (0,1%) correspondientes a: solución de CS, gel de ST y mezclas poliméricas de CS/ST a 25°C. Módulo elástico: G' (símbolos rellenos) y módulo viscoso: G'' (símbolos vacíos)	53
3.2	Micrografías obtenidas para matrices preparadas con 100%, 30% y 20% de CS utilizando 2 y 4 horas de entrecruzamiento. a) macroesferas completas; b) amplificación de la superficie exterior y c) cara interna del corte transversal de las macroesferas	55
3.3	Reacción propuestas en la fosforilación del almidón con STPP a pH<9 y altas temperaturas	58
3.4	Espectros de RMN ¹³ C CP-MAS para el CS (a), CS-2 (b) y CS-4 (c)	61
3.5	Espectro infrarrojo correspondiente a las muestras CS (a), CS-2 (b), CS-4 (c), ST (d), CS3ST7-2 (e), CS3ST7-4 (f), CS2ST8-2 (g) y CS2ST8-4 (h)	63
3.6	Difractogramas de rayos X del almidón de papa puro (a), quitosano puro (b), CS-2 (c), CS-4 (d), CS3ST7-4 (e), CS2ST8-2 (f), y CS2ST8-4 (g)	66
3.7	Termogramas obtenidos con CS, ST y las macroesferas CS-2, CS-4, CS3ST7-2, CS3ST7-4, CS2ST8-2 y CS2ST8-4	68
3.8	Termogramas DSC del ST (a), CS (b), CS-2 (c), CS-4 (d), CS3ST7-2 (e), CS3ST7-4 (f), CS2ST8-2 (g) y CS2ST8-4 (h).	74
3.9	Grado de hinchamiento en función del tiempo a 25°C correspondiente a las macroesferas CS-2, CS-4, CS3ST7-2, CS3ST7-4, CS2ST8-2 y CS2ST8-4	77
3.10	Espectro de ³¹ P-RMN de macroesferas de CS/ST entrecruzados con STPP esterilizadas y sin esterilizar	80
3.11	Micrografías de las macroesferas CS2ST8-2 no esterilizadas (a) y CS2ST8-2ES esterilizadas (b)	81
3.12	Micrografías correspondientes a matrices preparadas con diferentes composiciones de CS/PVA utilizando 2 y 4 h de	83

	entrecruzamiento. a) macroesferas completas; b) amplificación de la superficie y c) corte transversal de las macroesferas	
3.13	Difractogramas de rayos X de: PVA puro (a), CS puro (b), CS4PVA6-4 (c) y CS3PVA7-4 (d)	86
3.14	Termogramas para el CS, PVA, CS3PV7-4, CS4ST6-2 y CS4ST6-4.	87
3.15	Termogramas DSC del CS (a), PVA (b), CS3PVA7-4 (c), CS4PVA6-2 (d) y CS4PVA6-4 (e)	90
3.16	Variación del grado de hinchamiento en función del tiempo para las macroesferas CS3PVA7-2, CS4PVA6-2 y CS4PVA6-4 a 25 °C	92
4.1	Cinética de liberación de KNO ₃ para las macroesferas CS-2, CS2ST8-2 y CS3ST7-2. Las líneas corresponden a los ajustes no lineales utilizando la ecuación 2.6	97
4.2	Cinética de liberación de KNO ₃ para las macroesferas CS3PV7-4 y CS4PV6-2	102
5.1	Micrografías SEM de las superficies y secciones trasversales de las macroesferas de CS2ST8-2ES con los microorganismos inmovilizadas. Con magnificaciones de 50 X, 1500 X y 10000 X	104
5.2	Micrografías SEM de las superficies y secciones trasversales de las macroesferas de CS3PVA7-4ES con los microorganismos inmovilizadas. Con magnificaciones de 50 X, 1500 X y 10000 X	105
5.3	Recuento de las unidades formadoras de colonias por gramo de material (UFC/g) durante la inmovilización y conservación de Az, Ps y Az+Ps en las esferas de CS/ST	106
5.4	Recuento de las unidades formadoras de colonias por gramo de material (UFC/g) durante la inmovilización y conservación de Az, Ps y Az+Ps en las esferas de CS/PVA.	107
5.5	Cinética de liberación en agua estéril de <i>Azospirillum brasilense</i> Az39, <i>Pseudomonas fluorescens</i> ZME4 por separado (símbolo abierto) y en forma conjunta (símbolos cerrados) inmovilizadas en macroesferas de CS/ST. En el "inset" se muestra la cinética durante las primeras 25 h de liberación	109
5.6	Cinética de liberación en agua estéril de <i>Azospirillum brasilense</i> Az39, <i>Pseudomonas fluorescens</i> ZME4 por separado (símbolo abierto) y en forma conjunta (símbolos cerrados) inmovilizadas en macroesferas de CS/PVA. En el "inset" se muestra la cinética durante las primeras 25 h de liberación	110
5.7	Sobrevida de <i>Azospirillum brasilense</i> Az39, <i>Pseudomonas fluorescens</i> ZME4 separadamente (símbolos abiertos) y conjuntamente (símbolos rellenos) dentro de las esferas CS/ST en suelo	114
5.8	Sobrevida de <i>Azospirillum brasilense</i> Az39, <i>Pseudomonas fluorescens</i> ZME4 separadamente (símbolos abiertos) y	115

	conjuntamente (símbolos rellenos) dentro de las esferas CS/PVA en suelo	
5.9	Liberación de bacterias en suelo natural a partir de macroesferas de CS/ST	116
5.10	Liberación de bacterias en suelo natural a partir de macroesferas de CS/PVA	118

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
2.1	Composición de las macroesferas y tiempo de entrecruzamiento empleado	36
3.1	Frecuencia (ω) y valores de los parámetros reológicos (G' y G'') en el punto de cruce, determinados a partir de los barridos de frecuencia realizados a deformación constante y 25 °C para la solución de CS y las mezclas poliméricas de CS/ST	54
3.2	Porcentajes de la composición de P presente en la superficie de las matrices poliméricas obtenidas con 2 y 4 h de entrecruzamiento	58
3.3	Fracción soluble porcentual de las macroesferas compuestas por CS y CS/ST preparadas con diferentes tiempos de entrecruzamiento	60
3.4	Etapas en la descomposición térmica del CS y del ST	69
3.5	Descomposición térmica de las macroesferas preparadas con distintas composiciones de CS y ST utilizando 2 y 4 h de contacto con la solución con STPP	70
3.6	T_{max} experimental y T_{max} aplicando las reglas de las fases (Ec. 4.1) de las macroesferas preparadas con distintas composiciones de CS y ST utilizando 2 y 4 h de contacto con la solución con STPP	72
3.7	Picos de las transiciones térmicas y las entalpias de transición para las macroesferas preparadas con mezclas de CS y ST utilizando 2 y 4 h de entrecruzamiento	74
3.8	Parámetros cinéticos de liberación a 25 °C, obtenidos utilizando la ecuación 2.4 y valores del grado de hinchamiento máximo experimental correspondientes a las macroesferas preparadas con CS o CS/ST	78
3.9	Composición porcentual de P presente en la superficie de las macroesferas preparadas con las mezclas CS/PVA	85
3.10	Fracción soluble porcentual de las macroesferas CS/PVA a diferentes tiempos de entrecruzamiento	85
3.11	Etapas en la descomposición térmica del PVA	88
3.12	Descomposición térmica de las macroesferas preparadas con mezclas CS y PVA	88
3.13	T_{max} experimental y T_{max} aplicando las reglas de las fases (Ec. 4.2) de las macroesferas preparadas con distintas composiciones de CS y PVA utilizando 2 y 4 h de contacto con la solución con STPP	89
3.14	Picos de las transiciones térmicas y las entalpias de transición para las macroesferas preparadas con mezclas de CS y PVA utilizando 2 y 4 h de entrecruzamiento	91
3.15	Grado de hinchamiento en el equilibrio correspondiente a las macroesferas preparadas con CS o con CS/PVA	93

	utilizando diferentes tiempos de entrecruzamiento y parámetros cinéticos obtenidos del ajuste no lineal con la ecuación de Ritger–Peppas (Ec. 2.3)	
4.1	Porcentaje de carga del fertilizante químico modelo (KNO_3)	95
4.2	Parámetros cinéticos de liberación obtenidos del ajuste no lineal con la ecuación 2.6 correspondiente a las macroesferas CS-2, CS-4, CS3ST7-2 y CS2ST8-2 de nitrato de potasio a 25 °C	99
4.3	Porcentaje de carga del nitrato de potasio en la macroesferas preparadas con la mezcla CS/PVA	100
4.4	Parámetros cinéticos de liberación correspondiente a las macroesferas CS3PVA7-4 y CS4PVA6-2 obtenidos utilizando la ecuación 2.6	102
5.1	Datos cinéticos de la liberación de los microorganismos encapsulados desde las macroesferas de CS/ST	111
5.2	Datos cinéticos de la liberación de los microorganismos encapsulados desde las macroesferas de CS/PVA	113

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

En este capítulo se describen las características más importantes de los fertilizantes de liberación controlada, tanto químicos como biológicos. Se discuten los métodos de preparación, la forma de aplicación y las ventajas que presentan respecto a los fertilizantes químicos y biológicos convencionales de amplia aplicación actual.

INTRODUCCIÓN

La industrialización permitió la producción en masa de fertilizantes y pesticidas, generando durante el siglo pasado un inmenso desarrollo de la agricultura [1]. En la actualidad la población mundial es mayor a 7.000 millones de personas y se espera que para el año 2050 alcance los 9.500 millones [2]. Para satisfacer la demanda de alimentos de la creciente población, se han empleado de forma generalizada fertilizantes químicos y biológicos, los cuales tienen por objetivo proveer al cultivo de los nutrientes esenciales como el nitrógeno, el fósforo y el potasio (N, P, K) para favorecer el crecimiento y mejorar el rendimiento de los cultivos. Sin embargo, la mala administración de los fertilizantes aplicados, debido a su excesivo o inadecuado uso en la agricultura convencional, representa una amenaza para el medio ambiente [3,4].

Los procesos involucrados en la transformación del excedente de los fertilizantes aplicados son diversos ya que se deben a la acción microbiológica (nitrificación), a reacciones químicas que transforman los compuestos que no se utilizan (precipitación, hidrólisis, etc) y/o a procesos físicos como la volatilización y la lixiviación entre otros. Estos procesos también afectan la eficiencia del uso de los nutrientes y producen la contaminación [5,6] del agua a nivel superficial y subterránea, así como la degradación de la calidad del suelo e incluso cambios en los ecosistemas [7,8].

Por consiguiente, la industria agroquímica enfrenta un desafío permanente para desarrollar sistemas que aumenten la producción agrícola pero minimicen los problemas ambientales, ya sea mejorando los productos ya existentes o, desarrollando productos nuevos más específicos [9,10], que mejoren su eficiencia minimizando la frecuencia de su aplicación.

Un fertilizante ideal debería aplicarse una única vez, de manera que suministre la cantidad necesaria de nutrientes para el crecimiento óptimo del cultivo y produzca el menor efecto nocivo posible en el suelo, el agua y la atmósfera. El aumento de la producción de cultivos sin comprometer el medio ambiente puede lograrse aumentando la eficiencia de uso de los fertilizantes y del agua y,

minimizando los requerimientos de plaguicidas, a través del manejo integrado de los sistemas agrícolas.

Considerando que la incorporación de fertilizantes químicos tradicionales durante la siembra se realiza normalmente al principio de la campaña de producción, es imposible controlar los aportes nutritivos a la planta durante el desarrollo del cultivo. Por esta razón, es necesario seleccionar cuidadosamente el tipo y la cantidad del fertilizante empleado, ya que estos factores no pueden modificarse una vez realizada la siembra. A pesar de este inconveniente, los fertilizantes químicos tradicionales gozan de las ventajas de la simplicidad de su aplicación y de su bajo costo [11].

Hay una variedad de estrategias que se pueden utilizar para aumentar la eficiencia del uso de los fertilizantes químicos convencionales para minimizar su impacto negativo sobre el medio ambiente. Ellas se basan en mejoras de los métodos de aplicación de la fertilización tradicional que consisten en: la aplicación dividida o localizada, la fertilización de precisión y la fertirrigación [12,13].

A nivel comercial, también existen los fertilizantes químicos llamados de liberación controlada (CRFs) que poseen la capacidad de modular el aporte de los nutrientes [14–17]. El uso de este tipo de fertilizantes permite extender el tiempo de aprovechamiento de los nutrientes, minimizando o evitando concentraciones tóxicas para las plantas con la consecuente disminución de la posibilidad de daño medioambiental permitiendo la degradación por la flora microbiana edáfica [18]. El perfil de liberación del principio activo requerido por las plantas puede modificarse controlando la estructura del material con que se preparan en función de las variables de síntesis [19].

Si, además, los polímeros seleccionados para producir los CRFs son biodegradables y biocompatibles, se elimina la contaminación asociada por el uso de fertilizantes preparados a partir de polímeros sintéticos no biodegradables, que producen una acumulación de residuos en el suelo.

Por otro lado, existe otro tipo de fertilizantes denominados biofertilizantes que tradicionalmente son formulados que incluyen uno o más microorganismos promotores del crecimiento vegetal. Usualmente se comercializan como turbas o líquidos protectores llamados inoculantes [20]. Estas bacterias que se denominan PGPB por sus siglas en inglés (Plant Growth Promoting Bacteria: bacterias promotoras del crecimiento vegetal) mejoran la disponibilidad de nutrientes para las plantas y actúan a través de distintos mecanismos. Estos microorganismos proporcionan una fuente de nutrientes renovable como es el caso de la fijación biológica del nitrógeno, o aumentan la disponibilidad de nutrientes poco móviles del suelo como el fósforo [21–23].

Dentro de los mecanismos de acción, la promoción directa está basada en la producción de fitohormonas y en la mejor provisión de nutrientes a las plantas, destacándose entre este tipo de microorganismos los géneros *Rhizobium* y *Azospirillum*. Indirectamente, algunos microorganismos promueven el crecimiento y la salud de las plantas al suprimir o controlar patógenos, como es el caso de los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus* entre otros [24–26], encontrándose muchas veces efectos superpuestos cuando se utiliza un mismo microorganismo [27].

Su uso en las prácticas agrícolas sustentables es alentado debido a que incrementan el rendimiento de los cultivos, permitiendo reducir la fertilización química de forma parcial o total [28]. En la actualidad, en la Argentina, los biofertilizantes tradicionales son mayormente comercializados como formulaciones líquidas, aplicados a las semillas previamente a la siembra, mientras que en otros países se utilizan las turbas como vehículo de los microorganismos [29].

Si bien las formulaciones líquidas desarrolladas en la última década han logrado mejoras en la calidad del inoculante, existen numerosos inconvenientes relacionados con su aplicación, entre los que se destacan la heterogeneidad en la distribución de los microorganismos sobre las semillas, la pobre protección de las bacterias frente al estrés ambiental en el suelo [30] y además, una elevada susceptibilidad de contaminación. Las turbas, que son materiales orgánicos

complejos, a pesar de ser los soportes más utilizados para inocular semillas de leguminosas con rizobios a nivel mundial [31], poseen una alta variabilidad en su calidad, son propensas a contaminarse, y consecuentemente producen una disminución de la vida útil de los inoculantes afectando la calidad del producto final y su estabilidad durante el almacenamiento [32]. Por ejemplo, Fallik y Okon (1996) encontraron que la concentración celular de *Azospirillum brasilense* en una turba comercial disminuyó de 10^{10} a 10^5 UFC/g (Unidades Formadoras de Colonias) después de seis meses de almacenamiento [33].

En los últimos años se han generado formulaciones de inoculantes secos utilizando polímeros hidrofílicos biodegradables como el alginato, el carragenano, la pectina y el quitosano, entre otros, o utilizando sistemas matriciales no biodegradables preparados con nylon o polietilenimina [29,34–36]. Sin embargo, muchos de estos inoculantes no han llegado a comercializarse en forma masiva, principalmente por su alto costo de producción o porque generan una contaminación asociada al hecho de no ser biodegradables [37].

Como alternativa, se ha explorado el uso de hidrogeles preparados a partir de matrices poliméricas que ya han sido utilizados en numerosas aplicaciones relacionadas con las áreas biomédica, agrícola, ambiental y farmacéutica entre otras [38–45]. Los hidrogeles poseen una estructura tridimensional capaz de retener una gran proporción de agua, soluciones o fluidos biológicos. La estructura tridimensional es consecuencia de las interacciones y/o enlaces entre las cadenas poliméricas, entre los que podemos mencionar: enlaces covalentes, enlaces por puente hidrógeno, interacciones coulómbicas (electrostáticas) y fuerzas de Van der Waals [40,44]. Los hidrogeles se pueden dividir en dos categorías en función de la naturaleza de las uniones presentes en la estructura de la red tridimensional. Los hidrogeles se denominan geles "físicos" si la estructura de la red se debe a interacciones físicas. Estos hidrogeles son reversibles y es posible disolverlos cambiando algunas variables fisicoquímicas como el pH, la fuerza iónica de la solución y la temperatura, entre otros factores [40,44,46]. Los geles "permanentes" o "químicos", son aquellos en los que la red está formada por enlaces covalentes [40,44].

La estructura final de los hidrogeles se puede diseñar para controlar la densidad de entrecruzamiento, lo que permitiría modificar algunas propiedades específicas como la biodegradación, o preparar materiales inteligentes con respuestas controlables para expandir o contraer la red polimérica ante un cambio en las condiciones ambientales externas [40]. La densidad de entrecruzamiento puede ser homogénea o heterogénea dependiendo de las condiciones de reacción, entre las que podemos mencionar el pH, la temperatura y el tiempo de entrecruzamiento, entre numerosas variables experimentales [47]. Dependiendo del grado de entrecruzamiento final, el hidrogel presentará diferentes propiedades mecánicas, podrá modificar su capacidad de absorción de agua y se afectará el comportamiento cinético de liberación del agente activo incorporado, determinando así su potencial aplicación.

La liberación de un agente activo incorporado en un hidrogel polimérico está determinada por la etapa lenta del proceso de transporte del mismo.

Los posibles mecanismos controlantes de este proceso son [48–50]:

- I. **Difusión:** se presenta en sistemas poliméricos tipo reservorio o matriciales originalmente hinchados o en la capa de gel que se produce en matrices originalmente secas cuando éstas se ponen en contacto con un fluido que produce un hinchamiento de la matriz.
- II. **Hinchamiento por solvente:** se verifica en sistemas poliméricos originalmente secos o poco hinchados que tienen incorporado el principio activo. En el primer caso se produce un frente de hinchamiento y en el segundo caso aumenta el grado de hinchamiento de la red polimérica. En estos sistemas la liberación es controlada por un frente móvil del medio de disolución que genera una hidratación de la matriz polimérica. De esta manera se produce un fenómeno de difusión del solvente que genera un proceso de relajación de las cadenas poliméricas permitiendo la difusión del soluto a través de los poros llenos de solvente existentes en el gel generado como consecuencia de la hidratación.
- III. **Degradación de la matriz polimérica:** en estos sistemas la velocidad de liberación depende de la velocidad de degradación del polímero. Esta situación puede ocurrir por reacción química (hidrólisis) o por un fenómeno físico de destrucción lenta de la estructura tridimensional

debida al desacoplamiento de las cadenas (erosión). En el primer caso, el soluto se encuentra unido a la cadena polimérica a través de un enlace que puede romperse por hidrólisis o por actividad enzimática. En el segundo caso, el soluto es liberado a medida que la estructura de la red polimérica se va degradando.

Las matrices poliméricas utilizadas en esta Tesis se encuentran originalmente secas, por lo que el proceso de hinchamiento del material en el suelo húmedo resulta un proceso íntimamente relacionado con el proceso de liberación.

El proceso de hinchamiento es fuertemente dependiente de la composición química de la matriz, de la estructura, densidad de entrecruzamiento y de la morfología de la red tridimensional. Una vez que la matriz polimérica se pone en contacto con el agua, las primeras moléculas hidratarán la parte más polar (grupos hidrofílicos) del polímero dando lugar a una fracción de solvente químicamente unido. Finalmente, el material incluirá una cantidad adicional de agua, conocida como agua libre, que ocupará el espacio entre las cadenas poliméricas y los poros de la estructura de la matriz [44].

Cuando una matriz polimérica entrecruzada se pone en contacto con un fluido, ocurren dos fenómenos que se oponen, las cadenas poliméricas tienden a interactuar espontáneamente con las moléculas del fluido y los entrecruzamientos de la red polimérica tratan de mantener la forma inicial (fuerzas elásticas restrictivas en el interior del gel). El equilibrio de hinchamiento se alcanza cuando ambas fuerzas se igualan [40,44]. Los hidrogeles tienen la capacidad de absorber agua o soluciones acuosas debido a la hidrofiliidad de estos materiales, que normalmente está asociada a la presencia de grupos hidroxilo (-OH), carboxilo (-COOH), amida (-CONH₂), amino (-NH₂) y/o sulfónico (-SO₃H), presentes en la estructura de los polímeros [40,44,46].

El uso de hidrogeles biodegradables como sistemas de liberación controlada de fertilizantes químicos y biológicos, permitiría optimizar el manejo del agua, reducir los costos relacionados con la mano de obra para realizar el riego, minimizar las pérdidas de fertilizante químico, suministrar nutrientes a las plantas durante períodos prolongados, disminuir la frecuencia de aplicación del

agroquímico, minimizar los potenciales efectos negativos asociados con la sobredosificación y la lixiviación. Además, en el caso de los biofertilizantes, la matriz polimérica tiene un efecto protector de las PGPB de los estreses ambientales circundantes y de predadores naturales existentes en el suelo controlando al mismo tiempo su liberación.

Los materiales utilizados para la obtención de hidrogeles pueden ser polímeros sintéticos y/o naturales. Algunos polímeros naturales se pueden utilizar con escaso o nulo tratamiento químico previo o con modificaciones químicas que permiten obtener productos con propiedades diferentes a las originales. El uso de polímeros sintéticos no biodegradables en hidrogeles con potencial aplicación para la liberación controlada de fertilizantes químicos y biológicos es desventajoso porque aumenta el costo final del producto, no son ambientalmente amigables y tampoco son aptos para suelos con altos contenidos de sales [51,52].

Dentro de los biopolímeros más ampliamente usados para la preparación de CRFs se encuentra el quitosano (CS), que es un poliaminosacárido que se encuentra en estado natural en las paredes celulares de algunos hongos e insectos. Sin embargo, su principal fuente de producción es la hidrólisis de la quitina en medio alcalino para lo que usualmente se utiliza hidróxido de sodio o de potasio a elevada temperatura [53,54]. La quitina es el biopolímero más abundante en la naturaleza después de la celulosa. Su mayor fuente natural reside en el caparazón de los crustáceos [53]. Es altamente hidrofóbica e insoluble en agua y en la mayoría de los solventes orgánicos, lo que limita drásticamente su uso [53,54].

El CS es un heteropolisacárido natural catiónico, compuesto por unidades de glucosamina y acetilglucosamina (ver Figura 1.1). El CS es el derivado más importante de la quitina porque presenta propiedades significativamente diferentes.

Este biopolímero es antimicrobiano, no tóxico, hidrofílico, bioestimulador de semillas, biocompatible y biodegradable. Estas características son

fundamentales para su uso como materia prima en la producción de matrices poliméricas con fines agrícolas [54,55]. El quitosano es un bioestimulador porque produce una respuesta favorable en la defensa de la plantas [56], así como también ante las infecciones por patógenos [57]. El proceso industrial más utilizado para la obtención de CS es mediante la desacetilación de la quitina (Figura 1.2), lo que incrementa su costo limitando su aplicación como matriz polimérica en el desarrollo de CRFs [60].

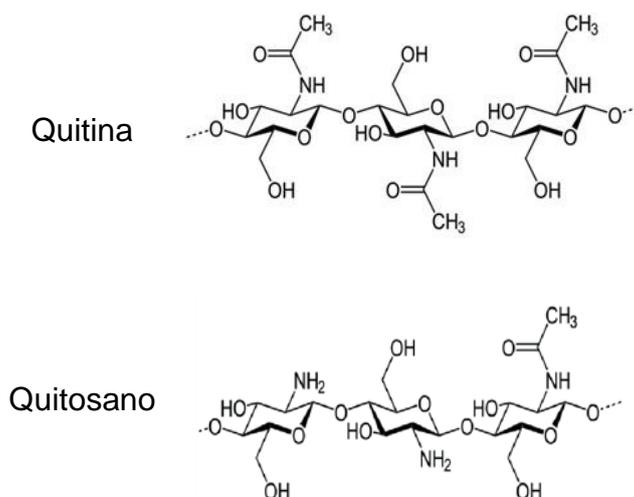


Figura 1.1. Estructura química de la quitina y del quitosano [58].

El CS posee grupos amino e hidroxilo reactivos aptos para ser modificados químicamente. El porcentaje de grupos amino que quedan libres en la molécula de CS es lo que se denomina grado de desacetilación (DD) el cual está estrechamente vinculado con su solubilidad e hidrofiliidad. Es un polielectrolito catiónico debido a la presencia de los grupos amino ($pK_a = 6,2$ a $7,0$) [59]. La protonación de los grupos amino del CS en medio ácido le confiere la posibilidad de reaccionar con compuestos polianiónicos, interactuar con superficies cargadas negativamente o producir quelatos con iones metálicos [60].

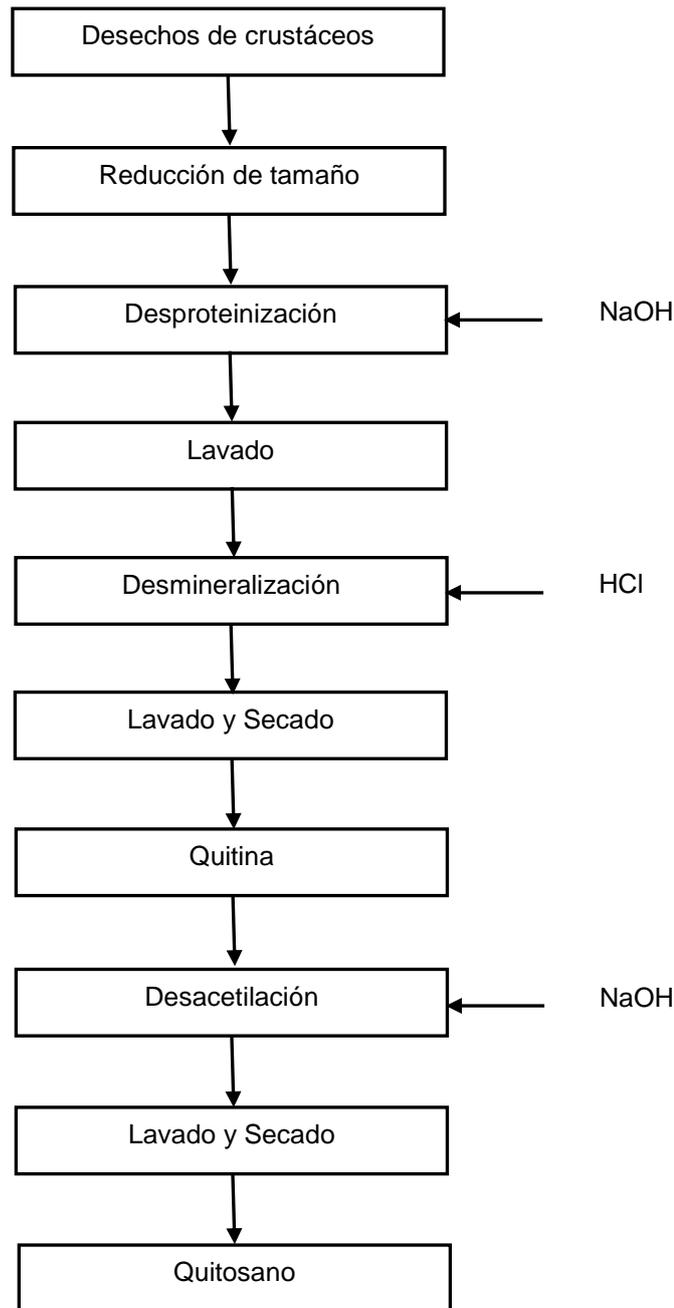


Figura 1.2. Diagrama de flujo simplificado para la obtención de quitosano a partir de quitina [61].

Otro biopolímero, que en esta Tesis se ha seleccionado para el desarrollo de matrices poliméricas con características aptas para ser utilizado en la preparación de fertilizantes, es el almidón (ST). También es un polisacárido natural, de bajo costo que se encuentra presente en granos, semillas y tubérculos de las plantas como compuesto energético de reserva, presentando en su característica granular varias formas y tamaños que dependen

básicamente de la fuente [65–67]. Su composición química es la de un polisacárido formado únicamente por unidades glucosídicas, es decir que es una macromolécula formada por gran cantidad de moléculas de anhidroglucosa que se repiten [65–67].

Los gránulos de almidón están compuestos por dos componentes principales de D-glucopiranososa en su estructura, la amilopectina y la amilosa cuya proporción es variable y depende de la fuente del almidón [62,63].

La amilopectina es un polisacárido altamente ramificado. Las ramificaciones están unidas a la cadena polimérica principal por enlaces α -D-(1→6), localizadas cada 20-30 unidades lineales de glucosa y constituyen aproximadamente el 5 % del total en la estructura, mientras que el resto de la cadena se encuentra unida mediante el enlace glucosídico α -D-(1→4) (ver Figura 1.3). La amilopectina es la responsable de la alternancia entre zonas amorfas y cristalinas por la presencia del enlace α -D-(1→6) [62,64].

La amilosa es un α -D-(1→4)-glucano con una estructura esencialmente lineal formada principalmente por unidades de α -D-glucopiranososa unidas por medio de enlaces α -(1→4) [65], con cadenas que poseen entre 200 a 2500 unidades monoméricas y pesos moleculares que van de cien mil hasta un millón [66].

El contenido de amilosa en el almidón oscila entre 15 y 30%.

El almidón es insoluble en agua a temperatura ambiente, pero por calentamiento en un medio acuoso sufre un proceso denominado gelatinización. Para este proceso se requiere un porcentaje de agua mayor al 30 % y una temperatura entre 60 y 75 °C, valor que depende de la fuente de origen del almidón. El fenómeno es originado por la ruptura de los enlaces de hidrógeno en las cadenas del almidón. Como consecuencia del mencionado proceso, la amilosa sale del gránulo y permite la entrada de moléculas de agua a los espacios entre las cadenas de amilopectina, quedando los grupos OH más expuestos para interaccionar con el agua. Cuando la temperatura alcanza un valor comprendido entre 60 y 75 °C (dependiendo de la fuente del almidón), comienza un proceso

que provoca un aumento en el desorden de las macromoléculas y consecuentemente una pérdida de la cristalinidad de forma irreversible. Este proceso permite aumentar la viscosidad logrando la solubilización del almidón y la formación del gel [66,67].

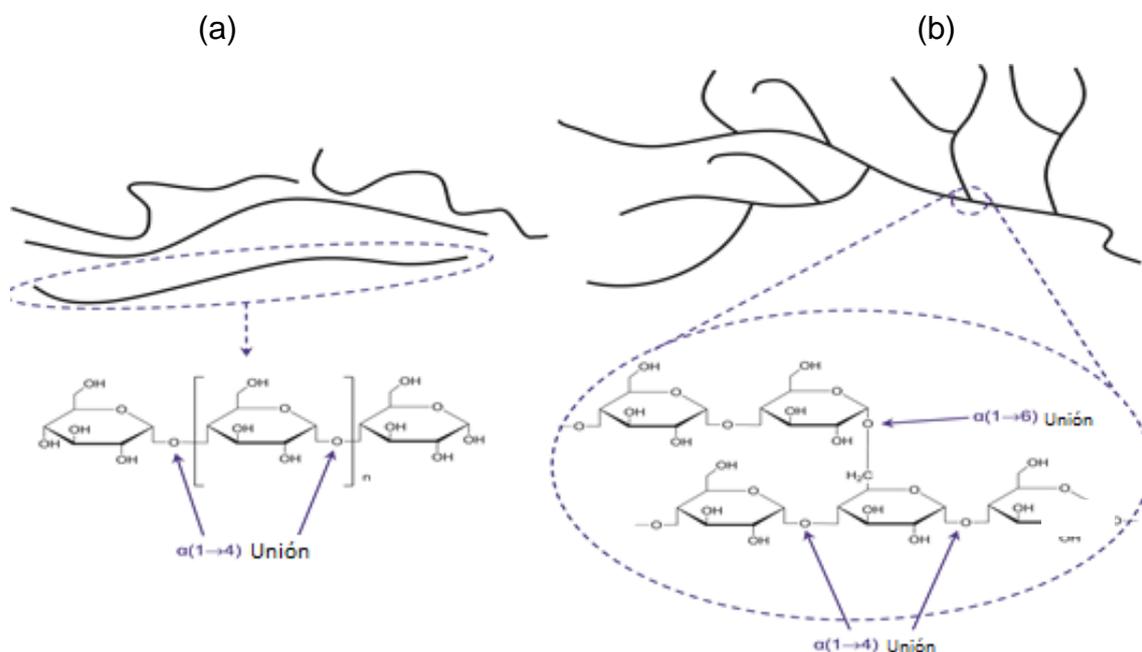


Figura 1.3. Diagrama esquemático de la estructura de (a) la amilosa y (b) de la amilopectina [64].

Cuando el sistema almidón-agua ya gelificado se enfría, los enlaces de hidrógeno entre las cadenas del polímero y las moléculas de agua se reemplazan con enlaces de hidrógeno entre las cadenas poliméricas. A nivel molecular, este proceso de reasociación se denomina retrogradación. De esta manera las cadenas macromoleculares se reordenan produciendo zonas cristalinas debido a la formación de enlaces de hidrógeno entre las mismas [67].

En esta Tesis también se explora el uso de un polímero sintético para la preparación de una matriz polimérica adecuada para generar un sistema de liberación controlada de fertilizantes químicos y biológicos. Se seleccionó al alcohol polivinílico (PVA) porque es un polímero hidrofílico, biodegradable y biocompatible. Debido a estas características se ha utilizado en diferentes campos de investigación, como el sector farmacéutico, biomédico, y agronómico, entre otros [68–71]. El PVA tiene una estructura química relativamente simple

con grupos hidroxilo de fácil acceso (Figura 1.4) [72]. La naturaleza hidrofílica del polímero se debe a la presencia de estos grupos hidroxilo y es considerada una característica clave ya que es también responsable de la versatilidad química inusual del PVA.

A través de estos grupos ocurre la interacción con cadenas poliméricas laterales con diversas características químicas y físicas, proporcionando la posibilidad de modificar la hidrofiliidad de la cadena polimérica y la generación de diversas estrategias de entrecruzamiento [72,73].

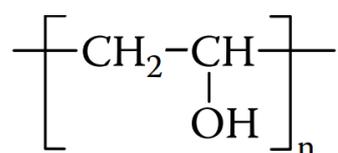


Figura 1.4. Estructura química del ségmero del PVA [68].

El monómero del PVA es el alcohol vinílico, pero el mismo no existe en una forma estable, debido a su tautómero, el acetaldehído. Por lo tanto, industrialmente el PVA se produce a partir de la polimerización por radicales libres del acetato de vinilo, obteniéndose el poliacetato de vinilo (PVAc) [68,74]. El PVA se obtiene finalmente a través de la hidrólisis alcalina del PVAc (Figura 1.5). Esta reacción normalmente no es completa, por lo tanto, la estructura del PVA posee numerosos grupos hidroxilos y una menor proporción de grupos acetatos. Esta proporción entre grupos hidroxilos y acetatos se denomina grado de hidrólisis, el cual mide la extensión de la reacción de alcóholisis. Es por esta razón que el PVA siempre se considera como un copolímero. El grado de hidrólisis, es un parámetro importante que determina las propiedades químicas y mecánicas, la solubilidad, y la cristalinidad del PVA [73,75].

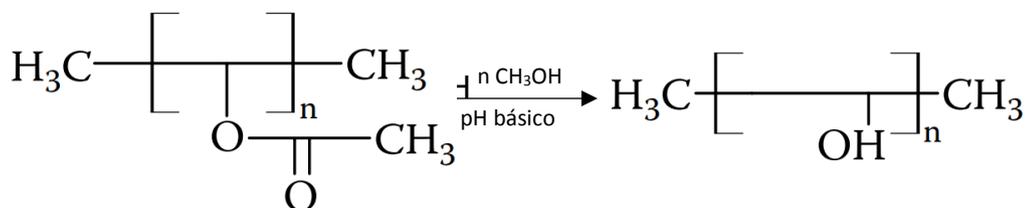


Figura 1.5. Diagrama esquemático de la obtención del PVA.

El desarrollo de nuevas matrices poliméricas biodegradables de liberación controlada de biofertilizantes (CRBs) y de fertilizantes químicos (CRFs) presenta

un enorme desafío desde el punto de vista científico, productivo y comercial respecto al reemplazo de los productos comerciales existentes en el mercado.

Los CRBs y los CRFs resultan útiles si: tienen la capacidad de liberar los activos encapsulados de manera controlada y efectiva en el tiempo de crecimiento de las plantas, son sencillos de manipular y aplicar con maquinaria agrícola de siembra convencional y fundamentalmente, se puede asegurar la estandarización de su calidad.

En el caso particular de los biofertilizantes, es necesario diseñar una matriz polimérica que proteja al microorganismo del estrés ambiental y permita su almacenamiento a temperatura ambiente por períodos prolongados asegurando la sobrevivencia de altos títulos bacterianos.

En esta Tesis se exploró la posibilidad de utilizar hidrogeles biodegradables en forma de esferas preparadas a partir de mezclas binarias de quitosano, almidón y alcohol polivinílico (CS/ST y CS/PVA) como sistemas de liberación controlada de fertilizantes de gran interés tecnológico en la industria agroquímica.

La presencia del CS en la red polimérica resulta imprescindible porque le confiere al material la posibilidad de generar hidrogeles entrecruzados iónicamente utilizando en la preparación de las esferas una solución acuosa de tripolifosfato de sodio (STPP) como entrecruzante iónico. Para ello se utiliza una metodología simple, sencilla y no contaminante que se desarrolla a temperatura ambiente.

El entrecruzamiento físico por interacción electrostática que se ha seleccionado, en lugar de utilizar agentes de entrecruzamiento químico como el glutaraldehído, el etilenglicol, el diglicidil éter o la genipina entre otros (agentes entrecruzante químicos normalmente empleados para la preparación de hidrogeles de CS), resulta fundamental porque evita los potenciales efectos adversos relacionados con la toxicidad del entrecruzante químico residual [76].

La interacción entre el STPP y el quitosano es altamente dependiente del pH. En el caso de utilizar un pH ácido se obtienen matrices poliméricas con una mayor

densidad de entrecruzamiento, debido a que el grupo amino del CS se encuentra protonado y disponible para interactuar con el ion polifosfórico, lo que daría como resultado una estructura más compacta (ver Figura 1.6 a) [77]. Si en cambio se realiza el entrecruzamiento a pH básico, el CS produciría una estructura más abierta con un entrecruzamiento iónico menor que a pH ácido (ver Figura 1.6 b) [77] que produce una estructura óptima para una aplicación agroquímica debido a que se limita el entrecruzamiento iónico.

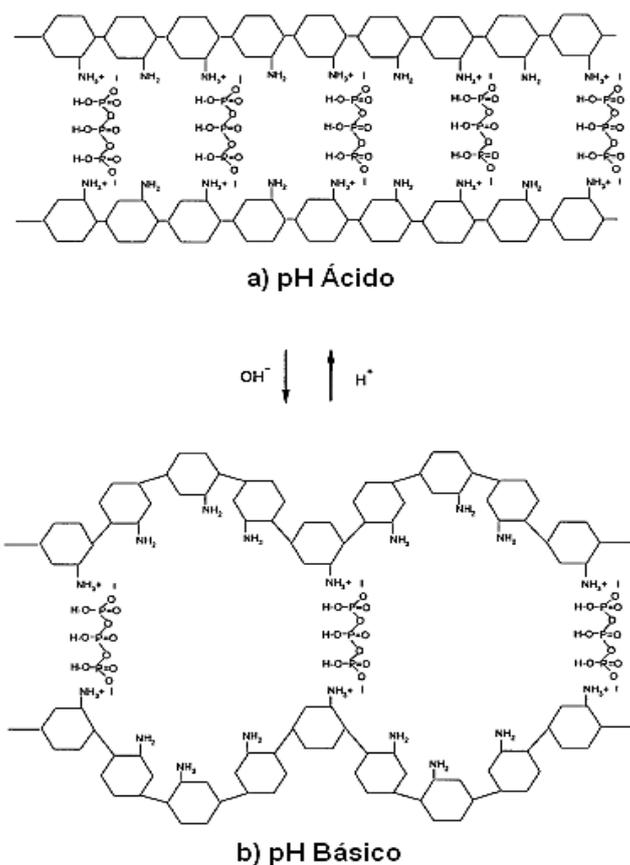


Figura 1.6. Estructura propuesta por Mi et al. para la interacción entre CS y STPP en: a) medio ácido y b) medio básico [77].

Como las matrices preparadas tienen por objetivo ser utilizadas como fertilizantes y biofertilizantes de liberación controlada, se seleccionó trabajar con una solución de STPP a pH básico (8,6). Este pH se obtiene como consecuencia de la hidrólisis de la sal de STPP en agua. Este pH se mantiene durante la preparación de las macroesferas asegurando la presencia de los dos tipos de iones (OH^- y $\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$) que compiten entre sí para reaccionar con el grupo amino protonado del CS (Figura 1.7) [78].

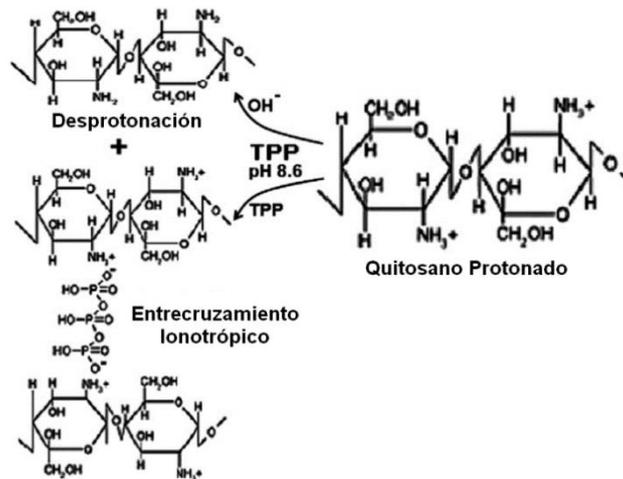


Figura 1.7. Mecanismo de interacción del CS y el STPP a pH 8,6 [78].

Muchos estudios ya han investigado la preparación de hidrogeles en forma de esferas usando CS y STPP bajo diversas condiciones de concentración, peso molecular de quitosano, pH, concentración de solución de STPP y tiempo de entrecruzamiento [76,79–81]. También se ha reportado el uso de matrices poliméricas preparadas con CS solo y/o con otros biopolímeros, entrecruzados con diferentes agentes entrecruzantes en forma de esfera, para diferentes aplicaciones relacionadas con la liberación controlada. A continuación se explicitan algunos de los resultados:

- a) Ibezim y col. (2011) prepararon microesferas de CS/STPP entrecruzadas iónicamente para la liberación controlada de pirimetamina [82]. Los análisis realizados con Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR) y con Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) confirmaron la presencia de pirimetamina en las microesferas, logrando encapsular hasta un 99 % m/m en las matrices que presentaron el mayor grado de hinchamiento.
- b) Shu y Zhu (2000) prepararon microesferas de CS, gelatina, y alginato utilizando STPP como entrecruzante (entrecruzaron la matriz a pH ácido y básico) para la liberación controlada de isotiocianato de fluoresceína acoplado a dextrano [83]. Obtuvieron una estructura con una composición uniforme y con una eficiencia en la carga de la droga mayor al 90 %. Debido a que el entrecruzamiento iónico se incrementa a pH bajos, el

tiempo de entrecruzamiento y el pH afectaron significativamente la liberación del fármaco. Verificaron que, a mayor tiempo de entrecruzamiento, el grado hinchamiento es menor debido a la formación de una estructura más rígida.

- c) Kumari y Rani prepararon microesferas de CS/ST entrecruzadas con glutaraldehído para la liberación controlada de clorhidrato de metformina [84]. Analizando los difractogramas de rayos X, observaron que el CS aumentó la cristalinidad del almidón y que el grado de hinchamiento dependió de la composición polimérica utilizada en la producción de las microesferas. Encontraron que, a mayor porcentaje de almidón, el porcentaje de fármaco liberado se incrementaba.

El elevado costo de las esferas de CS/STPP mencionadas en el ítem a), limita su aplicación como sistemas de liberación de fertilizantes en la agroindustria. Para abordar este inconveniente, en esta Tesis se usarán mezclas poliméricas compatibles preparadas con CS en bajas proporciones (del 20 a 40 % m/m) y ST de papa o PVA. Estos dos últimos se seleccionaron por ser económicos, biodegradables, biocompatibles, hidrofílicos y no tóxicos.

Hasta el momento no se han reportado en la literatura estudios sobre la influencia de la composición polimérica y del tiempo de entrecruzamiento en: las propiedades térmicas, la estructura, la cinética de hinchamiento y la velocidad de liberación de fertilizantes químicos y biológicos de sistemas de liberación que utilizan macroesferas preparadas con hidrogeles de quitosano/almidón o quitosano/alcohol polivinílico entrecruzados iónicamente con STPP.

El control de estas propiedades podría dar lugar a protocolos de preparación aptos para el diseño de matrices de CS/ST y CS/PVA como sistemas de liberación controlada de fertilizantes químicos y biológicos de acuerdo con requerimientos específicos.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar la potencial aplicación de hidrogeles biodegradables en forma de macroesferas (beads) basadas en mezclas poliméricas de quitosano y almidón, o de quitosano y alcohol polivinílico, para su uso en el área agronómica como fertilizantes químicos o biológicos de liberación controlada.

Objetivos específicos

1. Identificar la aplicabilidad de diferentes protocolos experimentales para la preparación de los dispositivos de liberación (macroesferas) en función de la composición final de la mezcla polimérica, del mecanismo y tiempo de entrecruzamiento responsable de la formación de las esferas y del tipo de fertilizante a incorporar.
2. Determinar la estructura, la morfología y las características térmicas de las diferentes macroesferas preparadas.
3. Determinar, para las macroesferas preparadas, la capacidad de absorción de agua, de solución acuosa de fertilizante químico (KNO_3) o de inóculos bacterianos preparados con dos bacterias PGPB seleccionadas (*Azospirillum brasilense* y *Pseudomonas fluorescens*) de manera independiente o conjunta.
4. Evaluar la aplicabilidad de las macroesferas como fertilizante, químico o biológico, de liberación controlada.

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

En este capítulo se detallan los métodos utilizados para el desarrollo experimental de este trabajo. Se describen la metodología para la preparación de los hidrogeles, las diferentes técnicas de caracterización empleadas, el procedimiento para evaluar la cinética de hinchamiento de los hidrogeles y la liberación de los diferentes agentes activos incorporados en las matrices poliméricas.

MATERIALES

Las materias primas utilizadas en esta investigación para desarrollar las matrices poliméricas fueron:

1. Quitosano en polvo de masa molar media con un grado de desacetilación del 81 %, viscosidad de 687 cP (Sigma-Aldrich, Estados Unidos).
2. Almidón de papa en polvo (Sigma-Aldrich, Estados Unidos).
3. Alcohol polivinílico de alto peso molecular (85.000 a 124.000 g/mol), 99 % de hidrólisis (Sigma-Aldrich, Estados Unidos).
4. Tripolifosfato de sodio en polvo, 85 % de pureza. Sigma-Aldrich (Estados Unidos).
5. Ácido láctico en solución acuosa al 90% v/v (Laboratorios Cicarelli, Argentina).

Activos encapsulados

1. Nitrato de potasio: se utilizó como fertilizante químico modelo debido a su sencilla detección conductimétrica, pureza del 97 % (Laboratorios Cicarelli, Argentina).
2. Microorganismos: se utilizaron como bacterias promotoras de crecimiento vegetal *Azospirillum brasilense* Az39 y *Pseudomonas fluorescens* ZME4. Fueron provistas por el Laboratorio de Bioquímica Vegetal y Microbiana de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad de Mar del Plata.

Materiales utilizados en la preparación de las muestras para SEM

1. Etanol (99,5 % de pureza) y acetona (99,9 % de pureza) (Sigma-Aldrich, Estados Unidos): se emplearon para la deshidratación de las matrices poliméricas cargadas con los microorganismos encapsulados.
2. Solución acuosa de glutaraldehído, 25 % m/v (Sigma-Aldrich, Estados Unidos). Se utilizó para fijar los microorganismos en la matriz polimérica.

Todos los materiales utilizados fueron de grado analítico.

El agua desionizada utilizada en todas las preparaciones se obtuvo a partir de un sistema de purificación Millipore Simplicity con una resistividad de 18 MΩ cm.

MÉTODOS

Método de preparación de los materiales poliméricos

Preparación de los hidrogeles

Solución de quitosano: se obtuvo agregando el polímero en polvo sobre una solución acuosa de ácido láctico al 1 % m/m bajo agitación mecánica a temperatura ambiente. Se utilizó la masa de polímero necesaria para que la concentración final fuera igual a 3 % m/m de CS.

Gel de almidón: el gel se preparó adicionando la suficiente cantidad de ST sobre agua desionizada de manera que la concentración final fuera del 8 % m/m. Luego, se calentó bajo agitación constante a 78 °C, hasta la gelatinización.

Gel de alcohol polivinílico: el gel se obtuvo agregando una masa de PVA sólido sobre agua desionizada asegurando que la concentración final de PVA fuera igual a 15 % m/m.

Posteriormente, se calentó bajo reflujo y con agitación magnética constante durante aproximadamente dos horas hasta lograr su disolución.

Solución de entrecruzante iónico: se preparó una solución de tripolifosfato de sodio adicionando la masa necesaria de sal al agua desionizada con agitación magnética hasta obtener una concentración final de 1 % m/m.

Solución de hidróxido de sodio: se preparó una solución de NaOH 2M para la preparación de macroesferas utilizando el fenómeno de coagulación.

Preparación de las macroesferas

Se prepararon 3 tipos de macroesferas:

1. *Macroesferas de quitosano:* se formaron utilizando la solución de CS.

2. *Macroesferas de quitosano/almidón*: se prepararon a partir de mezclas de la solución de CS y del gel de ST con una proporción en masa final igual a 20/80 o 30/70 % m/m (quitosano/almidón).
3. *Macroesferas de quitosano/alcohol polivinílico*: se obtuvieron con mezclas de la solución de CS y del gel de PVA con una composición final de 30/70 o 40/60 % m/m (quitosano/alcohol polivinílico).

En todos los casos se utilizó un agitador mecánico Biotraza OS40-PRO durante 30 minutos a 300 rpm para la preparación de la solución de quitosano o de las mezclas poliméricas a temperatura ambiente.

Las macroesferas se obtuvieron empleando una técnica de goteo del material polimérico sobre la solución del entrecruzante iónico utilizando agitación magnética. El tiempo de contacto con la solución de STPP se estableció en dos (2) y cuatro (4) horas.

La velocidad de goteo y el tamaño final de la macroesfera se reguló en función del diámetro de la boquilla, que se seleccionó en función de la composición de la matriz polimérica empleada (CS solo, CS/ST o CS/PVA) de manera de que el diámetro de todas las macroesferas obtenidas tuviera la menor dispersión posible.

Una vez obtenidas las macroesferas, se secaron en una estufa de vacío FAC (Argentina) a 40 °C hasta alcanzar peso constante.

El material preparado utilizando STPP a partir de CS o de las mezclas de CS/ST y CS/PVA con diferentes tiempos de entrecruzamiento se designó como: CS-2, CS-4, CS2ST8-2, CS2ST8-4, CS3ST7-2, CS3ST7-4, CS3PVA7-4, CS4PVA6-2 y CSPVA6-4 respectivamente (ver Tabla 1). El número 2 o 4 ubicado después del guion, corresponde al tiempo de entrecruzamiento en horas. A las matrices poliméricas seleccionadas para ser usadas como soporte en los sistemas de liberación de fertilizantes biológicos se le asignó la letra E al final del nombre de las muestras. Las macroesferas seleccionadas para preparar los biofertilizantes se identifican porque luego del tiempo de entrecruzamiento aparece ES.

Finalmente, todas las macroesferas secas preparadas sin el activo a liberar, se lavaron sumergiéndolas en abundante agua desionizada usando un lavador

ultrasónico. El objetivo de este lavado fue eliminar el STPP residual. Al finalizar el lavado se secaron nuevamente en una estufa de vacío a 40°C hasta alcanzar peso constante.

En el caso de las macroesferas que fueron utilizadas para incorporar las bacterias, luego del segundo secado se sometieron a un procedimiento de esterilización en autoclave a gas tipo Chamberland VZ 500 (Argentina) durante 20 min a 120 °C y 1 atm (ver Tabla 1.1) antes de la incorporación de las mismas.

En la Tabla 2.1 se resume la nomenclatura asignada en función de las condiciones de preparación (composición, tiempo de entrecruzamiento y proceso de obtención) para la totalidad de las macroesferas obtenidas.

Tabla 2.1 Composición de las macroesferas y tiempo de entrecruzamiento empleado.

Nombre de las Muestras	Composición (% m/m)*			Tiempo de entrecruzamiento
	CS	ST	PVA	(horas)
CS-2	100	0	0	2
CS-4	100	0	0	4
CS2ST8-2	20	80	0	2
CS2ST8-4	20	80	0	4
CS3ST7-2	30	70	0	2
CS3ST7-4	30	70	0	4
CS2ST8-2ES	20	80	0	2
CS3PV7-4	30	0	70	4
CS4PV6-2	40	0	60	2
CS4PV6-4	40	0	60	4
CS3PV7-4ES	30	0	70	4

* Composición final m/m alcanzada una vez que se obtuvieron las muestras secas.

Técnicas de caracterización

La caracterización de las propiedades fisicoquímicas de los materiales es fundamental para evaluar su aplicación. En esta sección se describen las técnicas experimentales utilizadas en la caracterización de las macroesferas.

Análisis reológico dinámico

El análisis de reología dinámica es útil para estudiar los cambios microestructurales producidos por las interacciones entre las cadenas poliméricas o debido al proceso de gelificación [85].

Los ensayos reológicos se realizaron utilizando un reómetro Paar Physica MCR 300 (Stuttgart, Alemania) equipado con un baño termostático con agua circulante para mantener la temperatura de las muestras a $25 \pm 0,5$ °C. Se utilizó la geometría de platos paralelos.

Las muestras fueron desgasificadas previamente y luego se ubicaron sobre el plato inferior donde se mantuvieron durante 10 minutos para alcanzar el equilibrio térmico y mecánico antes de realizar cada experimento. En todas las experiencias se colocó suficiente cantidad de muestra en la plataforma de manera de cubrir completamente el área ubicada entre los platos con un espesor de al menos 1 mm. Se mantuvo la humedad relativa alrededor de la muestra, utilizando un recipiente circular que rodea la plataforma de medición. De esta manera, se evitó la evaporación del agua que conllevaría a la variación de los parámetros reológicos medidos.

Las funciones reológicas obtenidas en los ensayos dinámicos oscilatorios deben ser medidas dentro del rango viscoelástico lineal (dentro del cual se verifica que la relación entre la tensión aplicada y la deformación son proporcionales) porque de esta manera los valores experimentales son independientes de la magnitud de la fuerza aplicada, de la magnitud de la deformación y de la velocidad de aplicación de la misma. Se fijó una temperatura de medición (25 °C) y se realizó

un barrido de esfuerzo (0 a 35 Pa) a una frecuencia fija (2,5 Hz) para determinar el rango viscoelástico lineal (RVL).

Una vez elegida la deformación (deformación constante de 0,1 %) que asegure un comportamiento viscoelástico lineal, se realizó un barrido de frecuencia de 0,1 a 100 rad/s. En los espectros realizados se registraron el módulo elástico o módulo de almacenamiento dinámico (G') y el módulo viscoso o módulo de pérdida (G'') en función de la frecuencia de oscilación. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado y cada muestra se midió por duplicado como mínimo.

Microscopía electrónica de barrido (SEM) y espectroscopía de energía dispersiva de rayos X (EDS).

Esta técnica otorga información de la topología superficial de la muestra analizada de una manera rápida con un costo adecuado. Las microscopías producen imágenes ampliadas y con la EDS se obtiene información *in situ* de la composición química de los materiales orgánicos e inorgánicos.

El equipo puede operar con alto vacío correspondientes a un ambiente muy seco (SEM). Se produce un haz de electrones de alta energía que produce la formación de imágenes y posibilita el análisis químico [86].

Microscopía electrónica de barrido (SEM): Las macroesferas se fijaron a la superficie del portamuestras mediante una cinta doble faz. La observación de las muestras secas previamente metalizadas con oro, se realizó utilizando un microscopio electrónico de barrido a alto vacío Karl Zeiss Supra 40 (Alemania), con cañón de electrones por emisión de campo operado a 3 kV y con una resolución de 2 nm.

Para la realización de las micrografías de las macroesferas con los microorganismos encapsulados, se necesitó fijar las bacterias empleando una solución acuosa de glutaraldehído (5 % v/v) durante 5 horas. Después las matrices poliméricas se sometieron a un proceso de deshidratación de varias

etapas. En cada una de ellas, las muestras se sumergieron durante una hora en distintas soluciones de etanol/agua, partiendo de una concentración inicial de 25/75 % hasta llegar al 100/0 % (etanol/agua, respectivamente). Por último las macroesferas fueron deshidratadas hasta llegar al punto crítico empleando para ello un secador Autosandri-810 con dióxido de carbono líquido como fluido de transición.

Espectroscopía de energía dispersiva de rayos X (EDS): Se utilizó un microscopio electrónico de barrido Karl Zeiss Supra 40 (Alemania) que posee un EDS-detector, Oxford Instruments Ltd, UK. El análisis EDS se realizó en el modo de detección semicuantitativa y el voltaje de aceleración utilizado fue de 20kV.

Difracción de rayos X (XRD)

Es una técnica que permite analizar el porcentaje de cristalinidad de una muestra empleando rayos X. Para generar este tipo de radiación se usa un cátodo emisor de electrones constituido por un filamento (Cu, Mo, Fe, Ni, Ag o W) calentado eléctricamente a muy alta temperatura. Los electrones emitidos son concentrados por un colimador y acelerados hacia el ánodo. Al incidir sobre este último, los electrones son desacelerados rápidamente, y su energía cinética se convierte parte en calor y parte en radiación de rayos X [87].

Los ensayos se realizaron usando las muestras en polvo con un difractómetro equipado con un goniómetro horizontal Rigaku D/max con geometría de Bragg-Bentano y radiación $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda=0.1542$ nm), en el rango $2\theta= 5-50^\circ$ con una potencia de 40Kv/20m Å y una velocidad de 5 °/min.

Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)

Este método óptico estudia la interacción entre la radiación infrarroja y la materia. Es una técnica apropiada para verificar en los materiales la existencia de interacciones inter e intramoleculares entre distintos grupos funcionales [88].

Los espectros de FTIR fueron obtenidos con un espectrofotómetro FTIR Nicolet 380, Thermo Scientific (Estados Unidos). Para tal fin, se prepararon pastillas por compresión del polvo formado por una parte de muestra y veinte partes de KBr espectroscópico. Cada espectro se adquirió con 40 barridos entre 400 y 4000 cm^{-1} con una resolución de 4 cm^{-1} .

Resonancia magnética nuclear (RMN)

La espectroscopía de resonancia magnética nuclear en soluciones o en sólidos, es una poderosa herramienta utilizada para la elucidación estructural de compuestos moleculares mediante la caracterización de los desplazamientos químicos, los acoplamientos y las intensidades relativas de los picos de resonancia [89].

Se utilizó un espectrómetro Bruker 176 Avance II-300 (Estados Unidos). Los espectros de alta resolución de ^{31}P y ^{13}C fueron obtenidos empleando la técnica de polarización cruzada (CP) para $\{^1\text{H}\} \rightarrow \{^{13}\text{C}\}$ y $\{^1\text{H}\} \rightarrow \{^{31}\text{P}\}$, y rotación en el ángulo mágico (Magic Angle Spinning = MAS) con desacople de protones durante la adquisición de datos.

La glicina fue usada como referencia externa para la determinación de los espectros y para fijar la condición de Hartmann-Hahn (cruce de señales) en los experimentos de CP. El tiempo de reciclado fue de 4 s y el tiempo de contacto durante la CP se ubicó entre 200–1500 μs . En todos los casos se utilizó una frecuencia de 10 kHz.

Análisis térmico

El análisis térmico engloba una serie de técnicas que permiten evaluar determinadas propiedades físicas y químicas de una muestra cuando se somete a un programa de calentamiento [90]. En este trabajo se utilizaron calorimetría diferencial de barrido y termogravimetría para analizar la influencia del método de preparación de las macroesferas en el comportamiento térmico.

Calorimetría diferencial de barrido (DSC): Con esta técnica se pueden determinar calores específicos, así como puntos de ebullición, fusión y cristalización, pureza de compuestos cristalinos, entalpías de reacción y otras transiciones de primer y segundo orden [90].

Se utilizó un Calorímetro Shimadzu, modelo DSC-60 Plus (Japón). El compartimento donde se coloca la muestra se purgó con nitrógeno a una velocidad de flujo de 30 mL min⁻¹ y como referencia se utilizó una cápsula vacía y sellada de aluminio. La velocidad de calentamiento fue de 10 °C min⁻¹. El rango de temperatura barrida fue de 25 a 350 °C. Las cápsulas de aluminio utilizadas para el análisis dentro de la celda del DSC se prepararon con aproximadamente 5,00 mg de muestra previamente seca y molida.

Análisis termogravimétrico (TGA): En este análisis se registran de manera continua las variaciones en función del tiempo o en función de la temperatura de la masa de una muestra expuesta a una atmósfera controlada [90]. En este trabajo los termogramas fueron registrados en función de la temperatura, con lo cual los cambios observados en la pendiente se asocian con la degradación del material. La derivada de la curva resultante del análisis termogravimétrico, permite determinar los puntos de inflexión (temperatura correspondiente a la velocidad máxima de degradación) para cada zona de pérdida de masa [90].

En el análisis termogravimétrico se utilizó un equipo Shimadzu, modelo TGA-50 (Japón). Se colocaron aproximadamente 10,00 mg de muestra seca y pulverizada dentro de una cápsula de aluminio, la cual fue sellada y perforada antes de la medición para permitir la salida de gases y de los productos de descomposición. Las muestras se calentaron a una velocidad de 10 °C min⁻¹ desde 25 hasta 500 °C en una atmósfera inerte, con una velocidad de flujo de 30 mL min⁻¹.

Fracción soluble

Para obtener la fracción soluble de las macroesferas entrecruzadas secas obtenidas luego de las etapas ya descritas en el ítem de obtención de las

matrices, se puso en contacto una masa determinada de material polimérico con agua desionizada durante 5 horas. Luego, el material hidratado se colocó en una estufa MCH (Argentina) a 30 °C durante 48 horas hasta masa constante.

La fracción soluble se definió como la relación entre la masa perdida como consecuencia de la inmersión en agua del material (m_f) y la masa inicial del material seco antes de la inmersión (m_0).

$$\% \text{ de la fracción soluble} = \left(1 - \frac{m_f}{m_0}\right) * 100 \quad (\text{Ec. 2.1})$$

Grado de hinchamiento de los materiales (“Swelling”)

El grado de hinchamiento de equilibrio permite evaluar la máxima cantidad de agua o fluido que puede incorporarse en la matriz polimérica.

Teniendo en cuenta que la carga de nitrato de potasio o de microorganismos se realizará por absorción de soluciones acuosas, esta información permitirá determinar la cantidad máxima de agente activo que se puede incorporar.

Hinchamiento con agua desionizada: en este tipo de ensayo, la matriz polimérica es expuesta a un fluido hasta alcanzar el equilibrio. Experimentalmente se pueden determinar dos grados de hinchamiento. El primero corresponde a la relación entre el volumen de la matriz polimérica hinchada con el solvente respecto al volumen de la matriz seca y el otro corresponde a la relación en masa entre el solvente incorporado en la matriz originalmente seca y el material polimérico seco [44,91].

En todos los ensayos de hinchamiento realizados en esta investigación se utilizó el método gravimétrico. Como fluido de hinchamiento se seleccionó agua desionizada obtenida de un equipo Millipore Simplicity cuyo pH se midió con un peachímetro marca Hanna Instrument, modelo Hi 2216 pH/ORP/ISP meter.

Las muestras secas se pesaron y después se colocaron en un recipiente con suficiente cantidad de agua desionizada a temperatura ambiente (25 °C). Las muestras hidratadas se pesaron a tiempos predeterminados después de remover el exceso de agua de la superficie con papel filtro. Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado. El grado de hinchamiento porcentual (Q_m) para cada muestra a un tiempo determinado (t) fue calculado con la siguiente ecuación:

$$Q_m = \frac{m_f - m_0}{m_0} * 100 \quad (\text{Ec. 2.2})$$

donde m_f es el peso de la muestra a un tiempo t y m_0 es el peso inicial del material seco.

Los valores experimentales del grado de hinchamiento en función del tiempo se pueden ajustar con la ecuación semiempírica tipo ley de potencia (ec. 2.3) que ha sido usada en numerosas publicaciones [92–94].

$$\frac{Q_{mt}}{Q_{m\infty}} = k t^n \quad (\text{Ec. 2.3})$$

reagrupando:

$$Q_t = k' t^n \quad (\text{Ec. 2.4})$$

donde Q_{mt} es el grado de hinchamiento másico al tiempo t ; $Q_{m\infty}$ es el grado de hinchamiento a tiempo infinito (grado de hinchamiento máximo); k es una constante de velocidad de absorción que involucra las características estructurales y geométricas de la matriz polimérica; k' es una constante que resulta del producto de k y $Q_{m\infty}$; t es el tiempo y n es un exponente característico que describe el mecanismo que gobierna el proceso de incorporación del solvente.

Para una geometría de la matriz polimérica esférica, como la utilizada en esta investigación, si n tiene un valor de 0,43 el mecanismo controlante de incorporación de solvente es la difusión del fluido de hinchamiento en la matriz

polimérica (proceso fickiano), si $n \geq 0,85$ el mecanismo limitante es la relajación de las cadenas poliméricas y si $0,43 < n < 0,85$ ambos procesos, el de difusión y el de relajación, influyen en el hinchamiento por solvente porque ocurren en escalas de tiempo comparables y el mecanismo controlante recibe el nombre de proceso anómalo [94]. Esta ecuación solo puede ser utilizada para el 60 % inicial de absorción de agua [92,94].

Hinchamiento con solución acuosa saturada de nitrato de potasio: La preparación de las matrices que se utilizarán como fertilizante químico se basó en la incorporación de nitrato de potasio por absorción, colocando las matrices poliméricas lavadas y secas en un volumen de solución saturada de KNO_3 durante 5 h. Para ello se tuvo en cuenta el grado de hinchamiento máximo determinado cuando se utilizó agua como solvente.

Se preparó una solución acuosa saturada de la sal, sabiendo que, a temperatura ambiente la solubilidad del fertilizante modelo seleccionado es de 20 g $\text{KNO}_3/100\text{g H}_2\text{O}$. Una vez finalizado el período de absorción, las matrices fueron secadas a 40°C hasta masa constante. El porcentaje de carga se calculó gravimétricamente mediante la siguiente ecuación:

$$\%Carga = \frac{m_f - m_0}{m_0} * 100 \quad (\text{Ec. 2.5})$$

donde m_0 es la masa inicial de las macroesferas secas y m_f es la masa final de las macroesferas secas luego de haber absorbido el fertilizante químico.

Hinchamiento con la solución que contiene las bacterias promotoras del crecimiento vegetal: para el entrapamiento de las bacterias en el soporte se prepararon cultivos puros de *Pseudomonas fluorescens* ZME4 (Ps) y *Azospirillum brasilense* Az39 (Az) en caldo nutritivo (NB) crecidos a 30°C agitados a 150 rpm hasta llegar a fase exponencial tardía o estacionaria temprana (Densidad Óptica a 600nm (DO600) =2). Los medios de cultivo se centrifugaron a 3000 g por 15 min a temperatura ambiente y se resuspendieron en un volumen adecuado de sobrenadante del cultivo.

El volumen del inóculo bacteriano utilizado, se determinó en función de la cantidad de bacterias necesarias para asegurar la biofertilización y de los resultados obtenidos en los ensayos de hinchamiento con agua considerando que las macroesferas secas deben absorber completamente el volumen del inóculo calculado. Se realizó la carga del soporte, previamente esterilizado por autoclave, con las cepas por separado (Az o Ps) o en conjunto (1:1) (Az+Ps).

Una vez realizada la incorporación de las bacterias, las macroesferas cargadas se secaron a 30 °C hasta alcanzar peso constante, manteniendo la esterilidad. El material resultante se almacenó a temperatura y humedad ambiente durante 1 año, con el objetivo de evaluar la supervivencia de los microorganismos y por lo tanto la viabilidad del material como biofertilizante.

Supervivencia de los microorganismos

La evaluación de la sobrevivencia bacteriana en las macroesferas se realizó colocando 0,01 g de material triturado con émbolo estéril en 1 mL de agua ultra pura estéril. Posteriormente se realizó la incubación durante 2 horas a 30°C con agitación. Luego, se determinó en las suspensiones las UFC/g mediante recuento con la técnica de la microgota, que consiste en sembrar diluciones seriadas de cada muestra sobre un medio agar nutritivo (NA) para *P. fluorescens* ZME4, o rojo congo (RC) para *A. brasilense* Az39, e incubando las placas a 30°C. En el caso del material conteniendo la mezcla de cepas (Az+Ps), se realizaron los recuentos en RC a 38 °C y NA a 30°C para poder leer colonias de Az y Ps, respectivamente.

Los resultados permitieron analizar la evolución del contenido de UFC por gramo de soporte (UFC/g) durante el período de almacenamiento.

Ensayos de liberación del activo encapsulado

Fertilizante químico

El ensayo de liberación del fertilizante (KNO_3) almacenado en las macroesferas se estudió colocando un peso conocido de las matrices cargadas en un volumen de 90 mL de agua desionizada (medio de liberación) a 25°C en condiciones estáticas (sin agitación).

Se utilizó un conductímetro HANNA Instrumens, modelo HI 9033 multi-range conductivity meter. La concentración acumulada del fertilizante en función del tiempo se determinó utilizando una recta de calibración con soluciones valoradas de nitrato de potasio. En todos los experimentos el electrodo del conductímetro se mantuvo en la misma posición fija respecto a la ubicación de las macroesferas.

Las curvas de liberación que permiten estudiar la cinética se obtuvieron graficando la concentración acumulada de KNO_3 en el medio receptor en función del tiempo. Las mediciones se realizaron por triplicado. Para analizar la cinética de liberación del soluto se utilizó la ecuación semiempírica del tipo ley de potencia de Ritger y Peppas [92]:

$$\frac{C_t}{C_\infty} = kt^n \quad (\text{Ec. 2.6})$$

reagrupando:

$$C_t = k't^n \quad (\text{Ec. 2.7})$$

donde C_t es la concentración acumulada del soluto liberado al tiempo t , C_∞ es la concentración acumulada del soluto liberado correspondiente al tiempo infinito, k' es la constante que involucra entre otras variables la masa de las macroesferas, la masa total de KNO_3 presente en el sistema y la geometría del dispositivo de liberación y n es el exponente que indica el mecanismo controlante de liberación.

Como ya se explicitó, para la geometría esférica correspondiente a las macroesferas, si n es 0,43 el proceso limitante en la cinética de liberación es la difusión fickiana, si $n \geq 0,85$ la relajación de las moléculas del polímero es el proceso limitante y si n está entre 0,43 y 0,85 se denomina transporte anómalo.

Si bien es posible, utilizando la función logaritmo, transformar las ecuaciones anteriormente nombradas en una función lineal y aplicar un ajuste lineal, se decidió utilizar el ajuste no lineal porque la transformación matemática distorsiona el error experimental [94].

El ajuste de los datos experimentales obtenidos se realizó utilizando la regresión no lineal de cuadrados mínimos con el método de Levenberg-Marquardt en el modo no robusto (Matlab versión 7.10, MathWorks, Inc., 2010). Los métodos robustos son aquellos que no excluyen ningún resultado, aunque parezca atípico, asignando distintos pesos a los datos. En este caso no existe la posibilidad de obtener datos con estas características y es por lo que se usa un modo no robusto.

La gran limitación de la aplicación de la ecuación semiempírica del tipo ley de potencia propuesta por Ritger y Peppas es que no describe en su totalidad a la curva de liberación. Las limitaciones teóricas de aplicabilidad de la ecuación son las siguientes [92,94]:

- * Se deben cumplir las condiciones de sumidero en el medio donde se está liberando la droga (la concentración final de la droga liberada en el medio receptor no debe superar el 10 % de su solubilidad).
- * El coeficiente de difusión del activo a liberar se considera constante e independiente de la concentración de la misma.
- * Solo es válida para una fracción de liberación menor o igual al 60 % del total de droga inicial.
- * La liberación se produce de manera isotérmica.

Biofertilizante

Para el análisis de la liberación de las bacterias desde el soporte, se estudió la cinética de liberación de cada cepa cuando se encapsulan individualmente o en forma conjunta utilizando como medio receptor agua estéril o suelo natural.

Medio receptor: agua estéril

Para el análisis de la cinética de liberación en agua se colocaron 15 mg del material polimérico cargado con las bacterias en 2 mL de agua destilada estéril y se dejó el sistema en estado estacionario durante 30 días a temperatura ambiente. A determinados intervalos de tiempo se retiró 0,1 mL sin disturbar la muestra y se determinó el número de UFC en la suspensión por mL de medio, se empleó el método de medición para cada cepa tal como se describió en el ítem correspondiente a la supervivencia de los microorganismos.

Medio receptor: suelo natural

La liberación en suelo natural se realizó para analizar la influencia de la presencia de otros microorganismos en el ambiente. Se utilizaron cepas recombinantes, que llevan marcadores de resistencia a un antibiótico de manera de poder individualizar las cepas de interés de entre la comunidad microbiana presente en el suelo. Para la obtención de la cepa *Azrif* (Az resistente a rifampicina), se seleccionaron mutantes naturales de la cepa salvaje resistentes al mencionado antibiótico rifampicina. Para ello se esparció un cultivo de Az en estado estacionario en una placa de medio RC conteniendo un gradiente de rifampicina (0-200 µg/mL). Las colonias desarrolladas en la zona de mayor concentración de antibiótico se subcultivaron 5 veces en un medio sin antibiótico para luego analizar la estabilidad de la resistencia mediante un recuento en placas con y sin rifampicina (50 µg/mL). Se seleccionó un clon con resistencia estable para los ensayos en suelo.

La cepa *Psgem* (Ps resistente a gentamicina) se obtuvo por introducción de una copia única de un transposón miniTn7 que lleva un cassette de resistencia a

gentamicina en un punto específico del genoma introduciendo los plásmidos pME3280a (que lleva el miniTn7) y pUX-BF13 (que provee la maquinaria de transposición) en la cepa *Ps* por electroporación [95]. Se seleccionaron clones recombinantes en medio LB con gentamicina (12.5 µg/mL) y se confirmó la integración del transgén por PCR (reacción en cadena de la polimerasa, en inglés polymerase chain reaction).

Para el análisis de la liberación en suelo se colocaron 10 mg de material cargado con las cepas *Azrif* y *Psgem* en 1 g de suelo Argiudol Típico libre de raíces recolectado debajo de los 10 cm de suelo superficial ubicado en el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) de la ciudad de Balcarce, Buenos Aires . El sistema se incubó a temperatura ambiente por 30 días a 20 °C, manteniendo la humedad del suelo constante, y se analizó la liberación bacteriana a determinados intervalos de tiempo. Se prepararon tres muestras por cada determinación. Para cuantificar las bacterias liberadas a partir del material, se retiró el soporte polimérico de la muestra, se lavó el suelo con 10 mL de agua destilada estéril y se analizó el contenido de UFC presentes, tal cual como se describió anteriormente empleando los antibióticos correspondientes para facilitar el conteo debido a la presencia de microorganismos naturales del suelo.

Con los datos obtenidos se analizó la cinética de liberación graficando UFC acumulada en agua estéril o en suelo natural en función del tiempo. Se utilizó nuevamente la ecuación semiempírica del tipo ley de potencia de Ritger y Peppas realizando un ajuste no lineal de los resultados experimentales [92,94]:

$$\frac{U_t}{U_\infty} = kt^n \quad (\text{Ec. 2.8})$$

reagrupando:

$$U_t = k't^n \quad (\text{Ec. 2.9})$$

donde U_t son las UFC liberadas al tiempo t , U_∞ son las UFC liberadas en el equilibrio, k' es la constante que involucra entre otras variables la masa de las

macroesferas, las UFC totales de los microorganismos presentes en el sistema y la geometría del dispositivo de liberación y n es el exponente de liberación.

El valor de n está relacionado con el mecanismo que controla el proceso de liberación como ya se describió en el ítem correspondiente a la liberación del nitrato de potasio.

CAPÍTULO III

CARACTERIZACIÓN DE LAS MACROESFERAS POLIMÉRICAS

En el presente capítulo se presentan los resultados obtenidos al emplear cada una de las técnicas de caracterización descritas en el capítulo anterior y se efectúa el análisis de los resultados obtenidos. Se utilizaron las matrices poliméricas basadas en CS, CS/ST y CS/PVA, preparadas con distintas composiciones y utilizando diferentes tiempos de entrecruzamiento.

CARACTERIZACIÓN DE LAS MATRICES POLIMÉRICAS PREPARADAS CON CS/ST

Reología dinámica

Los barridos de frecuencia a deformación constante (0,1%) presentados en la Figura 3.1 muestran la evolución de los módulos de almacenamiento (G') y de pérdida (G'') en función de la frecuencia correspondientes al CS 3 % m/m disuelto en ácido láctico 1 % m/m, al gel de ST 8 % m/m y a las diferentes mezclas poliméricas de CS/ST.

El G' está asociado a la energía almacenada por cada ciclo oscilatorio aplicado y depende de las características y concentración de las macromoléculas por lo que está directamente relacionado con la densidad de entrecruzamientos de la red polimérica. En cambio, el G'' está asociado a la energía disipada a la que contribuyen tanto las macromoléculas poliméricas como el solvente, por lo que es una medida de la energía perdida como calor durante el ciclo oscilatorio aplicado.

Se observó que todas las muestras estudiadas poseen un comportamiento viscoelástico. Analizando el barrido de frecuencia obtenido para el gel de almidón se encontró una escasa dependencia con la frecuencia del módulo elástico. Además, en todo el rango de frecuencias ensayado, el módulo G' supera en un orden de magnitud al módulo G'' . Estos resultados confirman que la solución de almidón luego de ser calentada se transforma en un gel [96].

En el caso de la solución de CS y de las mezclas poliméricas de CS/ST se observó que a bajas frecuencias el G'' es mayor que el G' y que ambas magnitudes muestran una dependencia con la frecuencia. Esto es indicativo de que tanto la solución de quitosano como las mezclas poliméricas, previamente al proceso de entrecruzamiento iónico, no son geles.

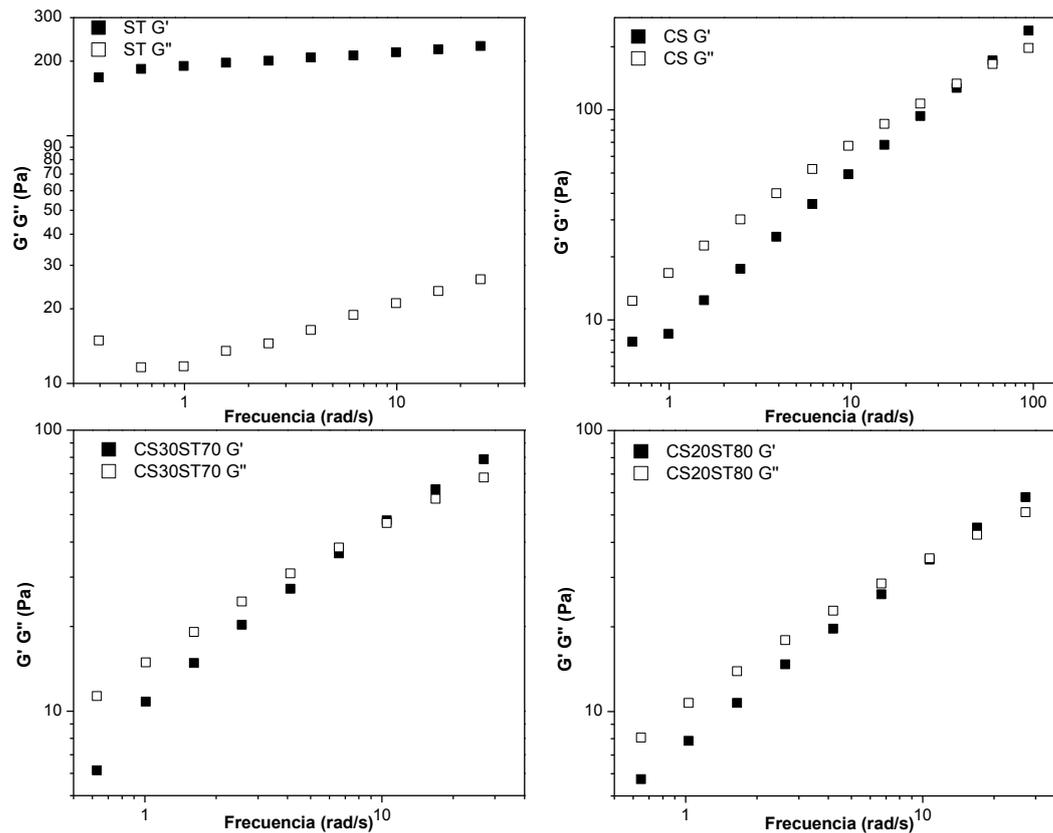


Figura 3.1. Barrido de frecuencia a deformación constante (0,1%) correspondiente a: gel de ST, solución de CS y mezclas poliméricas de CS/ST a 25°C. Módulo elástico: G' (símbolos rellenos) y módulo viscoso: G'' (símbolos vacíos).

El incremento en la composición de CS en las mezclas poliméricas, produjo un corrimiento de la frecuencia de cruce entre los módulos G' y G'' . A medida que se incrementó la composición de quitosano en la mezcla, la frecuencia de cruce, donde los módulos se igualan, se desplazó hacia valores más bajos al mismo tiempo que se registró un aumento del módulo elástico (ver tabla 3.1). Este resultado sería indicativo de un aumento en la rigidez de la matriz polimérica debido a la existencia de mayor cantidad de solapamientos entre las cadenas poliméricas y/o de un incremento de interacciones físicas intermacromoleculares debido a la formación de enlaces puente hidrógeno [97].

Los resultados obtenidos están relacionados con las interacciones que se producen entre los grupos amino protonados del CS y los grupos OH del almidón que ya han sido reportadas en investigaciones previas [46,98,99].

Resultados similares fueron obtenidos por Serrero et al. (2010) [99] y Horn et al. (2011) [100], usando una mezcla polimérica preparada con quitosano y almidón de papa oxidado.

Tabla 3.1 Frecuencia (ω) y valores de los parámetros reológicos (G' y G'') en el punto de cruce, determinados a partir de los barridos de frecuencia realizados a deformación constante y 25 °C para la solución de CS y las mezclas poliméricas de CS/ST.

Muestras sin entrecruzamiento	ω (rad/s)	$G' = G''$ (Pa)
CS	51,2	154,8
CS30ST70	8,7	43,3
CS20ST80	12,1	35,4

Horn et al. (2010) prepararon un film basado en quitosano, almidón de papa y almidón de papa oxidado [99]. Ellos determinaron que en las mezclas que originan los films, el G'' fue más alto que el G' , demostrando un comportamiento típico de mezclas poliméricas de materiales que no son geles al igual que los resultados reportados en esta Tesis.

Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Las macroesferas preparadas con las distintas composiciones en masa de CS/ST con distintos tiempos de entrecruzamiento, fueron caracterizadas morfológicamente por SEM. Cabe destacar que para el análisis por SEM, el hidrogel debe estar completamente seco, por lo que el tamaño e interconexión de los poros que se observan en las micrografías no refleja la morfología real del hidrogel hidratado [100].

En la Figura 3.2 se presentan las micrografías obtenidas para las macroesferas preparadas con CS y con mezclas CS/ST utilizando diferentes tiempos de entrecruzamiento.

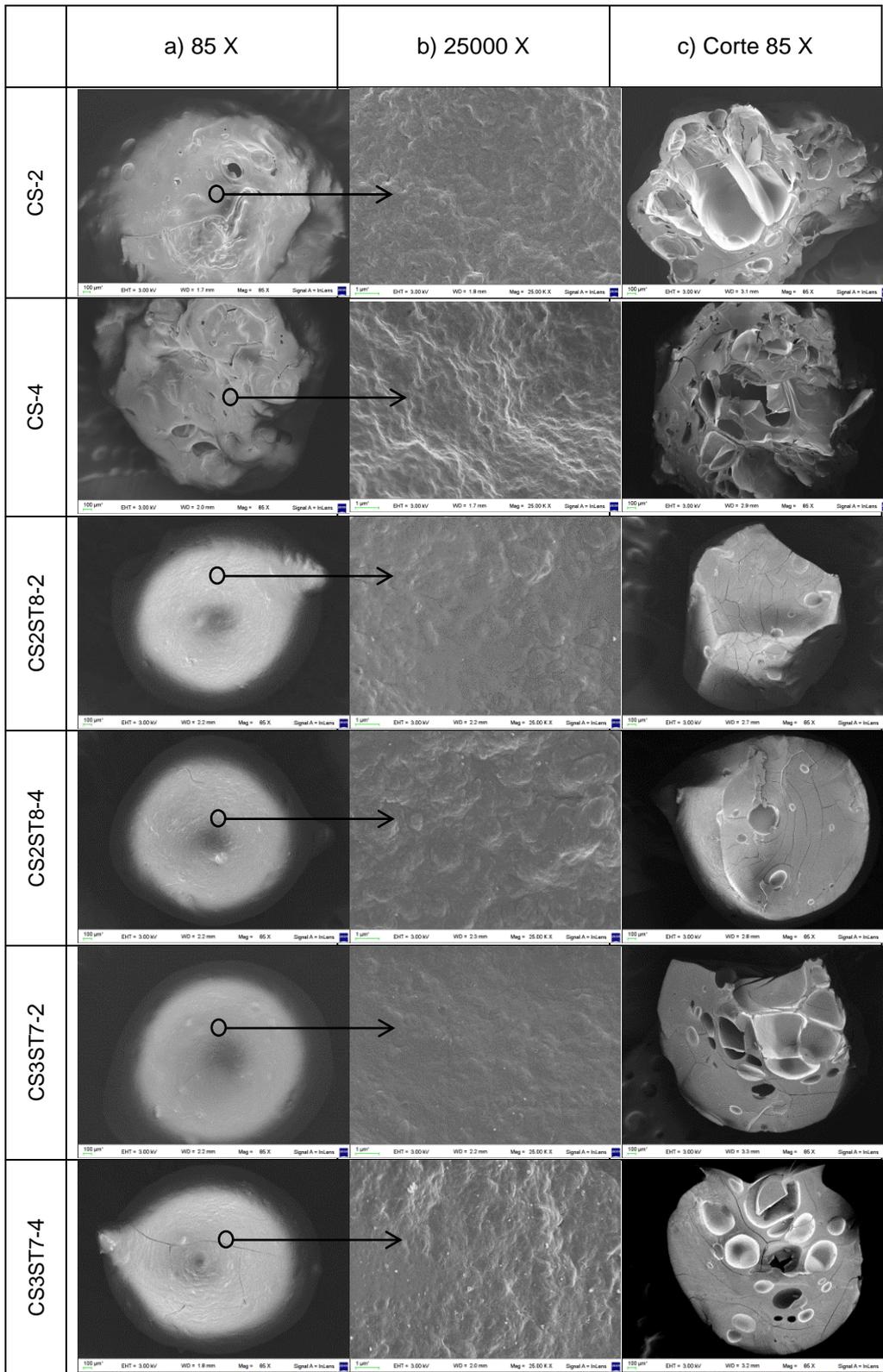


Figura 3.2. Micrografías obtenidas para matrices preparadas con 100%, 30% y 20% de CS utilizando 2 y 4 horas de entrecruzamiento. a) macroesferas completas; b) ampliación de la superficie exterior y c) cara interna del corte transversal de las macroesferas.

Del análisis de las imágenes ubicadas en la columna (a) de la Figura 3.2, el estudio morfológico reveló que las macroesferas poseen una forma aproximadamente esférica con un diámetro promedio igual a $3,70 \pm 0,30$ mm y $3,00 \pm 0,07$ mm para matrices poliméricas preparadas exclusivamente con CS y mezclas CS/ST respectivamente, poseen una superficie rugosa y se observan poros de diversos tamaños. La forma y el tamaño obtenidos fueron producto del método de obtención por goteo porque la dimensión final de la matriz dependió directamente del tamaño de las gotas del material polimérico que se puso en contacto con la solución del STPP a pH 8,6.

No se observó un cambio significativo en el tamaño de las macroesferas con el aumento del tiempo de entrecruzamiento. Sin embargo, Gan y col. observaron que para la formación de partículas nanométricas de quitosano entrecruzadas con STPP, el pH de la solución y el tiempo de entrecruzamiento fueron determinantes en la distribución del tamaño de las partículas obtenidas [101] lo que podría atribuirse al método de preparación seleccionado.

La columna (b) de la Figura 3.2 permite comparar con más detalle la morfología superficial de la cara externa de las macroesferas. Para cada uno de los tres tipos de macroesferas preparadas, se observó que la rugosidad superficial aumentó con el incremento del tiempo de entrecruzamiento.

Las imágenes que se aprecian en la columna © de la Figura 3.2, corresponden a la superficie interna de las macroesferas seccionadas transversalmente por la mitad. Se puede observar que existen cavidades o poros de diferentes tamaños que podrían originarse como consecuencia de la oclusión de burbujas de aire que se producen debido a la manipulación del material polimérico cuando se lo coloca en la boquilla que produce las gotas que se ponen en contacto con la solución de STPP.

En todas las imágenes analizadas se pudo observar que el número de poros se incrementó con el porcentaje de quitosano utilizado siendo máximo en las matrices preparadas exclusivamente con quitosano

Espectroscopía de Energía Dispersiva (EDS)

En la Tabla 3.2 se muestran los resultados obtenidos utilizando la técnica de EDS. Las mediciones se realizaron en la superficie de las macroesferas ya lavadas y secas preparadas con las distintas composiciones, con 2 y 4 h de entrecruzamiento. Se determinó la composición porcentual del contenido de fósforo en la superficie externa de las macroesferas de manera de tener una idea aproximada de la efectividad del entrecruzamiento iónico utilizado. Las mediciones se realizaron en diferentes puntos de la superficie y los resultados semicuantitativos de la Tabla 3.2 son el promedio de estas mediciones.

Los resultados obtenidos indican que la cantidad de fósforo superficial dependió de la composición polimérica del hidrogel y del tiempo de entrecruzamiento. Como consecuencia del pH de la solución obtenida al disolver la sal de STPP en agua (8,6), se encuentran dos tipos de iones (OH^- y $\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$) que compiten entre sí para reaccionar con el grupo amino protonado del CS. La preparación de las macroesferas se produjo mediante la técnica coacervación-separación de fases, donde ocurren simultáneamente la coagulación del CS y el entrecruzamiento iónico tal como se esquematizó en la Figura 1.7 [46,102].

Se observó que, al aumentar el tiempo de entrecruzamiento de 2 a 4 h, la cantidad de fósforo superficial se incrementó en todos los casos, lo que verificaría que durante el tiempo de contacto con la solución de STPP se produce la interacción iónica entre los aniones polifosfato y los grupos amino protonados del CS.

En el caso de las matrices preparadas a partir de las mezclas se observó que el agregado de ST, independientemente de la composición de la mezcla analizada, disminuye significativamente el contenido de fósforo superficial respecto a las macroesferas preparadas exclusivamente con CS lo que correlacionaría con una ausencia de interacción del entrecruzante seleccionado con el almidón.

Tabla 3.2 Porcentajes de la composición de P presente en la superficie de las matrices poliméricas obtenidas con 2 y 4 h de entrecruzamiento.

Muestra	Composición (% de P en Peso)
CS-2	3,36 ± 0,27
CS-4	5,27 ± 0,39
CS2ST8-2	1,95 ± 0,22
CS2ST8-4	2,65 ± 0,34
CS3ST7-2	1,41 ± 0,51
CS3ST7-4	2,39 ± 0,44

Lim et al. [103] así como otros investigadores [104,105] prepararon almidón fosfatado en presencia de STPP, calentando el biopolímero hasta una temperatura cercana o mayor a 100 °C y trabajando en un rango de pH entre 6 y 11. En la Figura 3.3 se muestran las reacciones que tienen lugar entre el STPP y el almidón a elevadas temperaturas:

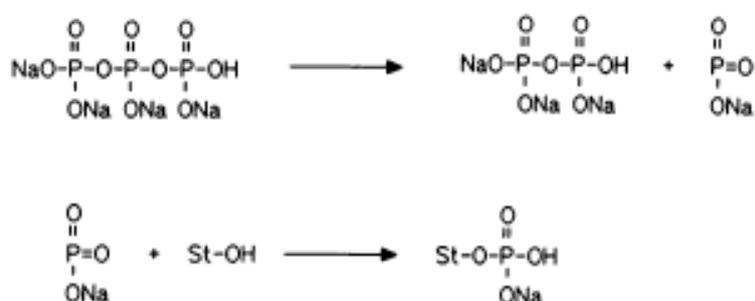


Figura 3.3. Reacción propuestas en la fosforilación del almidón con STPP a pH<9 y altas temperaturas [103].

Considerando que el entrecruzamiento realizado en esta Tesis tuvo lugar a 25 °C, se infiere que el fósforo incorporado en las macroesferas se debe exclusivamente al entrecruzamiento iónico que se produce con los grupos reactivos del CS, ya que se necesitarían temperaturas de reacción mayores que la temperatura utilizada, para lograr que ocurran las reacciones entre el STPP y el ST. Este hecho explicaría la disminución en la concentración de fósforo en las matrices preparadas con CS/ST al compararse respecto a las muestras donde se empleó exclusivamente este último biopolímero (ver Tabla 3.2).

Fracción Soluble

Como consecuencia de la disolución e hidrólisis del STPP, la solución acuosa del agente entrecruzante posee iones OH^- y tripolifosfóricos. Ambos iones pueden difundir dentro de las macroesferas formadas cuando el material polimérico se pone en contacto con la solución acuosa de STPP.

Los grupos OH^- producen la coagulación del quitosano y, los iones tripolifosfóricos el entrecruzamiento tal como se mostró en la Figura 1.7. Los iones OH^- compiten con los iones $\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$ para reaccionar con el grupo amino protonado del quitosano tan pronto como las gotas poliméricas entran en contacto con la solución de tripolifosfato de sodio.

Teniendo en cuenta que el entrecruzamiento iónico puede controlarse ajustando el pH de la solución acuosa de STPP, se eligió un pH de 8,6 para lograr una baja densidad de entrecruzamiento en la matriz polimérica [77,83] de acuerdo a los requerimientos específicos de la aplicación final.

Las macroesferas preparadas a partir de la solución de quitosano y de las mezclas (CS/ST) mantuvieron su integridad sin disolverse ni romperse durante el experimento.

Se encontró que la fracción soluble estaba directamente relacionada con la composición polimérica de la macroesfera y con el tiempo de entrecruzamiento. Las fracciones solubles calculadas según la ecuación 2.1 se muestran en la Tabla 3.3. La fracción soluble calculada fue mayor cuando se redujeron el porcentaje de CS o el tiempo de entrecruzamiento.

Los resultados experimentales indican que:

- La incorporación de ST en la estructura de las macroesferas incrementó alrededor de un 50% la fracción soluble en relación con las matrices preparadas exclusivamente con quitosano.

- Las mezclas preparadas con 20 o 30 % de CS originaron macroesferas con similares fracciones solubles cuando se usa el mismo tiempo de entrecruzamiento.
- El mayor tiempo de entrecruzamiento redujo a fracción soluble de todas las macroesferas.

Estos resultados estarían relacionados con la disminución de la densidad de entrecruzamiento iónico que involucra las cadenas de CS y con la mayor hidrofiliidad del almidón.

Tabla 3.3. Fracción soluble porcentual de las macroesferas compuestas por CS y CS/ST preparadas con diferentes tiempos de entrecruzamiento.

Muestra	% de la fracción soluble
CS-2	7,21 ± 0,27
CS-4	6,59 ± 0,32
CS2ST8-2	11,20 ± 0,50
CS2ST8-4	9,53 ± 0,48
CS3ST7-2	10,97 ± 0,47
CS3ST7-4	9,52 ± 0,54

Bourtoom y Chinnan (2008) obtuvieron resultados experimentales similares al preparar películas con mezclas de almidón de arroz y quitosano [106]. Ellos informaron una disminución en la fracción soluble con el aumento del porcentaje en peso de CS, que podría ser atribuible a las interacciones que ocurren entre ambos biopolímeros.

Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Los ensayos se realizaron utilizando las macroesferas preparadas exclusivamente con CS para analizar la influencia del entrecruzamiento sobre la estructura del CS.

El espectro de RMN de CP-MAS ¹³C para el CS sin entrecruzar, que resultó similar al encontrado en la literatura [107], se muestra en la Figura 3.4 (a).

Se pudieron identificar las siguientes señales características:

- a 60 ppm se observan dos señales que se atribuyen al carbono C6 y al carbono C2 del anillo piranosídico del CS
- a 76.4 ppm se observa una señal asociada a los carbonos C5 y C3
- a 84 ppm se identifica una señal correspondiente al carbono C4
- a 106,2 ppm se detecta la presencia del carbono C1.

Como resultado del entrecruzamiento del CS, las señales correspondientes al C1 y a C4 se modificaron. Se encontró que los picos mencionados se ensancharon y su intensidad disminuyó con respecto a las señales obtenidas con el CS sin entrecruzar, lo que indica que la interacción entre el CS y STPP se produjo efectivamente.

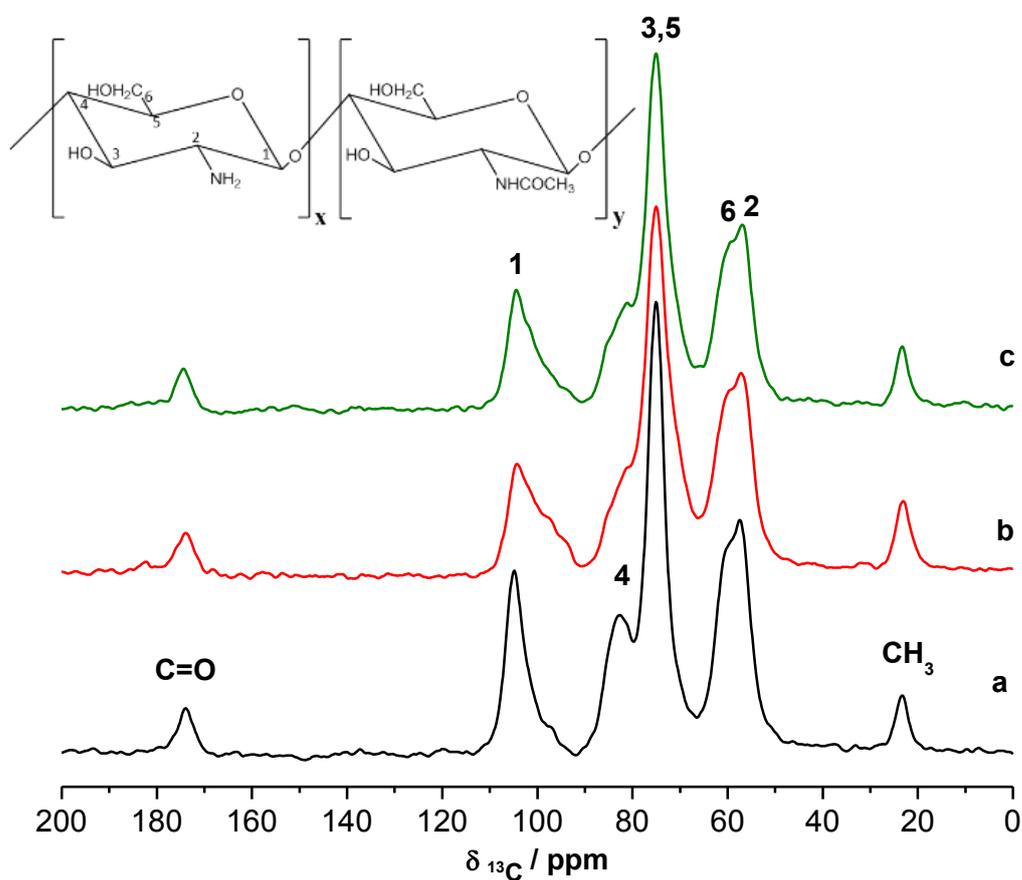


Figura 3.4. Espectros de RMN ¹³C CP-MAS para el CS (a), CS-2 (b) y CS-4 (c).

Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)

En la Figura 3.5 (a) se observa el espectro del quitosano en polvo utilizado para preparar las macroesferas. Posee una banda característica centrada a 3449 cm^{-1} que se atribuye a una superposición de las vibraciones de estiramiento de los grupos NH_2 y OH [108,109]. Los picos correspondientes al estiramiento simétrico y asimétrico del grupo CH del anillo y de los grupos CH_2OH y CH_3 tienen máximos en 2915 cm^{-1} y 2865 cm^{-1} [108,109]. Se observa un pequeño pico de los grupos CH_2 situado en 2150 cm^{-1} [108] y una banda ubicada a 1657 cm^{-1} para la amida I [108–111]. También hay una banda a 1657 cm^{-1} correspondiente al grupo CONH_2 y una señal a 1598 cm^{-1} debido al grupo NH_2 [102,111,112]. También se aprecian las vibraciones correspondientes a los grupos C-O piranosídicos y C-O-C del enlace glucosídico ubicados a 1070 cm^{-1} y de los grupos OH y CH presentes en el anillo con máximos en 1415 y 1320 cm^{-1} , respectivamente. Se observa la banda atribuida al CH_3 del grupo amida ubicada a 1380 cm^{-1} , el grupo C-O en 1255 cm^{-1} , los picos pertenecientes al enlace glucosídico C-O-C a 1150 y 1040 cm^{-1} y las bandas correspondientes al grupo CH_3COH a 850 y 838 cm^{-1} [84,108,113,114].

En las Figuras 3.5 (b) y (c) se presentan los espectros obtenidos para las matrices de CS preparadas con 2 y 4 h de entrecruzamiento (CS-2 y CS-4, respectivamente). Tal como se esperaba, todas las muestras entrecruzadas presentaron las bandas características del CS, confirmando que la estructura del mismo no sufrió modificación química alguna durante el entrecruzamiento. Las macroesferas preparadas solamente con CS mostraron un hombro a 1240 cm^{-1} , que puede asignarse a la vibración de estiramiento de los grupos $\text{P} = \text{O}$, lo que indica la presencia del fósforo como consecuencia del entrecruzamiento iónico. Existen publicaciones que reportan que a pH 8,6, la señal del grupo $\text{P} = \text{O}$ es visible como un pequeño hombro [46,102,111,112].

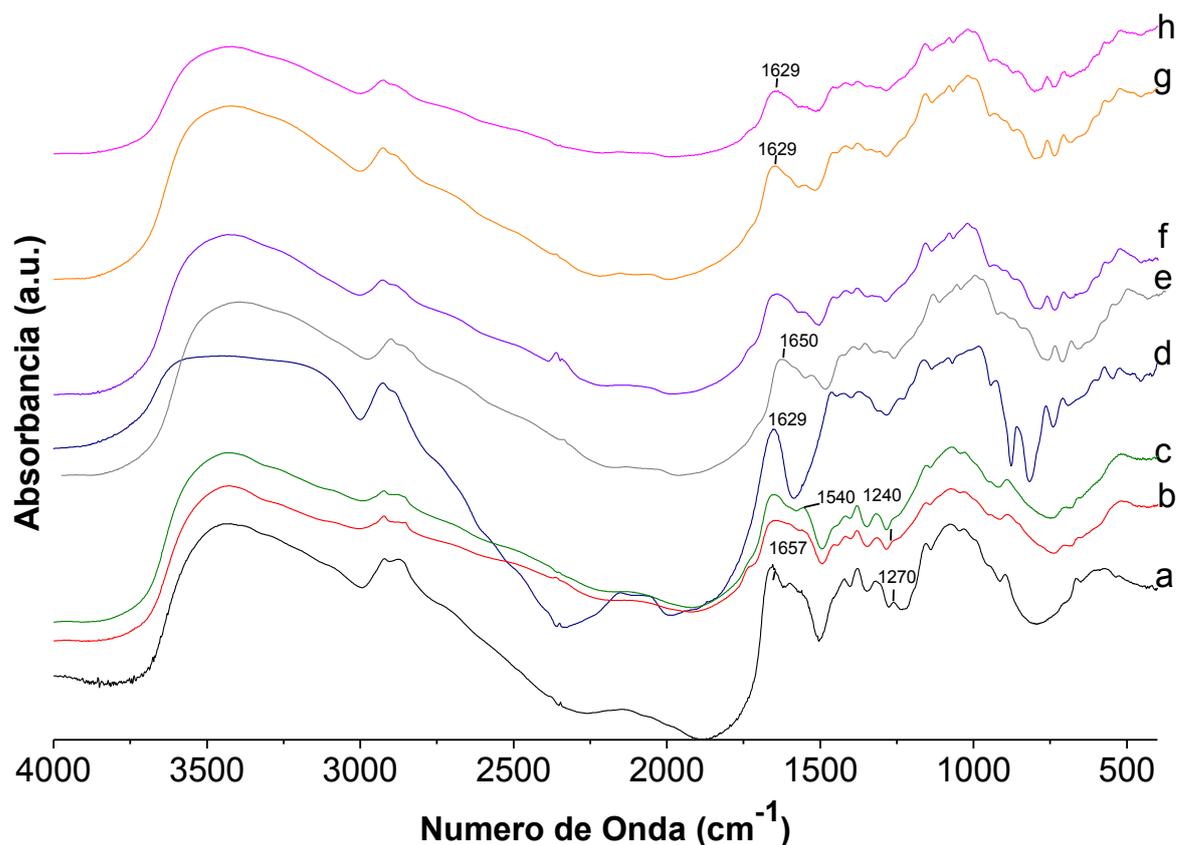


Figura 3.5. Espectro infrarrojo correspondiente a las muestras de: CS (a), CS-2 (b), CS-4 (c), ST (d), CS3ST7-2 (e), CS3ST7-4 (f), CS2ST8-2 (g) y CS2ST8-4 (h).

En los espectros obtenidos se encontró que la intensidad de este hombro aumentó con el aumento del tiempo de entrecruzamiento. Mi et al. [77] y Lee et al. [115], sintetizaron resinas y microesferas de CS entrecruzadas con STPP respectivamente. Los resultados que obtuvieron indican que a pH 8,6 la señal del grupo $P = 0$ es visible como un pequeño hombro que se vuelve un pico definido y más intenso a medida que el pH de la solución de STPP disminuye de 6 a 2. Cuando el pH de la solución entrecruzante es ácido, el entrecruzamiento es consecuencia de la interacción con el ion polifosfato, mientras que, a pH básico, el entrecruzamiento iónico es menos efectivo, como ya se ha explicado, dando como resultados matrices poliméricas menos densamente entrecruzadas.

Una comparación del espectro del CS puro con el de las macrosferas preparadas exclusivamente con quitosano mostró que el pico a 1657 cm^{-1} desapareció después del entrecruzamiento, y dos nuevos picos aparecieron a 1650 cm^{-1} y 1540 cm^{-1} , después de 2 y 4 h de entrecruzamiento. Esto se puede atribuir a la

interacción entre el ion amino protonado del CS y el ion polifosfórico del agente entrecruzante [46,112,116].

Además, se puede observar que la intensidad del pico posicionado a 1540 cm^{-1} aumentó al incrementarse el tiempo de entrecruzamiento, lo que correlacionaría con una mayor densidad de entrecruzamiento iónico [102]. Este comportamiento es consistente con el aumento en el contenido de fósforo hallado mediante el EDS realizado en las matrices CS-2 y CS-4 (ver Tabla 3.2). Por otro lado, el crecimiento del pico ubicado en 1650 cm^{-1} puede asociarse con la desprotonación del CS presente en las macroesferas, por efecto de los grupos hidroxilo resultantes de la hidrólisis del STPP [117].

El espectro FTIR del almidón de papa se presenta en la Figura 3.5 (d), en el que se muestra las bandas características. En la región de la “huella dactilar”, aparecen los picos a 1151 cm^{-1} , 1078 cm^{-1} y 1024 cm^{-1} correspondientes a las vibraciones de las uniones C-O-C del enlace glucosídico y las bandas con máximos en 931 cm^{-1} , 862 cm^{-1} , 769 cm^{-1} y 710 cm^{-1} atribuidas al anillo piranosídico [108,118–120]. Se observó una banda intensa a 1653 cm^{-1} debido a la vibración de flexión de los grupos OH presentes en la estructura [118–120]. Las bandas en 1151 cm^{-1} y 2930 cm^{-1} corresponden a las regiones de estiramiento de CO y CH presentes en el anillo [118,119].

En el caso de las dos matrices poliméricas preparadas con mezclas de CS/ST los espectros obtenidos fueron semejantes (Figuras 3.5 (e) – (h)). Se observaron tres de los cuatro picos característicos del anillo piranosídico correspondientes a la estructura del ST ubicados en 931 , 769 y 710 cm^{-1} [120], y también las bandas con máximos en 1151 cm^{-1} , 1078 cm^{-1} y 1024 cm^{-1} que son características de la región de la “huella dactilar” del almidón [119]. Este resultado confirma que el almidón mantuvo su estructura, aunque los picos fueron menos intensos cuando se comparan con el almidón puro. En la región ubicada entre $3100\text{--}3600\text{ cm}^{-1}$, las mezclas presentaron una señal similar a la del CS puro, atribuible al estiramiento axial de los grupos OH presentes en el CS y en el ST, y la banda asignable al estiramiento del enlace N-H perteneciente al grupo NH_2 del CS.

La gelatinización del almidón provoca la exposición de los grupos OH. Se ha establecido que estos grupos pueden formar enlaces de hidrógeno con los grupos hidroxilo, amino y amino protonado del quitosano [121–123]. Estas interacciones podrían causar cambios en los espectros correspondientes a los hidrogeles de CS/ST, como el corrimiento del pico correspondiente al grupo amino del quitosano que se corrió de 1657 cm^{-1} a 1629 cm^{-1} . Esto es evidencia de la buena compatibilidad molecular existente entre los biopolímeros seleccionados para producir las macroesferas.

Difracción de rayos X (XRD)

En la Figura 3.6 se muestran los patrones de difracción de rayos X correspondientes al ST, el CS y las macroesferas CS-2, CS-4, CS30ST70-2, CS30ST70-4, CS2ST80-2 y CS20ST80-4, que permiten analizar la naturaleza cristalina de los materiales.

El almidón es un polímero semicristalino cuya cristalinidad varía entre un 15 y un 51 %, dependiendo de la fuente del ST [124]. El difractograma del almidón (Figura 3.6 (a)) presentó múltiples picos a $5,25^\circ$; $10,41^\circ$; $6,85^\circ$; $23,71^\circ$; $24,16^\circ$; $30,61^\circ$ y $35,14^\circ$. El espectro obtenido corresponde a un patrón de difracción tipo B típico de los tubérculos, que ya ha sido descrita por diversos investigadores [125,126].

En la Figura 3.6 (b) se muestra el patrón de difracción del CS puro. Su difractograma posee dos picos bien definidos relacionados con su elevada cristalinidad ubicados a $10,55^\circ$ y $19,7^\circ$. Estos picos que corresponden a los planos de reflexión (100) y (002) [46,127] son compatibles con una estructura del tipo ortorrómbica. Otros investigadores han obtenido espectros de difracción similares [46,127,128] a los obtenidos en esta Tesis confirmando la estructura semicristalina del biopolímero.

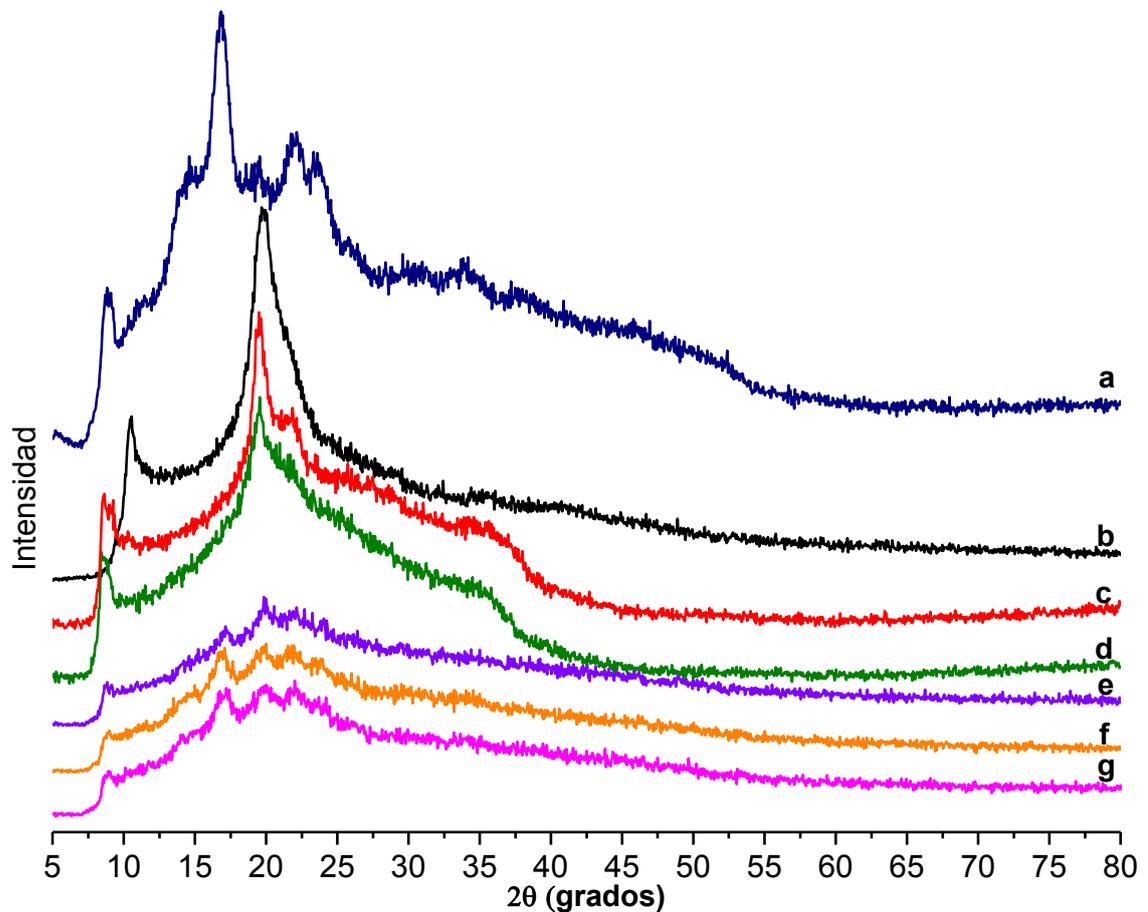


Figura 3.6. Difractogramas de rayos X del almidón de papa puro (a), quitosano puro (b), CS-2 (c), CS-4 (d), CS3ST7-4 (e), CS2ST8-2 (f), y CS2ST8-4 (g).

En las Figuras 3.6 (c) y (d) se muestran los difractogramas correspondientes a las muestras CS-2 y CS-4 entrecruzadas durante 2 y 4 h, respectivamente. Las macroesferas mostraron dos picos cristalinos prominentes a 8,2 y 19,1°. Las intensidades de ambos picos, utilizando los dos tiempos de entrecruzamiento, resultaron significativamente menores comparadas con las obtenidas cuando se utilizó CS puro y además se registró un desplazamiento de los picos que en el Cs sin entrecruzar aparecen a 10,55° y 19,7° como se mencionó anteriormente. Estas diferencias entre el patrón de difracción del CS y los difractogramas de las macroesferas entrecruzadas, estarían relacionadas con una modificación en la disposición de las macromoléculas en la red cristalina. Como consecuencia del método de preparación de macroesferas seleccionado, se obtuvo un material más amorfo debido a que el entrecruzamiento iónico inhibe el ordenamiento de las macromoléculas ya sea limitando o incluso evitando la formación de regiones cristalinas [115].

Se observó que el pico ubicado a $19,1^\circ$ de la muestra CS-4 resultó ser ligeramente más ancho que el pico registrado para la muestra CS-2, lo cual podría estar relacionado con una estructura más amorfa como consecuencia del mayor tiempo de entrecruzamiento [46].

A pesar del entrecruzamiento, los difractogramas XRD de las macroesferas CS-2 y CS-4, mantienen un patrón característico de muestras semicristalinas. Este comportamiento podría explicarse considerando que durante la obtención de las macroesferas a pH 8,6 se producen simultáneamente la desprotonación y el entrecruzamiento iónico, por lo tanto se podrían producir cadenas de CS desprotonadas que no presentan entrecruzamiento iónico o segmentos de cadena desprotonados móviles entre los puntos de entrecruzamiento [77,112]. Estas cadenas serían capaces de un reordenamiento compatible con la cristalinidad del material obtenido.

En las Figuras 3.6 (e)-(g) se presentan los difractogramas para las macroesferas preparadas con mezclas de CS/ST (CS2ST8-2, CS2ST8-4, y CS3ST7-4). En todos ellos se observó una disminución en la intensidad de las señales correspondientes a los picos característicos del ST y del CS, lo cual sugiere la existencia de una interacción entre las macromoléculas de estos polisacáridos [129].

A medida que aumentó la proporción de ST en la mezcla CS/ST, hay más grupos OH de las cadenas poliméricas del ST que podrían interactuar con los grupos amino y OH del quitosano. Se registró una menor intensidad y un corrimiento hacia un menor ángulo en la posición del pico de difracción del CS ubicado $10,55^\circ$ al aumentar el contenido de ST (Figuras 3.6 (e) - (g)) [129] como consecuencia del aumento de la interacción entre los biopolímeros. El corrimiento resultó mayor que el registrado en los difractogramas de las matrices preparadas exclusivamente de quitosano entrecruzado (CS-2 y CS-4).

Se ha reportado un comportamiento similar en películas preparadas a partir de mezclas de quitosano con almidón de papa o de maíz en ausencia de agentes entrecruzantes [100,121].

Termogravimetría (TGA)

En la Figura 3.7 se muestran las curvas obtenidas con el análisis termogravimétrico para el CS, el ST y todas las macroesferas preparadas.

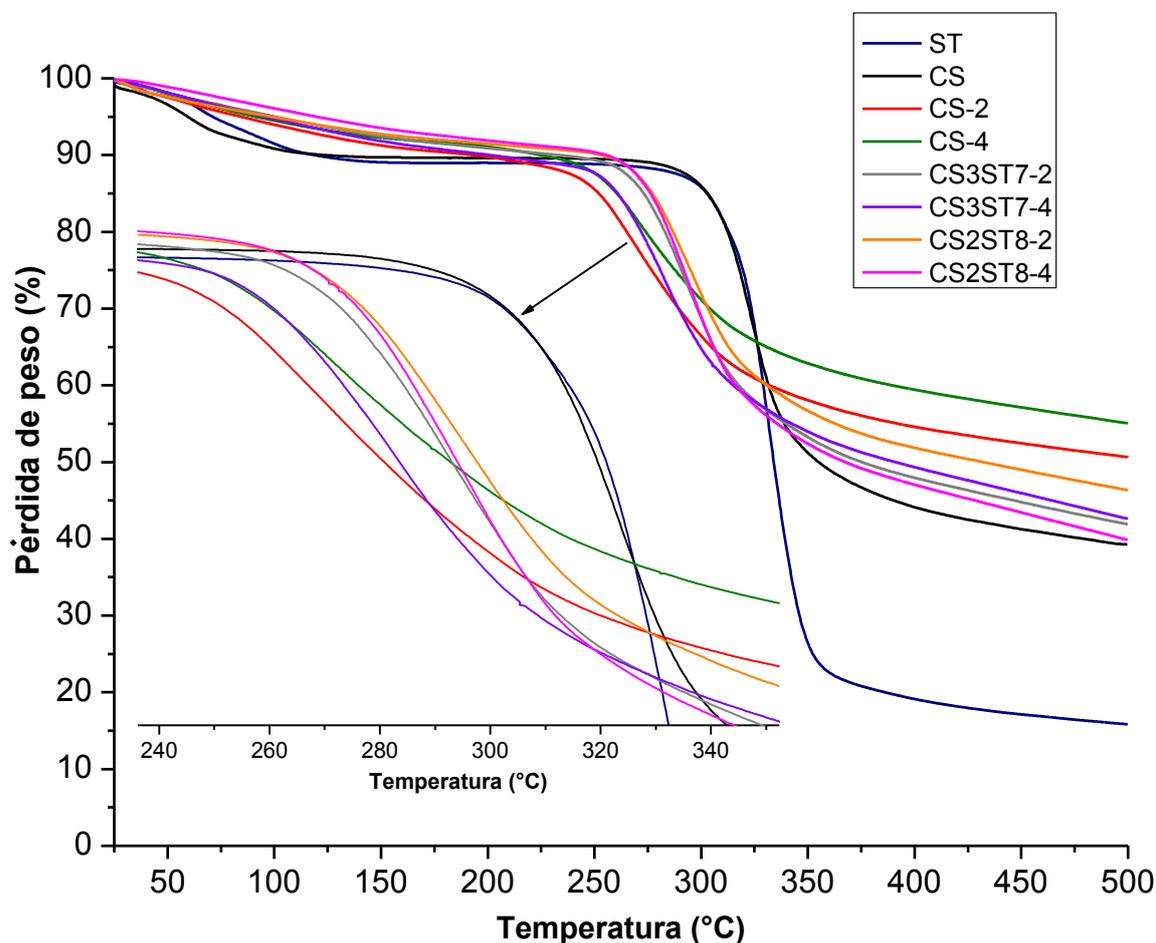


Figura 3.7. Termogramas obtenidos con CS, ST y las macroesferas CS-2, CS-4, CS3ST7-2, CS3ST7-4, CS2ST8-2 y CS2ST8-4.

En la Tabla 3.4 se indican, para el almidón y el quitosano, las tres etapas principales de pérdida de peso que se observan en los termogramas obtenidos. Las etapas coinciden con los resultados presentados por diferentes investigadores tanto para el ST [130–132] como para el CS [108,133].

En el caso del ST, la velocidad máxima de descomposición (T_{max}) ocurrió a 337,22 °C y para el CS puro la T_{max} fue de 324,45 °C.

En la Tabla 3.5 se presenta un resumen de los resultados obtenidos para todos los tipos de macroesferas obtenidos.

En el caso de los termogramas correspondientes a las matrices de CS entrecruzadas iónicamente con STPP (CS-2 y CS-4), al igual que en el caso del termograma del CS sin entrecruzar, se apreciaron tres zonas de pérdida de masa.

Tabla 3.4. Etapas en la descomposición térmica del CS y del ST

Material	Etapas	Intervalo de T (°C)	% de pérdida de masa acumulada	Causa
ST	1	25-115	10,82	Eliminación del agua
	2	314,88 - 358,14	69,62	Descomposición (degradación térmica) del almidón con formación de enlaces tipo éter y deshidratación de grupos hidroxilo en el anillo glucosídico, causando su escisión y la formación de dobles enlaces [134]
	3	355 -500	84,18	Formación de aromáticos (reacciones de ciclación) [134]
CS	1	25- 115	9,32	Eliminación de agua
	2	312,21 - 346,08	44,36	Despolimerización del quitosano (descomposición de las unidades acetiladas y no acetiladas) [108]
	3	346,08 - 500	60,91	Pirólisis del material o descomposición de los residuos de glucosamina [108]

Cuando se comparan las temperaturas de máxima degradación (T_{max}) obtenidas de los gráficos de dTG, las macroesferas preparadas con CS entrecruzado resultan térmicamente menos estables, encontrándose un descenso que varía entre el 14 y el 16 % según el tiempo de entrecruzamiento utilizado respecto a la T_{max} obtenida para el CS sin entrecruzar. La justificación de este resultado podría atribuirse a que las muestras entrecruzadas resultaron más amorfas que el CS utilizado y por lo tanto el menor grado de ordenamiento de las macroesferas de CS entrecruzado iónicamente ofrecería una menor resistencia a la degradación térmica.

Falguni et al. [78] prepararon fibras de CS mediante gelificación ionotrópica utilizando STPP a pH básico y ácido. En su investigación observaron que cuando las fibras estaban más entrecruzadas, lo cual sucede a pH ácido, el material resultaba ser menos estable térmicamente. Al igual que los resultados

encontrados en este trabajo, obtuvieron que sus materiales entrecruzados poseían una menor cristalinidad que originaba una disminución en la T_{max} .

En la Tabla 3.5 se presentan los resultados obtenidos para todas las macroesferas preparadas.

Tabla 3.5. Descomposición térmica de las macroesferas preparadas con distintas composiciones de CS y ST utilizando 2 y 4 h de contacto con la solución con STPP.

Muestra	Intervalo de T (°C)	% de pérdida de masa acumulada ^(a)	T_{max} (°C)
CS-2	25- 115	7,00	278,40
	240 – 340	27,63	
	340 – 500	51,62	
CS-4	25- 115	6,33	273,40
	240 – 340	27,21	
	340 – 500	49,08	
CS3ST7-2	25- 115	5,95	281,87
	240 – 340	43,93	
	340 – 500	54,92	
CS3ST7-4	25- 115	4,92	278,69
	240 – 340	44,35	
	340 – 500	56,93	
CS2ST8-2	25- 115	6,22	293,31
	240 – 340	45,85	
	340 – 500	59,88	
CS2ST8-4	25- 115	4,58	292,19
	240 – 340	44,91	
	340 – 500	57,64	

a) Se refiere al % de pérdida de masa desde el inicio del calentamiento (25°C) hasta la mayor temperatura considerada en cada etapa.

De los resultados de la Tabla 3.5 y la Figura 3.7, se puede concluir lo siguiente:

1. la adición de almidón a la mezcla polimérica generadora de las macroesferas causó una disminución en el grado de entrecruzamiento iónico debido a la menor concentración de quitosano.
2. se produjo una disminución en la cantidad de agua eliminada en la etapa comprendida entre 25 y 115 °C en comparación con los resultados obtenidos a partir las macroesferas preparadas exclusivamente con

quitosano. Considerando la alta hidrofiliidad del almidón, este resultado es sorprendente. Una probable explicación se relaciona con el hecho que el agua puede actuar como plastificante para ambos biopolímeros, pero en el caso del almidón, podría aumentar la retrogradación con el consiguiente aumento de la cristalinidad [135] y por lo tanto se produciría un efecto barrera que podría limitar la pérdida de agua de las macroesferas obtenidas a partir de las mezclas.

Para las matrices preparadas con las mezclas hay una segunda etapa de pérdida de masa, que se debería a la despolimerización del quitosano y a la descomposición del almidón. Este fenómeno se puede atribuir a un proceso complejo que incluye la deshidratación de los anillos del CS y a la despolimerización y descomposición de las unidades de glucosa que pertenecen al almidón [118].

En el intervalo 240 – 340 °C, no se detectaron diferencias significativas con el tiempo de exposición al STPP en solución. No obstante, la pérdida de masa en ese intervalo fue similar para las macroesferas preparadas con ambas mezclas y prácticamente duplicó los valores obtenidos para sus pares con CS entrecruzado.

Los resultados indican que entre 240 y 340°C, para las macroesferas preparadas con almidón, el fenómeno más importante fue la descomposición de este polisacárido con la formación de enlaces éter, la deshidratación y la escisión del anillo glucosídico con la formación de dobles enlaces y la despolimerización del CS tiene lugar en menor medida.

Finalmente, hay una tercera etapa entre 340 y 500 °C causada por la pirólisis del quitosano y la vaporización y eliminación de los productos volátiles de la descomposición del almidón [109]. En este intervalo tampoco se apreció un efecto importante del tiempo de exposición al STPP sobre el porcentaje de pérdida de masa. Sin embargo, el CS perdió una masa mucho mayor, respecto a las mezclas con almidón porque prevalece la pirólisis del CS sobre las reacciones de entrecruzamiento y formación de estructuras aromáticas que

tienen lugar con estas condiciones en el almidón. Estas últimas dan lugar a la formación de una mayor proporción de coque o carbón residual, en comparación con el CS, lo cual se traduce en una menor pérdida de masa total.

Analizando los resultados presentados en las Tablas 3.5 y 3.6, se encontró que la T_{max} de las macroesferas preparadas con mezclas que contienen ST resultaron menores a las que se obtendrían luego de aplicar la regla de las mezclas (Ec 3.1), este resultado estaría relacionado con la interacción entre el CS y el ST y por el entrecruzamiento iónico de la matriz polimérica. La regla de las mezclas para calcular T_{max} se aplica cuando se preparan mezclas poliméricas con un cierto grado de miscibilidad [136].

$$T_{max\ mezcla} = T_{max\ ST} \cdot W_{ST} + T_{max\ CS} \cdot W_{CS} \quad (3.1)$$

Donde:

W_{PVA} = Fracción másica de ST

W_{CS} = Fracción másica de CS

Tabla 3.6. T_{max} experimental y T_{max} calculada con la reglas de las fases de las macroesferas preparadas con distintas composiciones de CS y ST utilizando 2 y 4 h de entrecruzamiento.

Muestra	T_{max} Experimental (°C)	T_{max} Regla de las mezclas (°C)
CS3ST7-2	281,87	326,39
CS3ST7-4	278,69	326,39
CS2ST8-2	293,31	327,00
CS2ST8-4	292,19	327,00

Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).

En la Figura 3.8 se presentan los DSC correspondientes a los polímeros utilizados y a todas las matrices poliméricas preparadas con ambos tiempos de entrecruzamiento.

Para el ST (Figura 3.8 (a)) utilizado como materia prima, se observa un pico endotérmico a 83,16 °C. Soliman et al (1997) atribuyeron esta transición a la deshidratación del agua asociada al biopolímero [137].

El termograma obtenido para el CS puro (Figura 3.8 (b)), en el intervalo de temperaturas comprendido entre 30 y 140 °C, presentó una transición endotérmica con un pico centrado en 79,41 °C que se atribuye a la deshidratación del agua libre presente en el material [112,138,139]. El segundo pico responde a una transformación exotérmica con un máximo en 305,30 °C y una entalpía de transición asociada de 73,92 J/g que se debe a la despolimerización del quitosano [112,139] como consecuencia de la descomposición de las unidades amino y amida presentes [138].

Para las muestras preparadas con CS entrecruzado (Figuras 3.8 (c) y (d) se encontró que las temperaturas correspondientes al máximo del pico asociado a la evaporación del agua retenida en las matrices, son 87,72 °C y 100,09 °C para CS-2 y CS-4 respectivamente. Se observó un corrimiento hacia mayores temperaturas, tomando como referencia al CS sin entrecruzar, que correlacionaría con el aumento del grado de entrecruzamiento.

Los valores encontrados para las entalpías del pico endotérmico fueron de 261,44 J/g, 167,80 J/g y 190,56 J/g para las muestras CS, CS-2 y CS-4, respectivamente (ver Tabla 3.7). Se verificó que las macroesferas más entrecruzadas requirieron de mayor energía para eliminar el agua retenida. Como consecuencia del mayor tiempo de entrecruzamiento, las variaciones de entalpía se incrementaron producto del aumento del entrecruzamiento del material, lo que resulta consistente con lo observado con el estudio de TGA (Ver Figura 3.6 y Tabla 3.5).

El pico exotérmico que se originó como consecuencia de la descomposición del polímero mostró que, en las macroesferas de CS entrecruzadas, la transición ocurrió a menor temperatura independientemente del tiempo de entrecruzamiento utilizado. Este hecho estaría relacionado con la disminución de la cristalinidad por efecto del entrecruzamiento. Los resultados obtenidos coinciden con los

publicados por diferentes investigadores que utilizaron quitosano entrecruzado con STPP [46,112].

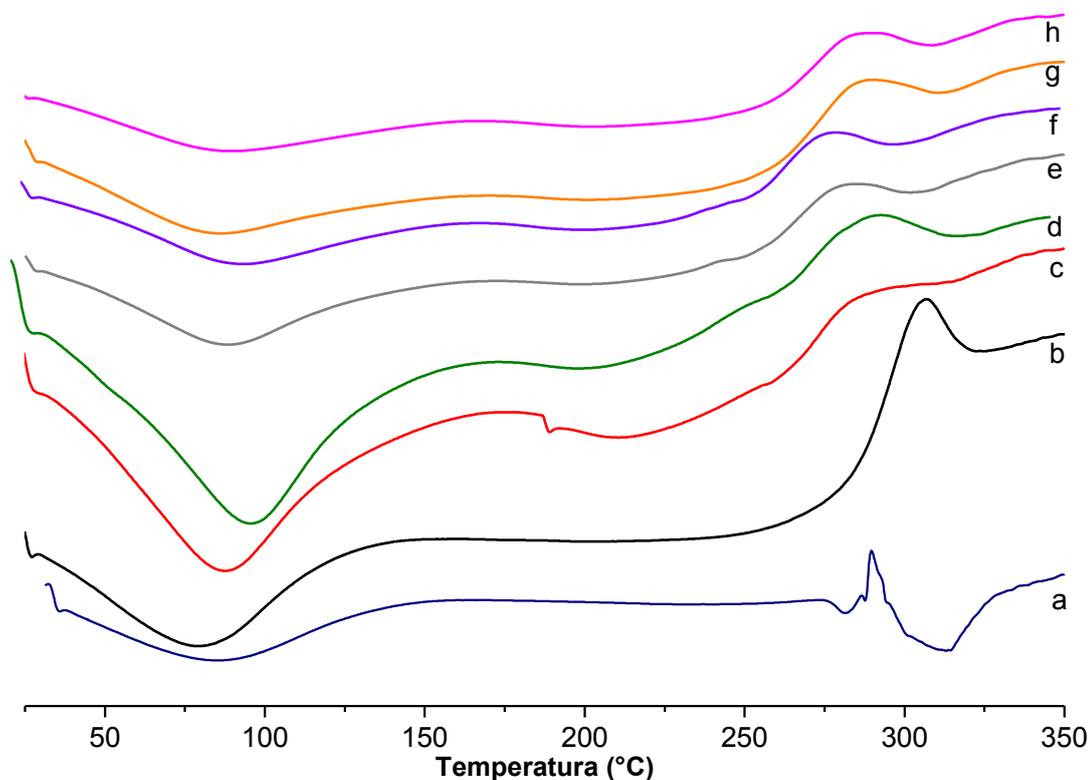


Figura 3.8. v

Tabla 3.7. Picos de las transiciones térmicas y las entalpías de transición para las macroesferas preparadas con mezclas de CS y ST utilizando 2 y 4 h de entrecruzamiento.

Muestra	Pico endotérmico T (°C)	Entalpía de transición J/g	Pico exotérmico T (°C)	Entalpía de transición J/g
CS3ST7-2	88,48	206,30	284,46	51,33
CS3ST7-4	93,63	238,62	279,54	54,21
CS2ST8-2	87,12	164,34	289,84	59,19
CS2ST8-4	92,55	209,51	286,95	70,63

Para las muestras preparadas con las mezclas (Figuras 3.8 (e)-(h), respectivamente), los resultados experimentales se presentan en la Tabla 3.7 donde se indican las temperaturas correspondientes a los picos endotérmicos y exotérmicos, así como las energías asociadas a las transiciones ya descritas.

En todas las muestras se apreció un pico endotérmico asociado con la pérdida de agua libre contenida en las matrices poliméricas. El contenido de quitosano asociado al grado de reticulación, las interacciones presentes en el sistema ST-CS (interacciones físicas por enlaces de hidrógeno) y el tiempo de reticulación son responsables de las diferencias encontradas. La mayor temperatura del pico endotérmico se corresponde con la matriz preparada con el máximo porcentaje de quitosano y el mayor tiempo de entrecruzamiento y la menor temperatura se registró con la matriz preparada con el menor porcentaje de Cs y 2 h de entrecruzamiento.

Cinética de hinchamiento

El estudio de la cinética de hinchamiento es muy importante para encontrar las condiciones óptimas para realizar la carga del fertilizante químico o biológico. Además, el proceso de hidratación de las macroesferas cargadas con el agente químico o biológico, tiene un papel clave en el control de la liberación del agente activo [140].

En las curvas de la Figura 3.9 se muestran los perfiles de la cinética de hinchamiento para las muestras CS-2, CS-4, CS2ST8-2, CS2ST8-4, CS3ST7-2 y CS3ST7-4.

Para ambos tiempos de entrecruzamiento, la integridad estructural de todas las matrices no se alteró durante la totalidad del intervalo de tiempo del experimento, lo que resultó ser una característica adecuada para las matrices que serán utilizadas como sistemas de liberación controlada de fertilizantes.

Se puede observar claramente que el grado de hinchamiento de todos los hidrogeles aumentó con el tiempo, pero después de un cierto período de aproximadamente 180 minutos, todas las macroesferas alcanzan el máximo grado de hinchamiento definido como grado de hinchamiento de equilibrio ($Q_{m\infty}$).

Independientemente de la composición de la macroesfera utilizada, se encontró que un aumento del tiempo de entrecruzamiento produjo una disminución aproximada del 11 % en el grado de hinchamiento [141]. Debido a que en el proceso de preparación de las macroesferas, la coagulación y el entrecruzamiento iónico comenzaron en la superficie de las macroesferas y continuaron hacia el interior, es esperable que el tiempo de entrecruzamiento afecte a la estructura final del material como consecuencia del aumento en la densidad de entrecruzamiento iónico de las macromoléculas de CS [46,102].

Los perfiles cinéticos de hinchamiento indicaron que el tiempo necesario para obtener un dado grado de hinchamiento, es menor en el caso de las matrices preparadas exclusivamente con CS, comparadas con las macroesferas generadas con las mezclas.

Aunque las macroesferas preparadas exclusivamente con CS son las que poseen la mayor densidad de entrecruzamiento iónico, su grado de hinchamiento resulta ser significativamente mayor que el obtenido con las macroesferas preparadas con las mezclas poliméricas. Este resultado se puede explicar con los resultados de SEM que mostraron que las macroesferas CS-2 y CS-4 son las que presentaron la mayor cantidad de poros y huecos en la superficie y en el interior con la consecuente mejora en la absorción.

Cuando se utilizaron matrices poliméricas obtenidas a partir de las mezclas CS/ST, la disminución del grado de hinchamiento se relacionó con el aumento del contenido de CS y con el incremento del tiempo de entrecruzamiento. Esto podría ser producto de las interacciones existentes entre las macromoléculas de un mismo biopolímero o entre ambos biopolímeros sumado al entrecruzamiento iónico entre el CS y el STPP. Los resultados de reología dinámica correlacionan con los resultados de hinchamiento ya que indicaron que cuando se incrementó el contenido de CS aumentaron las interacciones macromoleculares que limitarían la capacidad de hinchamiento de los materiales preparados. Los resultados de XRD, FTIR y TGA también indicaron que, en los xerogeles obtenidos con las mezclas, existen interacciones intermacromoleculares entre el

CS y el ST responsables de la variación del grado de hinchamiento observado [46].

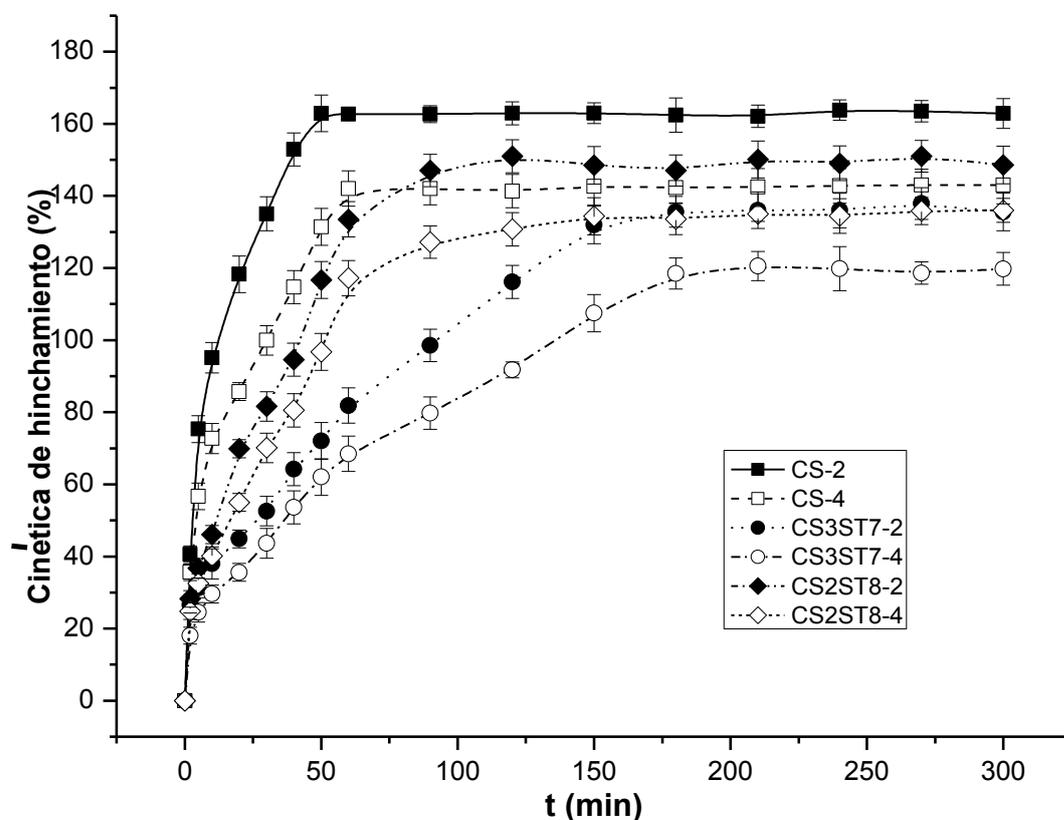


Figura 3.9. Grado de hinchamiento en función del tiempo a 25°C correspondiente a las macroesferas CS-2, CS-4, CS3ST7-2, CS3ST7-4, CS2ST8-2 y CS2ST8-4.

Como se muestra en la Tabla 3.8, el grado de hinchamiento de equilibrio para todos los materiales poliméricos varió en el rango comprendido entre 120 y 163 % aproximadamente, por lo que todas las matrices preparadas resultaron ser superabsorbentes ya que tienen la capacidad de absorber más del 100% de su peso [142] y por lo tanto son adecuadas para producir agroquímicos.

En la Tabla 3.8 se reportan los valores de los parámetros cinéticos obtenidos cuando se realizó el ajuste no lineal de los datos experimentales correspondientes a las cinéticas de hinchamiento de las macroesferas preparadas, utilizando la ecuación semiempírica de Ritger y Peppas (ec. 2.3). Los resultados muestran que el transporte de agua está principalmente controlado por el mecanismo de difusión fickiana donde la velocidad de difusión del agua que ingresa al xerogel es la etapa controlante.

Tabla 3.8. Parámetros cinéticos de liberación a 25 °C, obtenidos utilizando la ecuación 2.4 y valores del grado de hinchamiento máximo experimental correspondientes a las macroesferas preparadas con CS o CS/ST.

Muestra	Exponente n	k' (min^{-1})	R^2	Mecanismo de Transporte	$Q_{m\infty}$ Hinchamiento en el equilibrio (%)
CS-2	0,35±0,06	40,65±8,72	0,9814	Difusivo (Fickiano)	162,85±4.88
CS-4	0,39±0,06	27,98±5,46	0,9877	Difusivo (Fickiano)	142,62±3.85
CS3ST7-2	0,40±0,05	11,82±3,07	0,9838	Difusivo (Fickiano)	135,98±3.33
CS3ST7-4	0,45±0,04	10,40±2,01	0,9894	Transporte anómalo	120,85±3.72
CS2ST8-2	0,45±0,08	18,53±6,24	0,9716	Transporte anómalo	150,99±4.20
CS2ST8-4	0,43±0,06	17,34±4,16	0,9830	Difusivo (Fickiano)	133,58±3.29

El valor de la constante de k' disminuyó cuando se utilizó el mayor tiempo de entrecruzamiento, independientemente de la composición polimérica utilizada, debido al incremento de las interacciones macromoleculares que tienen lugar en la matriz polimérica. En el caso de las mezclas, se encontró que el valor de la constante de k' disminuyó cuando se incrementó el porcentaje de CS debido también al aumento de las interacciones iónicas.

INFLUENCIA DEL PROCESO DE ESTERILIZACIÓN

A fin de evaluar las modificaciones estructurales producidas como consecuencia del proceso de esterilización, se utilizaron las técnicas de caracterización RMN y SEM y se analizó el grado de hinchamiento de equilibrio.

Los ensayos se realizaron solamente con macroesferas preparadas con 20% de CS y 2 horas de entrecruzamiento (CS2ST8-2) porque esta composición fue la seleccionada para preparar el biofertilizante debido a que esta matriz resulta la más económica por poseer el menor porcentaje de quitosano y la más sencilla de preparar industrialmente porque requiere el menor tiempo de entrecruzamiento.

Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Con el fin de analizar la influencia del proceso de esterilización sobre el entrecruzamiento iónico de los materiales, se realizó un ensayo de RMN de las matrices poliméricas esterilizadas y de las no esterilizadas.

La Figura 3.10 muestra los espectros ^{31}P de las macroesferas CS2ST82-2ES (esterilizada) y CS2ST82-2 (no esterilizada). En el caso de la matriz polimérica no esterilizada se observaron tres picos. El pico ubicado a 2,37 ppm, se atribuyó a la cadena terminal del grupo fosfato [107,143]. También se pueden apreciar dos picos característicos asociados a la presencia de la especie trifosfato, uno ubicado a $-10,27$ ppm correspondiente al átomo de fósforo α terminal y otro localizado a $-22,53$ ppm relacionado con el átomo de fósforo medio, lo que indica la presencia, en la matriz polimérica, de grupos tripolifosfóricos asociados al STPP utilizado como entrecruzante iónico del CS [144].

El espectro obtenido confirmó la unión iónica entre el CS y el STPP en la estructura del material no esterilizado. Estos resultados estuvieron de acuerdo con el espectro de CP-MAS ^{31}P -RMN obtenido para CS entrecruzado con STPP informada por Sacco et al. (2014) [144].

Los resultados obtenidos cuando se realizó la resonancia magnética nuclear utilizando las muestras de las macroesferas esterilizadas, el espectro presentó solo dos picos ubicados a 2,37 ppm y $-10,27$ ppm. Como consecuencia del proceso de esterilización, el pico que encontraba a $-22,53$ ppm desapareció, lo que indicó la ruptura de la unión iónica entre el agente entrecruzante y las macromoléculas del CS.

El espectro registrado con el material esterilizado mostró cambios significativos en la intensidad de los dos picos mencionados en comparación con los mismos picos obtenidos en el espectro perteneciente al material no esterilizado. Hubo un aumento de la intensidad del pico localizada a 2,37 ppm y una disminución en el pico a $-10,27$ ppm. En consecuencia, el proceso de esterilización modificó la

densidad de entrecruzamiento iónico del material esterilizado disminuyéndolo con respecto al material sin esterilizar [145].

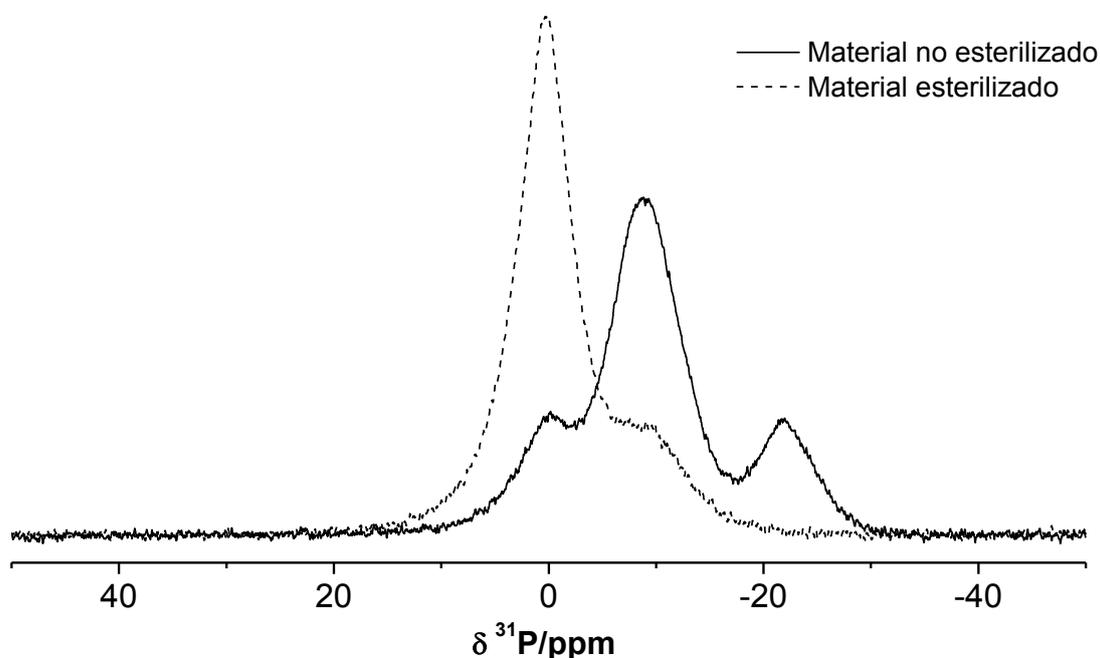


Figura 3.10. Espectro de ^{31}P -RMN de macroesferas de CS/ST entrecruzados con STPP esterilizadas y sin esterilizar.

Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

En las micrografías presentadas en la Figura 3.11 se puede observar que el proceso de esterilización produjo matrices con un diámetro de $1,8 \pm 0,04$ mm lo que implica una reducción aproximada del 40% del diámetro de las macroesferas respecto a las macroesferas obtenidas sin esterilizar.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los ensayos de termogravimetría, se puede asegurar que las condiciones aplicadas en el proceso de esterilización (120°C) no pueden descomponer ni despolimerizar a los biopolímeros utilizados para formar las macroesferas [46] por lo que la reducción de tamaño detectada no obedece a ninguno de estos procesos.

Los resultados de RMN indicaron, que el calor transferido al material cuando se realizó el proceso de esterilización disminuyó la densidad de entrecruzamiento de la red tridimensional, lo que sería la causa de la disminución del tamaño registrado.

Serp, Mueller, von Stockar y Marison también informaron una modificación en el tamaño de las matrices poliméricas en forma de esfera preparadas con alginato después de un tratamiento térmico. Los investigadores obtuvieron una reducción del 23% en el diámetro después de un tratamiento a 130 ° C durante 20 min. Ellos indicaron que la contracción en el tamaño de las macroesferas se debió a la reorganización de las cadenas de alginato junto con la pérdida de agua [146].

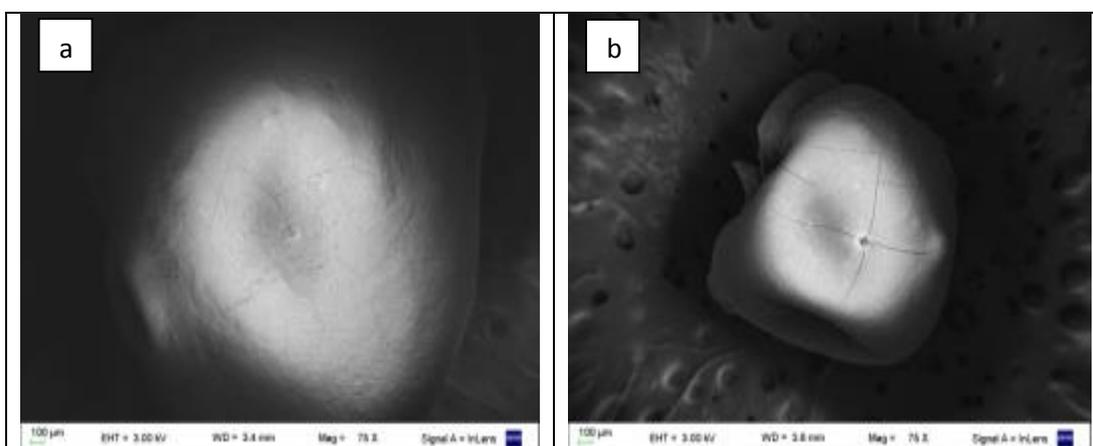


Figura 3.11. Micrografías de las macroesferas CS2ST8-2 no esterilizadas (a) y CS2ST8-2ES esterilizadas (b).

Grado de Hinchamiento en el equilibrio

Esta experiencia se realizó para evaluar la influencia de la esterilización en el grado de hinchamiento en el equilibrio. Este parámetro es fundamental para asegurar que la absorción del inóculo bacteriano garantice el título de microorganismos adecuado para producir el biofertilizante.

Las macroesferas esterilizadas presentaron un mayor grado de hinchamiento en el equilibrio (235%) con respecto a la misma matriz sin esterilizar (143%). La justificación del mencionado comportamiento radica en la disminución del grado de entrecruzamiento confirmado con el ensayo de RMN [147].

Cuando se preparan los biofertilizantes, el proceso de esterilización previo a la carga de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal resulta una etapa ineludible, por lo tanto, un incremento del grado de hinchamiento como consecuencia del mencionado proceso resulta óptimo teniendo en cuenta que la carga de los microorganismos se hace por absorción del inóculo bacteriano.

CARACTERIZACIÓN DE LAS MATRICES POLIMÉRICAS PREPARADAS CON CS/PVA

Las composiciones y tiempos de entrecruzamiento seleccionados para generar este tipo de matrices, es resultado de numerosos ensayos experimentales que permitieron optimizar la obtención efectiva de las macroesferas con las características deseada para la aplicación agroquímica.

Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

En la Figura 3.12 se presentan las micrografías obtenidas para las macroesferas preparadas con mezclas de CS/PVA utilizando diferentes tiempos de entrecruzamiento.

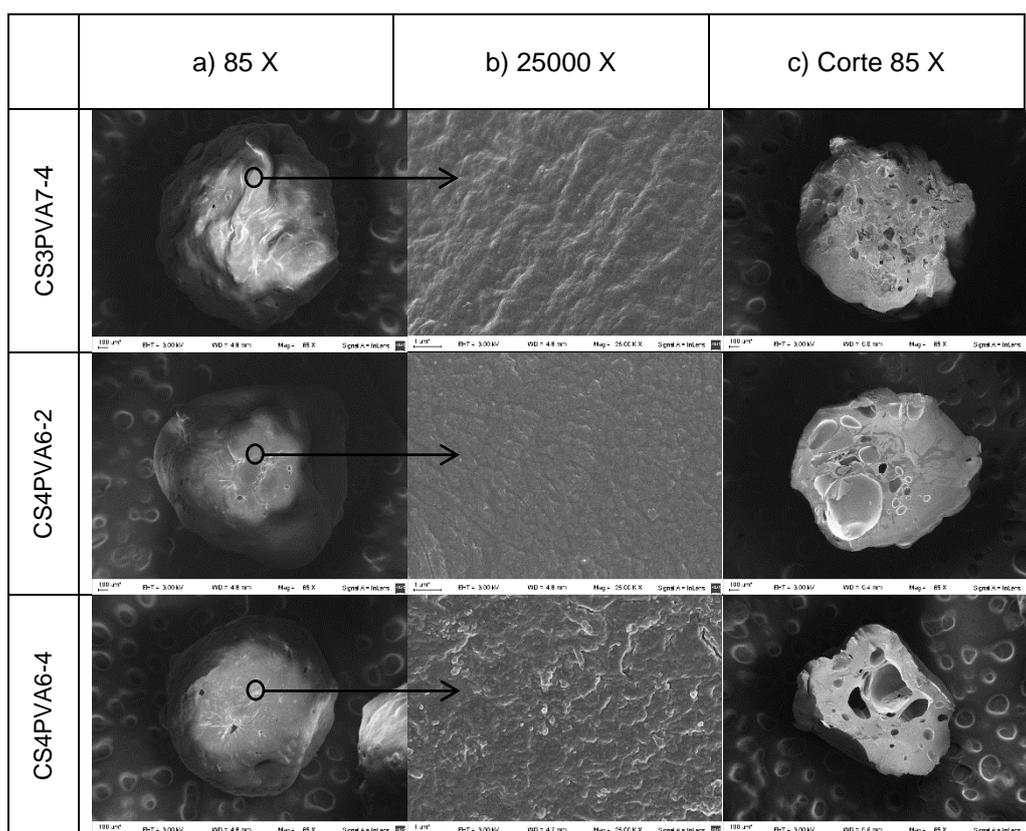


Figura 3.12. Micrografías correspondientes a matrices preparadas con diferentes composiciones de CS/PVA utilizando 2 y 4 h de entrecruzamiento. a) macroesferas completas; b) amplificación de la superficie y c) corte transversal de las macroesferas.

El análisis de la morfología superficial indicó que las macroesferas poseen una forma esférica irregular con un diámetro promedio de $1,55 \pm 0,50$ mm, son porosas y tienen una superficie rugosa. Al igual que para las macroesferas preparadas con CS/ST, la forma y el tamaño final obtenido fue producto del método de preparación seleccionado.

Se observó que todas las macroesferas estudiadas tuvieron una forma aproximadamente esférica con una pequeña protuberancia producto del proceso de obtención por goteo de la mezcla polimérica. En las micrografías se observaron poros y cavidades de diferentes tamaños debido a la oclusión de burbujas de aire que se generaron debido a la técnica de preparación empleada.

Como consecuencia de la incorporación del PVA, tanto la superficie exterior como la interior, resultaron porosas y con una rugosidad menor que la observada en las macroesferas preparadas exclusivamente con CS, pero mayor que la observada para el sistema CS/ST (ver Figura 3.2). Para las matrices preparadas con 40 % de CS se observó que la rugosidad superficial aumentó con el tiempo de entrecruzamiento de la misma forma observada con los sistemas CS y CS/ST descritos previamente.

Las micrografías de las matrices seccionadas transversalmente revelaron que debido a la presencia de PVA, las oquedades disminuyeron en número y en tamaño respecto a las existentes en las macroesferas preparadas exclusivamente con CS (ver Figura 3.2).

Espectroscopía de Energía Dispersiva (EDS).

En la Tabla 3.9 se muestran los resultados semicuantitativos obtenidos con la técnica de EDS para las muestras preparadas con las mezclas CS/PVA. La mayor concentración de CS en las mezclas, y el mayor tiempo de entrecruzamiento produjo un aumento de la composición porcentual de P medida en la superficie de las matrices poliméricas. Estas matrices, al igual que las analizadas anteriormente para los sistemas preparados con CS y CS/ST, poseen menor cantidad de P cuando la comparamos con las macroesferas preparadas

exclusivamente con CS (ver Tabla 3.2). La explicación radica en que el CS es el único polímero de la mezcla que se entrecruza iónicamente con el STPP utilizado [46], debido a que es imposible lograr la fosforilación del PVA sin una modificación química previa del mismo [148–150].

Tabla 3.9. Composición porcentual de P presente en la superficie de las macroesferas preparadas con las mezclas CS/PVA.

Muestra	Composición (% m/m de P)
CS3PV7-4	1,99 ± 0,41
CS4PV6-2	2,12 ± 0,53
CS4PV6-4	2,74 ± 0,58

Fracción Soluble

Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 3.10. Los resultados obtenidos demuestran una mínima influencia de la composición polimérica y el tiempo de entrecruzamiento en la fracción soluble determinada experimentalmente. El PVA es un polímero sintético biodegradable cuya solubilidad en agua caliente depende del peso molecular y del grado de hidrólisis. En este ensayo se utiliza agua a 25 °C, por lo que, esta podría ser la razón de la escasa influencia del tiempo de entrecruzamiento y la composición sobre la fracción soluble de las matrices poliméricas preparadas.

Tabla 3.10. Fracción soluble porcentual de las macroesferas CS/PVA a diferentes tiempos de entrecruzamiento.

Muestra	% de la fracción soluble
CS3PV7-4	8,05 ± 0,39
CS4PV6-2	8,42 ± 0,41
CS4PV6-4	7,37 ± 0,36

Difracción de rayos X (XRD)

En la Figura 3.13 se muestran los patrones de difracción de rayos X correspondientes a los polímeros utilizados y a las macroesferas preparadas.

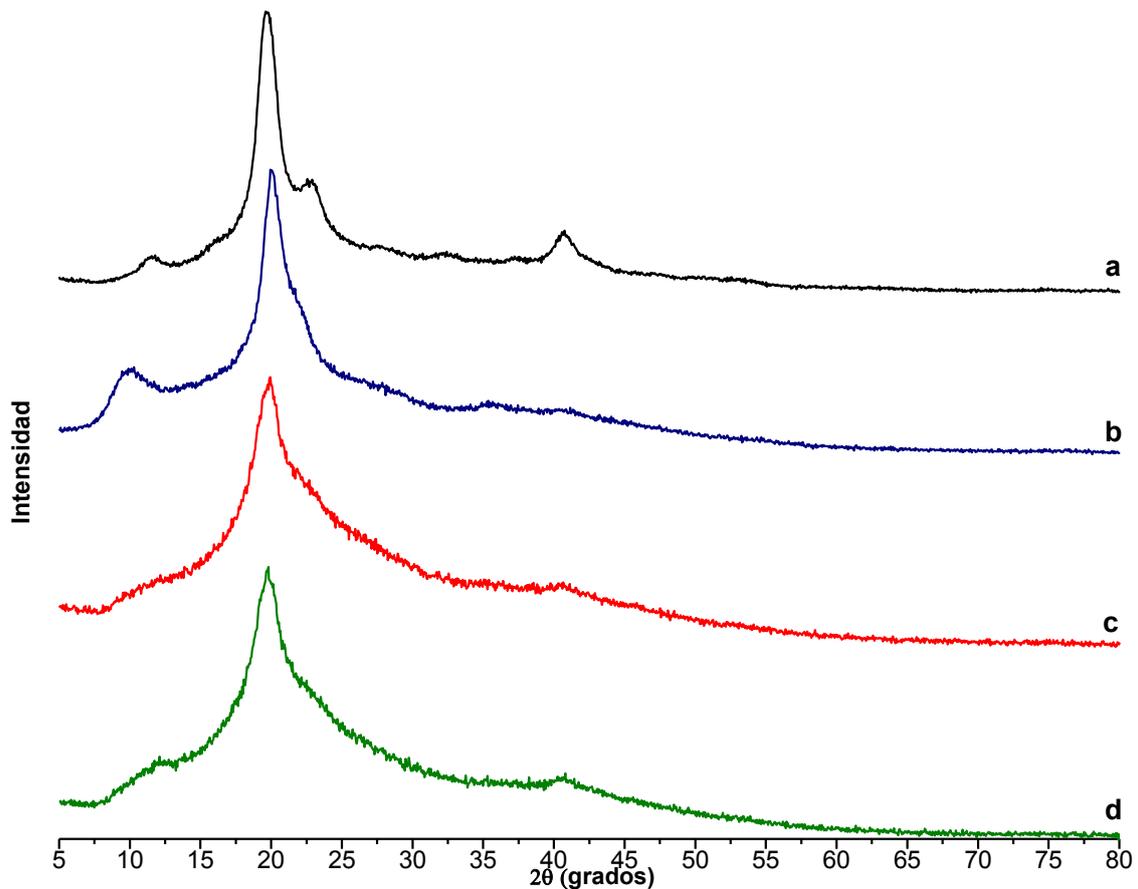


Figura 3.13. Difractogramas de rayos X de: PVA puro (a), CS puro (b), CS4PVA6-4 (c) y CS3PVA7-4 (d).

Como se puede apreciar la Figura 3.13 (a), el patrón de difracción del PVA presentó picos característicos en $12,0^\circ$, $19,5^\circ$, $22,6^\circ$ y $40,5^\circ$ que se atribuyen a la naturaleza semicristalina del polímero [151,152].

La Figura 3.13 (b) muestra el difractograma correspondiente al CS puro. Se pudieron observar dos picos debido a su naturaleza semicristalina ubicados a $10,55^\circ$ y $19,7^\circ$ como ya fue discutido previamente.

En las Figuras 3.13 (c) y (d) se muestran los patrones de difracción para las macroesferas preparadas con 30 y 40 % de CS en las mezclas y cuatro horas de entrecruzamiento.

En los difractogramas de las mezclas se observó la desaparición del pico ubicado a $22,6^\circ$ y la disminución de la intensidad de los picos ubicados a $12,0^\circ$ y $40,5^\circ$

asociados con la estructura cristalina del PVA. Se pudo apreciar que el aumento del contenido de CS provocó una menor intensidad de los picos mencionados. La disminución del orden cristalino observado en los patrones de difracción de las mezclas se podría relacionar con las interacciones puente hidrógeno que se generan entre ambos polímeros y por efecto del entrecruzamiento iónico [153,154].

Termogravimetría (TGA)

En la Figura 3.14 se muestran los perfiles de degradación de las muestras de CS, PVA, CS7PV3-4, CS6PV4-2 y CS6PV4-4.

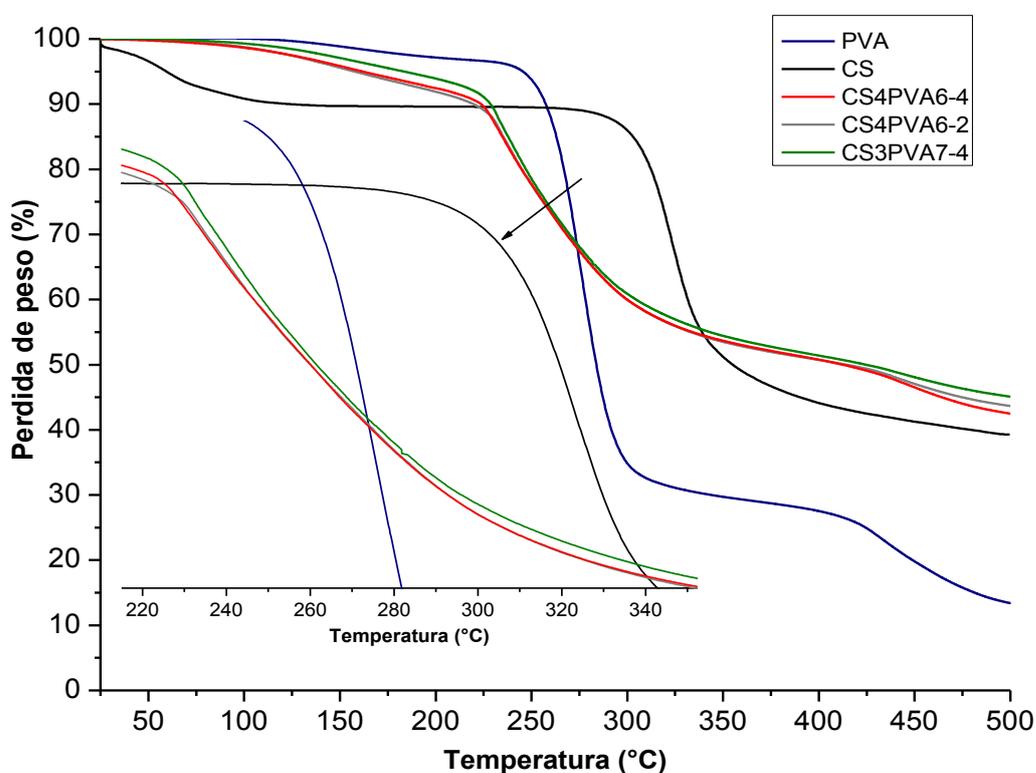


Figura 3.14. Termogramas para el CS, PVA, CS3PV7-4, CS4ST6-2 y CS4ST6-4.

El comportamiento térmico del PVA presenta tres zonas bien diferenciadas que se describen en la Tabla 3.11 con una T_{max} de 273,29 °C, que ya ha sido reportada por diferentes investigadores [155,156].

Tabla 3.11. Etapas en la descomposición térmica del PVA.

Material	Etapas	Intervalo de T (°C)	% de pérdida de masa acumulada (a)	Observaciones
PVA	1	25- 115	6,41	Eliminación de agua
	2	250 - 350	70,21	Reacción de deshidratación de los grupos –OH de las cadenas poliméricas [155].
	3	346,08 - 500	86,15	Pirólisis del material y la subsiguiente liberación de CO ₂ [157].

Los resultados del análisis termogravimétrico de las macroesferas preparadas a partir de CS y PVA entrecruzadas iónicamente con STPP utilizando diferentes tiempos de entrecruzamiento, se muestran en la Tabla 3.12.

Tabla 3.12. Descomposición térmica de las macroesferas preparadas con mezclas CS y PVA.

Muestra	Intervalo de T (°C)	% de pérdida de masa acumulada (a)	T _{max} (°C)
CS-2	25- 115	7,00	278,40
	240 – 340	27,63	
	340 – 500	51,62	
CS-4	25- 115	6,33	273,40
	240 – 340	27,21	
	340 – 500	49,08	
CS3PVA7-4	25- 115	6,41	299,01
	200 – 350	42,21	
	350 – 500	57,73	
CS4PVA6-2	25- 115	6,32	299,76
	200 – 350	40,03	
	350 – 500	55,12	
CS4PVA6-4	25- 115	4,84	302,93
	200 – 350	39,89	
	350 – 500	52,49	

(a) Se refiere al % de masa perdida desde el inicio del calentamiento (25°C) hasta la mayor temperatura considerada en cada etapa.

Los valores de T_{max} informados en las tablas se obtuvieron del gráfico dTG (primera derivada de los Termogramas).

De los resultados de las Tablas 3.9 y 3.10, se encontró que la T_{max} de las macroesferas preparadas con mezclas que contienen PVA resultaron menores a las que se obtienen luego de aplicar la regla de las mezclas (Ec 3.2).

$$T_{max\ mezcla} = T_{max\ PVA} * W_{PVA} + T_{max\ CS} * W_{CS} \quad (3.2)$$

Donde:

W_{PVA} = Fracción másica de PVA

W_{CS} = Fracción másica de CS

Tabla 3.13. T_{max} experimental y T_{max} aplicando las reglas de las fases

Muestra	T_{max} Experimental (°C)	T_{max} Regla de las mezclas (°C)
CS3PVA7-4	281,87	288,64
CS4PVA6-2	293,31	293,75
CS4PVA6-4	292,19	293,75

En todos los casos, la T_{max} experimental resultó inferior a la calculada con la regla de las fases por lo que la regla no es aplicable debido a la existencia de interacciones entre los polímeros que componen la mezcla y al efecto del entrecruzamiento iónico [158]. Estos resultados coinciden con lo reportado por Chen et al. [159] que prepararon microesferas de CS/PVA mediante entrecruzamiento iónico con STPP a pH básico.

Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).

En la Figura 3.15 se muestran las curvas de DSC para las muestras CS, PVA, CS3PV7-4, CS4PV6-2 y CS4PV6-4.

La Figura 3.15 (a) corresponde al DSC del PVA. Este polímero semicristalino presenta una transición térmica endotérmica asociada a la temperatura de fusión (T_m) que ocurrió a 231,28 °C y otra transición endotérmica a partir de 250 °C como consecuencia de la descomposición térmica del mismo [160,161].

El DSC del quitosano que presenta un pico endotérmico asociado a la pérdida de agua y un pico exotérmico debido a la despolimerización del polímero, ya ha sido analizado cuando se estudiaron las macroesferas preparadas con CS/ST.

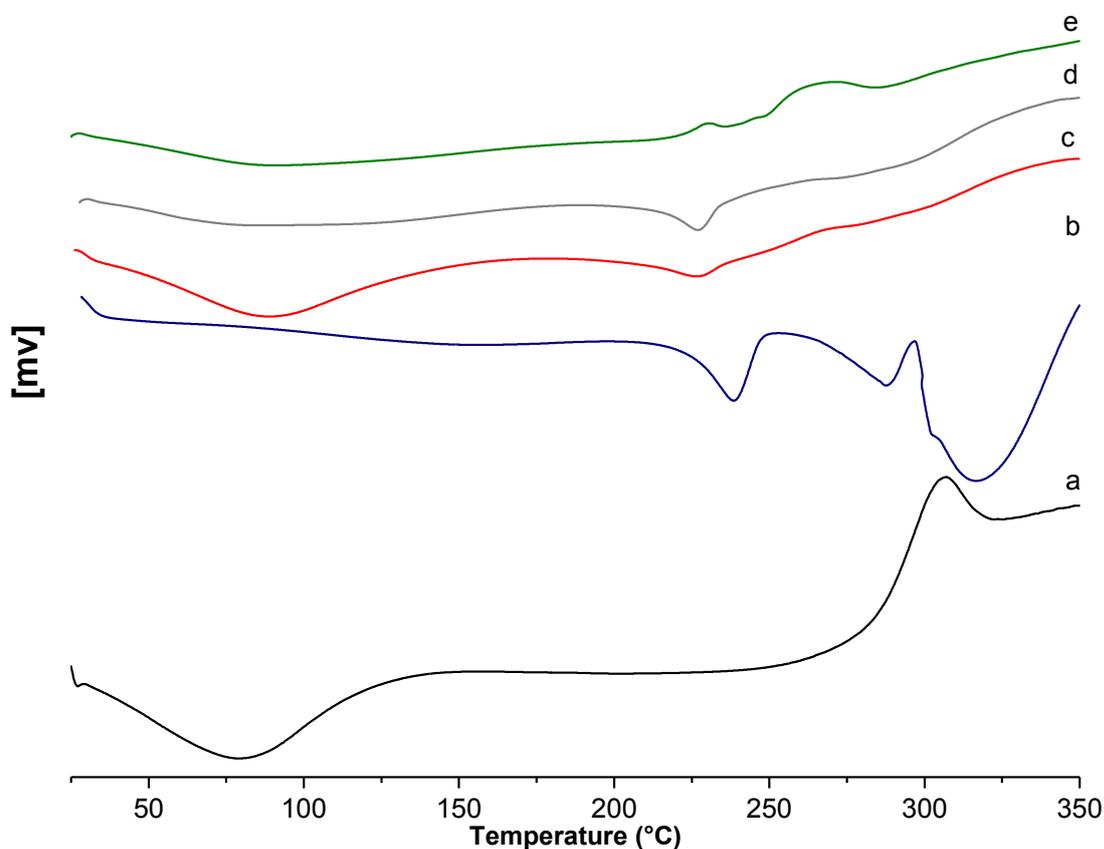


Figura 3.15. Termogramas DSC del CS (a), PVA (b), CS3PVA7-4 (c), CS4PVA6-2 (d) y CS4PVA6-4 (e).

El análisis térmico de las mezclas de CS/PVA mostró un corrimiento de la temperatura de fusión (T_m) producto de las interacciones entre ambos polímeros.

La T_m del PVA puro es 231,28 °C mientras que para las mezclas poliméricas las T_m registradas son 230,81 °C, 230,91 °C y 231,07 °C para las matrices CS3PVA7-4, CS4PVA6-2 y CS4PVA6-4 respectivamente (ver Tabla 3.14).

En este caso, las mezclas poliméricas utilizadas para generar las macroesferas poseen una temperatura de fusión menor que la T_m del PVA compatible con una reducción de la cristalinidad del material como consecuencia de la interacción

entre los polímeros y de la interacción iónica independientemente de la composición de la mezcla polimérica o del tiempo de entrecruzamiento utilizado para la formación de las macroesferas.

Tabla 3.14. Picos de las transiciones térmicas y las entalpías de transición para las macroesferas preparadas con mezclas de CS y PVA utilizando 2 y 4 h de entrecruzamiento.

Muestra	Pico endotérmico T (°C)	Entalpía de transición J/g	Pico exotérmico T (°C)	Entalpía de transición J/g	Pico endotérmico T (°C)	Entalpía de transición J/g
CS3PVA7-4	89,64	238,62	---	---	230,81	12,24
CS4PVA6-2	93,81	212,40	---	---	230,91	12,75
CS4PVA6-4	88,89	204,44	271,25	8,50	231,07	11,12

Los resultados encontrados coinciden con diferentes investigaciones que reportaron el desplazamiento de T_m hacia temperaturas más bajas cuando se utilizaron mezclas de PVA con otros polímeros hidrofílicos [162,163].

Otros autores también observaron la desaparición de la T_m relacionada con la presencia del PVA debido al efecto del entrecruzamiento, en todos los casos argumentando que sería debido a la destrucción de las zonas cristalinas por efecto del entrecruzamiento de las macromoléculas [160,164–167]. Esta última observación concuerda con los resultados obtenidos en esta Tesis, cuando se utiliza el mayor porcentaje de quitosano en la mezcla y el mayor tiempo de entrecruzamiento

Cinética de hinchamiento y mecanismo de transporte

En las Figura 3.16 se observan los perfiles de la cinética de hinchamiento para las muestras CS3PV7-4, CS4PV6-2, y CS4PV6-4.

El comportamiento resulta similar a lo observado cuando se utilizan las matrices de CS/ST. Ninguna de las muestras utilizadas se disolvió durante el tiempo que duró el experimento encontrándose que el grado de hinchamiento de todas las

muestras analizadas aumentó con el tiempo y que el perfil resultante para todas las matrices es similar.

Todas las muestras estudiadas alcanzaron la capacidad de hinchamiento de equilibrio ($Q_{m\infty}$) después de 2 horas.

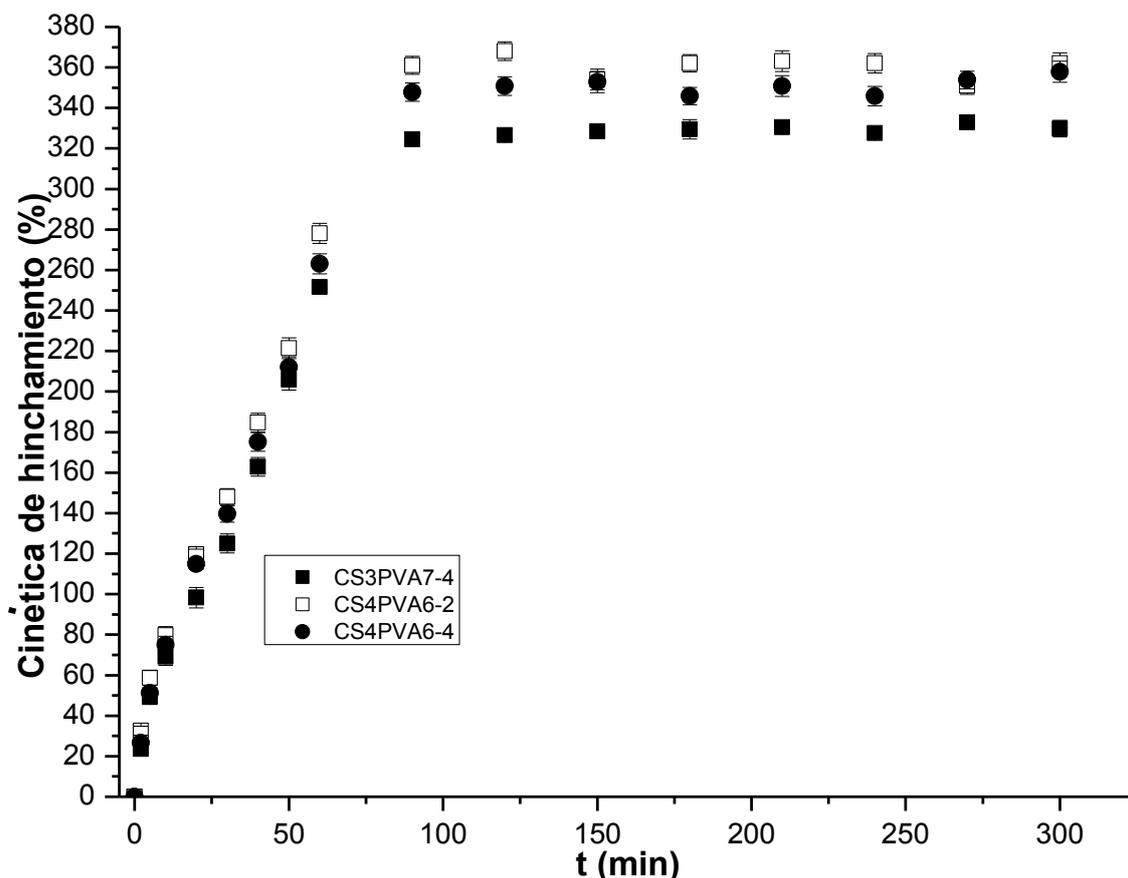


Figura 3.16. Variación del grado de hinchamiento en función del tiempo para las macroesferas CS3PVA7-2, CS4PVA6-2 y CS4PVA6-4 a 25 °C.

En función de los grados de hinchamiento de equilibrio obtenidos, se puede afirmar que los materiales preparados con PVA resultaron ser superabsorbentes ya que el $Q_{m\infty}$ varió de 324 a 361 % según la composición y el tiempo de entrecruzamiento seleccionados (ver Tabla 3.15). Estos valores resultaron superiores a los obtenidos con las macroesferas de CS y ST, lo que indicaría que el uso de PVA en la preparación de las matrices poliméricas resulta óptimo ya que incrementa de manera sorprendente el $Q_{m\infty}$ del material respecto al obtenido con CS y 2 h de entrecruzamiento (desde 162,85 a 361,05 %).

Las diferencias observadas en el comportamiento de hinchamiento estarían relacionadas con la estructura final de la matriz polimérica que es función de las interacciones macromoleculares, del entrecruzamiento iónico y de la porosidad del material tal como se ha discutido previamente y se puede apreciar en los resultados de la microscopía electrónica de barrido.

Los resultados del ajuste no lineal correspondientes a las curvas de la cinética de hinchamiento de los hidrogeles utilizando la ecuación 2.3 se muestran en la Figura 3.16 y los parámetros cinéticos en la Tabla 3.15.

Tabla 3.15 Grado de hinchamiento en el equilibrio correspondiente a las macroesferas preparadas con CS o con CS/PVA utilizando diferentes tiempos de entrecruzamiento y parámetros cinéticos obtenidos del ajuste no lineal con la ecuación de Ritger–Peppas (Ec. 2.3).

Muestras	Exponente n	k' (min^{-1})	R^2	Mecanismo de Transporte	$Q_{m\infty}$ Hinchamiento en el equilibrio (%)
CS-2	0,35±0,06	40,65±8,72	0,9814	Difusivo (Fickiano)	162,85±4,88
CS-4	0,39±0,06	27,98±5,46	0,9877	Difusivo (Fickiano)	142,62±3,85
CS3PVA7-4	0,77±0,04	10,18±1,78	0,9876	Transporte anómalo	324,53±4,02
CS4PVA6-2	0,73±0,04	13,44±2,18	0,9876	Transporte anómalo	361,05±8,90
CS4PVA6-4	0,81±0,06	17,18±3,26	0,9811	Transporte anómalo	347,82±6,20

Los valores obtenidos para el exponente n indican que la velocidad de difusión del agua y la relajación de las macromoléculas son las etapas controlantes del mecanismo de incorporación de agua en la red polimérica tridimensional.

CAPÍTULO IV

En este capítulo se analiza la cinética de liberación en agua del nitrato de potasio y se determina la etapa controlante del mecanismo de liberación

MECANISMO DE LIBERACIÓN DEL FERTILIZANTE QUÍMICO EN LOS SISTEMAS CS Y CS/ST

Incorporación de Nitrato de Potasio en las macroesferas

La absorción de nitrato de potasio se realizó colocando las macroesferas secas en una solución saturada del fertilizante modelo seleccionado (KNO_3) durante 5 h. El volumen de solución acuosa utilizada y el tiempo de absorción se determinaron en función de los resultados obtenidos en los ensayos de hinchamiento.

En la Tabla 4.1 se muestran los resultados del porcentaje de carga del agente activo incorporado a las matrices poliméricas calculado con la Ec. 2.5.

Tabla 4.1. Porcentaje de carga del fertilizante químico modelo (KNO_3).

Muestras	% de carga
CS-2	53,26±1,60
CS-4	49,80±0,89
CS3ST7-2	40,43±0,81
CS3ST7-4	37,92±1,33
CS2ST8-2	41,13±1,85
CS2ST8-4	38,67±1,16

Para todas las macroesferas con una dada composición, se verificó que a medida que aumentó el tiempo de entrecruzamiento, disminuyó la efectividad del proceso de incorporación del fertilizante como consecuencia de una rigidización de las matrices que limitó el hinchamiento.

Los porcentajes de encapsulación obtenidos variaron de 37,92 a 53,26 % obteniéndose el máximo valor para las macroesferas de CS-2 y el mínimo para las macroesferas preparadas con mezclas poliméricas de composiciones CS2ST8-4 y CS3ST7-4 que absorbieron un contenido de KNO_3 similar. La incorporación del ST en la estructura de las macroesferas disminuyó significativamente la absorción de fertilizante químico respecto a las matrices

preparadas exclusivamente con CS como consecuencia de los cambios estructurales que se producen, debido a las posibles interacciones entre el ST y el CS como se describió anteriormente.

Se debe mencionar que, en la aplicación agroindustrial, el porcentaje de agroquímico requerido para que una formulación se pueda clasificar como fertilizante de liberación controlada es del 60 % m/m, siendo el 40 % m/m restante la composición máxima de matriz polimérica permitida.

Como consecuencia de los resultados presentados en la Tabla 4.1, se podría asegurar que el método de encapsulación utilizado no cumpliría con los requerimientos necesarios para que las macroesferas estudiadas puedan catalogarse como CRFs a nivel comercial aunque efectivamente resulten fertilizantes de liberación controlada en cuanto a su comportamiento cinético [46].

Cinética de liberación del fertilizante

La liberación del nitrato de potasio a partir de las macroesferas cargadas con el soluto se realizó en agua desionizada sin agitación (ensayo estático) a temperatura constante (25 °C), tomando tres réplicas de cada una de las muestras estudiadas.

La Figura 4.1 corresponde a los perfiles de liberación del fertilizante obtenidos a partir de las muestras CS-2, CS-4, CS2ST8-2 y CS3ST7-2 de manera de analizar la influencia de la composición polimérica en la cinética de liberación.

La totalidad de las muestras utilizadas presentan un perfil de liberación similar. No se encontraron tiempos de retardo en la liberación del nitrato de potasio. Este tiempo se asocia al período necesario para llenar los poros y huecos con una mínima cantidad de agua del medio receptor previamente al comienzo de la liberación. Debido a la morfología superficial y a la estructura interna de las matrices poliméricas que se evaluaron con SEM, se produce un rápido hinchamiento del material [168]. Luego de 16 días de liberación, las

macroesferas mantuvieron su forma y tamaño con elevados porcentajes de liberación.

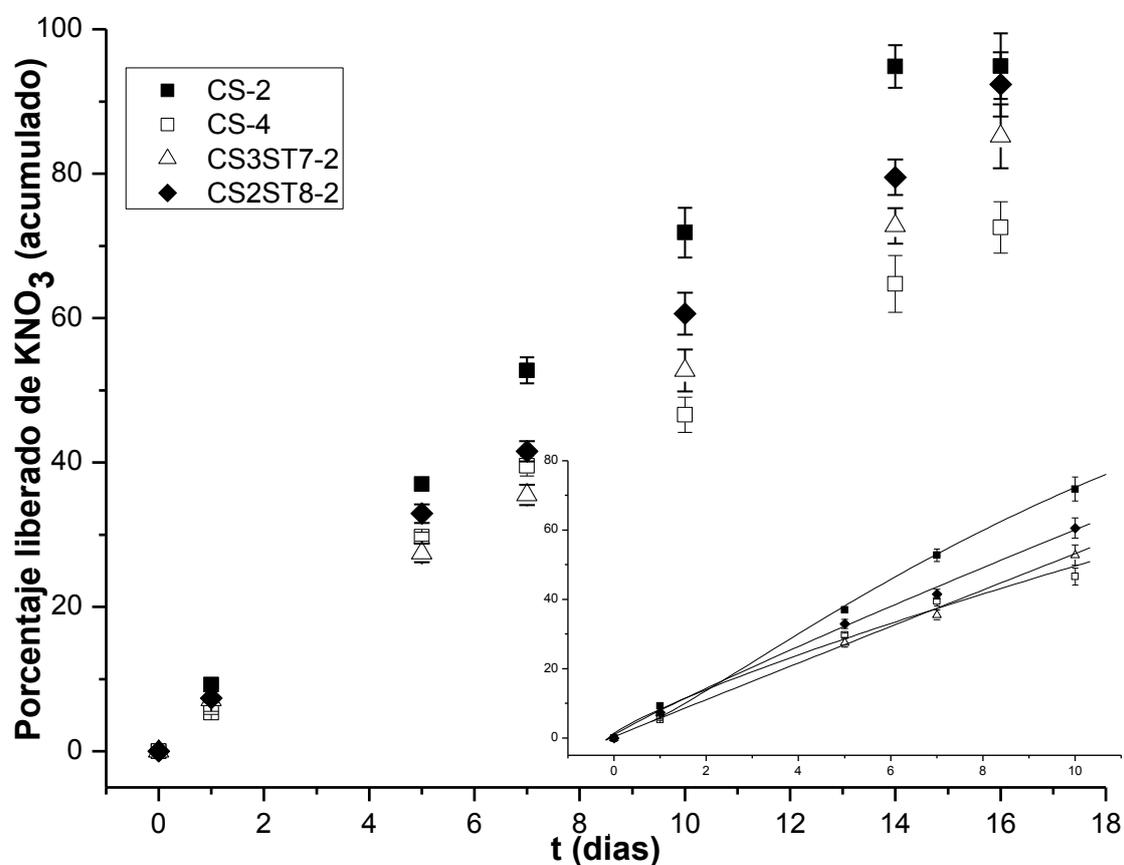


Figura 4.1. Cinética de liberación de KNO_3 para las macroesferas CS-2, CS-4, CS2ST8-2 y CS3ST7-2. Las líneas corresponden a los ajustes no lineales utilizando la ecuación 2.6.

Después de 5 días de contacto con agua se produjo un aumento de la concentración acumulada del 25 al 35 % en masa dependiendo del sistema polimérico utilizado.

Analizando los tiempos de liberación de los experimentos realizados por inmersión de las macroesferas en agua en condiciones estáticas, y teniendo en cuenta que la liberación en el suelo se encuentra controlada por la humedad que limita el proceso de hinchamiento, podemos inferir que los sistemas analizados podrían utilizarse como fertilizantes de liberación controlada.

Se determinó que la matriz polimérica preparada exclusivamente con quitosano entrecruzado durante 2 h originó una liberación máxima acumulada del 94,89 %

m/m en 16 días mientras que la matriz entrecruzada 4 h liberó un 72,57 % en el mismo lapso. Las matrices poliméricas preparadas con las dos mezclas de CS/ST entrecruzadas durante 2 h, liberaron al cabo de 16 días, el 85,18 y el 92,37 % del fertilizante presente inicialmente en las mencionadas matrices respectivamente.

Los resultados correlacionan con los obtenidos en los ensayos de hinchamiento por solvente y están relacionados con la estructura porosa, el grado de entrecruzamiento iónico y con las interacciones entre ambos biopolímeros como ya se ha discutido previamente. Los enlaces hidrógeno entre los grupos hidroxilo de la amilosa presentes en el almidón y los grupos amino del quitosano [46] junto con el grado de entrecruzamiento iónico entre el CS y el STPP, afectarían la estructura final de la matriz modificando la porosidad y tortuosidad de las macroesferas preparadas con las mezclas [169] mientras que para las macroesferas preparadas exclusivamente con CS la estructura interna muy porosa sería la responsables de los resultados obtenidos.

La tortuosidad es un parámetro difícil de cuantificar; que incluye el tamaño promedio del poro, la distribución de poros y las interconexiones entre los mismos [84]. Teniendo en cuenta que la longitud de la trayectoria de difusión para la liberación del fertilizante se ve afectada por la tortuosidad, la composición final y el entrecruzamiento de las matrices resultaron determinantes en los perfiles de liberación obtenidos.

Las macroesferas utilizadas tuvieron un comportamiento de liberación más efectivo que otras macroesferas cargadas con nitrato de potasio que fueron preparadas con mezclas poliméricas que involucran CS. Jamnongkan y Kaewpirom [170] informaron una liberación del 70% después de 4 días usando una matriz preparada con PVA/CS y Melaj M. y Daraio M [171] obtuvieron un 63% de liberación luego de 4 días usando tabletas de xantano y CS.

En la Tabla 4.2 se presentan los valores de los parámetros cinéticos, obtenidos con el ajuste no lineal de los datos experimentales de liberación de KNO_3 a partir los xerogeles empleando la ecuación 2.6.

Tabla 4.2. Parámetros cinéticos de liberación obtenidos del ajuste no lineal con la ecuación 2.6 correspondiente a las macroesferas CS-2, CS-4, CS3ST7-2 y CS2ST8-2 de nitrato de potasio a 25 °C.

Muestra	n	k' (M day ⁻ⁿ)	R ²	% KNO ₃ liberado a los 16 días
CS-2	0,86±0,03	(5,31±0,27)E ⁻⁸	0.9951	94.9 ± 4.3
CS-4	0,94±0,04	(3,03±0,27)E ⁻⁸	0.9856	72.57±1.84
CS3ST7-2	0,89±0,03	(2,93±0,17)E ⁻⁸	0.9945	85.18±3.12
CS2ST8-2	0,91±0,01	(3,24±0.09)E ⁻⁸	0.9988	92.37±4.70

Se encontró que el uso de ST en la composición polimérica que origina las macroesferas no afecta el mecanismo de liberación. El valor del parámetro n para todas las macroesferas testeadas estuvo en un rango que varió entre 0,86 y 0,94 (ver Tabla 4.2). Esto es indicativo de que la etapa controlante del mecanismo de liberación de todas las matrices poliméricas evaluadas es la relajación de las macromoléculas como consecuencia de la penetración del solvente [92,94].

También se pudo apreciar que a medida que aumentó la concentración del componente más hidrofílico (almidón), disminuyó la constante cinética k' (Tabla 4.2). Un aumento del contenido de almidón implicó una disminución del contenido de quitosano y por lo tanto un descenso del entrecruzamiento, lo que permitió una mayor liberación del fertilizante al medio (ver Figura 4.1).

Diferentes investigadores también informaron que el aumento del grado de entrecruzamiento correlaciona con la disminución del valor de la constante del modelo propuesto (k'), al igual que los resultados de la presente investigación [46,76,172]. Dichos resultados fueron atribuidos a que se produce una menor relajación de las cadenas poliméricas como consecuencia del aumento de las interacciones intermoleculares, lo que produce dos efectos muy relacionados: una disminución del hinchamiento por solvente de la matriz y una menor liberación del agente activo encapsulado.

MECANISMO DE LIBERACIÓN DE FERTILIZANTE QUÍMICO EN EL SISTEMA CS/PVA

Incorporación de Nitrato de Potasio en las macroesferas

La absorción de nitrato de potasio se realizó empleando el mismo método ya descrito para la carga de las macroesferas preparadas con CS o las mezclas de CS/ST. En la Tabla 4.3 se presentan los resultados del porcentaje de carga calculado usando la Ecuación 2.5.

Tabla 4.3. Porcentaje de carga del nitrato de potasio en la macroesferas preparadas con la mezcla CS/PVA.

Muestras	% de carga
CS3PVA7-4	59,98±2,62
CS4PVA6-2	63,72±2,43
CS4PVA6-4	62,21±2,67

El sistema preparado con PVA permitió aumentar el porcentaje de nitrato de potasio encapsulado respecto a los resultados obtenidos con las matrices preparadas con CS o con mezclas de CS/ST (ver Tabla 4.1 y Tabla 4.3).

Tanto el porcentaje de CS utilizado como el tiempo de entrecruzamiento, no produjeron diferencias significativas en el porcentaje de carga del fertilizante modelo seleccionado. Este resultado correlaciona con los resultados obtenidos en los ensayos de hinchamiento y sería consecuencia de una menor interacción entre los polímeros (CS y PVA) si se compara con las matrices preparadas a partir de CS/ST. Esta menor interacción entre las macromoléculas del CS y PVA provocaría un alto porcentaje de hinchamiento y como consecuencia un alto % de carga de KNO_3 en las macroesferas preparadas.

El porcentaje de agroquímico requerido para que una formulación se pueda clasificar como fertilizante de liberación controlada es de 60% m/m, por lo que, el grado de encapsulación alcanzado con estas composiciones de mezcla cumpliría con los requerimientos necesarios para que las macroesferas evaluadas puedan catalogarse como CRFs a nivel comercial.

Cinética de liberación del fertilizante

La liberación del nitrato de potasio se realizó utilizando como medio receptor agua desionizada a 25 °C en condiciones estáticas tal como se describió cuando se presentaron los resultados correspondientes a las matrices preparadas con distintas composiciones de CS y ST.

En La Figura 4.2 se pueden apreciar los perfiles de liberación del fertilizante obtenidos cuando se utilizaron las muestras CS3PVA7-4 y CS4PVA6-2 que fueron seleccionadas para analizar las macroesferas que presentaban el mayor y el menor porcentaje de carga.

Los resultados experimentales obtenidos con ambas muestras indicaron que los dos sistemas no presentaron prácticamente diferencias en la evolución de la concentración acumulada del agente activo liberado en función del tiempo.

Al igual que en las macroesferas de CS/ST no se observó un tiempo de retardo pero en este caso, la ventana de tiempo de liberación resultó sensiblemente menor ya que se liberó un 98 % del nitrato de potasio encapsulado al cabo de 10 días.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los ensayos de hinchamiento, y SEM, las matrices preparadas con mezclas de CS y PVA producen macroesferas muy porosas y con un perfil de liberación del agente activo que correlaciona con los resultados de hinchamiento.

La ventana de tiempo de liberación del principio activo es mucho menor comparada con la obtenida con la matriz de CS/PVA como consecuencia de los ensayos de hinchamientos presentados en el capítulo anterior.

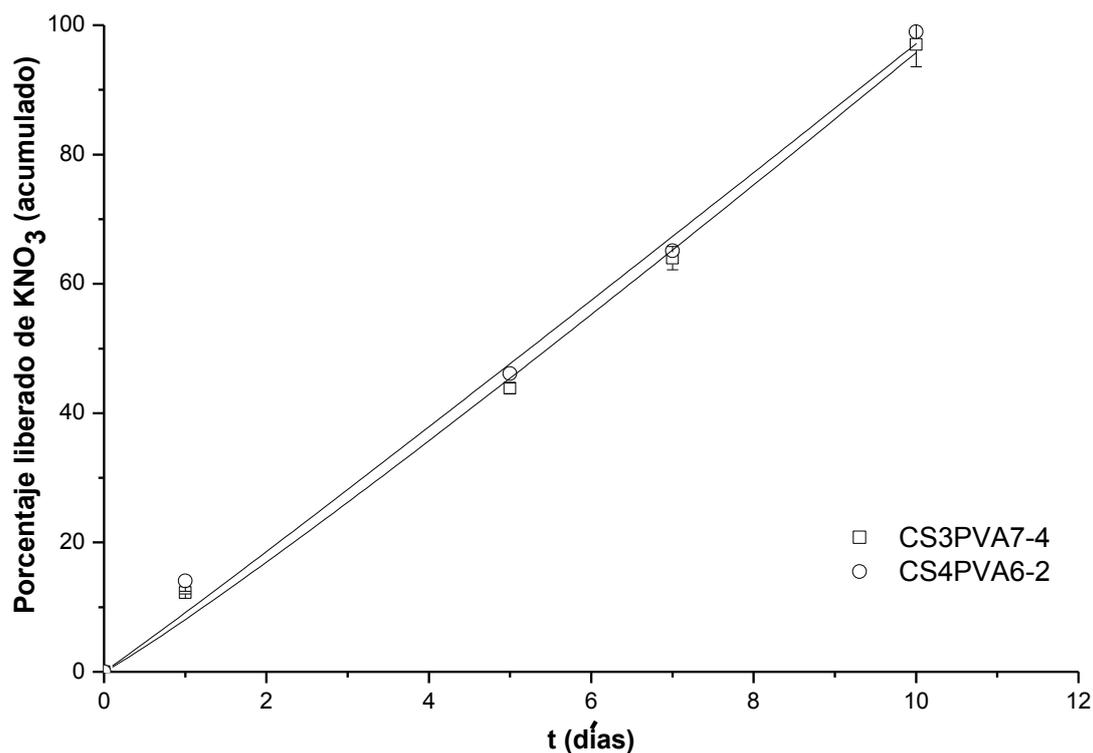


Figura 4.2. Cinética de liberación de KNO_3 para las macroesferas CS3PV7-4 y CS4PV6-2. Las líneas corresponden a los ajustes no lineales utilizando la ecuación 2.6.

En la Tabla 4.4 se presentan los valores de los parámetros cinéticos, obtenidos con el ajuste no lineal de los datos experimentales de liberación de KNO_3 a partir los xerogeles empleando la ecuación 2.6.

Tabla 4.4. Parámetros cinéticos de liberación correspondiente a las macroesferas CS3PVA7-4 y CS4PVA6-2 obtenidos utilizando la ecuación 2.6.

Muestras	n	k (min^{-n})	R ²
CS3PVA7-4	1,08±0,10	8,02±1,64	0,9908
CS4PVA6-2	1,03±0,11	9,10±0,12	0,9862

Para las dos matrices utilizadas en los ensayos de liberación, el proceso controlante en la liberación del fertilizante fue la relajación de las macromoléculas en la red tridimensional de la matriz polimérica, también llamado Super Caso II. El mecanismo que controla el mecanismo de liberación resultó independiente de la composición de la macroesfera y del tiempo de entrecruzamiento.

CAPÍTULO V

PREPARACIÓN DEL FERTILIZANTE BIOLÓGICO Y MECANISMO DE LIBERACIÓN DE LAS BACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL

En este capítulo se analiza la morfología de las macroesferas seleccionadas con las bacterias inmovilizadas, así como también, la supervivencia y la liberación en agua estéril y en suelo natural de los microorganismos encapsulados en forma individual o conjunta.

MECANISMO DE LIBERACIÓN DE FERTILIZANTE BIOLÓGICO

De las matrices poliméricas preparadas, caracterizadas y analizadas, se seleccionaron los materiales preparados con las mezclas CS/ST o CS/PVA, que poseían el menor porcentaje de quitosano y el menor tiempo de entrecruzamiento considerando el factor económico y el tiempo de producción que resultan fundamentales para la producción industrial.

Micrografías SEM de los soportes con las bacterias inmovilizadas

En las Figuras 5.1 y 5.2 se muestran las micrografías SEM de las esferas CS2ST8-2ES y CS3PVA7-4ES con los microorganismos inmovilizados. En ambos materiales se puede observar que tanto la superficie como el interior estaban poblados de bacterias (Figuras 5.1 y 5.2). Los microorganismos Az y Ps que se inmovilizaron por separado se encontraban adheridos a la superficie de las esferas formando aglomerados y biopelículas multicapa.

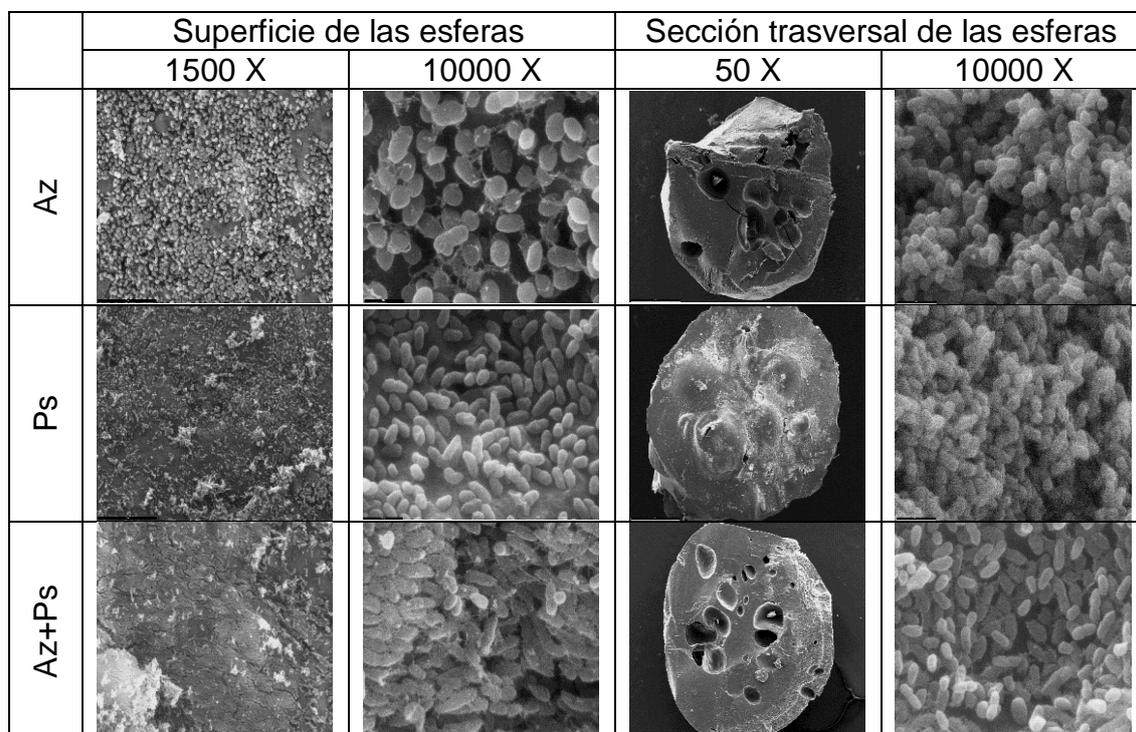


Figura 5.1. Micrografías SEM de las superficies y secciones trasversales de las macroesferas de CS2ST8-2ES con los microorganismos inmovilizadas. Con magnificaciones de 50 X, 1500 X y 10000 X.

En las matrices poliméricas donde se encapsuló Az se pudo observar material amorfo que se asemeja a la matriz polimérica extracelular auto-secretada por el biofilm microbiano tanto en la superficie como en el interior de las esferas cargadas [173]. Algunas células se vieron interconectadas entre sí por un material fibroso similar a las fimbrias. Esta característica no se observó en las células Ps. Curiosamente, cuando ambos microorganismos se co-inmovilizaron (Az+Ps), se unieron a las superficies de las esferas en forma de monocapas altamente ordenadas, con parches de agregados (Figura 5.1 y 5.2), encontrándose con menor grado de ordenamiento en el material CS3PVA7-4ES. Además, dentro del xerogel, Az y Ps tendieron a aglomerarse formando gruesas biopelículas en los orificios o canales de las matrices poliméricas (Figura 5.1 y 5.2).

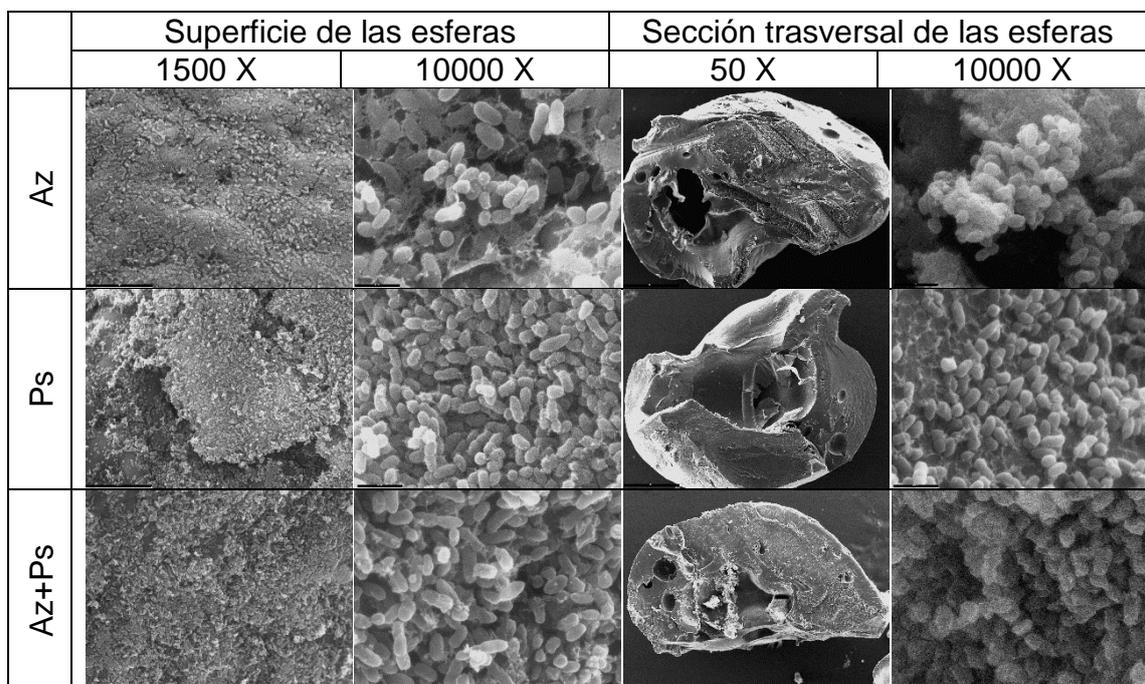


Figura 5.2. Micrografías SEM de las superficies y secciones trasversales de las macroesferas de CS3PVA7-4ES con los microorganismos inmovilizadas. Con magnificaciones de 50 X, 1500 X y 10000 X.

Supervivencia de los microorganismos encapsulados

En las Figuras 5.3 y 5.4 se muestra la supervivencia de los microorganismos encapsulados en los soportes seleccionados (CS2ST8-2ES y CS3PVA7-4ES, respectivamente) durante un período de un año. El número total de bacterias viables se midió inmediatamente después del proceso de inmovilización antes

del secado (día 0), el orden fue de aproximadamente $\times 10^{10}$ UFC/g de hidrogel para todos los casos.

c

Figura 5.3. Recuento de las unidades formadoras de colonias por gramo de material (UFC/g) durante la inmovilización y conservación de Az, Ps y Az+Ps en las esferas de CS/ST.

Como se muestra en las Figuras 5.3 y 5.4, el número de bacterias viables disminuyó de 1×10^{10} a 1×10^9 UFC/g después de 5 días de secado, esto demostraría que la supervivencia de los microorganismos durante el proceso de secado es un paso crítico y que disminuyó su viabilidad. El secado implica un gran estrés físico para las células inmovilizadas, la evaporación del agua presente en el material polimérico provoca un aumento de la presión osmótica, lo que conduce a la plasmólisis de los microorganismos. La muerte celular se atribuye principalmente a la alteración de la membrana plasmática [174]. Sin embargo, la supervivencia de las células deshidratadas depende de diversos factores, como las condiciones de secado, la especie de los microorganismos, la cepa bacteriana y las condiciones de cultivo [175].

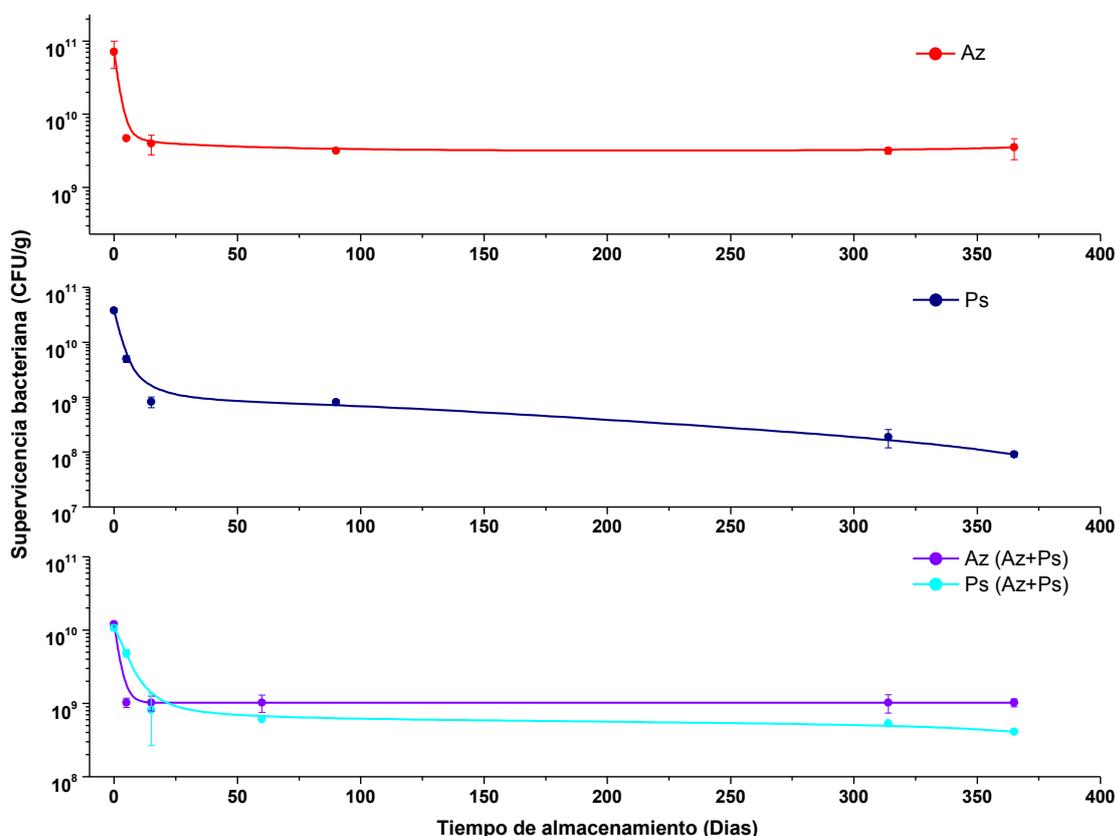


Figura 5.4. Recuento de las unidades formadoras de colonias por gramo de

material (UFC/g) durante la inmovilización y conservación de Az, Ps y Az+Ps en las esferas de CS/PVA.

Los resultados reportados por Schoebitz et al. (2012) confirmarían esta afirmación, ya que en su trabajo los investigadores demostraron que una gran proporción de bacterias fueron destruidas durante la deshidratación de una matriz polimérica en forma de esfera preparada a partir de alginato y alginato/almidón [176]. De hecho, la baja en la viabilidad bacteriana durante el secado de las células inmovilizadas en matrices poliméricas de alginato ha sido reportado como un punto crítico del proceso por diferentes autores [177–180].

Después de un año de almacenamiento, la viabilidad de Az inmovilizado por separado o en combinación con Ps (Az+Ps) en perlas de CS/ST y CS/PVA secas permaneció relativamente constante en valores aproximados de 1×10^9 UFC/g (Figuras 5.3 y 5.4). Por el contrario, Ps mostró una disminución gradual en la supervivencia celular durante el período de almacenamiento en ambos materiales, ya sea encapsulándola por separado o en conjunto con Az (Az+Ps). Después de 60 días de almacenamiento, el recuento de Ps se redujo a 1×10^8 UFC/g y luego disminuyó a aproximadamente 1×10^7 UFC/g al final del almacenamiento en el soporte CS2ST8-2ES (Figura 5.3). Se observó una mejor supervivencia de Ps (Az+Ps) en el soporte CS3PVA7-4ES (Figura 5.4), donde la sobrevivencia del microorganismo decreció a valores de 1×10^8 UFC/g, siendo mejor cuando se inmovilizaron ambos microorganismos en forma conjunta. Claramente, la supervivencia dependería de la naturaleza adaptativa de cada microorganismo [175,177], así como también, del soporte polimérico usado. Los resultados mostraron una mejor adaptabilidad de Az sobre Ps frente a condiciones estresantes y secas [181,182]. Incluso cuando se observó una disminución en el número de células viables de ambas cepas, la disminución en la viabilidad podría considerarse baja durante el período de un año y, característica necesaria para que las formulaciones sean adecuadas como sistemas para la biofertilización soportada.

Liberación de los microorganismos en agua estéril

Los comportamientos de liberación de las bacterias a partir de las matrices poliméricas CS2ST8-2ES y CS3PVA7-4ES en agua estéril se muestran en las Figuras 5.5 y 5.6 respectivamente. Después de sumergir los xerogeles con los microorganismos previamente inmovilizados en agua estéril durante 1 hora, las macroesferas que contenían Az y Ps (inmovilizadas por separado), Az+Ps (co-inmovilizadas) liberaron más de 10^3 UFC/g de hidrogel en todos los casos, la liberación inicial de microorganismos fue más rápida en las matrices poliméricas que contenían PVA en su estructura, alcanzando valores iniciales de 10^4 UFC/g, es decir, de un orden de magnitud mayor a un mismo tiempo, al compararlas con el material que contenía almidón.

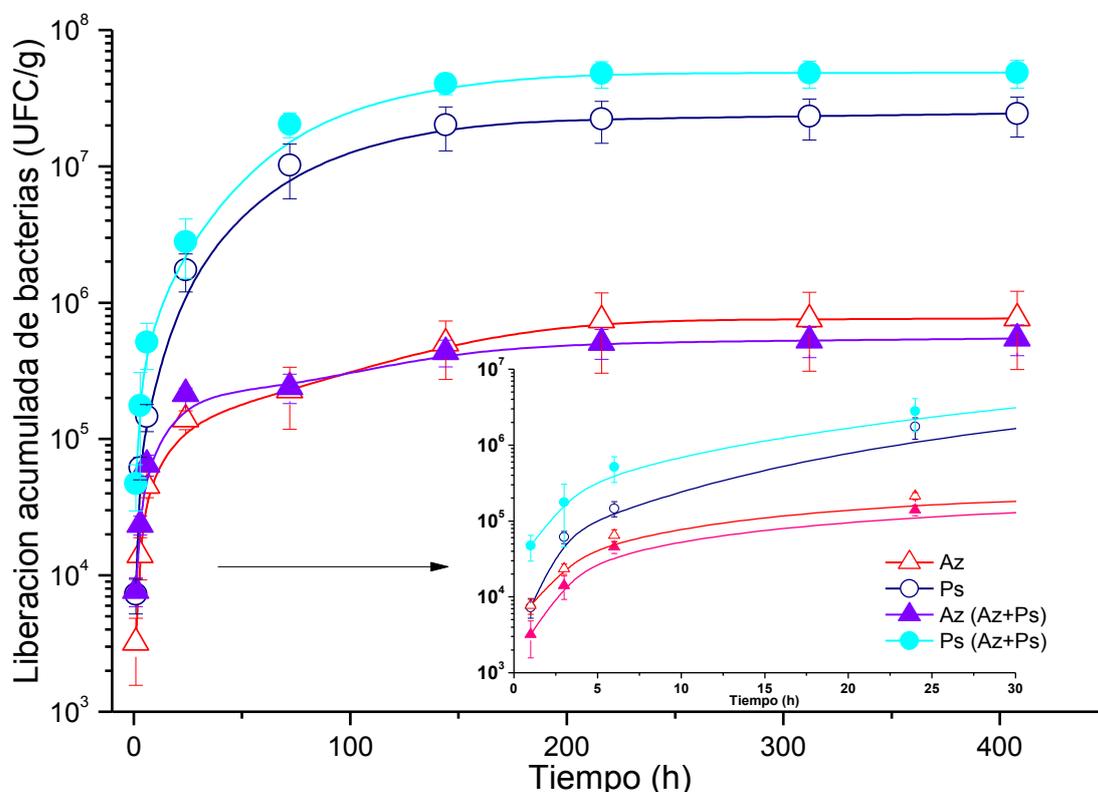


Figura 5.5. Cinética de liberación en agua estéril de *Azospirillum brasilense* Az39, *Pseudomonas fluorescens* ZME4 por separado (símbolo abierto) y en forma conjunta (símbolos cerrados) inmovilizadas en macroesferas de CS/ST. En el "inset" se muestra la cinética durante las primeras 25 h de liberación.

Las esferas CS/ST y CS/PVA cargadas con Ps produjeron una liberación de $\times 10^7$ UFC/g en los primeros 6 días y continuaron liberando microorganismos durante un período de 17 días (Figuras 5.5 y 5.6). La liberación de Ps inmovilizada como monoespecies o combinada (Az+Ps) a partir de ambos tipos de matrices poliméricas fue similar, alcanzando $\times 10^5$ UFC/g los primeros 6 días después de

la inmersión de ambos materiales. Curiosamente, las bacterias co-inmovilizadas se liberaron más rápido que las inmovilizadas individualmente, durante todo el período para Ps y hasta el día 4 para Az, para el material que contenía almidón. Por otro lado se observó que en ambos materiales la liberación de Ps fue más rápida al compararla con Az, pero se evidenció un aumento en la velocidad de liberación de Az en el material CS3PVA7-4ES, así como también un aumento de casi dos órdenes de magnitud de las UFC/g liberadas del hidrogel al compararla con las muestras de CS2ST8-2ES, la utilización de una matriz polimérica que contenía PVA causó una sorprendente disminución en la diferencia de la cantidad de bacterias de Az y Ps liberadas al llegar al equilibrio de liberación.

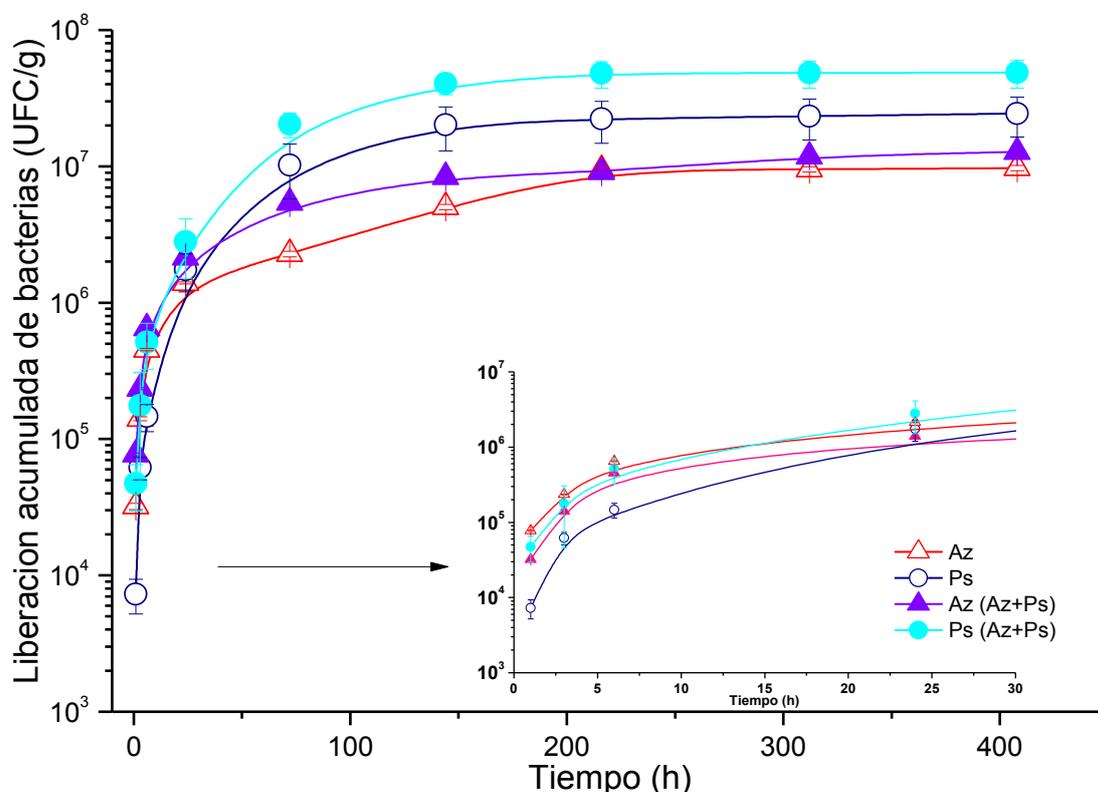


Figura 5.6. Cinética de liberación en agua estéril de *Azospirillum brasilense* Az39, *Pseudomonas fluorescens* ZME4 por separado (símbolo abierto) y en forma conjunta (símbolos cerrados) inmovilizadas en macroesferas de CS/PVA. En el “inset” se muestra la cinética durante las primeras 25 h de liberación.

El aumento de la velocidad de liberación de bacterias en el caso de los soportes conteniendo PVA podría ser resultados de dos fenómenos. El primero por la capacidad de hinchamiento, ya que las macroesferas CS/PVA poseen una mayor cinética de hinchamiento al compararla con el material de CS/ST. El mayor grado de hinchamiento causaría un mayor agrandamiento de los poros

del material, lo cual facilitaría la salida de los microorganismos al medio. El segundo motivo podría relacionarse al efecto protector del almidón reportado en algunas investigaciones, en las que se muestra que este material ayuda a la adhesión celular de los microorganismos en sus gránulos [183,184]. La afinidad de la adhesión al almidón depende de la cepa encapsulada [184]. Estos fenómenos explicarían el aumento de la velocidad de liberación y la mayor UFC liberadas particularmente en el caso de Az mono y co-inmovilizado (Az+Ps) en el material CS/PVA. Estos resultados confirmaron que las macroesferas seleccionadas tenían propiedades adecuadas para liberar bacterias.

Mecanismo de liberación de los microorganismos en agua estéril

Cuando las macroesferas se sumergen en una solución acuosa o en agua pura, el líquido penetra dentro de la matriz polimérica causando su hinchamiento y al mismo tiempo se libera el agente activo (bacterias) que se encuentra encapsulado. El mecanismo de transporte contribuye a la velocidad y grado de liberación de los microorganismos del material polimérico [93,94]. El mecanismo de liberación fue determinado y los perfiles de liberación de las bacterias desde los distintos materiales poliméricos fueron ajustados usando la ecuación (2.8) de Ritger–Peppas y se muestran en la Tabla 5.1 y 5.2.

Tabla 5.1. Datos cinéticos de la liberación de los microorganismos encapsulados desde las macroesferas de CS/ST.

Bacterias	Exponente n	k' (h ⁻¹)	R ²	Mecanismo de Transporte
Az	0,93±0,10	0,03661± 0,01160	0,9868	Super Caso-II
Ps	1,75±0,05	0,00663± 0,00015	0,9998	Super Caso-II
Az (Az+Ps)	0,94±0,07	0,05387± 0,01140	0,9943	Super Caso-II
Ps (Az+Ps)	1,26±0,03	0,00026± 0,00001	0,9995	Super Caso-II

Los datos experimentales fueron ajustados con la ecuación de Ritger–Peppas (Ec. 2.8).

Para las bacterias estudiadas en ambos soportes (CS/ST y CS/PVA) el exponente de liberación n fue mayor a 0.85, menos para las bacterias Az encapsuladas en la matriz polimérica CS/PVA donde n fue menor a 0.85 como se muestra en las Tabla 5.1 y Tabla 5.2. Esto es indicativo de que la velocidad de liberación es constante y controlada por la relajación de las matrices poliméricas para todas las bacterias inmovilizadas en ambos soportes poliméricos, menos para Az encapsulada por separado y en conjunto en las macroesferas de CS/PVA, donde el mecanismo de liberación resultó ser anómalo. Para estos dos últimos casos la liberación se vio afectada por la relajación de las cadenas de la matriz polimérica y el agente activo.

He et al. (2015), Wu et al. (2012), y Wu et al. (2014) prepararon biofertilizantes soportados con alginato/arcilla, alginato/almidón/arcilla y alginato/almidón respectivamente y estudiaron el mecanismo de liberación de diferentes tipos de bacterias. Ellos reportaron que en las diferentes matrices poliméricas estudiadas, el mecanismo que controló la liberación fue el transporte Super Caso-II, $n > 0.85$ [179,180,185]. Similarmente, la mayoría de los casos estudiados en esta Tesis mostraron la misma liberación (Tablas 5.1 y 5.2).

Liberación de las bacterias en suelo natural

La cantidad de bacterias remanente dentro de las macroesferas después de aplicar la esfera en el suelo se muestra en las Figuras 5.7 y 5.8. Una alta concentración de microorganismos vivos, aproximadamente 10^9 UFC/g, se encontró dentro de las macroesferas un día después de colocarse en el suelo no estéril. Se observó un incremento en las UFC/g para las especies encapsuladas de forma individual después de un día.

Investigaciones previas han encontrado un efecto de protección causado por el almidón, este provocaría mayor adhesión de ciertos microorganismos a sus gránulos, este efecto podría ser el causante de una menor tasa de liberación de Az en las macroesferas CS/ST al compararse con el material CS/PVA. Claramente la adhesión de los microorganismos al almidón depende de la naturaleza de la especie y cepa de cada microorganismo [176], este podría ser

una explicación porque el fenómeno afectaría Az principalmente, la que causaría una aceleración en la liberación y ocasionando un cambio en el mecanismo de liberación para estos dos casos.

Por otro lado, el uso de un polímero muy hidrofílico como el PVA también podría contribuir al aumento de la velocidad de liberación de las bacterias y a la mayor liberación del número de microorganismo al medio. Esto podría ocurrir debido a dos factores, por una mayor naturaleza hidrofílica del PVA y una posible menor interacción entre el PVA y el CS, si se compara con el ST y CS. Claramente la utilización de PVA para la formación de macroesferas favorece el aumento de la velocidad de liberación y el mayor número liberación de microorganismos encapsulados. La cinética de hinchamiento sería determinante en el comportamiento de liberación. Cuanto mayor fue el hinchamiento, mayor fue la cantidad de agente activo encapsulado al sistema de liberación.

El modelo matemático escogido para analizar la cinética de liberación de los diferentes microorganismos (tanto en forma conjunta como por separado) describió un mejor ajuste a los resultados experimentales obtenidos con ambos soportes seleccionados (CS2ST8-2ES y CS3PVA7-4ES) para un tiempo de liberación de 0 a 144 h.

Los resultados obtenidos en esta Tesis sugieren que la estructura del hidrogel y sus propiedades absorbentes fueron cruciales para la liberación controlada de las PGPB. La velocidad de liberación fue de forma rápida y prolongada. Estas dos propiedades son requeridas para que una matriz polimérica sea un buen soporte en el sistema de liberación de biofertilizantes.

Tabla 5.2. Datos cinéticos de la liberación de los microorganismos encapsulados desde las macroesferas de CS/PVA.

Bacterias	Exponente n	k'_s (h ⁻¹)	R ²	Mecanismo de Transporte
Az	0,87±0,11	0,0118± 0,0010	0,9768	Super Caso-II
Ps	1,13±0,09	0,0162± 0,0010	0,9928	Super Caso-II

Az(Az+Ps)	0,75±0,06	0,0451± 0,0094	0,9946	Anómalo
Ps(Az+Ps)	1,16±0,11	0,0285± 0.0145	0,9910	Super Caso-II

Los datos experimentales fueron ajustados a la ecuación de Ritger–Peppas (Ec. 2.8).

Sobrevida microbiana en las esferas aplicadas al suelo

La cantidad de bacterias remanente en las macroesferas después de aplicada en el suelo se muestra en las Figura 5.9 y Figura 5.10. Una alta concentración de microorganismos se verificó dentro de las matrices poliméricas un día después de aplicarse la macroesfera al suelo, encontrando concentraciones de aproximadamente 10^9 UFC/g en ambos soportes (CS2ST8-2ES y CS3PVA7-4ES). Se observó que la cantidad de microorganismos dentro de ambos soportes se mantuvo relativamente constante inicialmente cuando se inmovilizaron las especies bacterianas individualmente (Az, Ps). Después del día 7 comenzó a bajar la cantidad de bacterias hasta llegar el día 27 a valores de 10^7 y 10^8 CFU/g para Az y Ps, respectivamente (soporte CS/ST). Cuando se inmovilizaron en forma conjunta (Az+Ps) en la matriz polimérica CS2ST8-2ES las bacterias remanentes permanecieron relativamente constantes durante todo el proceso de liberación en suelo, alcanzando ordenes de 10^9 CFU/g en el material para Ps y 10^7 CFU/g para Az.

Estos números hacen presumir que el porcentaje de liberación microbiana al suelo libre de raíces fue pequeño y que una fracción mayor queda en la esfera (Figuras 5.9 y Figura 5.10).

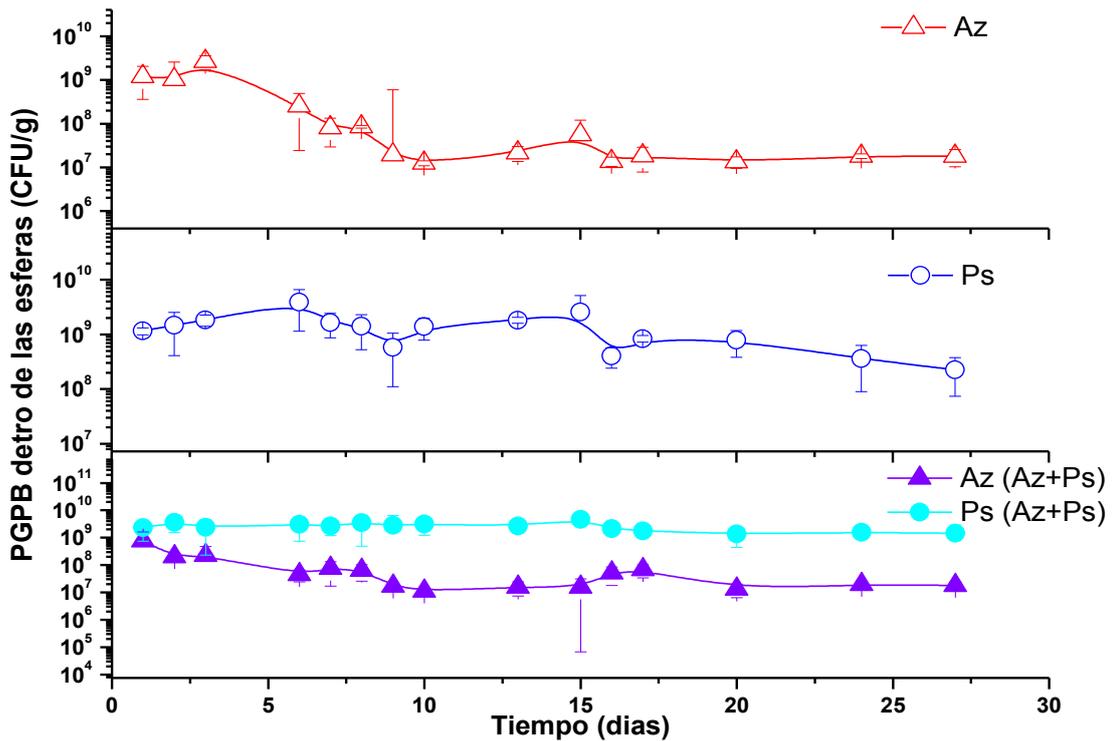


Figura 5.7. Sobrevida de *Azospirillum brasilense* Az39, *Pseudomonas fluorescens* ZME4 separadamente (símbolos abiertos) y conjuntamente (símbolos rellenos) dentro de las esferas CS/ST en suelo.

Se observó que la caída en las CFU fue más pronunciada en CS/PVA (Figura 5.10), alcanzando cifras de 10^6 y 10^7 CFU/g para Az y Ps, respectivamente (microorganismos inmovilizados en forma individual). Se evidenció una mayor baja en la cantidad de bacterias en el soporte CS/PVA al compararse con la matriz polimérica CS/ST. Esto pudiera ser debido a que el equilibrio de hinchamiento en el soporte CS/PVA es mayor que el CS/ST, facilitando la salida de células del material polimérico. La mayor baja en las CFU evidenciada para Az en el xerogel CS3PVA7-4E pudiera ser debido a la mayor adhesión de Az al soporte con ST [176], tal como se pudo observar en la liberación en agua estéril.

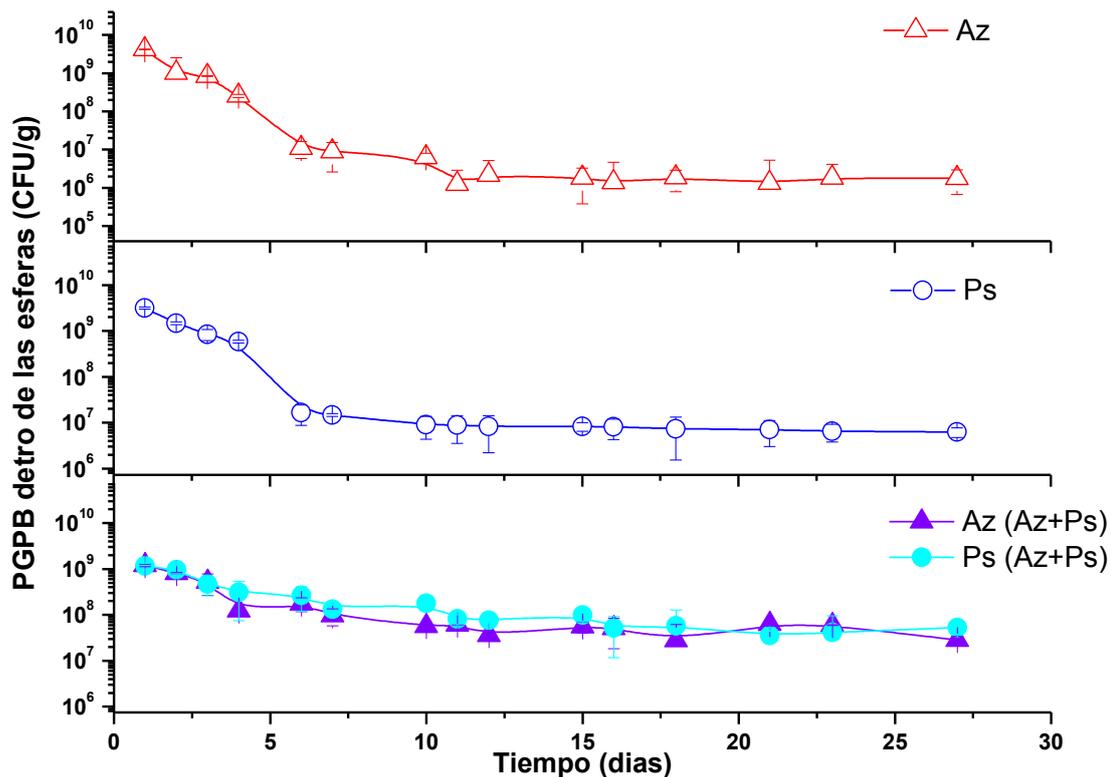


Figura 5.8. Sobrevida de *Azospirillum brasilense* Az39, *Pseudomonas fluorescens* ZME4 separadamente (símbolos abiertos) y conjuntamente (símbolos rellenos) dentro de las esferas CS/PVA en suelo.

Mientras que, este fenómeno no se observó cuando ambas cepas se co-
 inmovilizaron. En este caso, la utilización de ambas bacterias habría propiciado
 una interacción que derivaría en la limitación de liberación de las mismas. Sin
 embargo, después de 27 días, el número de células todavía era alto ($> 10^7$
 UFC/g) y la tasa de liberación fue más alta las macroesferas de CS/PVA.

En las Figuras 5.9 y 5.10 se muestra la liberación de Az y Ps en suelo natural
 inmovilizadas en forma separada y en conjunto para ambos soportes (CS2ST8-
 2ES y CS3PVA7-4ES, respectivamente). La cinética de los recuentos de CFU/g
 en el suelo mostró una forma opuesta al compararse la viabilidad bacteriana
 dentro de las macroesferas, al menos hasta el día 20 (Ver Figura 5.9 y 5.10),
 luego disminuyó levemente. Las bacterias liberadas de los soportes debieron
 migrar a través del suelo y competir con la microflora nativa presente. Az y Ps
 inmovilizadas separadas o cargadas en forma combinada, aumentaron sus
 números rápida y progresivamente en el suelo después de un día. Se probó una
 alta tasa de liberación de las PGPB con valores promedios de 10^6 (Az39f y Az39f

cuando se inmovilizaron conjuntamente con ZME4e) y 108 CFU / g (ZME4e y ZME4e cuando se inmovilizaron junto con Az39f). La concentración bacteriana aumentó progresivamente durante los primeros 20 días y luego comenzó a disminuir después de 24 días. La velocidad de liberación de las macroperlas de ZME4e fue mucho más rápida que Az39f (ambas inmovilizadas por separado o coinmovilizadas).

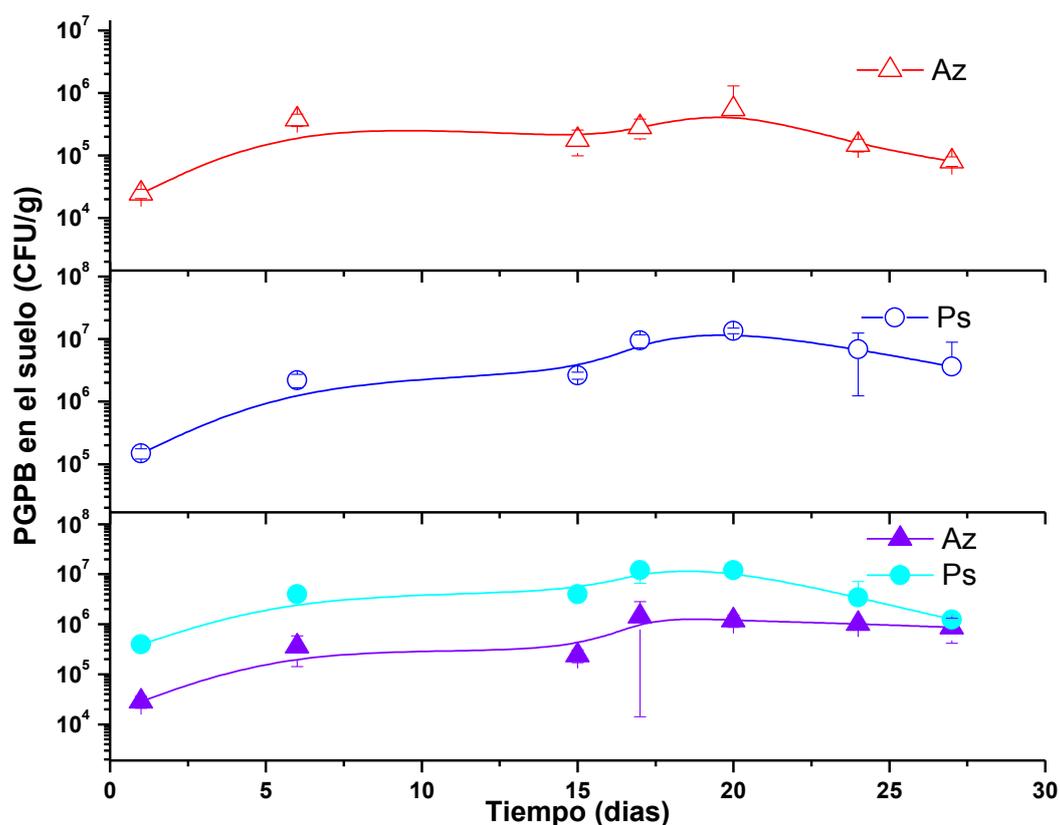


Figura 5.9. Liberación de bacterias en suelo natural a partir de macroesferas de CS/ST.

El material polimérico preparado y probado como soporte biofertilizante conlleva dos ventajas principales. En primer lugar, el material de soporte proporcionaría protección para las bacterias beneficiosas contra los factores ambientales adversos que ocurren en la rizosfera donde las bacterias encuentran condiciones difíciles y tienen que competir con la microflora nativa. En segundo lugar, la liberación inicial rápida permitiría la colonización rápida de las raíces, y luego, la

posterior liberación gradual y prolongada de las células aumentaría y permitiría efectos de biofertilización a largo plazo.

Los siguientes pasos para su comercialización son los procedimientos de escalamiento y la caracterización del material técnico de grado reactivo. Los datos disponibles sobre el presente procedimiento sugieren que se puede considerar un nuevo enfoque en el campo de la agricultura sostenible: el concepto de una liberación controlada de biofertilizantes.

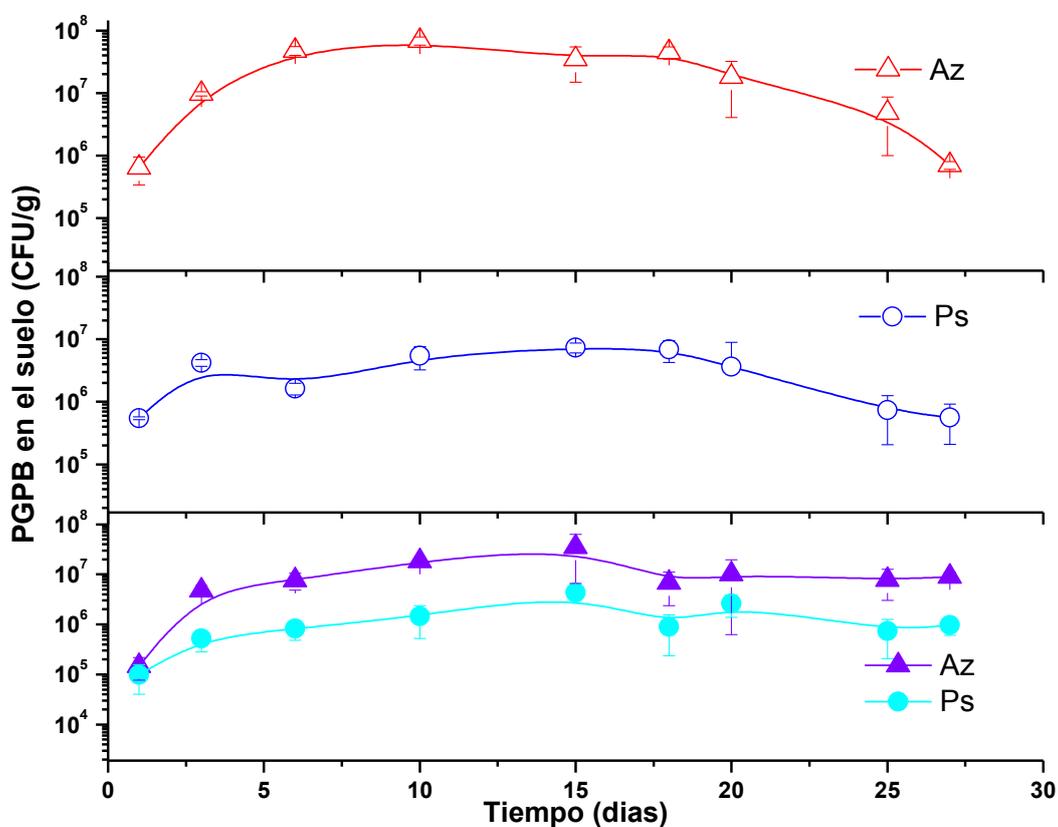


Figura 5.10. Liberación de bacterias en suelo natural a partir de macroesferas de CS/PVA.

CONCLUSIONES

Se prepararon macroesferas con CS y con mezclas de CS/PVA y CS/ST entrecruzadas iónicamente, utilizando una solución básica de tripolifosfato de sodio. Las matrices preparadas con quitosano resultaron aproximadamente esféricas y con una textura rugosa, mientras que la incorporación del ST y PVA redujo en gran proporción dicha rugosidad y produjo la formación de macroesferas más uniformes.

Los análisis de EDS y NMR confirmaron el entrecruzamiento iónico del quitosano con tripolifosfato de sodio a pH básico. El método de preparación seleccionado limitó el grado de entrecruzamiento de las macroesferas generando matrices superabsorbentes.

El entrecruzamiento iónico disminuyó la cristalinidad y la máxima temperatura de degradación de los materiales.

El grado de hinchamiento máximo correspondiente a los sistemas obtenidos a partir de mezclas poliméricas disminuyó con la incorporación del ST, y con el aumento del tiempo de entrecruzamiento y aumentó con el agregado del PVA utilizado en la preparación de las macroesferas. Se determinó que la etapa controlante es la difusión fickeana para las macroesferas de quitosano y CS/PVA, mientras que para las matrices preparadas con las mezclas CS/ST, el mecanismo controlante puede ser la difusión fickiana o un mecanismo de transporte anómalo según la composición y el tiempo de entrecruzamiento utilizados.

El porcentaje de encapsulación y de liberación del fertilizante químico seleccionado fue máximo cuando se utilizaron las macroesferas de CS/PVA.

Para todas las matrices preparadas con CS o con mezclas poliméricas CS/ST, independientemente del tiempo de entrecruzamiento seleccionado, se encontró que la etapa que controla el proceso de liberación del nitrato de potasio es la

difusión. En cambio, para las matrices preparadas con las mezclas CS/PVA la etapa controlante es la relajación de las macromoléculas.

La esterilización de las matrices preparadas con CS/ST produjo una disminución en el tamaño de la matriz polimérica, una disminución del entrecruzamiento iónico y un aumento en el grado de hinchamiento de equilibrio.

Los hidrogeles secos cargados con *A. brasilense* y/o *P. fluorescens* pueden almacenarse a temperatura y humedad ambiente durante un período prolongado de al menos 1 año asegurando la viabilidad de las bacterias.

La liberación de células a partir de las macroesferas de CS/ST y CS/PVA en agua estéril está controlada por un mecanismo de transporte denominado Súper Caso II donde la relajación de la cadena polimérica es la etapa lenta del mecanismo de la liberación.

Para los biofertilizantes preparados, la cinética de supervivencia de los microorganismos y su liberación en suelo natural difirió entre ambas especies bacterianas, lo que indica que las características fisiológicas de las bacterias cargadas influyen en el comportamiento final del biofertilizante.

La matriz polimérica cargada con una o más PGPB muestra un gran potencial biotecnológico como un material conveniente y económico para la formulación de biofertilizantes de liberación controlada para cultivos.

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA

Congresos nacionales e internacionales

- 1.- Jonas José Perez Bravo, Guillermo Maroniche, Nora François, Maria Pereyra y Cecilia Creus. Modalidad Oral: Esferas de quitosano y almidón como inoculante de liberación controlada de bacterias promotoras de crecimiento vegetal. XII Simposio Argentino de Polímeros (SAP). 2017, Los Cocos, Córdoba, Argentina.
- 2.- Jonas Jose Perez Bravo, Guillermo Maroniche, Nora François y Cecilia Creus. Modalidad Oral: Influencia de la composición en hidrogeles de quitosano/almidón: estudio reológico, comportamiento cinético de liberación y de hinchamiento por solvente. XX Congreso Argentino de Fisicoquímica Y Química Inorgánica (XX CAFQI). 2017, Villa Carlos Paz, Córdoba, Argentina.
- 3.- Jonas Jose Perez Bravo, Guillermo Maroniche, Maria Pereyra, Nora François y Cecilia Creus. Modalidad Oral: preparación de macroesferas de quitosano y almidón como innovación para la bioencapsulación de *A. brasilense* AZ39 Y *P. fluorescens* ZME4. III Congreso Argentino de Microbiología Agrícola y Ambiental (CAMAYA). 2015, CABA, Argentina.
- 4.- Jonas Jose Perez Bravo, Guillermo Maroniche, Maria Pereyra, Nora François y Cecilia Creus. Modalidad Póster: EFECTOS DE LA INOCULACION DE TRIGO CON *Azospirillum brasilense* Az39 Y *Pseudomonas fluorescens* ZME4 ENTRAMPADAS EN ESFERAS DE LIBERACIÓN CONTROLADA. III Congreso Argentino de Microbiología Agrícola y Ambiental (CAMAYA). 2015, CABA, Argentina.
- 5.- Jonas Perez y Nora Francois. Modalidad Póster: Preparation and properties of superabsorbent hydrogel based on chitosan and starch biopolymers for controlled release of fertilizer. Biodegradable Polymers and Biocomposites (BIOPOLI). 2015, CABA, Argentina.
- 6.- Jonas Jose Perez Bravo, Guillermo Maroniche, Maria Pereyra, Cecilia Creus y Nora Francois. Modalidad Póster: Influence of the sterilization treatments in novel chitosan-starch microspheres for immobilization of *A. Brasilense* AZ39 and *P. Fluorescens* ZME4. Biodegradable Polymers and Biocomposites (BIOPOLI). 2015, CABA, Argentina.
- 7.- Jonas Jose Perez Bravo, Cecilia Creus y Nora Francois. Modalidad Póster. Efecto del entrecruzamiento con tripolifosfato de sodio en la estabilidad térmica de macroesferas de quitosano. 30° Congreso Argentino de Química. 2014, CABA, Argentina.

Publicaciones Indexadas

- 1.- Perez, J.J., & Francois, N.J. (2016). Chitosan-starch beads prepared by ionotropic gelation as potential matrices for controlled release of fertilizers. *Carbohydrate Polymers*. 148, 134–142.
- 2.- JJ Perez, NJ Francois, GA Maroniche, MP Borrajo, MA Pereyra & CM Creus (2018). A novel, green, low-cost chitosan-starch hydrogel as potential delivery system for plant growth-promoting bacteria. *Carbohydrate Polymers*. 202, 409–417.

Producción Tecnológica

1.- Título de invención (Patente): “Material polimérico apto para liberación controlada de inoculante para ser aplicado en la producción de cultivos”. Titulares: UNMdP – UBA – CONICET. Inventores: Jonas Jose Perez Bravo, Nora Judit Francois, Cecilia Mónica Creus, María Alejandra Pereyra, Guillermo Andres Maroniche. Número de Acta: 20160102647. Fecha de presentación ante el INPI: 31/08/2016. V. Referencia: 007-16.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] X. Li, Q. Li, Y. Su, Q. Yue, B. Gao, Y. Su, A novel wheat straw cellulose-based semi-IPNs superabsorbent with integration of water-retaining and controlled-release fertilizers, *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* 55 (2015) 170–179. doi:10.1016/j.jtice.2015.04.022.
- [2] C. Béné, M. Barange, R. Subasinghe, P. Pinstруп-Andersen, G. Merino, G.-I. Hemre, M. Williams, Feeding 9 billion by 2050 – Putting fish back on the menu, *Food Secur.* 7 (2015) 261–274. doi:10.1007/s12571-015-0427-z.
- [3] A. Shaviv, R.L. Mikkelsen, CRF to increase efficiency of nutrient use and minimize environmental degradation - a review, *Fertil. Res.* 35 (1993) 1–12.
- [4] M. TRENKEL, *Slow- and Controlled-Release and Stabilized Fertilizers: An Option for Enhancing Nutrient Use Efficiency in Agriculture*, 2010. doi:10.1017/CBO9781107415324.004.
- [5] P. Pengthamkeerati, A. Modtad, Nitrification Inhibitor Effects on Nitrous Oxide Emission, Nitrogen Transformation, and Maize (*Zea mays* L.) Yield in Loamy Sand Soil in Thailand, *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 47 (2016) 875–887. doi:10.1080/00103624.2016.1159314.
- [6] M. Zaman, J.D. Blennerhassett, Effects of the different rates of urease and nitrification inhibitors on gaseous emissions of ammonia and nitrous oxide, nitrate leaching and pasture production from urine patches in an intensive grazed pasture system, *Agric. Ecosyst. Environ.* 136 (2010) 236–246. doi:10.1016/j.agee.2009.07.010.
- [7] M.A. Khan, W. Mingzhi, B.-K. Lim, J.-Y. Lee, Utilization of waste paper for an environmentally friendly slow-release fertilizer, *J. Wood Sci.* 54 (2008) 158–161. doi:10.1007/s10086-007-0924-6.
- [8] P. Wen, Z. Wu, Y. He, B.-C. Ye, Y. Han, J. Wang, X. Guan, Microwave-Assisted Synthesis of a Semi-interpenetrating Polymer Network Slow-Release Nitrogen Fertilizer with Water Absorbency from Cotton Stalks, *ACS Sustain. Chem. Eng.* 4 (2016) 6572–6579. doi:10.1021/acssuschemeng.6b01466.
- [9] F. Fava, G. Totaro, L. Diels, M. Reis, J. Duarte, O.B. Carioca, H.M. Poggi-Valardo, B.S. Ferreira, Biowaste biorefinery in Europe: opportunities and research & development needs, *N. Biotechnol.* 32 (2015) 100–108. doi:10.1016/j.nbt.2013.11.003.
- [10] M.E. Trenkel, *Controlled-Release and Stabilized Fertilizers in Agriculture*, 1997.
- [11] G. Rasul, G.B. Thapa, Sustainability of ecological and conventional agricultural systems in Bangladesh: an assessment based on environmental, economic and social perspectives, *Agric. Syst.* 79 (2004) 327–351. doi:10.1016/S0308-521X(03)00090-8.
- [12] A. Shaviv, Environmental friendly nitrogen fertilization, *Sci. China Ser. C Life Sci.* 48 (2005) 937–947. doi:10.1360/062005-285.
- [13] S. Lü, C. Feng, C. Gao, X. Wang, X. Xu, X. Bai, N. Gao, M. Liu, Multifunctional Environmental Smart Fertilizer Based on L-Aspartic Acid

- for Sustained Nutrient Release, *J. Agric. Food Chem.* 64 (2016) 4965–4974. doi:10.1021/acs.jafc.6b01133.
- [14] B. Azeem, K. KuShaari, Z.B. Man, A. Basit, T.H. Thanh, Review on materials & methods to produce controlled release coated urea fertilizer, *J. Control. Release.* 181 (2014) 11–21. doi:10.1016/j.jconrel.2014.02.020.
- [15] Z. Majeed, N.K. Ramli, N. Mansor, Z. Man, A comprehensive review on biodegradable polymers and their blends used in controlled-release fertilizer processes, *Rev. Chem. Eng.* 31 (2015). doi:10.1515/revce-2014-0021.
- [16] M.Y. Naz, S.A. Sulaiman, Slow release coating remedy for nitrogen loss from conventional urea: a review, *J. Control. Release.* 225 (2016) 109–120. doi:10.1016/j.jconrel.2016.01.037.
- [17] M. Zhang, B. Gao, J. Chen, Y. Li, A.E. Creamer, H. Chen, Slow-release fertilizer encapsulated by graphene oxide films, *Chem. Eng. J.* 255 (2014) 107–113. doi:10.1016/j.cej.2014.06.023.
- [18] D. Davidson, F.X. Gu, Materials for sustained and controlled release of nutrients and molecules to support plant growth, *J. Agric. Food Chem.* 60 (2012) 870–876. doi:10.1021/jf204092h.
- [19] A. Shaviv, Advances in controlled-release fertilizers, in: 2001: pp. 1–49. doi:10.1016/S0065-2113(01)71011-5.
- [20] N.K. Arora, S. Mehnaz, R. Balestrini, eds., *Bioformulations: for Sustainable Agriculture*, Springer India, New Delhi, 2016. doi:10.1007/978-81-322-2779-3.
- [21] B. Lugtenberg, F. Kamilova, Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria, *Annu. Rev. Microbiol.* 63 (2009) 541–556. doi:10.1146/annurev.micro.62.081307.162918.
- [22] E. Strzelczyk, M. Kampert, C.Y. Li, Cytokinin-like substances and ethylene production by *Azospirillum* in media with different carbon sources, *Microbiol. Res.* 149 (1994) 55–60. doi:10.1016/S0944-5013(11)80136-9.
- [23] M.A. Whitelaw, Growth Promotion of Plants Inoculated with Phosphate-Solubilizing Fungi, in: 1999: pp. 99–151. doi:10.1016/S0065-2113(08)60948-7.
- [24] Y. Bashan, L.E. De-Bashan, How the Plant Growth-Promoting Bacterium *Azospirillum* Promotes Plant Growth—A Critical Assessment, in: *Adv. Agron.*, 2010: pp. 77–136. doi:10.1016/S0065-2113(10)08002-8.
- [25] A. Esitken, Use of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Horticultural Crops, in: *Bact. Agrobiol. Crop Ecosyst.*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2011: pp. 189–235. doi:10.1007/978-3-642-18357-7_8.
- [26] C.M.J. Pieterse, C. Zamioudis, R.L. Berendsen, D.M. Weller, S.C.M. Van Wees, P.A.H.M. Bakker, Induced Systemic Resistance by Beneficial Microbes, *Annu. Rev. Phytopathol.* 52 (2014) 347–375. doi:10.1146/annurev-phyto-082712-102340.
- [27] E. Malusá, N. Vassilev, A contribution to set a legal framework for biofertilisers, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98 (2014) 6599–6607. doi:10.1007/s00253-014-5828-y.
- [28] C.E. Ochoa-Velasco, R. Valadez-Blanco, R. Salas-Coronado, F. Sustaita-Rivera, B. Hernández-Carlos, S. García-Ortega, N.F. Santos-Sánchez,

- Effect of nitrogen fertilization and *Bacillus licheniformis* biofertilizer addition on the antioxidants compounds and antioxidant activity of greenhouse cultivated tomato fruits (*Solanum lycopersicum* L. var. Sheva), *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 201 (2016) 338–345. doi:10.1016/j.scienta.2016.02.015.
- [29] J. Mishra, N.K. Arora, Bioformulations for Plant Growth Promotion and Combating Phytopathogens: A Sustainable Approach, in: *Bioformulations Sustain. Agric.*, Springer India, New Delhi, 2016: pp. 3–33. doi:10.1007/978-81-322-2779-3_1.
- [30] L.A. Leyva, Y. Bashan, L.E. De-Bashan, Activity of acetyl-CoA carboxylase is not directly linked to accumulation of lipids when *Chlorella vulgaris* is co-immobilised with *Azospirillum brasilense* in alginate under autotrophic and heterotrophic conditions, *Ann. Microbiol.* 65 (2015) 339–349. doi:10.1007/s13213-014-0866-3.
- [31] M.D. Denton, D.J. Pearce, R.A. Ballard, M.C. Hannah, L.A. Mutch, S. Norng, J.F. Slattery, A multi-site field evaluation of granular inoculants for legume nodulation, *Soil Biol. Biochem.* 41 (2009) 2508–2516. doi:10.1016/j.soilbio.2009.09.009.
- [32] Y. Bashan, Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture, *Biotechnol. Adv.* 16 (1998) 729–770. doi:10.1016/S0734-9750(98)00003-2.
- [33] E. Fallik, Y. Okon, Inoculants of *Azospirillum brasilense*: Biomass production, survival and growth promotion of *Setaria italica* and *Zea mays*, *Soil Biol. Biochem.* 28 (1996) 123–126. doi:10.1016/0038-0717(95)00084-4.
- [34] Y. Bashan, L.E. de-Bashan, S.R. Prabhu, J.P. Hernandez, Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: Formulations and practical perspectives (1998-2013), *Plant Soil.* 378 (2014) 1–33. doi:10.1007/s11104-013-1956-x.
- [35] L. Herrmann, D. Lesueur, Challenges of formulation and quality of biofertilizers for successful inoculation, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97 (2013) 8859–8873. doi:10.1007/s00253-013-5228-8.
- [36] B.C. Larisch, D. Poncelet, C.P. Champagne, R.J. Neufeld, Microencapsulation of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *J. Microencapsul.* 11 (1994) 189–195. doi:10.3109/02652049409040450.
- [37] Y.P. Timilsena, R. Adhikari, P. Casey, T. Muster, H. Gill, B. Adhikari, Enhanced efficiency fertilisers: a review of formulation and nutrient release patterns, *J. Sci. Food Agric.* 95 (2015) 1131–1142. doi:10.1002/jsfa.6812.
- [38] E. Caló, V. V. Khutoryanskiy, Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products, *Eur. Polym. J.* 65 (2015) 252–267. doi:10.1016/j.eurpolymj.2014.11.024.
- [39] E.S. Dragan, Design and applications of interpenetrating polymer network hydrogels. A review, *Chem. Eng. J.* 243 (2014) 572–590. doi:10.1016/j.cej.2014.01.065.
- [40] E.M. Ahmed, Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review, *J. Adv. Res.* 6 (2015) 105–121. doi:10.1016/j.jare.2013.07.006.
- [41] V.K. Thakur, M.K. Thakur, Recent Advances in Graft Copolymerization and Applications of Chitosan: A Review, *ACS Sustain. Chem. Eng.* 2 (2014) 2637–2652. doi:10.1021/sc500634p.

- [42] K. Varaprasad, G.M. Raghavendra, T. Jayaramudu, M.M. Yallapu, R. Sadiku, A mini review on hydrogels classification and recent developments in miscellaneous applications, *Mater. Sci. Eng. C.* 79 (2017) 958–971. doi:10.1016/j.msec.2017.05.096.
- [43] M.R. Aguilar, J. San Román, Introduction to smart polymers and their applications, in: *Smart Polym. Their Appl.*, Elsevier, 2014: pp. 1–11. doi:10.1533/9780857097026.1.
- [44] F. Ullah, M.B.H. Othman, F. Javed, Z. Ahmad, H.M. Akil, Classification, processing and application of hydrogels: A review, *Mater. Sci. Eng. C.* 57 (2015) 414–433. doi:10.1016/j.msec.2015.07.053.
- [45] L.A. Sharpe, A.M. Daily, S.D. Horava, N.A. Peppas, Therapeutic applications of hydrogels in oral drug delivery, *Expert Opin. Drug Deliv.* 11 (2014) 901–915. doi:10.1517/17425247.2014.902047.
- [46] J.J. Perez, N.J. Francois, Chitosan-starch beads prepared by ionotropic gelation as potential matrices for controlled release of fertilizers, *Carbohydr. Polym.* (2016). doi:10.1016/j.carbpol.2016.04.054.
- [47] J. Zhu, R.E. Marchant, Design properties of hydrogel tissue-engineering scaffolds, *Expert Rev. Med. Devices.* 8 (2011) 607–626. doi:10.1586/erd.11.27.
- [48] V. Dhote, F.J. Vernerey, Mathematical model of the role of degradation on matrix development in hydrogel scaffold, *Biomech. Model. Mechanobiol.* 13 (2014) 167–183. doi:10.1007/s10237-013-0493-0.
- [49] A.C. Dumitru, F.M. Espinosa, R. Garcia, G. Foschi, S. Tortorella, F. Valle, M. Dallavalle, F. Zerbetto, F. Biscarini, In situ nanomechanical characterization of the early stages of swelling and degradation of a biodegradable polymer, *Nanoscale.* 7 (2015) 5403–5410. doi:10.1039/C5NR00265F.
- [50] B. Panda, R. Subhadarsini, S. Mallick, Biointerfacial phenomena of amlodipine buccomucosal tablets of HPMC matrix system containing polyacrylate polymer/ β -cyclodextrin: Correlation of swelling and drug delivery performance, *Expert Opin. Drug Deliv.* 13 (2016) 633–643. doi:10.1517/17425247.2016.1154038.
- [51] M. Xie, M. Zheng, P. Cooper, W.E. Price, L.D. Nghiem, M. Elimelech, Osmotic dilution for sustainable greenwall irrigation by liquid fertilizer: Performance and implications, *J. Memb. Sci.* 494 (2015) 32–38. doi:10.1016/j.memsci.2015.07.026.
- [52] S. Phuntsho, J.E. Kim, M.A.H. Johir, S. Hong, Z. Li, N. Ghaffour, T. Leiknes, H.K. Shon, Fertiliser drawn forward osmosis process: Pilot-scale desalination of mine impaired water for fertigation, *J. Memb. Sci.* 508 (2016) 22–31. doi:10.1016/j.memsci.2016.02.024.
- [53] A. Anitha, S. Sowmya, P.T.S. Kumar, S. Deepthi, K.P. Chennazhi, H. Ehrlich, M. Tsurkan, R. Jayakumar, Chitin and chitosan in selected biomedical applications, *Prog. Polym. Sci.* 39 (2014) 1644–1667. doi:10.1016/j.progpolymsci.2014.02.008.
- [54] I. Hamed, F. Özogul, J.M. Regenstein, Industrial applications of crustacean by-products (chitin, chitosan, and chitooligosaccharides): A review, *Trends Food Sci. Technol.* 48 (2016) 40–50. doi:10.1016/j.tifs.2015.11.007.
- [55] A. Usman, K.M. Zia, M. Zuber, S. Tabasum, S. Rehman, F. Zia, Chitin and chitosan based polyurethanes: A review of recent advances and

- prospective biomedical applications, *Int. J. Biol. Macromol.* 86 (2016) 630–645. doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.02.004.
- [56] S.H. Doares, T. Syrovets, E.W. Weiler, C.A. Ryan, Oligogalacturonides and chitosan activate plant defensive genes through the octadecanoid pathway., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92 (1995) 4095–4098. doi:10.1073/pnas.92.10.4095.
- [57] S. Bautista-Baños, M. Hernández-López, E. Bosquez-Molina, C.L. Wilson, Effects of chitosan and plant extracts on growth of *Colletotrichum gloeosporioides*, anthracnose levels and quality of papaya fruit, *Crop Prot.* 22 (2003) 1087–1092. doi:10.1016/S0261-2194(03)00117-0.
- [58] V. Zargar, M. Asghari, A. Dashti, A Review on Chitin and Chitosan Polymers: Structure, Chemistry, Solubility, Derivatives, and Applications, *ChemBioEng Rev.* 2 (2015) 204–226. doi:10.1002/cben.201400025.
- [59] A.M. Chuah, T. Kuroiwa, I. Kobayashi, M. Nakajima, Effect of chitosan on the stability and properties of modified lecithin stabilized oil-in-water monodisperse emulsion prepared by microchannel emulsification, *Food Hydrocoll.* 23 (2009) 600–610. doi:10.1016/j.foodhyd.2008.03.014.
- [60] C. Choi, J.-P. Nam, J.-W. Nah, Application of chitosan and chitosan derivatives as biomaterials, *J. Ind. Eng. Chem.* 33 (2016) 1–10. doi:10.1016/j.jiec.2015.10.028.
- [61] P.R. Sivashankari, M. Prabakaran, Deacetylation modification techniques of chitin and chitosan, in: *Chitosan Based Biomater.* Vol. 1, Elsevier, 2017: pp. 117–133. doi:10.1016/B978-0-08-100230-8.00005-4.
- [62] S. Wang, C. Li, L. Copeland, Q. Niu, S. Wang, Starch Retrogradation: A Comprehensive Review, *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 14 (2015) 568–585. doi:10.1111/1541-4337.12143.
- [63] F. Zia, K.M. Zia, M. Zuber, S. Kamal, N. Aslam, Starch based polyurethanes: A critical review updating recent literature, *Carbohydr. Polym.* 134 (2015) 784–798. doi:10.1016/j.carbpol.2015.08.034.
- [64] F. Xie, E. Pollet, P.J. Halley, L. Avérous, Starch-based nanobiocomposites, *Prog. Polym. Sci.* 38 (2013) 1590–1628. doi:10.1016/j.progpolymsci.2013.05.002.
- [65] G. Liu, Z. Gu, Y. Hong, L. Cheng, C. Li, Structure, functionality and applications of debranched starch: A review, *Trends Food Sci. Technol.* 63 (2017) 70–79. doi:10.1016/j.tifs.2017.03.004.
- [66] S. Wang, L. Copeland, Effect of Acid Hydrolysis on Starch Structure and Functionality: A Review, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 55 (2015) 1081–1097. doi:10.1080/10408398.2012.684551.
- [67] J.J.G.G. van Soest, H. Tournois, D. de Wit, J.F.G.G. Vliegthart, Short-range structure in (partially) crystalline potato starch determined with attenuated total reflectance Fourier-transform IR spectroscopy, *Carbohydr. Res.* 279 (1995) 201–214. doi:10.1016/0008-6215(95)00270-7.
- [68] C. Barner-Kowollik, T. Junkers, *Handbook of Vinyl Polymers: Radical Polymerization, Process, and Technology*, *Macromol. Chem. Phys.* 210 (2009) 1766–1766. doi:10.1002/macp.200900443.
- [69] S. Chen, M. Yang, C. Ba, S. Yu, Y. Jiang, H. Zou, Y. Zhang, Preparation and characterization of slow-release fertilizer encapsulated by biochar-based waterborne copolymers, *Sci. Total Environ.* 615 (2018) 431–437. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.09.209.

- [70] C. Brough, D.A. Miller, J.M. Keen, S.A. Kucera, D. Lubda, R.O. Williams, Use of Polyvinyl Alcohol as a Solubility-Enhancing Polymer for Poorly Water Soluble Drug Delivery (Part 1), *AAPS PharmSciTech.* 17 (2016) 167–179. doi:10.1208/s12249-015-0458-y.
- [71] A. Karimi, M. Navidbakhsh, S. Faghihi, Measurement of the Mechanical Failure of Polyvinyl Alcohol Sponge Using Biaxial Puncture Test, *J. Biomater. Tissue Eng.* 4 (2014) 46–50. doi:10.1166/jbt.2014.1134.
- [72] K.Y. Lee, D.J. Mooney, Hydrogels for Tissue Engineering, *Chem. Rev.* 101 (2001) 1869–1880. doi:10.1021/cr000108x.
- [73] C.M. Hassan, N.A. Peppas, Structure and Applications of Poly(vinyl alcohol) Hydrogels Produced by Conventional Crosslinking or by Freezing/Thawing Methods, in: *Biopolym. - PVA Hydrogels, Anionic Polym. Nanocomposites*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, n.d.: pp. 37–65. doi:10.1007/3-540-46414-X_2.
- [74] R.K. Tubbs, Sequence distribution of partially hydrolyzed poly(vinyl acetate), *J. Polym. Sci. Part A-1 Polym. Chem.* 4 (1966) 623–629. doi:10.1002/pol.1966.150040316.
- [75] T. DON, C. KING, W. CHIU, C. PENG, Preparation and characterization of chitosan-g-poly(vinyl alcohol)/poly(vinyl alcohol) blends used for the evaluation of blood-contacting compatibility, *Carbohydr. Polym.* 63 (2006) 331–339. doi:10.1016/j.carbpol.2005.08.023.
- [76] W.-C. Lin, D.-G. Yu, M.-C. Yang, pH-sensitive polyelectrolyte complex gel microspheres composed of chitosan/sodium tripolyphosphate/dextran sulfate: swelling kinetics and drug delivery properties, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 44 (2005) 143–151. doi:10.1016/j.colsurfb.2005.06.010.
- [77] F. Mi, S. Shyu, C. Kuan, S. Lee, K. Lu, S. Jang, Chitosan – Polyelectrolyte Complexation for the Preparation of Gel Beads and Controlled Release of Anticancer Drug . I . Effect of Phosphorous Polyelectrolyte Complex and Enzymatic Hydrolysis of Polymer, *Polymer (Guildf).* 74 (1999) 1868–1879.
- [78] F. Pati, B. Adhikari, S. Dhara, Development of chitosan–tripolyphosphate fibers through pH dependent ionotropic gelation, *Carbohydr. Res.* 346 (2011) 2582–2588. doi:10.1016/j.carres.2011.08.028.
- [79] F.-M. Hsieh, C. Huang, T.-F. Lin, Y.-M. Chen, J.-C. Lin, Study of sodium tripolyphosphate-crosslinked chitosan beads entrapped with *Pseudomonas putida* for phenol degradation, *Process Biochem.* 43 (2008) 83–92. doi:10.1016/j.procbio.2007.10.016.
- [80] S.-J. Wu, T.-H. Liou, C.-H. Yeh, F.-L. Mi, T.-K. Lin, Preparation and characterization of porous chitosan-tripolyphosphate beads for copper(II) ion adsorption, *J. Appl. Polym. Sci.* 127 (2013) 4573–4580. doi:10.1002/app.38073.
- [81] X.. Shu, K.. Zhu, Controlled drug release properties of ionically cross-linked chitosan beads: the influence of anion structure, *Int. J. Pharm.* 233 (2002) 217–225. doi:10.1016/S0378-5173(01)00943-7.
- [82] E. Ibezim, C. Andrade, C. Marcia, B. Barretto, D.C. Odimegwu, F. De Lima, Ionically Cross-Linked Chitosan/Tripolyphosphate Microparticles for the Controlled Delivery of Pyrimethamine, an Antiprotozoal, *Ibnosina J. Med. Biomed. Sci.* 3 (2011) 77–88. doi:10.4103/1947-489X.210876.
- [83] X.Z. Shu, K.J. Zhu, A novel approach to prepare tripolyphosphate/chitosan complex beads for controlled release drug

- delivery, *Int. J. Pharm.* 201 (2000) 51–58. doi:10.1016/S0378-5173(00)00403-8.
- [84] K. Kumari, U. Rani, Controlled Release of Metformin hydrochloride through crosslinked blends of chitosan-starch, *Adv. Appl. Sci. Res.* 2 (2011) 48–54.
- [85] Chang Dae Han, *Rheology and Processing of Polymeric Materials: Volume 1: Polymer Rheology*, Oxford University Press, Inc., Oxford, UK, 2007.
- [86] Y. Wang, V. Petrova, Scanning Electron Microscopy, in: *Nanotechnol. Res. Methods Foods Bioprod.*, Wiley-Blackwell, Oxford, UK, 2012: pp. 103–126. doi:10.1002/9781118229347.ch6.
- [87] R. Guinebretiere, X-ray diffraction by polycrystalline materials, 68 (2007) 351. doi:10.1002/9780470612408.
- [88] P.R. Griffiths, J.A. de Haseth, *Fourier Transform Infrared Spectrometry*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, 2007. doi:10.1002/047010631X.
- [89] N.M.R. Spectroscopy, S. State, A.C.S.S. Series, A.C. Society, *NMR Spectroscopy of Polymers in Solution and in the Solid State*, 2002.
- [90] P.J. Haines, *Principles of Thermal Analysis and Calorimetry*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2002. doi:10.1039/9781847551764.
- [91] M.R. Guilherme, F.A. Aouada, A.R. Fajardo, A.F. Martins, A.T. Paulino, M.F.T. Davi, A.F. Rubira, E.C. Muniz, Superabsorbent hydrogels based on polysaccharides for application in agriculture as soil conditioner and nutrient carrier: A review, *Eur. Polym. J.* 72 (2015) 365–385. doi:10.1016/j.eurpolymj.2015.04.017.
- [92] P.L. Ritger, N.A. Peppas, A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs, *J. Control. Release.* 5 (1987) 23–36. doi:10.1016/0168-3659(87)90034-4.
- [93] N.A. Peppas, J.J. Sahlin, A simple equation for the description of solute release. III. Coupling of diffusion and relaxation, *Int. J. Pharm.* 57 (1989) 169–172. doi:10.1016/0378-5173(89)90306-2.
- [94] P.L. Ritger, N.A. Peppas, A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices, *J. Control. Release.* 5 (1987) 37–42. doi:10.1016/0168-3659(87)90035-6.
- [95] B. Koch, L.E. Jensen, O. Nybroe, A panel of Tn7-based vectors for insertion of the gfp marker gene or for delivery of cloned DNA into Gram-negative bacteria at a neutral chromosomal site, *J. Microbiol. Methods.* 45 (2001) 187–195. doi:10.1016/S0167-7012(01)00246-9.
- [96] C. Yan, D.J. Pochan, Rheological properties of peptide-based hydrogels for biomedical and other applications, *Chem. Soc. Rev.* 39 (2010) 3528. doi:10.1039/b919449p.
- [97] F. Madsen, A rheological examination of the mucoadhesive/mucus interaction: the effect of mucoadhesive type and concentration, *J. Control. Release.* 50 (1998) 167–178. doi:10.1016/S0168-3659(97)00138-7.
- [98] A. Martinez-Ruvalcaba, E. Chornet, D. Rodrigue, Dynamic rheological properties of concentrated Chitosan solutions, *Appl. Rheol.* 14 (2004) 140–147. doi:10.3933/AppIRheol-14-140.
- [99] M.M. Horn, V.C. Martins, A.M. Plepis, Effects of starch gelatinization and oxidation on the rheological behavior of chitosan/starch blends, *Polym.*

- Int. 60 (2011) 920–923. doi:10.1002/pi.3021.
- [100] J. Ngoenkam, A. Faikrua, S. Yasothornsrikul, J. Viyoch, Potential of an injectable chitosan/starch/glycerol phosphate hydrogel for sustaining normal chondrocyte function, *Int. J. Pharm.* 391 (2010) 115–124. doi:10.1016/j.ijpharm.2010.02.028.
- [101] Q. Gan, T. Wang, C. Cochran, P. McCarron, Modulation of surface charge, particle size and morphological properties of chitosan-TPP nanoparticles intended for gene delivery, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 44 (2005) 65–73. doi:10.1016/j.colsurfb.2005.06.001.
- [102] F. Mi, S. Shyu, S. Lee, T. Wong, Kinetic Study of Chitosan-Tripolyphosphate Complex Reaction and Acid-Resistive Properties of the Chitosan-Tripolyphosphate Gel Beads Prepared by in-Liquid Curing Method, (1999) 6–8.
- [103] S. Lim, P.A. Seib, Preparation and Pasting Properties of Wheat and Corn Starch Phosphates', *Cereal Chem.* 70 (1993) 137–144. doi:10.1111/j.1365-2621.2003.tb07032.x.
- [104] X. Shi, Effects of food gums on viscosities of starch suspensions during pasting, *Carbohydr. Polym.* 50 (2002) 7–18. doi:10.1016/S0144-8617(01)00369-1.
- [105] Y. Sang, O. Prakash, P.A. Seib, Characterization of phosphorylated cross-linked resistant starch by ³¹P nuclear magnetic resonance (³¹P NMR) spectroscopy, *Carbohydr. Polym.* 67 (2007) 201–212. doi:10.1016/j.carbpol.2006.05.009.
- [106] T. Bourtoom, M.S. Chinnan, Preparation and properties of rice starch–chitosan blend biodegradable film, *LWT - Food Sci. Technol.* 41 (2008) 1633–1641. doi:10.1016/j.lwt.2007.10.014.
- [107] M. da S. Barbi, F.C. Carvalho, C.P. Kiill, H. Da Silva Barud, S.H. Santagneli, S.J.L. Ribeiro, M.P.D. Gremião, Preparation and Characterization of Chitosan Nanoparticles for Zidovudine Nasal Delivery, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 15 (2015) 865–874. doi:10.1166/jnn.2015.9180.
- [108] A. Pawlak, M. Mucha, Thermogravimetric and FTIR studies of chitosan blends, *Thermochim. Acta.* 396 (2003) 153–166. doi:10.1016/S0040-6031(02)00523-3.
- [109] J. Zawadzki, H. Kaczmarek, Thermal treatment of chitosan in various conditions, *Carbohydr. Polym.* 80 (2010) 395–401. doi:10.1016/j.carbpol.2009.11.037.
- [110] Z. Cui, Y. Xiang, J. Si, M. Yang, Q. Zhang, T. Zhang, Ionic interactions between sulfuric acid and chitosan membranes, *Carbohydr. Polym.* 73 (2008) 111–116. doi:10.1016/j.carbpol.2007.11.009.
- [111] M. Pieróg, M. Gierszewska-Dróżyńska, J. Ostrowska-Czubenko, Effect of ionic crosslinking agents on swelling behavior of chitosan hydrogel membranes, *Prog. Chem. Appl. Chitin Its.* XIV (2009) 75–82. doi:10.1016/j.carbpol.2009.01.036.
- [112] D.R. Bhumkar, V.B. Pokharkar, Studies on effect of pH on cross-linking of chitosan with sodium tripolyphosphate: A technical note, *AAPS PharmSciTech.* 7 (2006) E138–E143. doi:10.1208/pt070250.
- [113] W. Yang, J. Fu, T. Wang, N. He, Chitosan/Sodium Tripolyphosphate Nanoparticles: Preparation, Characterization and Application as Drug Carrier, *J. Biomed. Nanotechnol.* 5 (2009) 591–595. doi:10.1166/jbn.2009.1067.

- [114] J. Xu, S. Strandman, J.X.X. Zhu, J. Barralet, M. Cerruti, Genipin-crosslinked catechol-chitosan mucoadhesive hydrogels for buccal drug delivery, *Biomaterials*. 37 (2015) 395–404. doi:10.1016/j.biomaterials.2014.10.024.
- [115] S.T. Lee, F.L. Mi, Y.J. Shen, S.S. Shyu, Equilibrium and kinetic studies of copper (II) ion uptake by chitosan-tripolyphosphate chelating resin, *Polymer (Guildf)*. 42 (2001) 1879–1892.
- [116] L. Qi, Z. Xu, X. Jiang, C. Hu, X. Zou, Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles, *Carbohydr. Res.* 339 (2004) 2693–2700. doi:10.1016/j.carres.2004.09.007.
- [117] F. Pati, B. Adhikari, S. Dhara, Development of chitosan-tripolyphosphate fibers through pH dependent ionotropic gelation, *Carbohydr. Res.* 346 (2011) 2582–2588. doi:10.1016/j.carres.2011.08.028.
- [118] J.M. Fang, P.A. Fowler, J. Tomkinson, C.A.S. Hill, The preparation and characterisation of a series of chemically modified potato starches, *Carbohydr. Polym.* 47 (2002) 245–252. doi:10.1016/S0144-8617(01)00187-4.
- [119] I. Capron, P. Robert, P. Colonna, M. Brogly, V. Planchot, Starch in rubbery and glassy states by FTIR spectroscopy, *Carbohydr. Polym.* 68 (2007) 249–259. doi:10.1016/j.carbpol.2006.12.015.
- [120] K. Iizuka, T. Aishima, Starch Gelation Process Observed by FT-IR/ATR Spectrometry with Multivariate Data Analysis, *J. Food Sci.* 64 (1999) 653–658. doi:10.1111/j.1365-2621.1999.tb15104.x.
- [121] S. Mathew, M. Brahmakumar, T.E. Abraham, Microstructural imaging and characterization of the mechanical, chemical, thermal, and swelling properties of starch–chitosan blend films, *Biopolymers*. 82 (2006) 176–187. doi:10.1002/bip.20480.
- [122] F.M. Pelissari, M.V.E. Grossmann, F. Yamashita, E.A.G. Pineda, Antimicrobial, Mechanical, and Barrier Properties of Cassava Starch–Chitosan Films Incorporated with Oregano Essential Oil, *J. Agric. Food Chem.* 57 (2009) 7499–7504. doi:10.1021/jf9002363.
- [123] Q. Wang, N. Zhang, X. Hu, J. Yang, Y. Du, Chitosan/starch fibers and their properties for drug controlled release, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 66 (2007) 398–404. doi:10.1016/j.ejpb.2006.11.011.
- [124] M.L. Foresti, M. del P. Williams, R. Martínez-García, A. Vázquez, Analysis of a preferential action of α -amylase from *B. licheniformis* towards amorphous regions of waxy maize starch, *Carbohydr. Polym.* 102 (2014) 80–87. doi:10.1016/j.carbpol.2013.11.013.
- [125] H.F. Zobel, Starch Crystal Transformations and Their Industrial Importance, *Starch - Stärke*. 40 (1988) 1–7. doi:10.1002/star.19880400102.
- [126] A. Buleon, P. Colonna, V. Planchot, S. Ball, Starch granules : structure and biosynthesis, *Int. J. of Biol. Macromol.* 23 (1998) 85–112.
- [127] G.L. Clark, A.F. Smith, X-ray diffraction studies, 40 (1996) 863–879. doi:10.1021/j150376a001.
- [128] M. Jaworska, K. Sakurai, P. Gaudon, E. Guibal, Influence of chitosan characteristics on polymer properties. I: Crystallographic properties, *Polym. Int.* 52 (2003) 198–205. doi:10.1002/pi.1159.
- [129] Y.X. Xu, K.M. Kim, M.A. Hanna, D. Nag, Chitosan–starch composite film: preparation and characterization, *Ind. Crops Prod.* 21 (2005) 185–192.

- doi:10.1016/j.indcrop.2004.03.002.
- [130] S.M. Lai, T.M. Don, Y.C. Huang, Preparation and properties of biodegradable thermoplastic starch/poly(hydroxy butyrate) blends, *J. Appl. Polym. Sci.* 100 (2006) 2371–2379. doi:10.1002/app.23085.
- [131] Y. Tian, Y. Li, X. Xu, Z. Jin, Starch retrogradation studied by thermogravimetric analysis (TGA), *Carbohydr. Polym.* 84 (2011) 1165–1168. doi:10.1016/j.carbpol.2011.01.006.
- [132] M.N. Anglès, A. Dufresne, Plasticized Starch / Tunicin Whiskers Nanocomposite Materials . 2 . Mechanical Behavior, *Macromolecules.* 34 (2001) 2921–2931. doi:10.1021/ma001555h.
- [133] M.K. Sureshkumar, D. Das, M.B. Mallia, P.C. Gupta, Adsorption of uranium from aqueous solution using chitosan-tripolyphosphate (CTPP) beads, *J. Hazard. Mater.* 184 (2010) 65–72. doi:10.1016/j.jhazmat.2010.07.119.
- [134] J.F. Mano, D. Koniarova, R.L. Reis, C. De Azure, C. De Gualtar, Thermal properties of thermoplastic starch / synthetic polymer blends with potential biomedical applicability, *J. Mater. Sci.* 14 (2003) 127–135.
- [135] L. Zhiqiang, Y. Xiao-su, F. Yi, Effect of Bound Water on Thermal Behaviors of Native Starch, Amylose and Amylopectin, *Starch - Stärke.* 51 (1999) 406–410. doi:10.1002/(SICI)1521-379X(199912)51:11/12<406::AID-STAR406>3.0.CO;2-K.
- [136] P.M. Remiro, M. Cortazar, E. Calahorra, M.M. Calafel, The effect of crosslinking and miscibility on the thermal degradation of an uncured and an amine-cured epoxy resin blended with poly(ϵ -caprolactone), *Polym. Degrad. Stab.* 78 (2002) 83–93. doi:10.1016/S0141-3910(02)00122-2.
- [137] A.A.A. Soliman, N.A. El-Shinnawy, F. Mobarak, Thermal behaviour of starch and oxidized starch, *Thermochim. Acta.* 296 (1997) 149–153. doi:10.1016/S0040-6031(97)00040-3.
- [138] L.S. Guinesi, E.T.G. Cavalheiro, The use of DSC curves to determine the acetylation degree of chitin/chitosan samples, *Thermochim. Acta.* 444 (2006) 128–133. doi:10.1016/j.tca.2006.03.003.
- [139] B. Sarmiento, D. Ferreira, F. Veiga, A. Ribeiro, Characterization of insulin-loaded alginate nanoparticles produced by ionotropic pre-gelation through DSC and FTIR studies, *Carbohydr. Polym.* 66 (2006) 1–7. doi:10.1016/j.carbpol.2006.02.008.
- [140] K. Huanbutta, P. Sriamornsak, S. Limmatvapirat, M. Luangtana-anan, Y. Yoshihashi, E. Yonemochi, K. Terada, J. Nunthanid, Swelling kinetics of spray-dried chitosan acetate assessed by magnetic resonance imaging and their relation to drug release kinetics of chitosan matrix tablets, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 77 (2011) 320–326. doi:10.1016/j.ejpb.2010.11.019.
- [141] Z. Yalinca, E. Yilmaz, F.T. Bullici, Evaluation of chitosan tripolyphosphate gel beads as bioadsorbents for iron in aqueous solution and in human blood in vitro, *J. Appl. Polym. Sci.* 125 (2012) 1493–1505. doi:10.1002/app.34911.
- [142] H. Omidian, J.G. Rocca, K. Park, Advances in superporous hydrogels, *J. Control. Release.* 102 (2005) 3–12. doi:10.1016/j.jconrel.2004.09.028.
- [143] R.M. Wenslow, K. Fiske, K.T. Mueller, An Overview of Solid-State NMR Correlation Experiments in Phosphate Glass Systems, in: 1999: pp. 228–241. doi:10.1021/bk-1999-0717.ch006.
- [144] P. Sacco, M. Borgogna, A. Travan, E. Marsich, S. Paoletti, F. Asaro, M.

- Grassi, I. Donati, Polysaccharide-Based Networks from Homogeneous Chitosan-Tripolyphosphate Hydrogels: Synthesis and Characterization, *Biomacromolecules*. 15 (2014) 3396–3405. doi:10.1021/bm500909n.
- [145] R. Palmeira-de-Oliveira, A. Palmeira-de-Oliveira, C. Gaspar, S. Silvestre, J. Martinez-de-Oliveira, M.H. Amaral, L. Breitenfeld, Sodium Tripolyphosphate: An excipient with intrinsic in vitro anti-Candida activity, *Int. J. Pharm.* 421 (2011) 130–134. doi:10.1016/j.ijpharm.2011.09.030.
- [146] D. Serp, M. Mueller, U. von Stockar, I.W. Marison, Low-temperature electron microscopy for the study of polysaccharide ultrastructures in hydrogels. II. Effect of temperature on the structure of Ca²⁺-alginate beads, *Biotechnol. Bioeng.* 79 (2002) 253–259. doi:10.1002/bit.10287.
- [147] J.J. Perez, N.J. Francois, G.A. Maroniche, M.P. Borrajo, M.A. Pereyra, C.M. Creus, A novel, green, low-cost chitosan-starch hydrogel as potential delivery system for plant growth-promoting bacteria, *Carbohydr. Polym.* 202 (2018) 409–417. doi:10.1016/j.carbpol.2018.07.084.
- [148] S. Siripattanakul, W. Wirojanagud, J. McEvoy, E. Khan, Effect of Cell-to-matrix Ratio in Polyvinyl Alcohol Immobilized Pure and Mixed Cultures on Atrazine Degradation, *Water, Air, Soil Pollut. Focus*. 8 (2008) 257–266. doi:10.1007/s11267-007-9158-2.
- [149] Y.-L. Liu, Y.-C. Chiu, Novel approach to the chemical modification of poly(vinyl alcohol): Phosphorylation, *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* 41 (2003) 1107–1113. doi:10.1002/pola.10654.
- [150] S. Majumdar, B. Adhikari, Polyvinyl alcohol: A taste sensing material, *Sensors Actuators B Chem.* 114 (2006) 747–755. doi:10.1016/j.snb.2005.07.052.
- [151] W. Li, X. Li, Y. Chen, X. Li, H. Deng, T. Wang, R. Huang, G. Fan, Poly(vinyl alcohol)/sodium alginate/layered silicate based nanofibrous mats for bacterial inhibition, *Carbohydr. Polym.* 92 (2013) 2232–2238. doi:10.1016/j.carbpol.2012.12.004.
- [152] S.B. Kuila, S.K. Ray, Dehydration of dioxane by pervaporation using filled blend membranes of polyvinyl alcohol and sodium alginate, *Carbohydr. Polym.* 101 (2014) 1154–1165. doi:10.1016/j.carbpol.2013.09.086.
- [153] H. Zheng, Y. Du, J. Yu, R. Huang, L. Zhang, Preparation and characterization of chitosan/poly(vinyl alcohol) blend fibers, *J. Appl. Polym. Sci.* 80 (2001) 2558–2565. doi:10.1002/app.1365.
- [154] H.M.P. Naveen Kumar, M.N. Prabhakar, C. Venkata Prasad, K. Madhusudhan Rao, T.V. Ashok Kumar Reddy, K. Chowdoji Rao, M.C.S. Subha, Compatibility studies of chitosan/PVA blend in 2% aqueous acetic acid solution at 30°C, *Carbohydr. Polym.* 82 (2010) 251–255. doi:10.1016/j.carbpol.2010.04.021.
- [155] S. Kayal, R.V. Ramanujan, Doxorubicin loaded PVA coated iron oxide nanoparticles for targeted drug delivery, *Mater. Sci. Eng. C*. 30 (2010) 484–490. doi:10.1016/j.msec.2010.01.006.
- [156] Y. Xu, W. Hong, H. Bai, C. Li, G. Shi, Strong and ductile poly(vinyl alcohol)/graphene oxide composite films with a layered structure, *Carbon N. Y.* 47 (2009) 3538–3543. doi:10.1016/j.carbon.2009.08.022.
- [157] Y. Xu, W. Hong, H. Bai, C. Li, G. Shi, Strong and ductile poly(vinyl alcohol)/graphene oxide composite films with a layered structure, *Carbon N. Y.* 47 (2009) 3538–3543. doi:10.1016/j.carbon.2009.08.022.
- [158] L. Jin, R. Bai, Mechanisms of Lead Adsorption on Chitosan/PVA Hydrogel

- Beads, *Langmuir*. 18 (2002) 9765–9770. doi:10.1021/la025917l.
- [159] Q. Chen, Y. Liu, T. Wang, J. Wu, X. Zhai, Y. Li, W.W. Lu, H. Pan, X. Zhao, Chitosan–PVA monodisperse millimeter-sized spheres prepared by electrospraying reduce the thromboembolic risk in hemorrhage control, *J. Mater. Chem. B*. 5 (2017) 3686–3696. doi:10.1039/C7TB00032D.
- [160] N. El Miri, K. Abdelouahdi, M. Zahouily, A. Fihri, A. Barakat, A. Solhy, M. El Achaby, Bio-nanocomposite films based on cellulose nanocrystals filled polyvinyl alcohol/chitosan polymer blend, *J. Appl. Polym. Sci.* 132 (2015) n/a-n/a. doi:10.1002/app.42004.
- [161] J. Jang, D.K. Lee, Plasticizer effect on the melting and crystallization behavior of polyvinyl alcohol, *Polymer (Guildf)*. 44 (2003) 8139–8146. doi:10.1016/j.polymer.2003.10.015.
- [162] S.. Sudhamani, M.. Prasad, K. Udaya Sankar, DSC and FTIR studies on Gellan and Polyvinyl alcohol (PVA) blend films, *Food Hydrocoll.* 17 (2003) 245–250. doi:10.1016/S0268-005X(02)00057-7.
- [163] Y.M. Lee, S.H. Kimt, S.J. Kimt, Preparation and characteristics of β -chitin and poly(vinyl alcohol) blend, *Polymer (Guildf)*. 37 (1996) 5897–5905. doi:10.1016/S0032-3861(96)00449-1.
- [164] Z. Wang, F. Yan, H. Pei, J. Li, Z. Cui, B. He, Antibacterial and environmentally friendly chitosan/polyvinyl alcohol blend membranes for air filtration, *Carbohydr. Polym.* 198 (2018) 241–248. doi:10.1016/j.carbpol.2018.06.090.
- [165] E. Yang, X. Qin, S. Wang, Electrospun crosslinked polyvinyl alcohol membrane, *Mater. Lett.* 62 (2008) 3555–3557. doi:10.1016/j.matlet.2008.03.049.
- [166] R. Shi, J. Bi, Z. Zhang, A. Zhu, D. Chen, X. Zhou, L. Zhang, W. Tian, The effect of citric acid on the structural properties and cytotoxicity of the polyvinyl alcohol/starch films when molding at high temperature, *Carbohydr. Polym.* 74 (2008) 763–770. doi:10.1016/j.carbpol.2008.04.045.
- [167] J.-S. Park, J.-W. Park, E. Ruckenstein, On the viscoelastic properties of poly(vinyl alcohol) and chemically crosslinked poly(vinyl alcohol), *J. Appl. Polym. Sci.* 82 (2001) 1816–1823. doi:10.1002/app.2023.
- [168] N. Singh, J. Singh, L. Kaur, N. Singh Sodhi, B. Singh Gill, Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources, *Food Chem.* 81 (2003) 219–231. doi:10.1016/S0308-8146(02)00416-8.
- [169] J. Viyoch, T. Sudedmark, W. Srema, W. Suwongkrua, Development of hydrogel patch for controlled release of alpha-hydroxy acid contained in tamarind fruit pulp extract, *Int. J. Cosmet. Sci.* 27 (2005) 89–99. doi:10.1111/j.1467-2494.2004.00250.x.
- [170] T. Jamnongkan, S. Kaewpirom, Potassium Release Kinetics and Water Retention of Controlled-Release Fertilizers Based on Chitosan Hydrogels, *J. Polym. Environ.* 18 (2010) 413–421. doi:10.1007/s10924-010-0228-6.
- [171] M.A. Melaj, M.E. Daraio, Preparation and characterization of potassium nitrate controlled-release fertilizers based on chitosan and xanthan layered tablets, *J. Appl. Polym. Sci.* 130 (2013) 2422–2428. doi:10.1002/app.39452.
- [172] A.P. Rokhade, S.A. Patil, T.M. Aminabhavi, Synthesis and characterization of semi-interpenetrating polymer network microspheres

- of acrylamide grafted dextran and chitosan for controlled release of acyclovir, *Carbohydr. Polym.* 67 (2007) 605–613. doi:10.1016/j.carbpol.2006.07.001.
- [173] H.-C. Flemming, J. Wingender, The biofilm matrix, *Nat. Rev. Microbiol.* (2010). doi:10.1038/nrmicro2415.
- [174] Y. Mille, L. Beney, P. Gervais, Viability of *Escherichia coli* after combined osmotic and thermal treatment: a plasma membrane implication, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1567 (2002) 41–48. doi:10.1016/S0005-2736(02)00565-5.
- [175] C.A. Morgan, N. Herman, P.A. White, G. Vesey, Preservation of microorganisms by drying; A review, *J. Microbiol. Methods.* 66 (2006) 183–193. doi:10.1016/j.mimet.2006.02.017.
- [176] M. Schoebitz, H. Simonin, D. Poncelet, Starch filler and osmoprotectants improve the survival of rhizobacteria in dried alginate beads, *J. Microencapsul.* 29 (2012) 532–538. doi:10.3109/02652048.2012.665090.
- [177] Y. Bashan, J.-P. Hernandez, L. Leyva, M. Bacilio, Alginate microbeads as inoculant carriers for plant growth-promoting bacteria, *Biol. Fertil. Soils.* 35 (2002) 359–368. doi:10.1007/s00374-002-0481-5.
- [178] D.C. Campos, F. Acevedo, E. Morales, J. Aravena, V. Amiard, M.A. Jorquera, N.G. Inostroza, M. Rubilar, Microencapsulation by spray drying of nitrogen-fixing bacteria associated with lupin nodules, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 30 (2014) 2371–2378. doi:10.1007/s11274-014-1662-8.
- [179] Y. He, Z. Wu, L. Tu, Y. Han, G. Zhang, C. Li, Encapsulation and characterization of slow-release microbial fertilizer from the composites of bentonite and alginate, *Appl. Clay Sci.* 109–110 (2015) 68–75. doi:10.1016/j.clay.2015.02.001.
- [180] Z. Wu, Y. He, L. Chen, Y. Han, C. Li, Characterization of *Raoultella planticola* Rs-2 microcapsule prepared with a blend of alginate and starch and its release behavior, *Carbohydr. Polym.* 110 (2014) 259–267. doi:10.1016/j.carbpol.2014.04.011.
- [181] S.P. Chowdhury, T. Nagarajan, R. Tripathi, M.N. Mishra, D. Le Rudulier, A.K. Tripathi, Strain-specific salt tolerance and osmoregulatory mechanisms in *Azospirillum brasilense*, *FEMS Microbiol. Lett.* 267 (2007) 72–79. doi:10.1111/j.1574-6968.2006.00540.x.
- [182] J.E. García, G. Maroniche, C. Creus, R. Suárez-Rodríguez, J.A. Ramirez-Trujillo, M.D. Groppa, In vitro PGPR properties and osmotic tolerance of different *Azospirillum* native strains and their effects on growth of maize under drought stress, *Microbiol. Res.* 202 (2017) 21–29. doi:10.1016/j.micres.2017.04.007.
- [183] X. Wang, I.L. Brown, A.J. Evans, P.L. Conway, The protective effects of high amylose maize (amylomaize) starch granules on the survival of *Bifidobacterium* spp. in the mouse intestinal tract, *J. Appl. Microbiol.* 87 (1999) 631–639. doi:10.1046/j.1365-2672.1999.00836.x.
- [184] R. Crittenden, A. Laitila, P. Forssell, J. Matto, M. Saarela, T. Mattila-Sandholm, P. Myllarinen, Adhesion of *Bifidobacteria* to Granular Starch and Its Implications in Probiotic Technologies, *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (2001) 3469–3475. doi:10.1128/AEM.67.8.3469-3475.2001.
- [185] Z. Wu, L. Guo, S. Qin, C. Li, Encapsulation of *R. planticola* Rs-2 from alginate-starch-bentonite and its controlled release and swelling behavior

under simulated soil conditions, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 39 (2012) 317–327. doi:10.1007/s10295-011-1028-2.