



GOBIERNO DE
MÉXICO



CONACYT
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología



CENTRO DE INVESTIGACIÓN
EN QUÍMICA APLICADA

Saltillo, Coahuila a 06 de diciembre de 2022

Programa de Maestría en Tecnología de Polímeros

Coordinación de Posgrado Presente

Por este conducto nos permitimos informar a esta coordinación que, el documento de tesis preparado por **JIMENA BORJA CAMACHO** titulado Desarrollo de un Biosensor Electroquimioluminiscente para la detección de Fosfato proveniente de Sistemas de Fertilizantes de Base Fósforo Microencapsulados en Matrices de Almidón de Maíz y Cera de Candelilla el cual fue presentado el día 28 de noviembre de 2022, ha sido modificado de acuerdo a las observaciones, comentarios y sugerencias, realizadas por el Comité Evaluador asignado. Por tal motivo, avalamos que el documento adjunto corresponde a la versión final del documento de tesis.

Atentamente,

SINODALES


Dr. Antonio Serguei Ledezma Pérez
Presidente


Dr. Antonio Cárdenas Flores
Secretario


Dra. Heidi Andrea Fonseca Florido
Vocal

ASESORES


Dr. Carlos José Espinoza González


Dr. Arxel de León Santillán

TESIS CON CARACTER ABIERTO

PROGRAMA: MAESTRÍA EN TECNOLOGÍA DE POLÍMEROS

AUTOR: JIMENA BORJA CAMACHO FIRMA 

TITULO: Desarrollo de un Biosensor Electroquimioluminiscente para la detección de Fosfato proveniente de Sistemas de Fertilizantes de Base Fósforo Microencapsulados en Matrices de Almidón de Maíz y Cera de Candelilla

ASESORES: Dr. Carlos José Espinoza González FIRMA 

Dr. Arxel de León Santillán FIRMA 

El Centro de Investigación en Química Aplicada clasifica el presente documento de tesis como ABIERTO.

Un documento clasificado como Abierto se expone en los estantes del Centro de Información para su consulta. Dicho documento no puede ser copiado en ninguna modalidad sin autorización por escrito del Titular del Centro de Información o del Director General del CIQA.

Saltillo, Coahuila, a 28 de Noviembre de 2022


Sello de la Institución



Dr. Oliverio Santiago Rodríguez Fernández
Director General del CIQA



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA APLICADA
Programa de Maestría en Tecnología de Polímeros

TESIS

**Desarrollo de un Biosensor Electroquimioluminiscente para la detección
de Fosfato proveniente de Sistemas de Fertilizantes de Base
Fósforo Microencapsulados en Matrices de Almidón de
Maíz y Cera de Candelilla**

Presentada por:

JIMENA BORJA CAMACHO

Para obtener el grado de:

Maestro en Tecnología de Polímeros

Asesorada por:

Dr. Carlos José Espinoza González
Dr. Arxel de León Santillán.

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA APLICADA
Programa de Maestría en Tecnología de Polímeros

TESIS

**Desarrollo de un Biosensor Electroquimioluminiscente para la detección
de Fosfato proveniente de Sistemas de Fertilizantes de Base
Fósforo Microencapsulados en Matrices de Almidón de
Maíz y Cera de Candelilla**

Presentada por:

JIMENA BORJA CAMACHO

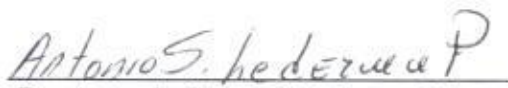
Para obtener el grado de:

Maestro en Tecnología de Polímeros

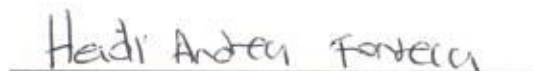
Asesorada por:

**Dr. Carlos José Espinoza González
Dr. Arxel de León Santillán**

SINODALES


Dr. Antonio Serguei Ledezma Pérez
Presidente


Dr. Antonio Cárdenas Flores
Secretario


Dra. Heidi Andrea Fonseca Florido
Vocal

DECLARACIÓN

Declaro que la información contenida en la Parte Experimental así como en la Parte de Resultados y Discusiones de este documento y que forman parte de las actividades de investigación y desarrollo realizadas durante el período que se me asignó para llevar a cabo mi trabajo de tesis, será propiedad del Centro de Investigación en Química Aplicada.

Saltillo, Coahuila a 28 de noviembre de 2022

JIMENA BORJA CAMACHO

Nombre y Firma

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Jimena Borja Camacho', written over a horizontal line.

Jimena Borja Camacho



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA APLICADA

Programa de Maestría en Tecnología de Polímeros

TESIS

“Desarrollo de un Biosensor Electroquimioluminiscente para la detección de Fosfato proveniente de Sistemas de Fertilizantes de Base Fósforo Microencapsulados en Matrices de Almidón de Maíz y Cera de Candelilla”

Presentada por:

JIMENA BORJA CAMACHO

Para obtener el grado de:

Maestro en Tecnología de Polímeros

Asesorado por:

Dr. Carlos José Espinoza González

Dr. Arxel de León Santillán

Saltillo, Coahuila

Noviembre, 2022

Agradecimientos

Al Centro de Investigación de Química Aplicada y a CONACyT por la beca de maestría otorgada.

A mis asesores el Dr. Carlos Espinoza y al Dr. Arxel de León Santillán, por brindar los medios para lograr el desarrollo de este proyecto.

A Daniel Canseco por su apoyo durante el desarrollo del biosensor, por compartir sus conocimientos de electroquímica, por las recomendaciones bibliográficas, por su consejo profesional y por siempre tener la disponibilidad de ayudar a aclarar mis dudas incluso en fin de semana.

Al Dr. Antonio Ledezma por su agradable compañía y brindarme material para realizar este proyecto.

A Carmen Natividad Canché por brindarme su apoyo y amistad durante toda mi estancia en el laboratorio de Microbiología y Materiales avanzados.

A Noé Benjamín Navarro y a Miguel Carillo por su disponibilidad para ayudar, por su apoyo con la técnica de spray drying y por compartir sus conocimientos.

A la M.C. Layza Arizmendi por instruirme en las técnicas de spray-drying y su apoyo en el laboratorio.

A mis sinodales, Dra. Heidi Fonseca, Dr. Antonio Cárdenas y Antonio Ledezma por sus observaciones, sugerencias y orientación en el desarrollo del documento de tesis.

Al Laboratorio Nacional de Materiales Grafénicos (LNMG) por facilitar el uso de equipos de caracterización, para realizar la técnica de DSC.

Al Dra. Yolanda Ortega por proporcionar espacios y equipos para la realización de este proyecto.

A M.C. Aída Esmeralda García Valdez y Nancy G. Espinosa Pinales por su apoyo durante todo el posgrado.

A mis Padres y a mis hermanos por siempre apoyarme en todas las decisiones que he tomado, por ser tan positivos y darme el impulso para ser mejor persona.

A Fernanda Moreno por motivarme, por brindarme su apoyo y consejo profesional desde el día que decidí estudiar la maestría hasta el día de hoy.

Resumen

La contaminación del agua por eutrofización es una problemática global y con mayor frecuencia se encuentran zonas afectadas por este proceso. Los principales causantes de este fenómeno son los nutrientes fósforo (P) y nitrógeno (N) provenientes del uso indiscriminado o inapropiado de fertilizantes. La tecnología de “liberación controlada-lenta de fertilizantes” por medio de encapsulamiento, está emergiendo como una nueva estrategia para hacer más eficiente el uso de fertilizantes, y así disminuir la contaminación de aguas. Igualmente se busca el uso de matrices biodegradables y materia prima proveniente de fuentes renovables y de bajo costo. El grupo de investigación de Materiales Avanzados de CIQA ha generado diversos sistemas microencapsulados a base de biopolímeros, mediante tecnologías de secado por atomización y pulverización por enfriamiento. Los métodos actuales para la detección del ión fosfato son poco selectivos y requieren procedimientos complejos. Por esta razón, se realizó un diseño experimental para el desarrollo de un biosensor electroquimioluminiscente (ECL) como una herramienta selectiva para la determinación y cuantificación del ión fosfato, con el objetivo de monitorear los perfiles de liberación de dos matrices a base de un fertilizante fosfatado bajo distintas condiciones de pH. Para ello se ha escogido una reacción bioquímica catalizada por la enzima Fosfatasa alcalina (ALP), la cual bajo condiciones específicas puede ser inhibida por el ión fosfato. Se han utilizado electrodos serigrafados para la aplicación de las técnicas de voltametría cíclica para el sistema ECL con luminol acoplada a un sistema biológico. Adicionalmente, el ácido fítico funge como sustrato de la reacción para generar ácido fosfórico el cual tiene un efecto de decaimiento en la emisión de luz del luminol, de modo que fue posible desarrollar un biosensor para la detección de fosfato mediante un sistema on/off. De acuerdo con los resultados obtenidos el método desarrollado para detección del ión fosfato presenta una respuesta favorable, se observa que los perfiles de liberación a base de cera de candelilla permiten una liberación más lenta de fertilizante comparado con los encapsulados a base de goma de mezquite. El biosensor desarrollado en este trabajo permite cuantificar de manera rápida el contenido de fosfato con una desviación del 28.81 % respecto al valor obtenido con la técnica analítica por absorción atómica.

Palabras claves: Biopolímeros, spray-drying, liberación controlada, electroquimioluminiscencia (ECL).

Índice de Contenido

Agradecimientos.....	2
Resumen.....	3
Índice de Contenido.....	4
Índice de Figuras.....	7
Índice de tablas.....	11
Abreviaturas.....	12
Capítulo 1.....	13
Introducción.....	13
1.1. Introducción.....	13
1.2. Referencias de introducción.....	15
Capítulo 2.....	17
Antecedentes.....	17
2.1. Biosensores.....	17
a.- Voltametría cíclica.....	28
b.- Luminóforo.....	28
c.- Co-reactante.....	28
d.- Material del electrodo.....	29
2.2. Problemática global en relación con el fósforo.....	34
2.1.1 Perfil de liberación de fertilizante.....	53
2.1.2 Mecanismo de liberación de fertilizantes encapsulados.....	54
2.1.3 Cinética de liberación y modelos matemáticos.....	55
2.5 Referencias de antecedentes.....	57
Capítulo 3.....	64
Panorama global de la tesis.....	64
3.1 Justificación.....	64

3.2	Hipótesis	64
3.3	Objetivo general	65
3.4	Objetivos específicos	65
3.5	Referencias de panorama global de la tesis.	66
Capítulo 4		67
Parte experimental		67
4.1	Diseño y desarrollo de un biosensor electroquimioluminiscente	67
4.2	Procedimiento para generar ECL control	69
4.3	Estudio de la actividad enzimática por el método ECL:	70
4.4	Procedimiento para estudiar la inhibición enzimática acoplada a método ECL:	71
4.5	Microencapsulación	72
4.5.1	Materiales	72
4.6	Metodología	73
4.6.1	Sistema encapsulado 60% MAP-40% Matriz con Goma de Mezquite	73
4.6.1.1	Desarrollo de una nanoemulsión de cera de candelilla	73
4.6.1.2	Preparación de una solución de matriz de bpolímero con fertilizante.	74
4.6.1.3	Obtención de microencapsulado mediante secado por atomización (Spray drying)	74
4.6.2	Obtención de un sistema de fertilizante MAP encapsulado en una matriz de Cera de candelilla ...	75
4.6.2.1	Desarrollo de la emulsión para generar microencapsulados de cera de candelilla	75
4.6.2.2	Obtención de microencapsulado mediante el proceso de atomización por enfriamiento (Spray chilling) 76	
4.6.2.3	Preparación de membranas para el perfil de liberación	77
4.6.2.4	Sistemas para el estudio del perfil de liberación	77
4.7	Caracterización de los microencapsulados mediante DSC	78
4.8	Morfología de los encapsulados de MAP mediante SEM	78
4.9	Determinación del tamaño de partícula	78
4.10	Espectrometría de masas por plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS)	78
4.3	Referencias de la metodología	79
Capítulo 5		81
Resultados y Discusión		81



5.1	Desarrollo del biosensor para la determinación de ECL.....	81
5.1.1	Estudios de estabilidad del electrodo.....	81
5.1.2	Optimización de condiciones experimentales para generar ECL	85
5.2	Desarrollo de un biosensor electroquimioluminiscente	97
5.3	Determinación de perfil de liberación de MAP mediante ECL.	112
5.4	Análisis térmico de los sistemas microencapsulados previo y posterior a las pruebas de liberación	123
5.5	Análisis de la morfología de los microencapsulados previo y posterior a las pruebas de liberación. 126	
5.6	Cinética de la liberación del fertilizante mediante modelado matemático	129
5.7	Comparación del biosensor desarrollado para la detección de fosfato mediante (ICP-MS).....	132
5.1	Referencias de los resultados.....	134
	Capítulo 6	139
	Conclusiones.....	139
	Perspectivas y trabajo futuro	141

Índice de Figuras

Figura 1 Clasificación de biosensores (modificado de https://www.mdpi.com/1424-8220/19/22/4916/htm) .	18
Figura 2 Estructura de la enzima ALP [120].	20
Figura 3 Inhibición de ALP por fosfato inorgánico [125].	22
Figura 4 Síntesis de luminol [30].	29
Figura 5 Mecanismo electroquimioluminiscente del luminol [30].	30
Figura 6 Sensor basado en la inhibición ECL del luminol para la detección de vitamina C [123].	31
Figura 7 . Detección de tinte rojo de textiles basado en la inhibición de ECL de un sistema de luminol [122].	32
Figura 8 Curva estándar para calcular la concentración de fosfato inorgánico mediante método modificado de Knowles y Plaxton (pendiente= 4.8795, r= 0.989) [63].	34
Figura 9 Proyecciones globales de crecimiento poblacional (UN Dept. of International Economic and Social Affairs, 1992) [77].	35
Figura 10 Producción de fertilizantes fosfatados (Imagen modificada de Cadmium in phosphate fertilizers, AEEP).	38
Figura 11 Uso eficiente de fertilizantes (Imagen modificada de Haifa Negec Technologies LTD 2021).	39
Figura 12 Liberación de fertilizante convencional vs liberación controlada (Imagen modificada de Chalk et al. 2015)[87].	41
Figura 13 Emulsiones en el proceso de microencapsulación (imagen modificada de Chopde et al 2013) [92].	42
Figura 14 Ilustración esquemática de las microcápsulas: (A) núcleo-coraz matriz monocapa, (B) polinuclear o múltiples núcleos, (C) dispersión en matriz, (D) matriz insoluble, (E) matriz soluble, (F) matriz de múltiples capas.	44
Figura 15 Estructura de la amilosa y la amilopectina (Imagen modificada de Chemistry Stack Exchange et. al 2016 [108].	47
Figura 16 Diferencia estructural de aceites, grasas y ceras [109].	49
Figura 17 . Macro-ovillo polidisperso de acuerdo al modelo de cuerda enrollada filamentosa [111].	51

Figura 18 Imágenes tomadas en SEM para almidón proveniente de A) maíz, B) papa y C) Cassava. Imagen tomada de artículo [50].	52
Figura 19 Encapsulación de fertilizante MAP con cera de candelilla [54].	53
Figura 20 Medición por conductimetría para aproximar perfil de liberación de fosfato proveniente de microcápsulas de quitosano [113].	54
Figura 21 Mecanismos de liberación a) difusión por medio de poros llenos de agua, b) difusión a través del polímero, c) bombeo por presión osmótica y d) erosión [30].	55
Figura 22 Esquema de un electrodo serigrafiado de carbono [2].	67
Figura 23 Esquema general del equipo de electroquimioluminiscencia.	68
Figura 24 Estructura de OSA [11].	73
Figura 25 Equipo de secado por atomización, equipo Spray Dryer, Büchi, B-290, ubicado en las instalaciones del Centro de Investigación de Química Aplicada, Saltillo, Coah.	75
Figura 26 Voltagramas cíclicos A) 7 ciclos con Buffer PBS pH 9.0. B) 7 ciclos con Buffer de borato pH 9.5, C) 6 ciclos con Buffer de Glicina pH 10.0 y D) 6 ciclos con buffer de borato sobre electrodo dañado.	82
Figura 27 Picos característicos de la oxidación del oro a 200 mV y su reducción a 700 mV [4].	83
Figura 28 Efecto de las concentraciones de luminol (0.65, 1.25, 2.5, 5, 10 y 15 mg/mL) sobre la emisión de luz en A) PBS a pH 9. En B) buffer de borato a pH 9.5. En C) Buffer de glicina a pH 10. En D) Emisión promedio.	86
Figura 29 Efecto de las concentraciones de peróxido de hidrógeno (5, 10, 15, 20, 25 y 30 %) sobre la emisión de luz en A) PBS a pH 9. En B) buffer de borato a pH 9.5. En C) Buffer de glicina a pH 10. En D) Emisión promedio.	89
Figura 30 Mecanismo del luminol para la emisión de luz.	90
Figura 31 Determinación del intervalo de potencial experimental para la emisión del luminol en un intervalo de potencial de $E=0V$ a $E_2=1.2V$.	90
Figura 32 Esquema del mecanismo del luminol sobre un electrodo para producir ECL [8].	91
Figura 33 Voltagrama cíclico de un sistema de luminol con electrodo de oro (curva negra) y electrodo de carbón (curva azul).	92
Figura 34 Respuesta de la emisión de luz sobre electrodo A) de oro y B) electrodo de carbón.	93
Figura 35 Respuesta de emisión de luz sobre un electrodo A) de oro y B) electrodo de carbón, en un ambiente oscuro.	94

Figura 36 Efecto de la concentración del ácido fosfórico sobre el pH.	95
Figura 37 Efecto de la concentración del ácido fosfórico sobre la emisión de luz ECL. A) Voltagrama cíclico del efecto de la concentración de ácido fosfórico sobre el sistema luminol. B) Emisión de luz obtenida bajo la influencia de la concentración de ácido fosfórico.	96
Figura 38 Elementos del sistema que conformarán el biosensor: columna 1 sistema control de luminol.	98
Figura 39 Influencia de los componentes del biosensor sobre la actividad enzimática, incubando los sistemas a 37°. a) Sistema de luminol, b) sistema 2 (ALP+MAP), c) sistema (ALP+MAP+Bx) y d) sistema (ALP+MAP+Bx+L).	101
Figura 40 Influencia de la solución tampón de glicina al 50mM sobre la emisión de luz en un sistema de luminol. A) detección de respuesta fotosensible, B) 5 ciclos de voltametría cíclica.	103
Figura 41 Análisis de la influencia de la solución tampón de glicina al 50mM sobre la emisión de luz en un sistema de luminol.	103
Figura 42 Representación esquemática de la doble capa eléctrica [19].	104
Figura 43 Respuesta de la emisión de luz en el tiempo con una solución tampón a base de glicina.	105
Figura 44 Comparación de la emisión de luz de un sistema con fertilizante MAP (línea roja) y ácido fítico (línea negra) bajo las mismas condiciones de prueba.	107
Figura 45 Actividad de la enzima bajo la influencia de ácido fítico. a) 0.3 mg/mL, b) 0.6 mg/mL y c) 0.9 mg/mL.	108
Figura 46 Diagrama esquemático del sistema bajo la influencia del ácido fítico.	109
Figura 47 Diagrama esquemático del sistema bajo una concentración conocida de MAP sobre el sistema de luminol.	110
Figura 48 Diagrama esquemático del funcionamiento del biosensor.	111
Figura 49 Curva de concentración contra respuesta ECL, A) Curva respecto a concentración de fertilizante MAP. B) curva respecto a concentración de fósforo.	112
Figura 50 Micrografía SEM de A) Microcapsulas por técnica Spray Chilling CeraC50/50, B) Microcapsulas por técnica Spray Drying GMZT40/60, C) Distribución de tamaño de partícula del sistema CeraC50/50, D) Distribución de tamaño de partícula del sistema GMZT40/60.	113
Figura 51 Efecto del pH sobre el perfil de liberación de un sistema microencapsulado CeraC-40 y GMZT40/60a pH 7.0.	117
Figura 52 Efecto del pH sobre el perfil de liberación de un sistema microencapsulado GMZT40/60a pH 4.0,	

7.0 y 8.5.....	118
Figura 53 Respuesta electroquímioluminiscente del biosensor a la liberación del MAP en función del tiempo de muestreo: A) sistema microencapsulado CeraC50/50A a pH = 7.0. B) sistema microencapsulado GMZT40/60 a pH = 7.0. C) sistema microencapsulado GMZT40/60 a pH = 8.5. D) sistema microencapsulado GMZT40/60 a pH = 4.0.	119
Figura 54 Tendencia de la respuesta ECL del perfil de liberación: A) sistema CeraC50/50A a pH = 7.0, SD=1.40E – 08. B) sistema GMZT40/60 a pH = 7.0, SD=1.68E – 08 C) sistema GMZT40/60 a pH = 8.5, SD=1.40E – 08. D) sistema GMZT40/60 a pH =4.0, SD=1.17E – 08.....	121
Figura 55 Perfil acumulado de sistemas microencapsulads de GMZT40/60 a pH = 8.5 (Negra, GMZT40/60 a pH = 7.0 (Roja), GMZT40/60 a pH = 4.0 (Azul) y CeraC50/50A a pH = 7.0 (Rosa).	122
Figura 56 Respuesta Termograma obtenido mediante DSC del sistema A) CeraC50/50 a pH 7.0. B) sistema GMZT40/60 a pH 7.0. C) sistema GMZT40/60 post liberación a pH 4.0 y sistema GMZT40/60 post liberación a pH 8.5 y D) Emulsión cera de candelilla tween60 1:1.	124
Figura 57 Micrografía SEM de sistema microencapsulada CeraC50/50. Fracción correspondiente a Pre-liberación A) x170, C) x400, E) x1000. Fracción correspondiente a Post-liberación B) x170, D) x400, F) x1000.	127
Figura 58 Micrografía SEM de sistema microencapsulada GMZT40/60. Fracción correspondiente a Pre-liberación A) x750, C) x1000, E) x1500. Fracción correspondiente a Post-liberación B) x750, D) x1000, F) x1500.....	128
Figura 59 Gráficas correspondientes a los modelos cinéticos de liberación A) Modelo Korsmeyer peppas, B) Modelo de orden cero, C) Modelo de primer orden.....	131

Índice de tablas

Tabla 1. Tipos de luminiscencia y su origen [130]	24
Tabla 2. Elementos esenciales para plantas, origen, función y porcentaje.	36
Tabla 3. Principales diferencias entre las técnicas de Spray Chilling y Spray drying [103]	43
Tabla 4. Principales diferencias entre las técnicas de Spray Chilling y Spray drying [103].	46
Tabla 5. Contenido de amilosa y amilopectina de almidones según su origen [129].	48
Tabla 6. Características estructurales de la goma de mezquite por la técnica de dispersión de luz estática y dinámica.	50
Tabla 7. Establecimiento de condiciones para voltametría cíclica.....	68
Tabla 8. Concentraciones de ALP para generar actividad enzimática acoplada a ECL.	71
Tabla 9. Características del Fosfato monoamónico.	72
Tabla 10. Variables para el proceso de Spray Chilling.....	76
Tabla 11. Relación de volumen experimental de soluciones para la generación de ECL.....	85
Tabla 12. Relación de Volumen experimental de soluciones para la generación de ECL.....	87
Tabla 13. Volumen de las concentraciones de los elementos que conforman el biosensor.	99
Tabla 14. Valores de pH de un sistema de liberación de fertilizante a base de CeraC50/50 y GMZT40/60 en función del tiempo.....	115
Tabla 15. Valores de pH de un sistema de liberación de fertilizante de GMZT40/60 en función del tiempo.	116
Tabla 16. Modelos cinéticos de liberación.	130
Tabla 17. Comparación del biosensor desarrollado (BS) con espectrometría de masas por plasma (ICP-MS)	133

Abreviaturas

A	Amperio
ALP	Enzima fosfatasa alcalina
amu	Unidad de masa atómica
a.u.	Unidades arbitrarias
BX	Buffer de borato
CeraC 50/50	Sistema microencapsulados a base de cera de candelilla
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
ECL	Electroquimioluminiscencia
GMZT 40/60	Sistema microencapsulados a base de goma de mezquite y almidón de maíz
h	horas
I	Intensidad de ECL en función del tiempo
I0	Intensidad inicial de ECL
ICP-MS	Espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo
KP	Korsmeyer Peppas
M	Molar
mM	Mili molar
mA	Mili ampere
MAP	Fosfato monoamónico
mg/mL	Miligramo sobre mililitro
nW	Nano-Watts
OSA	Ácido octenil succínico
pH	Potencial de hidrógeno
s	Segundo
SEM	Microscopía electrónica de barrido
SD	Desviación estándar
V	Voltio

Capítulo 1

Introducción

1.1. Introducción

En las próximas décadas se espera un aumento de la población a nivel mundial, lo cual requiere implementar medidas tecnológicas para no poner en riesgo la seguridad alimentaria según un reporte de la FAO 2018 [1]. Con el aumento poblacional y la demanda por distintos tipos de cultivo, el sector agrícola en las últimas décadas se ha visto obligado a migrar a procesos de producción masiva, lo que requiere acelerar los ciclos naturales del suelo y de las plantas [2][4]. Para satisfacer la demanda se hace necesaria la aplicación de fertilizantes, sin embargo, el fertilizante se usa de manera desmesurada generando un desequilibrio ambiental [3]. El fertilizante en exceso se volatiliza, es tóxico para las plantas y la microbiota; y subsecuentemente se filtra en los suelos generando la contaminación de aguas y acidificación de los suelos [6][7].

Se ha optado por técnicas de liberación controlada como atrapamiento y encapsulamiento de fertilizante a distintos niveles, como una estrategia para minimizar el daño ambiental causado por el exceso de fertilizantes. Dicha estrategia ha demostrado ser una alternativa eficiente para aumentar el rendimiento de los fertilizantes, disminuye el número de aplicaciones por temporada, se controla la dosificación y se evita la filtración de fertilizantes a medios acuosos [9].

Diferentes tipos de materiales se han utilizado para el encapsulamiento de fertilizantes, entre los que se encuentran una variedad de polímeros sintéticos; sin embargo, su uso ha resultado contraproducente, ya que, se ha provocado la contaminación de los suelos por la presencia de micro plásticos [8][10][11]. Los biopolímeros son una alternativa sustentable para generar encapsulamiento, tienen la ventaja de ser compatibles con el medio ambiente, pueden ser modificados, compuestos e incluso contener nanocompuestos [14]. Ya se han realizado diversas investigaciones con biopolímeros como lignina, carboximetilcelulosa, almidón modificado y quitosano [9][12]. En esta investigación los biopolímeros como los polisacáridos y las ceras naturales son un foco de atención por sus propiedades, su disponibilidad y su función como agentes encapsulantes [14].

El grupo de investigación en Materiales Avanzados del CIQA ya ha trabajado con cera de candelilla y

almidón por la técnica de spray chilling y spray drying para generar sistemas de liberación controlada de fertilizantes [15] [16] [17]. Para que la liberación controlada sea eficiente se debe conocer el perfil de liberación, para adecuar los sistemas a las necesidades metabólicas de las plantas, ya que, los cultivos difieren considerablemente en propiedades biológicas, químicas y físicas. Conociendo el perfil se evita el uso excesivo de fertilizantes y se brindan los nutrientes necesarios para el óptimo desarrollo de las plantas [5] Actualmente existen dificultades para validar la efectividad de liberación de los encapsulados de fertilizante a base de fosfato, ya que, el ión fosfato no es fácil de cuantificar. Los métodos actuales para la determinación del ión fosfato son por colorimetría y potenciometría, dichas técnicas son complejas y poco exactas. Otra técnica muy común es la formación del complejo de azul de molibdato, sin embargo, requiere numerosos pasos y condiciones específicas para su correcta determinación. Aunado a esto tiene la desventaja de tener interferencia con diversas moléculas, alto costo de reactivos/equipo y baja sensibilidad [19].

Con los métodos actuales se hace sumamente complicada la detección del ión fosfato para los fines de esta investigación. En este contexto, los biosensores electroquimioluminiscente (ECL) se convierten en una alternativa para la detección selectiva. Un biosensor se puede definir como un dispositivo capaz de convertir una señal bioquímica en una señal eléctrica, la cual puede ser cuantificada [21]. Los biosensores se componen de dos partes: un elemento receptor, el cual interactúa directamente con la sustancia de interés para detección mediante una reacción bioquímica o química; y un transductor, el cual se encarga de convertir la información química en una señal analítica capaz de ser detectada.

En este caso la enzima ALP funge como elemento receptor y el luminol como el elemento transductor quien presenta una luminiscencia azul brillante; la señal eléctrica de la reacción del biosensor será cuantificada a través de un fotodiodo [20][21]. La finalidad del presente estudio es desarrollar un biosensor ECL para determinar el perfil de liberación de sistemas microencapsulados a base de almidón y cera de candelilla conteniendo un fertilizante fosfatado. Mediante la técnica de voltametría cíclica se permitirá determinar la capacidad del biosensor para detectar el ión fosfato. El presente método servirá como una estrategia para la detección del ión fosfato con una cantidad de muestra mínima y eventualmente dará pie para trabajos futuros para buscar que el biosensor sea portátil y reutilizable.

1.2. Referencias de introducción.

- [1] FAO (Food Agricultural Organization). Fresh Fruit Production Worldwide 1990–2016 (2018).
- [2] Chen, L. Xin, X., yuan, Q, Su, D., Liu, W. ``Phytochemical properties and antioxidant capacities of various coored berries. *J. Sci Food Agrie*, 94, 180-188, (2013).
- [3] N K A Astiari, N P A Sulistiawati, I B K Mahardika and I N Rai. Improving the quality fruit of citrus cv. Siam out off-season through the application of fertilización and pruning. *J. phys. Conft. Ser.* 1402 055088. (2019).
- [4] J. Maximillian, M. L. Brusseau, E.P. Glenn and A.D. Matthias, “Pollución and environmental perturbations in the global system”, *Enviromental and Pollution science*, 2019, pp. 457-476.
- [5] Srivastava. AK, Malhorta, S.K, “Nutrient use efficiency in perennial fruit crops-a review. *J. Plant Nutr.* 40, 1928-1953, (2017).
- [6] Bunemann, E.K., Schwenka, G.D. and L. VanZwiten. Impact of agricultural inputs on soil organisms -- a review. *Australian Journal of Soil Research.* 44: 379-408 (2006).
- [7] Siafu Ibahati Sempeho, Hee Taik Kim, Egid Mubofu, and Askwar Hilonga. Meticulous overview of the controlled release fertilizers. *Adv. Chem.* (2014).
- [8] Shaviv, A. *Advances in Controlled Release Fertilizers. Advances in Agronomy.* 71 (2000) 1-49.
Irfan, S. A., Razali, R., KuShaari, K., Mansor, N., Azeem, B., & Ford Versypt, A. N. (2018).
- [9] A review of mathematical modeling and simulation of controlled-release fertilizers. *Journal of Controlled Release*, 271, 45–54.
- [10] Shoji, S., Delgado, J., Mosier, A., & Miura, Y. (2001). Use of controlled release fertilizers and nitrification inhibition to increse nitrogen use efficiency and to conserve air and water quality. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 32(7-8).
- [11] Y. Yang, M. Zhang, Y. Li, X. Fan, Y. Geng, Improving the quality of polymer-coated urea with recycled plastic, proper additives, and large tablets, *J. Agric. Food Chem.* 60 (45) (2012) 11229–11237.
- [12] Ni, B., Liu, M., Lü, S., Xie, L., & Wang, Y. (2011). Environmentally Friendly Slow-Release Nitrogen Fertilizer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(18).
- [13] Dubey R, Shami TC, Rao Bhasker KU. Microencapsulation technology and applications. *Def Sci J.* (2009) 59: 82-95.
- [14] Albertini, B., Passerini, N., Pattarino, F., & Rodriguez, L. (2008). New spray congealing atomizer

for the microencapsulation of highly concentrated solid and liquid substances. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 69(1), 348–357.

[15] García Carrillo, E. A. (2017). Ceras de polímeros naturales-surfactantes derivados de sacáridos: matrices encapsulantes biomiméticas para la liberación lenta de fertilizantes [Tesis de maestría, Centro de Investigación en Química Aplicada.] Repositorio CIQA.

[16] Martínez Lara, C. (2018). Starch and candelilla wax hybrids for slow release of microencapsulated phosphates. [Tesis de maestría, Centro de Investigación en Química Aplicada.] Repositorio CIQA.

[17] N. Navarro-Guajardo et al., Candelilla wax as natural slow-release matrix for fertilizers encapsulated by spray chilling, *J. Renew. Mater.*, vol. 6, núm. 3, pp. 226–236, 2018.

[18] Xiaoli Zhu, Tao Gao. Chapter 10 Espectrometry, nano-inspired biosensors for protein assay with clinical applications, Elsevier, pp. 237-264, 2019.

[19] Doku, G. N., Agbozo, W. K., Haswell, S. J., & McCreedy, T. (2020). Phosphomolybdenum Blue Detection – A Review of Characteristics, Achievements, Challenges and Future Prospects. *Ghana Journal of Science*, 61(1), 43–49.

[20] Khan, P., Idrees, D., Moxley, M. A., Corbett, J. A., Ahmad, F., von Figura, G., ... Hassan, M. I. (2014). Luminol-Based Chemiluminescent Signals: Clinical and Non-clinical Application and Future Uses. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 173(2), 333–355.

[21] Nikolelis, D. P., Varzakas, T., Erdem, A., and Nikoleli, G. P. (Eds.). (2013). Portable biosensing of food toxicants and environmental pollutants. CRC Press, 806 pp.

Capítulo 2

Antecedentes

2. 1. Biosensores

Durante las últimas décadas el uso de biosensores ha ido en aumento especialmente para el diagnóstico clínico, extendiéndose a otros sectores como el monitoreo ambiental y la bioelectrónica. Dichos dispositivos son atractivos como herramientas analíticas por su especificidad, alta sensibilidad, capacidad de respuesta, tiempo de medición, acoplamiento a sistemas integrados, versatilidad y bajo costo [1].

El término "Biosensor" fue definido por Collings y Caruso en 1997 como: " Un dispositivo analítico que aprovecha un sistema de reconocimiento biológico para una molécula diana, en conjunto con un transductor fisicoquímico, el cual permite convertir el evento de reconocimiento biológico en una señal capaz de ser utilizada para su detección" [2].

2. 1. 1 Clasificación de biosensores

Un biosensor es un dispositivo capaz de transformar información química en una señal analítica útil. De manera general, se componen de dos partes: el receptor, el cual se encarga de reconocer la sustancia de interés mediante un acoplamiento de tipo químico con receptores de ácido desoxirribonucleico (DNA), fagos, células, anticuerpos o enzimas. Por otro lado, se encuentra el transductor, el cual se encarga de convertir la información química procedente del receptor en una señal analítica y los transductores pueden ser ópticos, colorimétricos, piezoeléctricos, electroquímicos o combinación de ellos [1]. El sistema receptor y transductor es tan diverso, práctico e innovador como sea posible. Al final, la clave para hacer funcionar el dispositivo es la generación de una señal medible [2] (Figura 1).

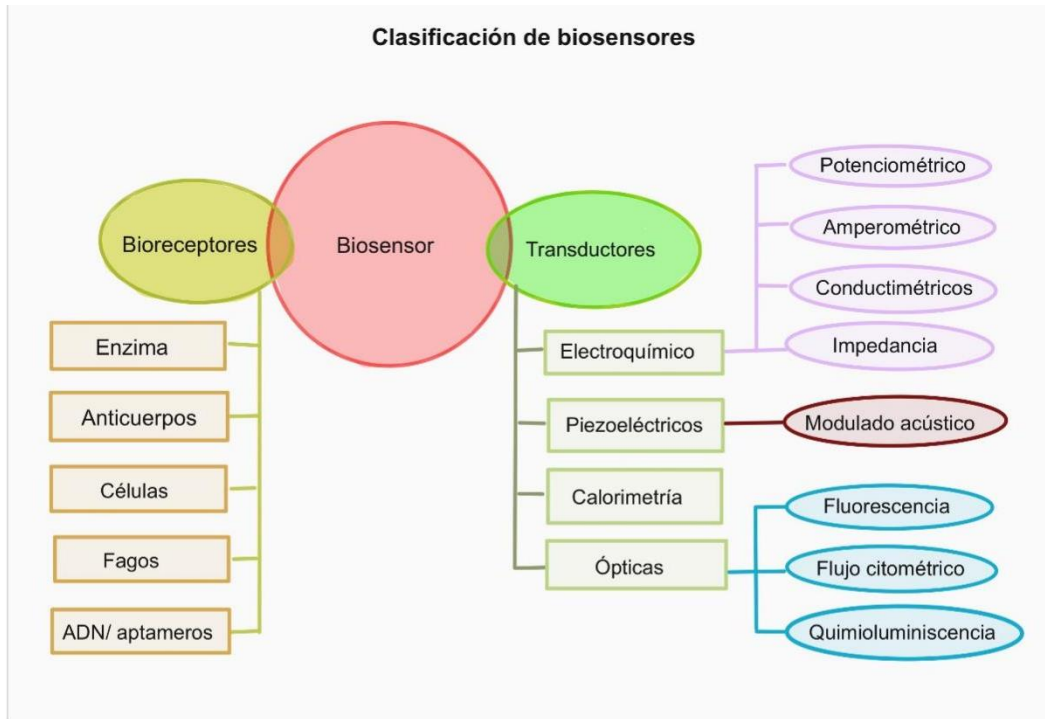


Figura 1 Clasificación de biosensores [3].

2. 1. 2 Receptores

Los receptores son moléculas como: enzimas, células o anticuerpos encargadas de reconocer a la sustancia de interés mediante un enlace. Los receptores deberán cumplir con ciertas características para poder ser empleados como elementos de reconocimiento: Debe poseer una afinidad hacia el objeto de reconocimiento; deberá ser lo suficientemente selectivo para reconocer a este elemento en presencia de otros compuestos en el medio y adicionalmente permanecer estable por un periodo de tiempo [1][4].

2. 1. 2. 1 Enzimas

Las enzimas se encargan de catalizar reacciones químicas, mediante la interacción de un sustrato dentro de una región específica de la enzima, dicha área se conoce como centro activo. Para que la actividad enzimática sea eficiente se requieren condiciones específicas de temperatura, pH y fuerza iónica del medio en el que se desarrolla la catálisis [5]. El tiempo de vida de un biosensor enzimático está limitado por la estabilidad de las enzimas, no obstante, es posible aumentar la estabilidad de la enzima mediante métodos químicos o inmovilización. Las enzimas son muy utilizadas debido a que son selectivas, su periodo de

respuesta es corto, se pueden generar prototipos simples para probar su funcionamiento, son capaces de auto-regenerarse y comercialmente existe una gran variedad de enzimas [4].

2. 1. 2. 2 Fosfatasa Alcalina (ALP)

La fosfatasa alcalina (ALP) es una enzima hidrolasa, por tanto, es capaz de hidrolizar un enlace químico de fosfato. Los sustratos de esta enzima son grupos fosfatos unidos a nucleótidos, proteínas, antígenos, entre otras muchas sustancias que contienen fosfato. Su actividad principal es la remoción de fosfatos, es decir, la desfosforilación de moléculas en condiciones alcalinas [5]. La reacción catalítica se da en dos pasos: en el primero se genera un intermediario covalente de fosfoserina y en el segundo se da un ataque nucleofílico en medio acuoso para liberar un fosfato inorgánico y un nuevo fosfoéster o especie libre.

Una de las reacciones más simples y conocidas es la catálisis con el sustrato 4-aminofenil fosfato, tanto fosfatasas ácidas como las alcalinas son capaces de llevar a cabo la hidrólisis de este compuesto, esta reacción ha sido muy utilizada para la identificación de fosfatasas [6]. Una molécula que funge como sustrato es el ácido fítico, dicha molécula es común en la naturaleza y constituye la principal forma de almacenamiento de fósforo en semillas y plantas, ya que, es una molécula que contiene seis unidades de fósforo; sin embargo, dicha molécula debe ser procesada mediante enzimas (fitasas) para ser aprovechada por diversas especies [7]. N.T. Davies y colaboradores en 1978 estudiaron las similitudes entre la actividad de la enzima fosfatasa alcalina y enzima fitasa, concluyendo que el ácido fítico que es un éster Hexa fosfato de inositol, actúa como un sustrato para la enzima ALP, ya que, esta última hidroliza ésteres fosfatados de origen orgánico. Según las observaciones de Davies, bajo todas las condiciones estudiadas la ALP reaccionó de manera paralela a la enzima fitasa, teniendo un rol similar a la actividad de dicha enzima. En la literatura este es uno de los pocos reportes donde se hace referencia a la posible capacidad de la ALP para interactuar con el ácido fítico [8].

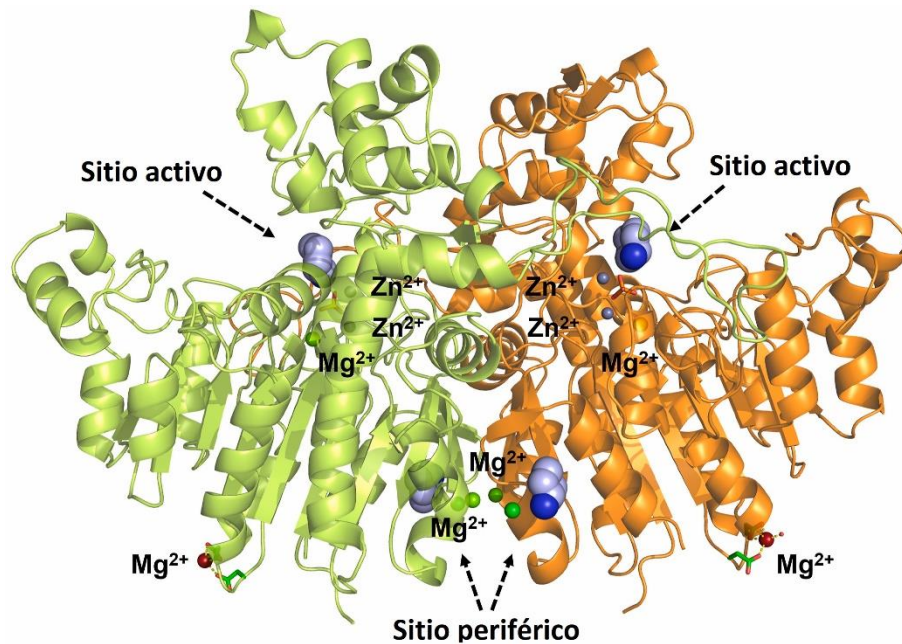


Figura 2 Estructura de la enzima ALP [120]

La enzima está compuesta por un homodímero conformado por dos unidades monoméricas y dependiendo del organismo del cual proviene su peso molecular puede ir desde los 35 a 49.4 KDa. La estructura secundaria del sitio activo consiste en dos cadenas de polipéptidos idénticos que al plegarse forman regiones con estructuras basadas en hélices alfa y vueltas beta, pero también se forman regiones plegadas sólidamente de espiral. La mayoría de las enzimas tienen involucrados dos iones de Zn^{+2} y uno de Mg^{+2} en la vecindad del centro activo (Figura 2) [9]. Durante la catálisis el Zn_1 coordina el oxígeno del enlace ester ortofosfórico, mientras que el Zn_2 coordina el oxígeno de la hidrólisis del intermediario fosfoseril. Estos iones son necesarios en el sitio activo, ya que, favorecen el ambiente electropositivo para la hidrólisis de grupos fosfato y estructuralmente se permite la activación de la enzima. La reacción necesita cofactores los cuales aumentan la velocidad de reacción química, los cofactores suelen ser iones metálicos de Mg^{2+} , Zn^{2+} y Mn^{2+} . Se ha visto que, a mayor concentración de dichos iones, mayor es la actividad de la ALP, excepto para el Zn^{2+} , ya que, el aumento de estos iones provoca la acción opuesta [9][10]. La ALP estructuralmente es compleja, sin embargo, se han dilucidado estructuras de diferentes especies como fosfatasa de placenta humana, de intestino de rata, de bacterias, de bovino y de camarón, las cuales demuestran similitudes estructurales [9]. Para estudios analíticos se encuentran disponibles una variedad de enzimas a nivel comercial como *Escherichia coli* e intestino de bovino.

2. 1. 2. 3 Inhibición de la Fosfatasa Alcalina

Los inhibidores son sustancias que reducen o cesan la actividad de una enzima, se usan en la naturaleza y regulan el metabolismo de los organismos de manera normal. Las sustancias inhibidoras ocupan el lugar del sustrato en el sitio activo de la enzima o en otros lugares de la enzima que impiden la catálisis de reacción o la disminuyen. Una vez que el inhibidor desocupa el sitio de inhibición la enzima puede o no volver a su estado original de actividad, lo que deriva en inhibidores reversibles y no reversibles. La ALP ha sido muy estudiada e interacciona con una basta cantidad de sustratos y también es susceptible a la inhibición por distintos tipos de sustancias [10][5][11].

- Inhibición por aminoácidos: el contenido de aminoácidos puede afectar la actividad de la ALP, especialmente la L-Fenilalanina es un inhibidor no competitivo y estereoespecífico. También el L-triptófano, la histidina y lisina son inhibidores no competitivos.
- Inhibición por metales ionizados: La inhibición con vanadiato de sodio es atribuido a la formación de estados de transición trigonales, los cuales son similares a los estados de transición de los grupos fosfato y se percibe que estructuralmente interaccionan fuertemente con el sitio activo de la enzima.
- Inhibición con EDTA: El ácido etilendiaminotetraacético, este tipo de agentes quelantes inhiben de manera irreversible, ya que, eliminan al zinc del centro activo de la enzima.
- Ditioneitol y el mercaptoetanol, actúan como inhibidores no competitivos modificando la estructura, esta inhibición es reversible, ya que, la enzima recupera su actividad al disminuir las cantidades de estas sustancias.
- Inhibición por fosfato y derivados de fosfato: La ALP es inhibida por su propio producto de reacción, igualmente por fosfato inorgánico, iones fosfato y algunos derivados de fosfato. El fosfato es considerado un inhibidor competitivo, ya que, se une al sitio activo y compite con el sustrato. Extraordinariamente el fosfato bajo condiciones favorables puede actuar como sustrato o como sustancia inhibitoria.

2. 1. 2. 4 Aplicación de la inhibición enzimática

Las enzimas son elementos clave en los biosensores, los cuales se han desarrollado principalmente en el

campo clínico, para el diagnóstico y monitoreo de enfermedades, pero también para monitoreo medioambiental han sido de gran utilidad. Desde 1975 Guilbault y colaboradores inmovilizaron fosfatasa alcalina (ALP) junto con la enzima glucosa oxidasa (GOX), mediante su inhibición se permitió la cuantificación de fosfato, la desventaja de dicho dispositivo era una baja sensibilidad a bajas concentraciones [5]. La investigación de Guilbault permitió un avance en el desarrollo de biosensores acoplados a enzimas y más recientemente se han utilizado diversas enzimas como nucleósido fosfatasa, xantina oxidasa, piruvato oxidasa, peroxidasas, entre otras; que acopladas a sistemas quimioluminiscentes por inhibición permiten la detección de un analito [12]. Se ha podido determinar el contenido de pesticidas mediante la inhibición de la actividad enzimática de la acetilcolinesterasa, cuya presencia permite cuantificar a través del grado de inactivación de la enzima [12]. También ha sido posible la detección de metales pesados mediante la inhibición de la (ALP), la cual se encuentra en una membrana de microalga *chlorella vulgaris*, dicho sistema permite la determinación de metales pesados por efecto de la inhibición de la enzima [5]. La enzima (ALP) proveniente de intestino de bovino se ha reportado en diversas investigaciones ser inhibida por fosfato inorgánico, fluoro fosfatos, pirofosfato inorgánico, glicerolfosfato y otros derivados de fosfato (Figura 3) [13]. El uso de enzimas para la detección de diversos analitos se ha hecho más complejo; con la combinación de hasta tres enzimas [14] [6].

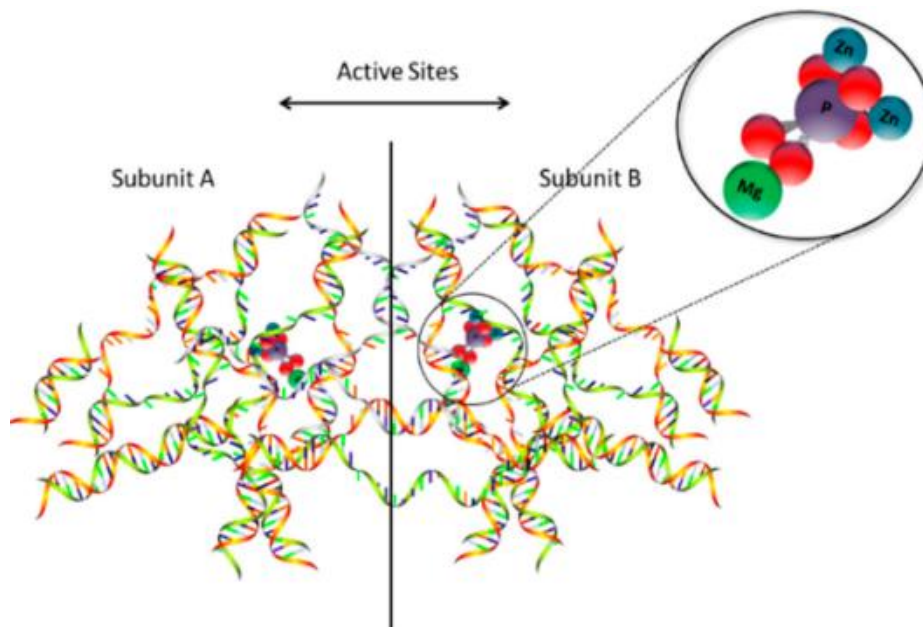


Figura 3 Inhibición de ALP por fosfato inorgánico [13].

2. 1. 3 Transductores

El transductor es un elemento que se encuentra asociado a un evento fisicoquímico y es capaz de producir una señal, la magnitud de la señal es proporcional a la del sistema con el analito de interés. Los sistemas de transducción agudizan las señales, algunos ejemplos son: eléctricos, ópticos, piezoeléctricos, termométricos, magnéticos y nano-mecánicos. Algunos marcadores ópticos de transducción son; fluorescencia, luminiscencia, quimioluminiscencia, electroluminiscencia, etc.

Existen numerosas moléculas con características luminiscentes, cada molécula tiene características fundamentales que permitirán su uso eficiente en sistemas analito-receptor-transductor, no todas las moléculas son igualmente útiles para las distintas técnicas de detección. Por esta razón los elementos que conforman el biosensor deben ser acoplados y específicos para su correcto funcionamiento. Los transductores presentan ciertas ventajas comparado con otros sistemas de reconocimiento como tiempos de respuesta corto, elevada sensibilidad, bajos requerimientos y bajo costo [12].

2. 1. 3. 1 Luminiscencia

La palabra luminiscencia proviene del latín “lumen” que significa luz, y quien acuñó este término fue Eilhard Wiedemann en 1888, quien definió diversos fenómenos los cuales no estaban basados en la transformación de energía por incandescencia [15]. De manera general la luminiscencia se produce mediante una transición de relajación de un estado excitado a un nivel electrónico de menor energía. Dicha transición se caracteriza por la disipación de energía en forma de fotones en el rango del UV visible. Los procesos luminiscentes se clasifican de acuerdo con la naturaleza de la reacción que provee la energía necesaria para alcanzar el estado excitado [16][17]. Diversas especies de flora y fauna generan bioluminiscencia y existen diversos procesos que permiten la generación de luz (Tabla 1) [18]. La luminiscencia es una herramienta acoplada a biosensores, de manera que el sistema permite monitorear la producción de fotones provenientes de una reacción química y es posible relacionar la intensidad de luz con la concentración de alguna sustancia de interés.

Tabla 1. Tipos de luminiscencia y su origen [18]

Tipo de luminiscencia	Causada o iniciada por:
Fotoluminiscencia (fluorescencia, fosforescencia)	Absorción de fotones
Quimioluminiscencia	Reacción química
Bioluminiscencia	Reacción bioquímica en un organismo vivo
Electrogeneración quimioluminiscente	Reacción electroquímica
Electroluminiscencia	Recombinación radiativa de electrones y vacancias en la materia
Cristaloluminiscencia	Reacciones de cristalización
Lioluminiscencia	Disolución de un sólido en un solvente
Sonoluminiscencia	Implosión de burbujas en un líquido cuando se excita con sonido
Mecano-luminiscencia	Por acción mecánica sobre un sólido

2. 1. 3. 2 Electroquimioluminiscencia (ECL)

Electroquimioluminiscencia (ECL) es la conversión de energía eléctrica en energía radiativa. Es un proceso que genera luz *in situ* por especies electroquímicas sobre la superficie de un electrodo al aplicar un potencial, existe transferencia electrónica lo que resulta en la emisión de luz. La ECL es una técnica analítica que cada vez atrae mayor atención por sus ventajas: versatilidad, alta sensibilidad, selectividad y el bajo costo. Adicionalmente no involucra una fuente de luz externa y se evitan problemas relacionados con dispersión de luz e interferencias, también los estados de excitación pueden ser fácilmente controlados variando los potenciales eléctricos, es una técnica no destructiva y en algunos casos los luminóforos pueden ser regenerados después de la emisión [19].

2. 1. 3. 3 Principios Básicos de Electroquímica

La transferencia de electrones entre la superficie de un electrodo y las especies reductoras u oxidantes disueltas en un electrolito es un paso crítico para llevar a cabo una reacción electroquímica. Las especies disueltas y sus fronteras de orbitales moleculares HOMO (orbital molecular ocupado de mayor energía) y LUMO (orbital molecular ocupado de menor energía) definen la reactividad electroquímica por procesos de óxido-reducción. Imponiendo progresivamente potenciales negativos, la energía del electrón aumenta y es más fácil transferir electrones del electrodo hasta el orbital electrónico vacante LUMO de las especies químicas involucradas, dicho proceso se conoce como reducción. Llevar los potenciales a valores más positivos provoca el decaimiento de la energía de los electrones dentro del electrodo, entonces un electrón es removido del orbital molecular ocupado de mayor energía y se considera como una reacción de oxidación. Dependiendo del potencial aplicado las especies pueden ser reducidas y oxidadas, y la corriente se vuelve una medida útil, ya que, los electrones cruzan una interfase y el flujo de electrones es directamente proporcional a la velocidad de reacción electroquímica que se lleva a cabo en el electrodo, por tanto, se pueden aproximar la cantidad de especies transformadas electroquímicamente. El rendimiento de ECL no se estima directamente, ya que, depende de las condiciones experimentales como el solvente, la concentración, el potencial aplicado y el material del electrodo [12].

2. 1. 3. 4 Mecanismo para obtener Electroquimioluminiscencia

La transferencia de electrones se puede dar por diferentes vías dependiendo del luminóforo, las cuales se pueden generar mediante: Transferencia de electrones por un luminóforo, por aniquilación, co-reactante, por la ruptura de un enlace del luminóforo y una ruta especial de inducción por calentamiento de electrones [15] [16] [17] [20].

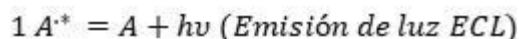
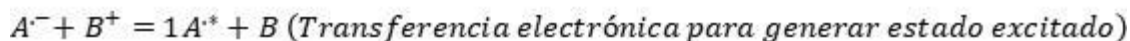
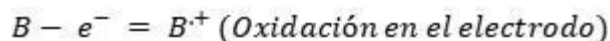
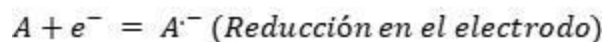
2. 1. 3. 4. 1. Transferencia de electrones por luminóforo

En esta vía, el estado de emisión del luminóforo se produce por la transferencia de electrones que ocurre en solución y el luminóforo está directamente involucrado. Dos especies, o dos estados redox de la misma molécula generan una transferencia de electrones para producir el estado excitado, del proceso de transferencia se puede distinguir dos vías: Aniquilación y co-reactante. reversible siempre y cuando no

esté asociado a un paso químico, después de generar ECL al final de la transferencia es posible la regeneración del luminóforo [17].

2. 1. 3. 4. 2. Aniquilación

En esta vía, la especie reducida A^- y la especie oxidada B^+ se producen electroquímicamente por pulsos alternos de potencial sobre la superficie del electrodo, cabe señalar que dichas especies pueden ser de inicio la misma molécula solamente con estados de óxido-reducción diferentes. Dichas especies se recombinan para formar el estado excitado $1A^*$ [17].



La formación de una especie en su estado excitado va a depender de la energía libre de reacción entre A^- y B^+ . Si la reacción exergónica es suficiente, se rellena directamente el estado excitado del luminóforo, es decir, el singlete. En este caso la energía de reacción es mayor o igual a la energía del estado emisor del singlete y la emisión de ECL sigue una ruta-S. Por el contrario, si la energía de aniquilación no es suficiente para rellenar el estado del singlete, se seguirá otra ruta más simple para producir un estado de triplete. Dicha ruta-T resulta accesible y eventualmente se alcanza un estado singlete en un segundo paso. Esta ruta es simple porque solamente se requiere de un luminóforo, solvente y al electrolito soporte. Sin embargo, para que se logre llegar al estado excitado las especies reducidas y oxidadas se deben formar cerca del electrodo, esto limita a la técnica al uso de solventes como acetonitrilo y (N,N-Dimetilformamida) DMF. La ventana de potencial del agua no es suficiente para formar especies lo suficientemente estables. La desventaja de esta vía es el quenching por dioxígeno [15].

2. 1. 3. 4. 3. Co-reactante

Es una vía alternativa cuando las especies oxidadas o reducidas del luminóforo en un proceso de aniquilación no son lo suficientemente estables. Un co-reactante es una especie química que luego de oxidarse o reducirse en la superficie del electrodo, produce intermediarios altamente reactivos capaces de

reaccionar con el luminóforo para llegar a un estado excitado. Esta vía es muy simple experimentalmente, ya que, solamente requiere imponer un potencial o barrer el potencial en una sola dirección [22]. Algunos tipos de co-reactantes son: oxalato, tripropilamina (TPrA), Nicotinamida adenina dinucleótido (NADH), 2-(dibutylamino) etanol (DBAE), peroxidisulfato, peróxido de benzoilo (BPO), entre otros [17].

El mecanismo de “reducción-oxidación” se genera de la siguiente manera [16]:

- 1) Se lleva a cabo la oxidación electroquímica sobre la superficie del electrodo.
- 2) Se rompe un enlace (o transferencia de átomo) la reacción del co-reactante genera un radical fuerte.
- 3) La transferencia de electrones entre la especie altamente reducida del co-reactante y el luminóforo oxidado son lo suficientemente exergónicas para producir ECL.

El co-reactante será una molécula que va a ser consumida irreversiblemente en una reacción de ruptura de enlaces, la cual es necesaria para alcanzar el estado excitado para que el luminóforo pueda ser regenerado y sea capaz de empezar un nuevo ciclo de ECL. Para seleccionar un sistema co-reactante / luminóforo eficiente para generar un alto ECL, se deben cumplir con ciertos requerimientos: la solubilidad en el medio, estabilidad, potenciales adecuados redox y una vida media de radicales suficiente para lograr la emisión de luz [16].

2. 1. 3. 4. 4. Ruptura de enlace del luminóforo

La ruptura de enlaces permite generar fotones, sin embargo, la ruptura debe ser lo suficientemente fuerte para alcanzar la energía suficiente para rellenar el estado emisor. La ruptura de enlace significa que el luminóforo solamente podrá emitir un fotón a la vez, ya que, es una reacción irreversible, totalmente opuesto a las reacciones de transferencia de electrones. Los luminóforos más comunes son; Lucigenina (bis-N-metil actridiniumnitrate), éster de acridinio, el luminol y sus derivados. En una solución básica y en presencia de peróxido de hidrógeno el Luminol es capaz de llegar a un estado excitado (3-aminofthalato) [21]. La desventaja de este método es que solamente emite luz una sola vez, es una técnica destructiva que puede dañar muestras sensibles. Sin embargo, bajo condiciones específicas se puede reproducir la señal inicial, pero está limitada a las condiciones y concentraciones del sistema [16] [20].

2. 1. 4 Elementos clave para llevar a cabo ECL

a.- Voltametría cíclica

La voltametría cíclica sirve para examinar las propiedades electroquímicas de una especie química, la energía del electrón dentro del electrodo se sincroniza continuamente por medio de un barrido en un rango de potencial lineal. Los experimentos comienzan donde no ocurre ningún tipo de reacción electroquímica y se van moviendo en un periodo de tiempo hasta alcanzar procesos de oxidación y reducción. La manera más común de presentar los datos electroquímicos es mediante una gráfica de la corriente en función del potencial (i vs. E). Dicha gráfica se considera equivalente a un espectro obtenido en espectroscopía. También es común encontrar gráficas de la intensidad de la luz ECL en función del potencial (ECL vs. E) [20].

b.- Luminóforo

El luminóforo es la molécula que alcanza el estado excitado y emite luz, se distinguen tres clases de luminóforos: Orgánicos, inorgánicos y nanopartículas. La mayoría de los luminóforos orgánicos contienen anillos aromáticos de 5 o 6 carbonos o varios heteroátomos como N, O, S, como el perileno, rubreno y sus derivados. Los complejos inorgánicos contienen (Cr, Cu, Mo, Ru, Rh, Re, Os, Ir, Pt) el luminóforo inorgánico más utilizado es el $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ tris(bipiridina)cloruro de rutenio (II). Es una sal comercialmente disponible en forma de hexahidrato, es un sólido cristalino rojo, soluble en agua y en solventes polares. La razón de que sea el luminóforo más popular radica en su estabilidad química, propiedades luminiscentes y su alta reactividad en el estado excitado. Las nanopartículas y los puntos cuánticos (quantum dots) tienen la característica de que sus propiedades electrónicas son controladas por su tamaño y por la morfología de su superficie, el seleniuro de zinc (ZnSe) o sulfato de cadmio (CdS) son los más utilizados. La cantidad tan diversa de luminóforos que existen actualmente permite seleccionar longitudes de onda emitidas en el rango visible, lo que facilita la detección [17].

c.- Co-reactante

El co-reactante permite la presencia de especies oxidantes fuertes y la generación de especies reducidas simultáneamente. Un co-reactante eficiente debe producir un radical fuerte después de iniciar con una oxidación. Los dos co-reactantes más utilizados para la generación de ECL son aminas y peróxidos. Para el caso del peróxido, se reduce a un radical aniónico, entonces el enlace O-O sufre homólisis, es decir, la molécula se divide equitativamente y cada átomo retiene un electrón. Lo que genera un anión carboxilato,

dando lugar a un radical oxidante bastante fuerte. Es importante notar que durante la ECL la formación de especies disociadas no siempre es fácil de determinar, ya que, depende de la naturaleza del co-reactante. Por tanto, habrá veces que existirá una discrepancia en los potenciales redox reportados en la literatura [16].

d.- Material del electrodo

La emisión de luz se genera por la transferencia de electrones, la transferencia es influenciada por la naturaleza química del electrodo. Actualmente existe una variedad comercial amplia de electrodos, electrodos a base de metales (Au, Pt, Ag) y a base de carbón (carbón vítreo, dopados con boro o diamante, etc.) Se debe buscar un electrodo que permita el proceso electroquímico y que pueda ser acoplado a los elementos del sistema [21].

2. 1. 5 Luminol

El luminol es un compuesto orgánico de bajo costo, baja toxicidad, soluble en solventes orgánicos y exhibe un alto rendimiento de quimioluminiscencia, tiene un brillo característico color azul cuando se mezcla con un agente oxidante apropiado. El luminol no puede ser regenerado estrictamente como otros luminóforos, sin embargo, el luminol es de gran interés porque podría sustituir complejos inorgánicos y se ha visto que es útil en biosensores [22]. El luminol se sintetiza en un proceso de dos pasos (Figura 4): 1) La hidrazina se calienta junto con ácido nitroftálico en presencia de trietilenglicol con glicerol. Ocurre una reacción de condensación por sustitución nucleófila sobre la porción de un grupo carbonilo, por medio de un nucleófilo que cede electrones, el resultado de este proceso es la pérdida de agua y la formación de 3 nitroftáto hidrazina. 2) Se genera una reacción de reducción del grupo nitro a un grupo amino con ditionito de sodio, a través de un intermediario transitorio de hidroxilamina y se produce luminol [20].

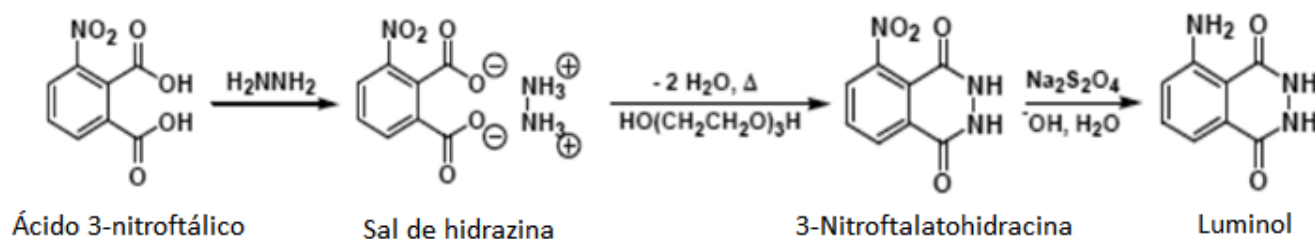


Figura 4 Síntesis de luminol [30].

2. 1. 6 Mecanismo ECL del luminol

Existen dos mecanismos por los cuales se puede llevar a cabo la ECL del luminol [21] (Figura 5).

El mecanismo 1, ocurre cuando se desprotona el luminol en un medio básico, la base permite atrapar los hidrógenos unidos a los átomos de nitrógeno. Se forma una especie intermedia la cual reacciona con oxígeno molecular que permite el intercambio de amidas por ésteres por adición cíclica, la reacción se favorece si se toma en cuenta que el nitrógeno molecular es un grupo saliente. Se forma un peróxido de hidrógeno altamente inestable y al romperse da lugar a 3-aminofталato, dejando a la molécula en estado excitado. Cuando la molécula pasa de un estado excitado a un estado basal se libera energía en forma de luz de color azul a una longitud de onda de 425 nm. Este tipo de reacciones tienen un bajo rendimiento cuántico, suelen ser catalizadas en presencia de hierro (Fe), haciendo el fenómeno de producción de la luz un proceso casi inmediato al contacto [22].

Mecanismo 2 ocurre bajo condiciones alcalinas el luminol se desprotona ($pK=6.2$) y el anión es electroquímicamente oxidado sobre la superficie del electrodo, dando como resultado un compuesto diazo quinona. En la presencia de peróxido de hidrógeno se genera un estado excitado (3-aminofталato) dicho compuesto emite luz a 420 nm al regresar a su estado basal [22].

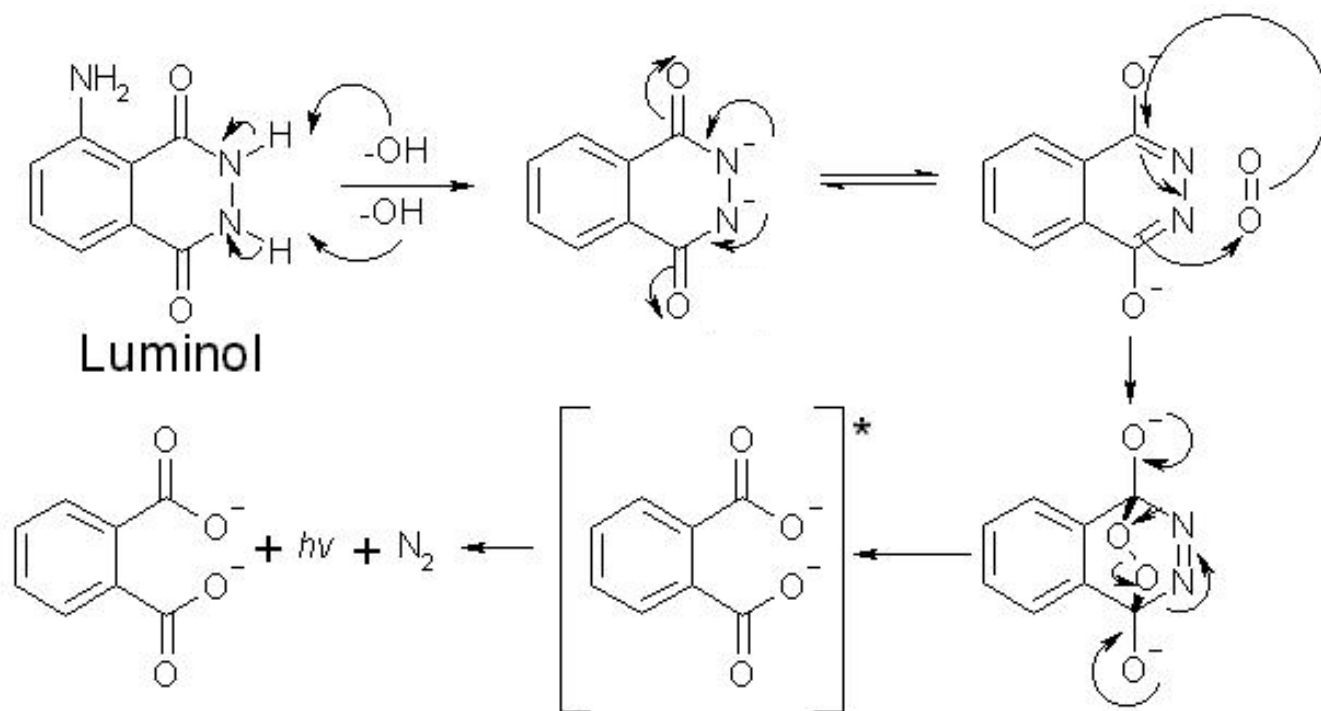


Figura 5 Mecanismo electroquimioluminiscente del luminol [23].

2. 1. 7 Aplicaciones analíticas del luminol acoplado a ECL

Hong Dai y colaboradores en 2008 desarrollaron un sensor ECL basado en la inhibición de luz con vitamina C (vitC). En años recientes la industria de los alimentos ha decidido fortificar una variedad de alimentos con vitaminas, sin embargo, la concentración de vitamina puede afectar la calidad de los bienes alimenticios. Existen diversos métodos colorimétricos, químicos, fluoro métricos y cromatográficos para la detección de vitC. Sin embargo, la ECL ha demostrado ser una técnica eficiente y de bajo costo para la detección de analitos. La investigación consistió en estudiar el efecto de la concentración de la vitC sobre un electrodo funcionalizado con PMMA y luminol, dicho ensamble ofreció reproducibilidad del sistema y una emisión de luz intensa. La manera en que se detecta la vitC es porque sobre la superficie del electrodo sufre una deshidrogenación para formar ácido dehidroascórbico, este ácido es un agente reductor e interacciona con el oxígeno disuelto para formar un ácido dicetogúconico. La formación del ácido junto con el agotamiento del oxígeno en el medio, generan que la emisión ECL se vea disminuida conforme aumenta la adición de vitC (Figura 6) [26].

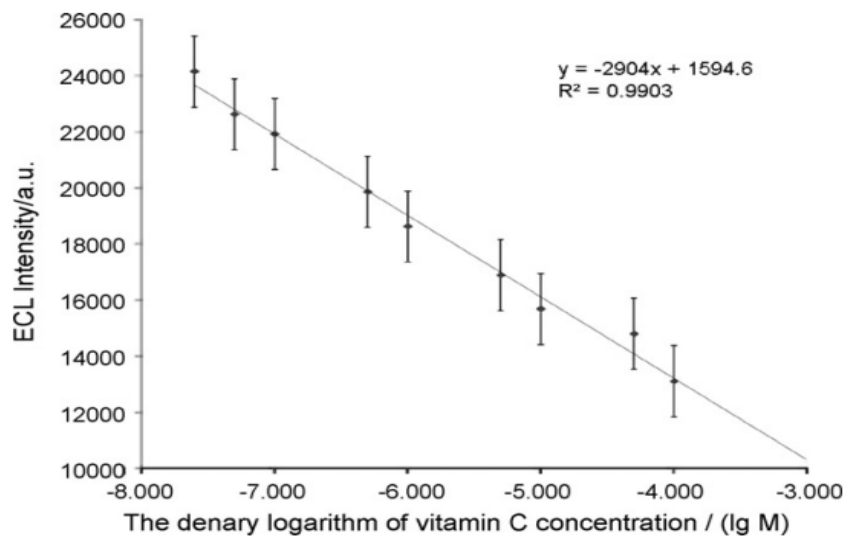


Figura 6 Sensor basado en la inhibición ECL del luminol para la detección de vitamina C [123].

Carolina V. Uliana y colaboradores en 2020 desarrollaron un sensor basado en la inhibición del luminol por ECL para la detección del tinte rojo en textiles. Los tintes en textiles están ampliamente distribuidos y suelen encontrarse en aguas residuales, sin embargo, la preocupación comienza al detectar cantidades cada vez mayores de este tinte, ya que, es un contaminante ambiental con efectos negativos en la salud

humana como desórdenes reproductivos, carcinogenicidad y es un disruptor endocrino. Para la generación del biosensor se funcionalizan partículas magnéticas con luminol en un sistema ECL, demostrando que la tinta roja es capaz de inhibir la ECL del luminol. En dicho estudio la inhibición de la luz se utilizó como una medida de la señal para la determinación del tinte rojo en un medio acuoso. Se hizo una curva de calibración de la ECL con un porcentaje de tinte rojo que demuestra la inhibición de la luz con un coeficiente de 0.9997 para los límites de detección para concentración de 0.5, 2.0, 4.0, 8.0, 12.0 y 17.0 pgmL^{-1} denotando una clara disminución de la luz conforme aumenta la concentración de tinte rojo (Figura 7) [25].

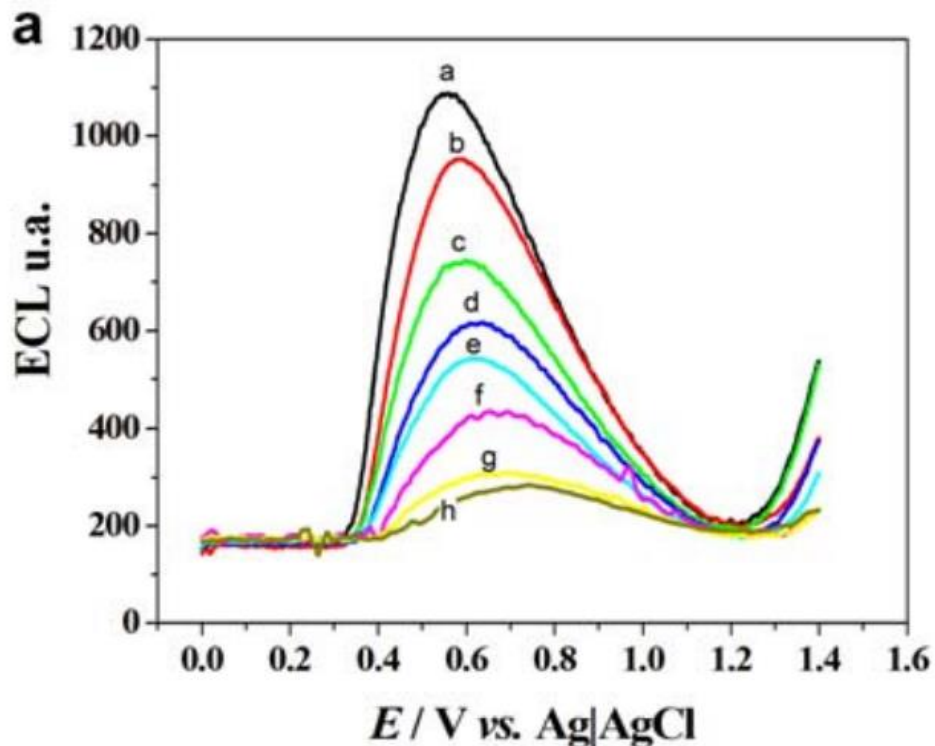


Figura 7 . Detección de tinte rojo de textiles basado en la inhibición de ECL de un sistema de luminol [122].

El desarrollo de biosensores bajo la técnica de ECL se ha convertido en una poderosa herramienta analítica para la detección específica de fármacos, pesticidas, bisfenol-A y iones metálicos [24]. A dicha técnica se le ha acoplado luminol por sus características electroquímicas, sensibilidad y por generar señales visibles. La reacción electroquímica con luminol presenta un pico característico de oxidación, dicho pico se ha reportado entre 0.45 V hasta 2.8 V, el valor obtenido es dependiente de las condiciones del sistema y la capacidad del potenciostato para generar corriente [25].

2. 1. 8 Uso potencial de los biosensores

Existe una infinidad de aplicaciones en las cuales se pueden utilizar los biosensores: monitoreo de glucosa para pacientes diabéticos, análisis de alimentos, monitoreo ambiental, detección de medicamentos y tratamiento de aguas, por mencionar algunos ejemplos. Esta tecnología ha demostrado ser una herramienta de alta especificidad; con tiempos de respuesta cortos, en pocos minutos; se necesitan pequeñas cantidades de muestra y tienen alta sensibilidad a bajas concentraciones. En este proyecto se pretende desarrollar la tecnología de un biosensor como una alternativa para la detección de grupos fosfato provenientes de fertilizantes microencapsulados.

2. 1. 8. 1 Métodos para la determinación del fosfato

Existen diversos métodos reportados para la detección de fosfato: colorimétricos y potenciométricos. Los cuales se basan en una determinación indirecta, es decir, se basan en aproximaciones. Cabe señalar que las desventajas más comunes de estos métodos son: la necesidad de un número considerable de pasos para obtener la respuesta esperada, alto costo de reactivos, baja sensibilidad de método e interferencia con moléculas no involucradas en la detección.

La potenciometría es un método que involucra todas las propiedades electroquímicas con las que cuenta una solución, por tanto, la concentración de un analito es proporcional a la concentración, recordemos que los fertilizantes generalmente se encuentran conjugados con otros macronutrientes, los cuales se verán involucrados en la medición y no solo la sustancia de interés.

Knowles y plaxton fueron los primeros en desarrollar un método colorimétrico basado en la absorción del complejo de azul de molibdeno, el cual se forma tras reducir un complejo de un amonio con molibdeno-fosfato inorgánico (PO_4^{3-}) en un medio ácido. Se hace un análisis por medio de un espectrofotómetro a diferentes diluciones [62]. El método parece sencillo, sin embargo, presenta una alta interferencia, ya que, el molibdeno reacciona fácilmente con diversas moléculas pudiendo dar resultados falsos positivos a la determinación de Pi.

Martínez y col. (Martínez Lara, C. 2018) utilizó un método modificado de Knowles y plaxton, para determinar el perfil de liberación del Pi liberado a partir de sistemas de microcápsulas de almidón-MAP. Se obtiene un complejo de amonio molibdato-Pi de color, el cual es posible analizar por medio de un espectrofotómetro UV-Vis midiendo la absorbancia a 213 nm (Figura 8) [27].

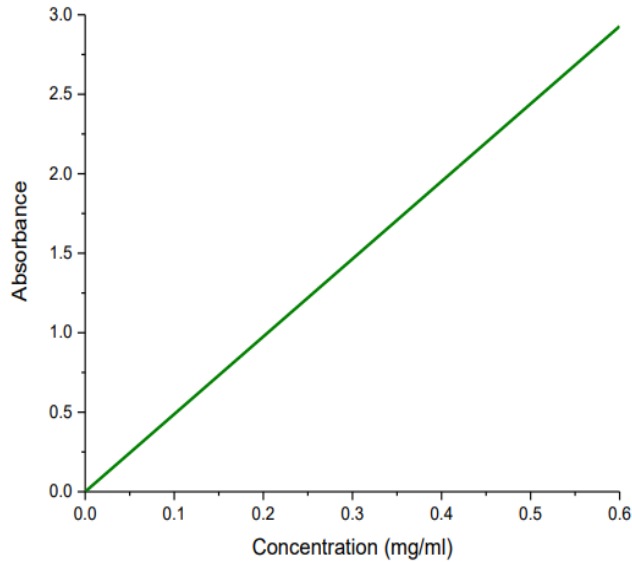


Figura 8 Curva estándar para calcular la concentración de fosfato inorgánico mediante método modificado de Knowles y Plaxton (pendiente=4.8795, $r=0.989$) [63].

2. 2. Problemática global en relación con el fósforo

2. 2. 1 Aumento de la población y la seguridad alimentaria

Existe una enorme preocupación para garantizar la seguridad alimentaria de la creciente población mundial, se proyecta un aumento poblacional de 7.6 billones de habitantes actuales a 8.6 billones para 2030 y 9.8 billones para 2050 (Figura 9) [28]. El aumento poblacional implica la urgente necesidad de producir una mayor cantidad de alimentos, aunado a una demanda por distintos tipos de cultivos. Para satisfacer los requerimientos existen dos factores importantes: aumentar las superficies de cultivo y proporcionar nutrientes en formas asimilables. Las superficies de cultivo se ven día a día disminuidas por el aumento de la industrialización, la urbanización, desertificación, sequía o inundaciones. Estos factores atentan contra la seguridad alimentaria global [29]. Los fertilizantes son una manera de añadir nutrientes asimilables al suelo, ya que, contienen elementos químicos que son esenciales para el crecimiento y desarrollo de las plantas [30]. Sin embargo, el uso excesivo o inadecuado conduce a daños ambientales severos como la eutrofización. Actualmente se busca tomar acciones multidisciplinarias para mejorar los sistemas de agricultura junto con soluciones tecnológicas para administrar y dosificar los nutrientes necesarios de manera adecuada, para obtener un mayor rendimiento.

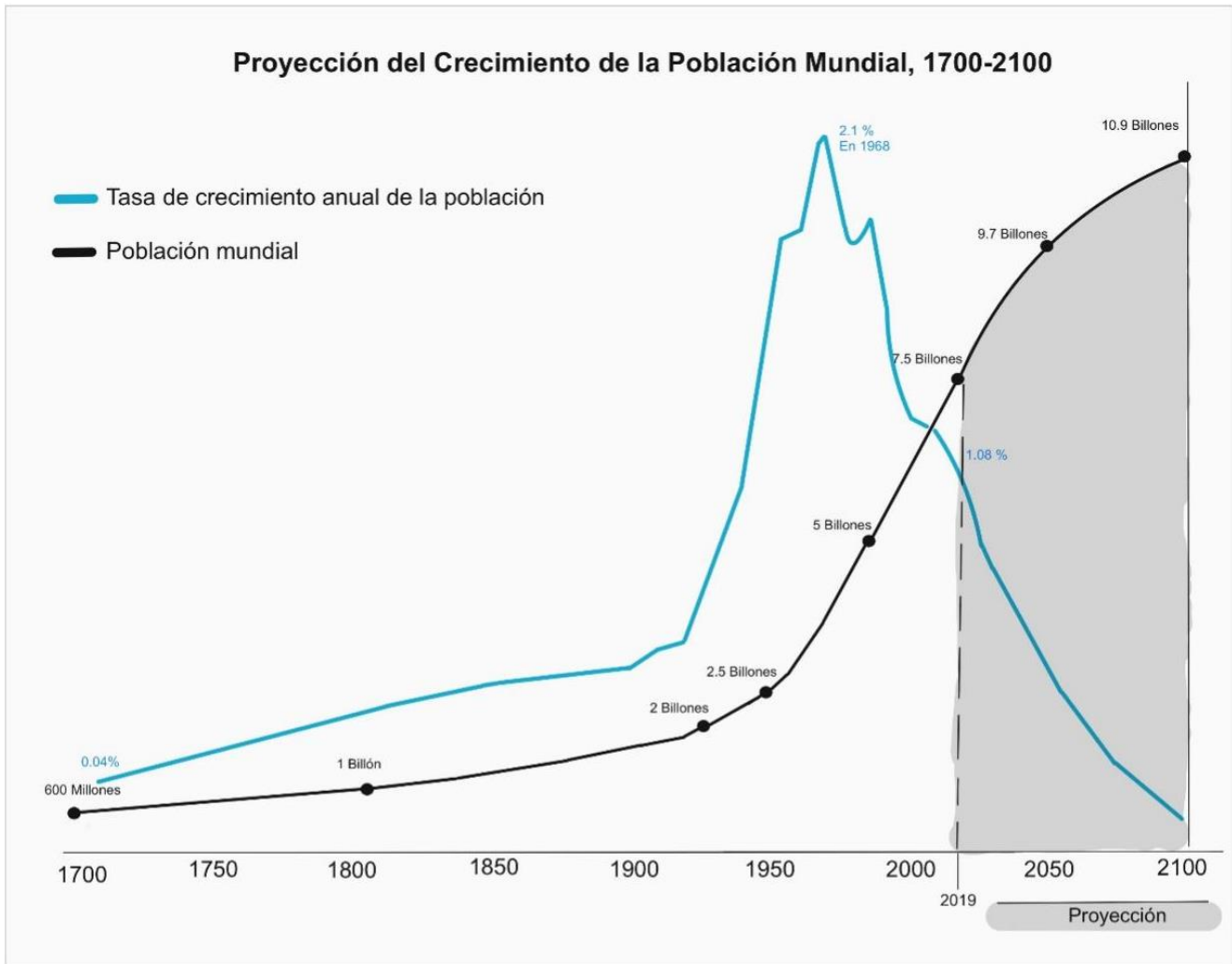


Figura 9 Proyecciones globales de crecimiento poblacional (UN Dept. of International Economic and Social Affairs, 1992) [31].

2.2.2 Elementos esenciales para las plantas

De manera general, se consideran dieciséis nutrientes esenciales para cumplir con las funciones metabólicas normales de una planta (Tabla 2). Los nutrientes esenciales provienen del aire, agua y suelo que circunda la planta; el suelo alberga la microbiota y minerales que proveen la mayor cantidad de nutrientes como: Nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K), calcio (Ca), magnesio (Mg), azufre (S), hierro (Fe), manganeso (Mn), Zinc (Zn), Cobre (Cu), boro (B), molibdeno (Mo) y cloro (Cl) [4] [32]. Dichos nutrientes se dividen en dos categorías básicas; micronutrientes, que son requeridos en cantidades muy pequeñas y los macronutrientes que son necesarios en grandes cantidades, los tres nutrientes primarios son; nitrógeno, fósforo y potasio.

Tabla 2. Elementos esenciales para plantas, origen, función y porcentaje.

Elemento	Símbolo	Origen	Concentración
Carbón	C	Constituye carbohidratos necesarios para la fotosíntesis.	45%
Oxígeno	O	Constituye carbohidratos para la respiración.	45%
Hidrógeno	H	Mantiene el balance osmótico, permite reacciones químicas.	6%
Nitrógeno	N	Constituye aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos.	1-5%
Potasio	K	Involucrado en fotosíntesis, síntesis de proteínas y traslocación de carbohidratos.	0.5-1%
Fósforo	P	Constituye proteínas, coenzimas, ácidos nucleicos y sustratos metabólicos. Participa en transferencia de energía.	0.1-5%
Magnesio	Mg	Activador de enzimas, componente de clorofila.	0.1-0.4%
Azufre	S	Componente de ciertos aminoácidos y proteínas.	0.1-0.4%
Cloro	Cl	Involucrado en la producción de oxígeno y fotosíntesis.	0.01-1%
Hierro	Fe	Involucrado en la síntesis de clorofila y en la transferencia de electrones entre enzimas.	50-250 ppm

Manganeso	Mn	Controla diferentes procesos de oxidorreducción y está involucrado en la fotosíntesis.	20-200 ppm
Boro	B	Translocación de azúcares y metabolismo de hidratos de carbono.	6-60 ppm
Zinc	Zn	Involucrado con enzimas que regulan otras enzimas	25-150 ppm
Cobre	Cu	Cataliza procesos de respiración celular y es componente de varias enzimas.	5-20 ppm

2. 2. 3 Fertilizantes base fósforo

El fósforo se presenta en la naturaleza en forma mineral: como roca fosfórica cuya composición varía entre un 4% hasta un 20% de pentóxido de fósforo y otros minerales [33][34]. El proceso para la fabricación de fertilizantes a base de fosfato consta de dos pasos: La preparación de la materia prima y la producción de ácido fosfórico. En primera instancia la roca se tritura al tamaño de grava gruesa, el material se limpia de impurezas y se enriquece para elevar su contenido de fosfato. Una vez enriquecido, el material se muele, se seca simultáneamente y se procede a la fabricación del ácido en un reactor. Azufre elemental se funde a altas temperaturas para producir dióxido de azufre, el cual se convierte mediante catalizadores a un trióxido de azufre, dicho compuesto es altamente inestable y absorbe fácilmente agua para formar ácido sulfúrico. La roca de fosfato se introduce en el reactor y reacciona de manera inmediata con el ácido sulfúrico formando ácido fosfórico y sulfato de calcio di hidratado. El ácido fosfórico se filtra para separarlo del calcio di hidratado [34]. El ácido fosfórico es un precursor para la fabricación de una gran variedad de fertilizantes a base de fósforo (Figura 10). El fosfato de di amonio (DAP) y el fosfato monoamónico (MAP) se encuentran entre los fertilizantes más utilizados a nivel agrícola. El DAP se fabrica añadiendo dos porciones molares de amoníaco y una porción molar de ácido fosfórico, mientras que el MAP se produce añadiendo 1:1 porciones molares de amoníaco y ácido fosfórico [35].

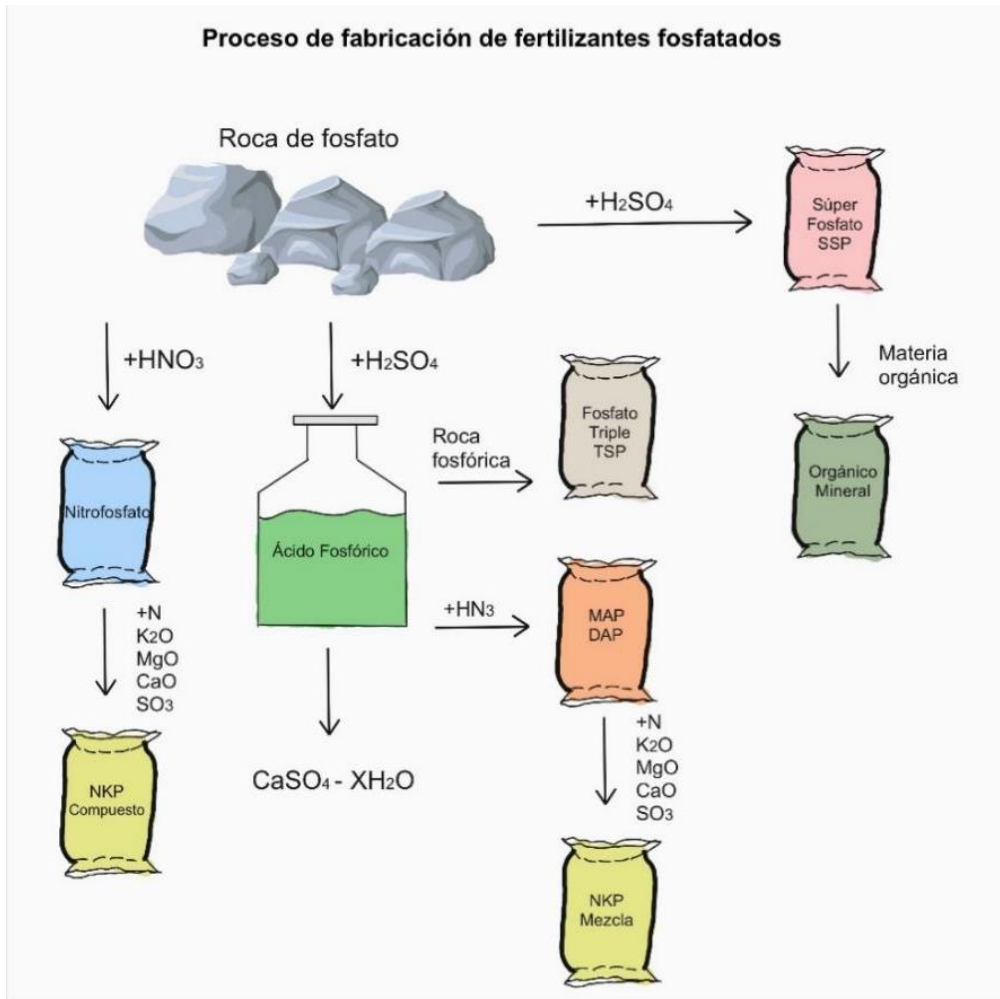


Figura 10 Producción de fertilizantes fosfatados (Imagen modificada de Cadmium in phosphate fertilizers, AEEP).

2. 2. 4 Características del Fosfato monoamónico (MAP)

El fertilizante conocido como fosfato monoamónico (MAP) con formula química $[(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4]$ ha sido durante muchos años un fertilizante en uso agrícola, ya que, contiene dos de los macronutrientes más importantes, aproximadamente 48 a 68 % de pentóxido de fósforo y de 10 a 12 % de nitrógeno. Tiene la ventaja de ser una sal granular soluble en agua, por tanto, se disuelve fácilmente en el suelo si el contenido de humedad es el adecuado. Al disolver los gránulos en agua el pH de la solución suele bajar hasta 4.0 a 4.5 y en el suelo la solución que rodea a los gránulos es moderadamente ácido, lo que ha hecho que este fertilizante se vuelva deseable para los suelos con condiciones neutras o con un pH alto. Adicionalmente es estable a altas temperaturas lo que permite su transporte y funcionamiento en climas extremos, ya que,

se descompone hasta los 200°C en amoníaco gaseoso y ácido fosfórico fundido [35]. Este fertilizante es altamente versátil, ya que, se puede aplicar de forma granular directamente en el suelo o el polvo se prepara en suspensión para su aplicación foliar o en el agua para riego [36]. Los medios ácidos generados por MAP favorecen notablemente la absorción de ciertos nutrientes en las plantas como son Fe y Zn. Se debe tener en cuenta que los fertilizantes fosfatados se vuelven insolubles al ser mezclados con fertilizantes conteniendo calcio (ej. Nitrato de calcio) [36].

2. 2. 5 Limitaciones en el uso de fertilizantes convencionales.

Para lograr establecer un uso más eficiente de los fertilizantes es necesario alcanzar un equilibrio entre la absorción de nutrientes y los requerimientos nutritivos de las plantas durante su ciclo de vida. Es importante conocer las características químicas y físicas de los suelos, ya que, de este dependerá la disponibilidad de los nutrientes [37]. De manera convencional y en la mayoría de los casos los fertilizantes son aplicados al suelo de manera directa [38]. Se ha observado que la aplicación directa del fertilizante no coincide con los requerimientos puntuales en el crecimiento de las plantas, por tanto, el fertilizante no aprovechado tiene más posibilidad de provocar daños al medio ambiente [39]. Por esta razón se ha optado por el uso de sistemas de liberación controlada: los cuales optimizan la dosificación del fertilizante (Figura 11).

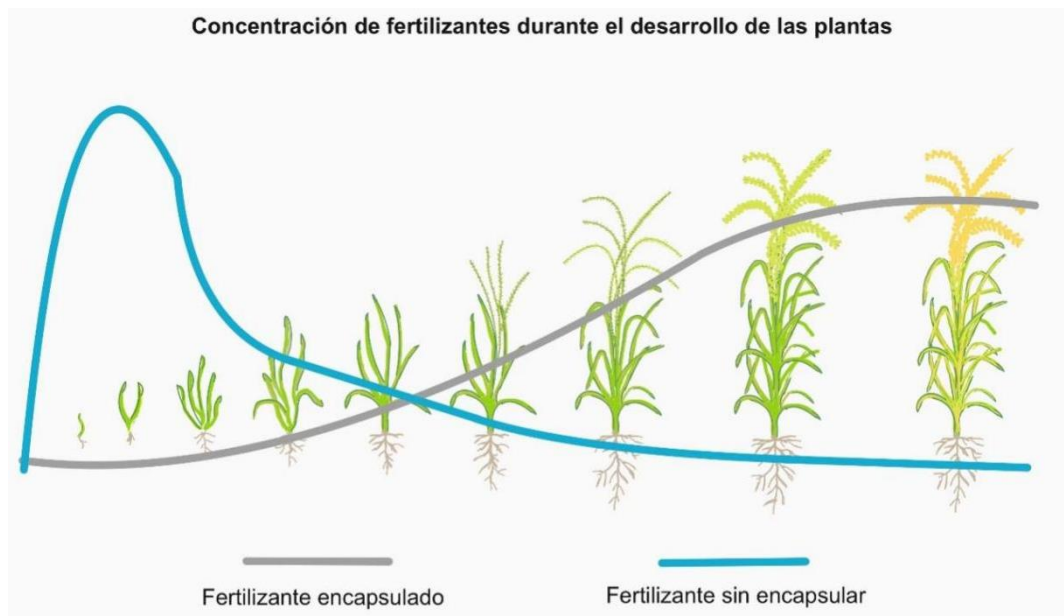


Figura 11 Uso eficiente de fertilizantes (Imagen modificada de Haifa Negec Technologies LTD 2021).

2.2.6 Características de sistemas de liberación controlada

Los sistemas de liberación controlada se refieren a la encapsulación o recubrimiento de una sustancia de interés para ser liberada escalonadamente en el tiempo, la velocidad de liberación es limitada para prolongar los efectos de la sustancia en el sitio de uso [40]. Este tipo de sistemas son comercialmente disponibles principalmente en la industria farmacéutica [42]. Actualmente se ha dirigido el mismo enfoque a la industria agrícola para alcanzar las concentraciones suficientes de nutrientes durante el ciclo de vida de las plantas (Figura 12) [41].

La encapsulación de fertilizantes presenta ventajas para la correcta nutrición de los cultivos [41][38]:

- Los sistemas proveen a las plantas con la concentración necesaria de nutrientes requeridos para el óptimo crecimiento de las plantas, permitiendo aumentar la cantidad de productos cosechados y su calidad.
- Este tipo de sistemas permite la correcta difusión de nutrientes en el medio donde se encuentran las raíces, asegurando disponibilidad suficiente de nutrientes y reduciendo la cantidad de fertilizante a utilizar.
- Los sistemas de liberación controlada se aplican una sola vez durante la temporada y se permite cubrir las necesidades nutricionales del cultivo, ahorrando costos de aplicación y los costes asociados a los fertilizantes convencionales.
- Los sistemas se aplican por única ocasión directamente al suelo, sin precisar de complejos sistemas de riego o equipos especiales de inyección hidráulica.
- Al utilizar cantidades de fertilizante menores se minimiza la pérdida por lixiviación, volatilización o fijación previniendo daños al medio ambiente.
- Los fertilizantes encapsulados tienen baja probabilidad de causar daño a semillas o generar problemas de fertilidad.

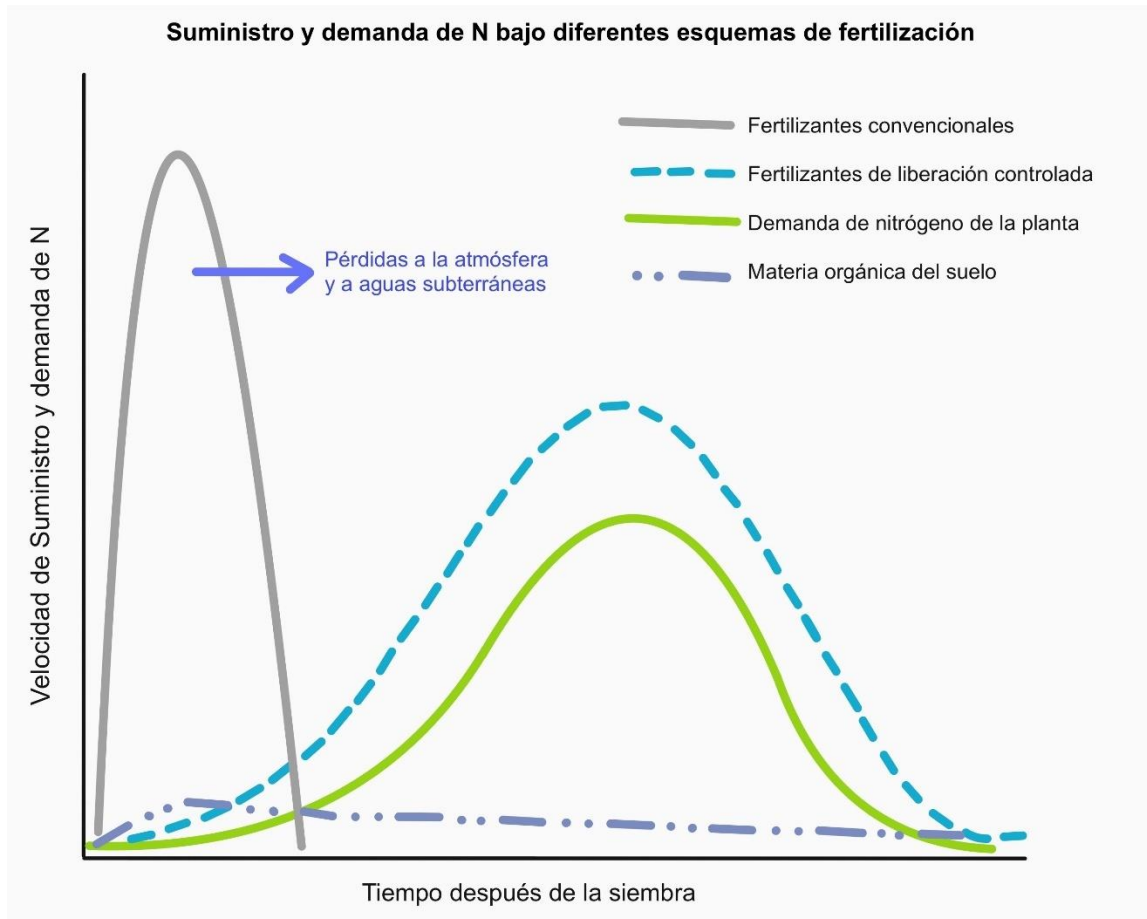


Figura 12 Liberación de fertilizante convencional vs liberación controlada (Imagen modificada de Chalk et al. 2015)[43].

2.2.7 La microencapsulación como tecnología

La microencapsulación consiste en la generación de partículas pequeñas, con un núcleo que contenga el material de interés en una matriz homogénea o heterogénea, uniforme o no uniforme en espesor. Provee una barrera física para optimizar las propiedades del material y la retención está gobernada por: la funcionalidad química, solubilidad, volatilidad y polaridad de la matriz. Estas técnicas tienen ventajas inminentes comparado con el uso de fertilizantes sin recubrir [44]. Lograr el diseño de emulsiones es fundamental para formulado con éxito una variedad de microcápsulas a partir de materiales de distinta naturaleza (Figura 13). Comercialmente existen sustancias de diversa naturaleza como vitaminas, minerales, colorantes, probióticos, saborizantes, nutraceuticos, antioxidantes, aromas, aceites, enzimas, bacterias, drogas y fertilizantes como sistemas microencapsulados [45] [46] [47].

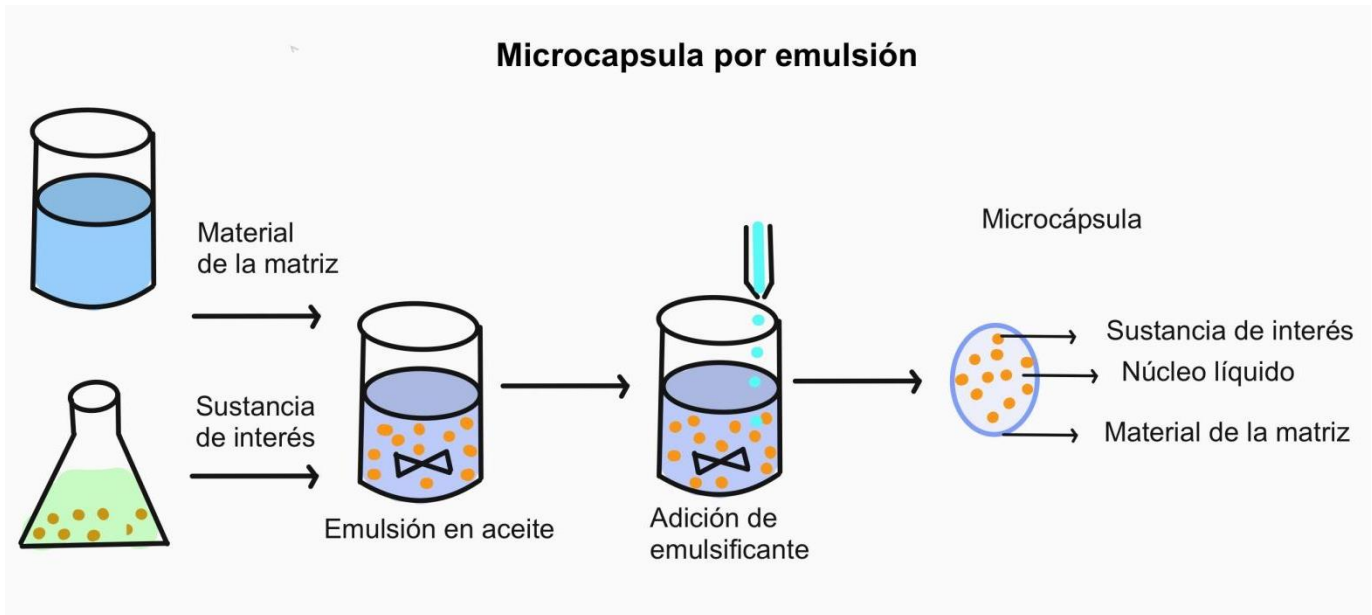


Figura 13 Emulsiones en el proceso de microencapsulación (imagen modificada de Chopde et al 2013) [48].

2. 2. 8 Técnicas para la formación de microcápsulas

En las últimas dos décadas se han generado diversos métodos para llevar a cabo el proceso para la generación de microcápsulas, el método debe presentar alta interdependencia con los materiales a utilizar para obtener propiedades funcionales en conjunto, las técnicas por spray presentan diversas ventajas [47]: Las técnicas de spray-chilling y spray drying son similares, ya que, forman partículas sólidas por medio de la atomización. La principal diferencia radica en la temperatura de la zona donde se forman las partículas, en la técnica de enfriamiento las partículas sólidas se forman a bajas temperaturas, mientras que en la técnica de secado las partículas se forman durante la evaporación de un solvente. A continuación, se presentan las características de dichas técnicas (Tabla 3).

Tabla 3. Principales diferencias entre las técnicas de Spray Chilling y Spray drying [49]

Característica	Spray drying	Spray Chilling
Flujo de energía	Se induce la evaporación el medio	Se induce la solidificación del medio
Equipo	Alimentación sin calor	Alimentación caliente
Flujo de la cámara	Aire caliente	Aire frío
Tamaño de partícula	5-150 μm	20-200 μm
Morfología de partícula	Partículas geométricas con superficie irregular y porosa	Densas, esféricas y de superficie lisa
Etapas principales	Dispersión de agente activo, atomización y deshidratación	Dispersión de agente activo, mezcla fundida, atomización y enfriamiento
Contenido de sólidos	5-50 %	10-20 %

2. 2. 9 Estructura de las microcápsulas

Las microcápsulas se encuentran en un intervalo de tamaño de entre 1 a 1000 μm y constan de dos partes el núcleo y la matriz [47]. El núcleo contiene la sustancia activa de interés, mientras que la matriz se protege de manera permanente o temporal. La morfología que adquieren las microcápsulas es dependiente de los materiales a utilizar y la técnica por la cual se generan las microcápsulas. Las microcápsulas pueden tener formas regulares o irregulares y se clasifican en cuatro: Mononuclear, polinuclear, matriz y capas (Figura 14) [50].

- a) Mononuclear: contiene la matriz alrededor de un núcleo.
- b) Polinuclear: contienen múltiples núcleos o incluso contenido incrustado a la matriz por la parte externa

de la microcápsula.

- c) **Matriz:** permiten una distribución homogénea de la matriz junto con la sustancia activa.
- d) **Capas:** permiten múltiples capas externas, por tanto, pueden ser mononucleares y polinucleares con varias capas o incluso forman clústeres de microcápsulas.

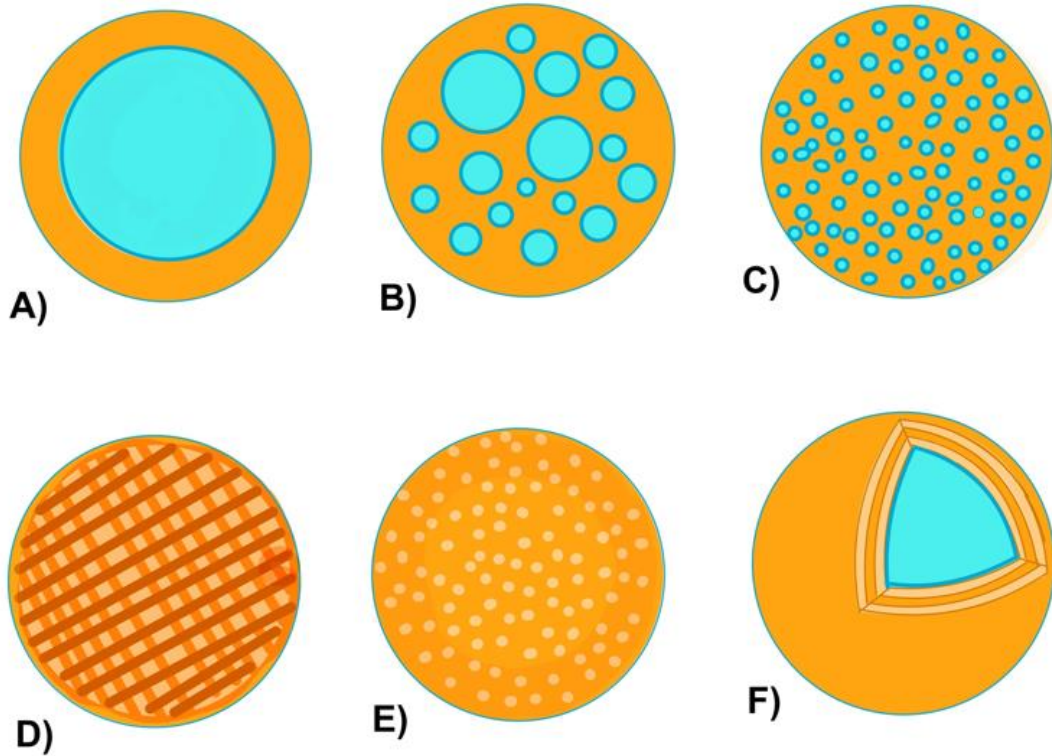


Figura 14 Ilustración esquemática de las microcápsulas: (A) núcleo-coraza matriz monocapa, (B) polinuclear o múltiples núcleos, (C) dispersión en matriz, (D) matriz insoluble, (E) matriz soluble, (F) matriz de múltiples capas.

2. 2. 10 Estímulos para la liberación de activos encapsulados

Para que una microcápsula pueda liberar su contenido de manera paulatina se requiere ajustar 3 factores: el tamaño del gránulo, el grosor del recubrimiento y la uniformidad. Se ha reportado que el radio y el espesor del recubrimiento son proporcionales a la fase de retraso e inversamente proporcional a la velocidad de liberación [51]. Adicionalmente, existen sistemas inteligentes donde la liberación del material ocurre por uno o varios estímulos. Los estímulos se clasifican en físicos, químicos o biológicos. Algunos ejemplos son sistemas microencapsulados diseñados para ser sensibles a estímulos térmicos, eléctricos, magnéticos, mecánicos, radiación UV, ultrasonido, interacción con enzimas biológicas y

cambios en pH por alcalinidad o acidificación del medio [52].

De todos estos se destacan 2 estímulos que afectan la liberación controlada y vale la pena detallar a mayor profundidad:

El pH del suelo es un parámetro importante para el crecimiento de las plantas, ya que, de este depende la disponibilidad de los nutrientes. La mayoría de los nutrientes se encuentran disponibles entre pH 5.5 y 7.0 [53]. Por consiguiente, la acidez o alcalinidad del medio tiene un efecto sobre las especies químicas de la superficie de la microcápsula, así como un efecto en el coeficiente de difusión de iones [54]. En diversas investigaciones se ha reportado que bajo condiciones ácidas entre (pH 2-5) existe una gran concentración de iones H^+ , esta concentración de iones de hidrógeno causa la protonación de aniones de carboxilato (COO^-) y se previenen las interacciones electrostáticas de los aniones en la matriz de los microencapsulados, disminuyendo su capacidad de absorción de agua y por tanto, se evita el hinchamiento. De manera similar bajo condiciones alcalinas ($> pH 9$) la presencia de iones de Na^+ en una solución previenen las interacciones electrostáticas impidiendo de igual manera la difusión de agua y por tanto la liberación. Bajo condiciones más neutras entre pH 5-9 se espera que el hinchamiento de matrices sea máximo, ya que, las interacciones electrostáticas no se ven restringidas [55].

La temperatura también es un estímulo importante para la liberación, bajo condiciones reales la temperatura del suelo varía durante el día, de manera general los aumentos de temperatura podrían afectar a los microencapsulados, ya que, aumentan la solubilidad de los nutrientes dentro de una matriz polimérica, afecta la velocidad de difusión y los aumentos de temperatura provocan un aumento en el tamaño del poro, ya que, la partícula se podrá hinchar y permitirá velocidades de liberación mucho mayores. Se ha reportado que la difusión ocurre más rápidamente a $37^\circ C$ comparado con $25^\circ C$ [56].

2.2.11 Materiales para la generación de matrices de encapsulamiento

Para la fabricación de sistemas de liberación controlada de fertilizantes se utilizan una variedad de materiales; de origen orgánico, inorgánico e incluso biomimética de materiales (Tabla 4) [41]. Actualmente los más utilizados son polímeros derivados del petróleo ej.: (Poliétileno, poliestireno, poliacrilamida, polisulfona, poli acetato, poliuretano y (poliacrilato ácido-co-acrilamida) los cuales son eficientes para generar microcápsulas y sistemas de liberación controlada [57]. Sin embargo, tienen la desventaja de tener nula o baja degradación en el suelo, lo que conlleva a otras problemáticas ambientales

por acumulación de micro plásticos [58] [57]. Los conocimientos actuales sobre el impacto ecológico de los micro plásticos en los suelos y su efecto sobre la seguridad alimentaria es limitado [105]. Por tanto, se deben buscar alternativas a la fabricación de sistemas encapsulados con materiales de bajo costo y amigables con el medio ambiente [40].

Tabla 4. Principales diferencias entre las técnicas de Spray Chilling y Spray drying [49].

Nombre comercial	Material de matriz	Empresa / proveedor
SCU	Sulfuro+Cera+Tierra diatomea+Alquitrán	Tennessee Valley Authority
Meister	Poliolefina + Polvo inorgánico	Chisso Col. Kitakysya Japan
LP30-80, LPS40-200, LPSS-100	Poliolefina	Chisso-Asahi Fertilizer Corporation
CRU	Material polimérico	Agrium Inc. Calgary
CU & CUS	Material polimérico	Chisso-Asahi Fertilizer
PCF	Tipo- Poliuretano	Haifa chemicals Co. Ltd
Urea recubierta con Zn	Óxido de zinc	Indo-Gulf

2. 2. 12 Biomateriales para encapsulación

La elección del material juega un papel importante en las propiedades de la microcápsula, para cumplir su función y mantener estabilidad en el tiempo. Los materiales de origen natural suelen presentar fragilidad mecánica y alta densidad que provoca defectos o fallas en su uso. En los últimos años se ha estudiado la manera de encapsular fertilizantes utilizando como componente principal de la matriz: lignina, carboximetilcelulosa, almidón modificado y quitosano [59].

2. 2. 12. 1 Almidón

El almidón es un polisacárido de origen natural y es ampliamente utilizado, accesible y de bajo costo; se obtiene de diversas fuentes naturales provenientes de cereales, granos y de tubérculos. Su estructura esta

compuesta por polisacáridos: amilopectina en un porcentaje entre 70-80% y amilosa 20-30% (Figura 15) [60]. La amilosa y la amilopectina forman un sistema semi cristalino, donde se atribuye la parte cristalina a las cadenas de amilopectina con peso molecular aproximado de 300,000 amu, sus ramificaciones le permiten formar agrupaciones compactas, mientras que las cadenas de amilosa se encuentran libres y no son capaces de agruparse, por tanto, forman regiones amorfas y su peso molecular oscila entre 10,000-50,000 amu [61][62]. Las estructuras granulares semi cristalinas básicas del almidón son dependientes de la especie vegetal de origen (Tabla 5).

La estructura física y las propiedades del almidón pueden ser modificadas por medio de tratamientos químicos, físicos, mecánicos o enzimáticos [64]. El uso a nivel industrial está determinado principalmente por el grado de gelatinización y de retrogradación, así como las propiedades funcionales de solubilidad, hinchamiento y absorción de agua [63] [60].

La gelatinización, modifica el ordenamiento molecular de los gránulos de manera gradual o irreversible, las fuerzas intermoleculares se rompen en presencia de agua y temperatura. La ruptura intermolecular deja grupos hidroxilos expuestos, lo que permite la interacción con moléculas de agua y la absorción de agua, mejorando propiedades estructurales [65]. Cabe señalar que a pesar de las mejoras funcionales y estructurales del almidón no se puede utilizar como matriz encapsulante sin la presencia de componentes activos de superficie, los cuales son necesarios para lograr la efectividad funcional como material de encapsulación.

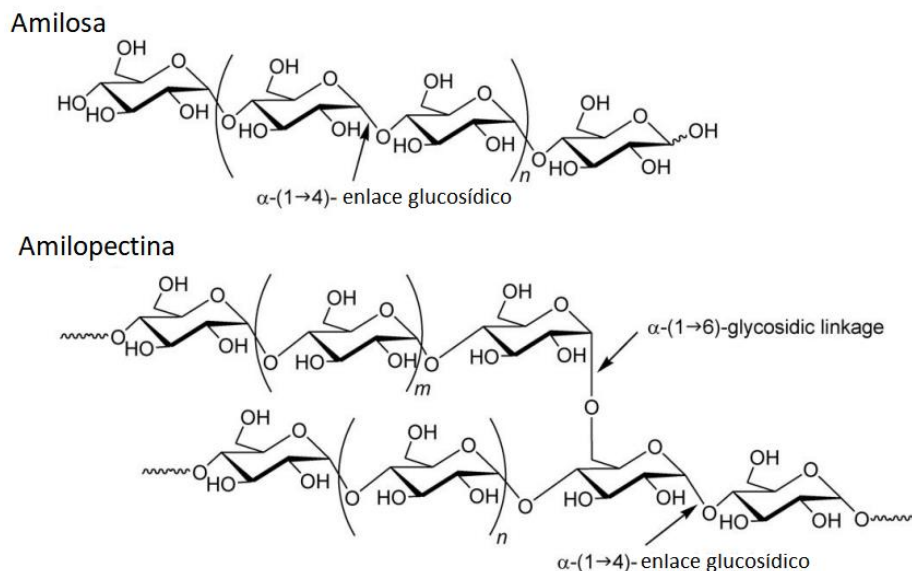


Figura 15 Estructura de la amilosa y la amilopectina (Imagen modificada [66]).

Tabla 5. Contenido de amilosa y amilopectina de almidones según su origen [67].

Origen del almidón	Tamaño de gránulo (Micrómetro)	Amilosa (%)	Amilopectina (%)
Papa Oca	6-100	30	70
Yuca	18	17	83
Amaranto	3-30	31.2	68.8
Trigo	25	25	75
Arroz	7	19	81

2. 2. 13 Ceras naturales

Las ceras naturales se consideran materiales convenientes para la encapsulación por su hidrofobicidad, ductilidad, sólidas a temperatura ambiente, estables, pueden contener material sólido o líquido y proveen una retención del material a largo plazo. Presentan propiedades reológicas y microestructurales funcionales a nivel industrial [68]. A diferencia de los aceites y grasas las ceras presentan una microestructura característica que permite la encapsulación y liberación controlada de compuestos solubles en agua (Figura 16).

2. 2. 13. 1 Cera de candelilla

La cera de candelilla se extrae de la planta mexicana *E. antisiphilitica* Zuccarini, la cual crece en zonas desérticas y donde el clima seco promueve la producción de cera. La función de la cera en las plantas es limitar la pérdida de agua y protegerla de factores abióticos como: temperaturas extremas, radiación, salinidad y sequía [44][69]. La composición de la cera puede variar de acuerdo con la temporada, edad de la planta, región y el clima. De manera general se compone por 42% hidrocarburos, 39% de resina y fitoesterol, 6% lactonas (éster cíclico), 8% resina libre y ácidos, 5% resina libre y alcoholes [70]. Para su extracción los tallos alargados se hierven en una solución al 0.2% de ácido sulfúrico durante dos ciclos y finalmente se calienta para eliminar impurezas y exceso de humedad. Físicamente se caracteriza por tener color desde café claro hasta amarillo, es dura, quebradiza (fácil de pulverizar), es insoluble en agua, pero

altamente soluble en solventes orgánicos y su punto de fusión se encuentra entre los 68.5°C a 72.5°C. La cera de candelilla está reconocida como un producto seguro por la FDA entra en la categoría de GRAS por sus siglas en inglés (Generally Recognized as Safe). Es usada como aditivo en industria de los alimentos por ser comestible, ha sustituido la cera de Carnauba y cera de abeja, sirve como recubrimiento de frutas por sus propiedades de permeabilidad a vapor de agua, se usa como un agente aglutinante en el chicle, también se usa en industria cosmética como componente de bálsamos y barras de loción [70].

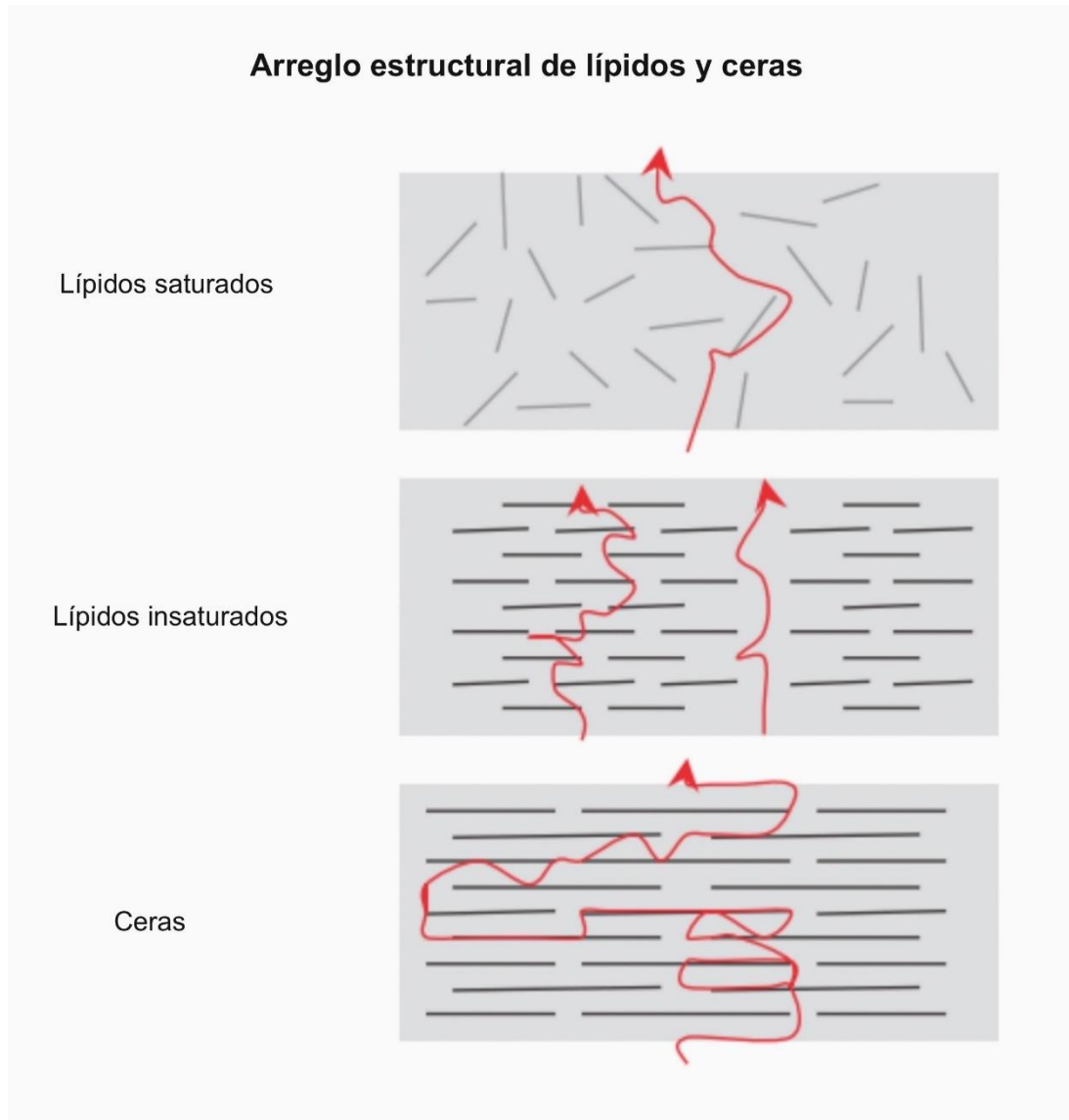


Figura 16 Diferencia estructural de aceites, grasas y ceras [68].

2. 2. 13. 2 Goma de Mezquite.

El árbol de mezquite pertenece al género (*Prosopis* spp.) Se conocen 44 especies, de las cuales 8 especies se encuentran en México, la mayor densidad se concentra en la zona norte del país [71]. El mezquite representa una fuente importante de materia prima para consumo humano, ya que, se utiliza para hacer muebles, leña, carbón y produce productos de alto valor como la miel o la goma de mezquite. La miel y la goma se obtienen directamente de la corteza del árbol. La goma no ha sido completamente estudiada, pero se han encontrado características estructurales por la técnica de dispersión de luz estática y dinámica (Tabla 6) [72].

Tabla 6. Características estructurales de la goma de mezquite por la técnica de dispersión de luz estática y dinámica.

Características	Valores
Peso molecular	368,000 g/mol
Radio de giro (RG)	50.47 nm
Radio hidrodinámico (RH)	9.48 nm
Relación RG/RH	5.32

La goma de mezquite se encuentra constituida por polisacáridos del Tipo II los cuales se conforman por proteoglicanos unidos covalentemente a una fracción proteica que oscila entre 2 y 4.8%. El polisacárido que lo compone se ha descrito como una cadena central de unidades de D-galactosa, enlazadas por uniones $\beta(1-3)$ y $\beta(1-6)$ a esta se le unen cadenas laterales de algunos residuos de D-galactosa. Esta estructura muy ramificada genera una conformación molecular compacta, sin embargo, la estructura terciaria no ha sido completamente elucidada y normalmente se compara con el modelo de cuerda enrollada filamentosa propuesto para la goma arábica (Figura 17) [73].

La goma de mezquite tiene propiedades funcionales deseables para un sinnúmero de aplicaciones a nivel industrial y comercial, ya que, comparte características fisicoquímicas similares a la goma arábica y se encuentra autorizada por la secretaría de salud para su uso en alimentos procesados. La goma se caracteriza por tener: alta solubilidad en agua, baja viscosidad, pH entre 6 a 9, compatibilidad, no es reactiva al estar en combinación con diversos tipos de sustancias, capacidad emulsificante y su capacidad para encapsular por las técnicas de secado por aspersión [71].

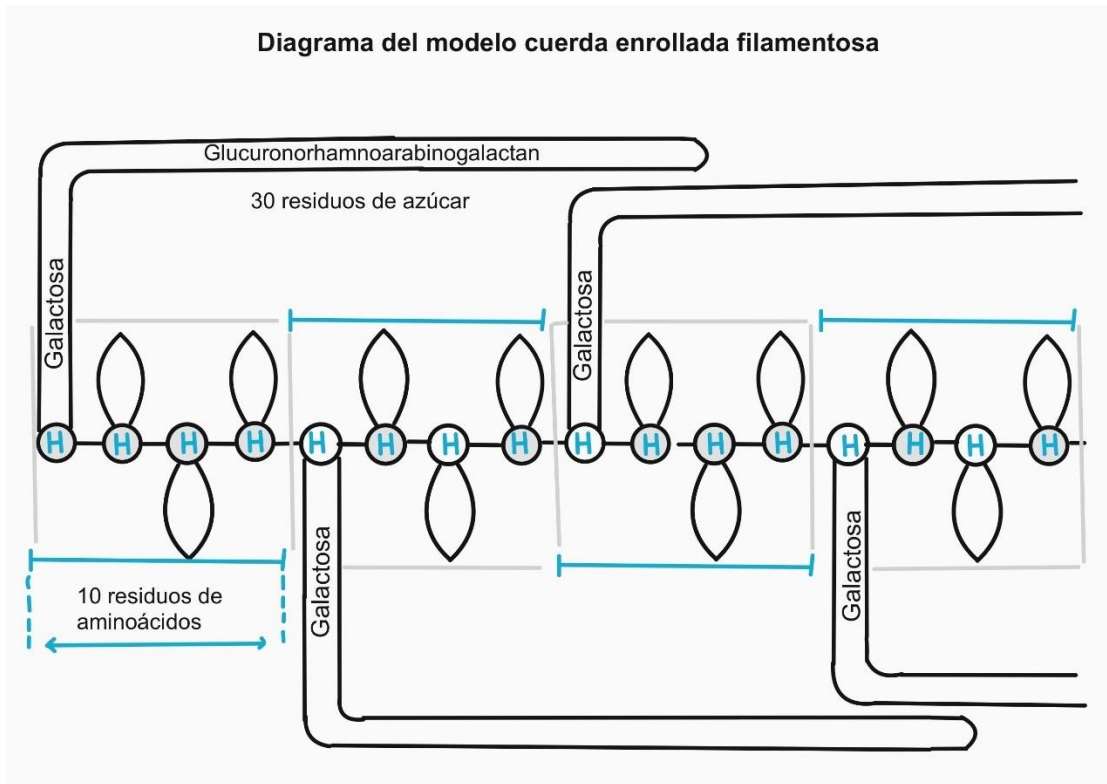


Figura 17 . Macro-ovillo polidisperso de acuerdo al modelo de cuerda enrollada filamentosa [73].

2. 2. 14 Sistemas encapsulados a base de biopolímeros

Existen registros de diversas investigaciones que generaron sistemas de liberación controlada de fertilizantes con resultados altamente favorables al usar materiales naturales, biopolímeros, material biodegradable y ceras naturales como recubrimiento [63]. Qiao y colaboradores obtuvieron un sistema de liberación retardada de fertilizantes mediante el encapsulamiento de gránulos de urea con almidón modificado y Etilcelulosa (EC). Primeramente, para generar dicho sistema se seleccionó un tamaño de gránulo entre 2-3 mm por medio de tamizaje, una vez teniendo uniformidad en el tamaño de gránulo se prepara la matriz que cubrirá dichos gránulos. La matriz está compuesta por dos capas, una a base de EC como componente primario de recubrimiento y como capa externa almidón superabsorbente. Dicho proceso se logró asperjando bajo presión una mezcla de etanol, EC y ácido esteárico sobre los gránulos de urea, una vez obtenida la primera capa de recubrimiento de manera uniforme se procedió con el segundo recubrimiento utilizando una mezcla del almidón hidratado, las partículas se secaron en un horno a baja temperatura 45°C para obtener los sistemas de liberación controlada de urea. En dicho trabajo el almidón

utilizado se obtuvo de tres fuentes: maíz, papa y cassava. El almidón recibió un tratamiento con nitrato de amonio cérico y fue mezclado con alto esfuerzo de cizalla para obtener matrices uniformes (Figura 18). Se analizó el comportamiento de liberación en un ambiente controlado durante 24 h, donde la urea sin recubrir tuvo una liberación de 95% y de los recubrimientos con almidón el almidón de papa tuvo una liberación del 40% en 24h, concluyendo que la matriz a base de almidón es capaz de retener agua y liberar de forma retardada el contenido de urea [74].

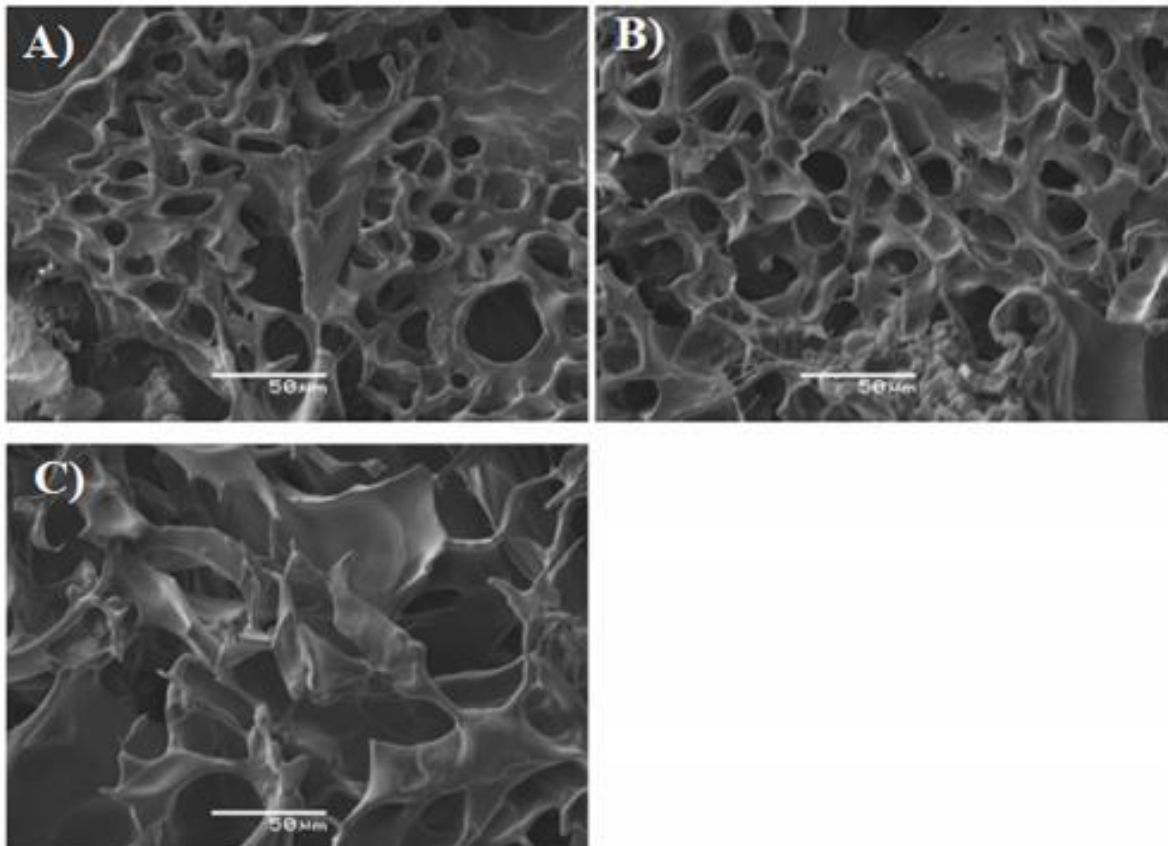


Figura 18 Imágenes tomadas en SEM para almidón proveniente de A) maíz, B) papa y C) Cassava. Imagen tomada de artículo [74].

El grupo de trabajo de CIQA utilizó cera de candelilla para la microencapsulación de MAP por un proceso de spray chilling [75]. El proceso de Spray chilling permitió obtener microcápsulas esféricas con una superficie uniforme (Figura 19). Esta investigación reveló que existe una buena interacción entre los cristales de fertilizante MAP embebidos en la matriz encapsulante de cera de candelilla, sugiriendo que la cera es capaz de nuclear alrededor de la superficie del cristal de fertilizante, lo que hace que el sistema de liberación sea más estable, también se crean regiones amorfas el sistema que crean vías polares para la

correcta absorción de agua y la liberación del fertilizante [75].

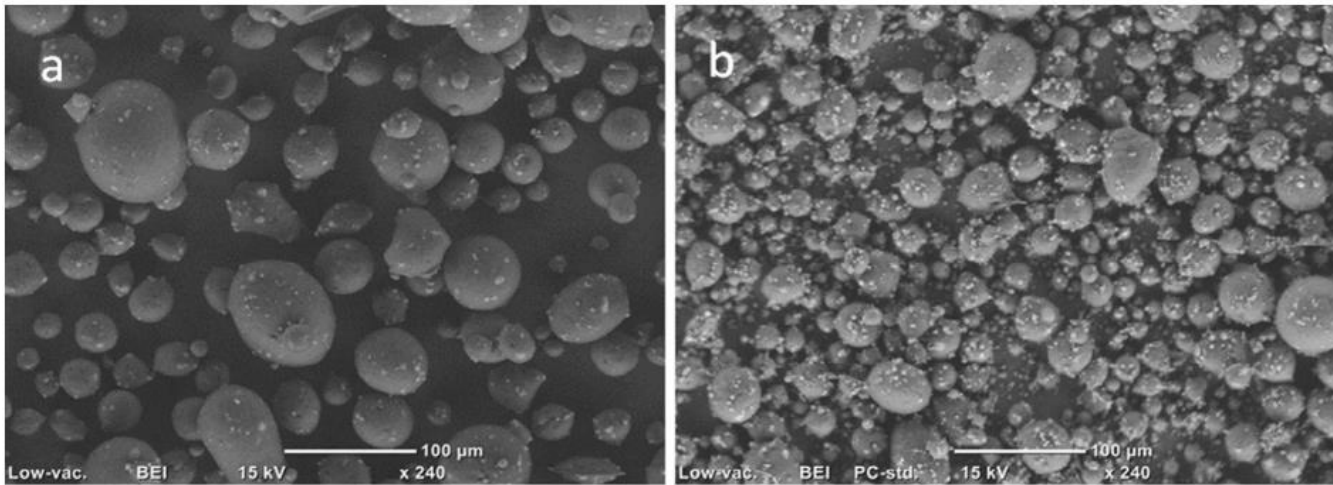


Figura 19 Encapsulación de fertilizante MAP con cera de candelilla [75].

2.1.1 Perfil de liberación de fertilizante

El perfil de liberación es un parámetro de gran importancia al diseñar microencapsulados con cualquier fin, ya que determina la concentración de la sustancia de interés en un periodo de tiempo específico. En el caso de los fertilizantes es necesario alcanzar las concentraciones óptimas para que los nutrientes puedan ser asimilados por las plantas y al mismo tiempo evitar fallas que llevan a la liberación total del contenido. Al hacer más eficiente el uso de los fertilizantes se reduce la contaminación en el medio ambiente y la contaminación de aguas por procesos de eutrofización. En el campo hay varios factores que influyen sobre la degradación y la hidrólisis química de los encapsulados como son el tamaño de partícula, la temperatura del suelo y la actividad microbiana. Sin embargo, para evitar un sinnúmero de variables la liberación controlada *in vitro* ofrece una idea de la potencialidad del sistema.

Un ejemplo es el perfil de liberación de microcápsulas a base de fosfato de potasio en una matriz de quitosano generadas por la técnica de secado por atomización. El sistema para estudiar el perfil de liberación consistió en colocar 140 mg de los encapsulados en un tubo de diálisis con 40 mL de agua a 40°C. La concentración de fosfato en el medio se midió mediante la técnica de conductimetría en un periodo aproximado de 20 horas, dicho perfil permite aproximar la concentración liberada de fosfato (Figura 20) [76].

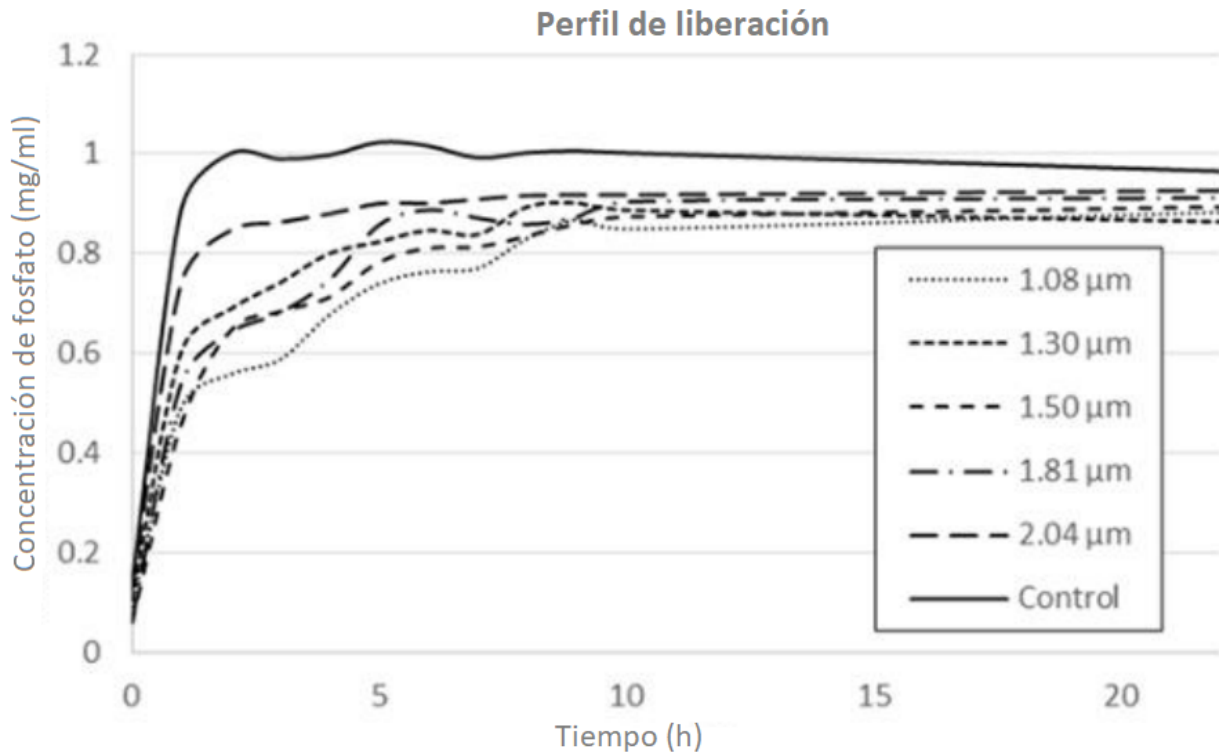


Figura 20 Medición por conductimetría para aproximar perfil de liberación de fosfato proveniente de microcápsulas de quitosano [76].

2.1.2 Mecanismo de liberación de fertilizantes encapsulados

La liberación de las partículas microencapsuladas se refiere a la manera en la cual las moléculas se transportan desde el interior de una microcápsula hasta el medio exterior. Los perfiles de liberación se ejecutan bajo condiciones controladas donde se identifican tres etapas: La primera etapa, está determinada por el fertilizante adherido a la superficie de la microcápsula y por los poros o canales superficiales, durante esta etapa la liberación es rápida. La segunda etapa, es un proceso lento que depende de la tasa de difusión entre el agua que entra a la partícula y el fertilizante que se disuelve, esta etapa depende de las propiedades fisicoquímicas de los componentes del sistema. En la tercera etapa ocurre una liberación rápida, ya que, existe una erosión o ruptura de la partícula ocasionando la liberación del resto del contenido. También existe la posibilidad de liberar todo el contenido, este mecanismo de falla sucede a causa de factores externos y más frecuentemente en membranas no elásticas (Sulfuro o recubrimientos inorgánicos) [77].

La complejidad de los sistemas no siempre permite saber con exactitud cuáles son las etapas del proceso, en ocasiones no resulta obvio conocer cuál es la etapa que determina la velocidad de liberación. Por esta razón se destacan los procesos más comunes: A) difusión por medio de poros llenos de agua, B) difusión a través del polímero, C) bombeo por presión osmótica y D) erosión (Figura 21) [30].

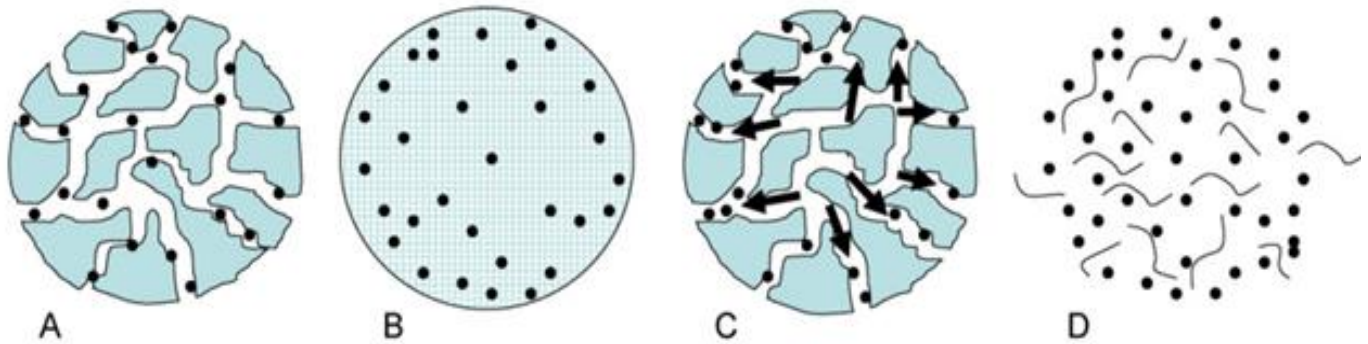


Figura 21 Mecanismos de liberación a) difusión por medio de poros llenos de agua, b) difusión a través del polímero, c) bombeo por presión osmótica y d) erosión [78].

2.1.3 Cinética de liberación y modelos matemáticos

Existen diversos modelos cinéticos que describen la liberación de una sustancia a partir de su estructura inicial. Los cambios cualitativos y cuantitativos alteran la liberación y el rendimiento de la sustancia de interés en el sitio de acción, se han buscado herramientas que faciliten el diseño y desarrollo de productos encapsulados para predecir el comportamiento y reducir estudios. Los modelos se basan en funciones matemáticas que aproximan el comportamiento del fertilizante del interior al exterior de la matriz. Estos modelos incluyen el modelo de Korsmeyer Peppas, el modelo de orden cero y el modelo de primer orden [79].

- Modelo de orden cero: Es ampliamente utilizado para sistemas que no se degradan, por tanto, la superficie de la partícula se mantiene constante en el tiempo y la cinética de liberación suele ser lenta. Este modelo se puede aplicar a diversos tipos de sistemas de liberación, especialmente matrices de baja solubilidad, encapsulados y sistemas osmóticos [80]. La siguiente ecuación describe el modelo:

$$[Q] = -kt + [Q]_0 \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde Q_t es la cantidad de fertilizante disuelto en el tiempo, Q_0 es la cantidad inicial de fertilizante en la solución y k_0 corresponde a la constante de liberación de orden cero [80].

- Modelo de primer orden: Es ampliamente utilizado para describir la absorción y liberación de sistemas a bases de matrices porosas, a medida que el fertilizante disminuye en la matriz la concentración del medio aumenta, el proceso está condicionado por la saturación del soluto y los elementos que siguen esta liberación se expresan mediante la siguiente ecuación [80].

$$\log[Q - Q_t] = kt + \log[Q] \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde Q_t es la cantidad de fertilizante remanente durante el tiempo, Q_0 es la cantidad inicial de fertilizante en la solución y k_1 es la constante de liberación de primer orden.

- Modelo de Korsmeyer Peppas: permite explicar el mecanismo de liberación donde se presenta erosión o disolución de la matriz, ha sido ampliamente utilizado para describir sistemas poliméricos y la liberación se puede expresar mediante la siguiente ecuación.

$$F = (Mt / M) = K_m t^n \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde Mt/M corresponde a la fracción de fertilizante liberado en el tiempo t , k_r es la constante característica de las interacciones polímero y la sustancia de interés y n corresponde al exponente de difusión característica de la liberación. Un valor de $0 < n < 0.5$ indica un régimen de difusión con una liberación obstaculizada. Un valor de $n = 0.5$ indica que el mecanismo de liberación sigue la ley de Fick, es decir, es una liberación de primer orden, donde la difusión es el mecanismo principal. Valores de $0.5 < n < 1.0$ corresponden a una difusión anómala que no sigue la ley de Fick o corresponde a una cinética de orden cero, entre estos se encuentra la relajación del polímero o la degradación. Valores $n > 1.0$ corresponden a transporte por hinchamiento del polímero o severas modificaciones que ocurren en la matriz [80].

2.5 Referencias de antecedentes.

- [1] Martínez-Periñán, E., Gutiérrez-Sánchez, C., García-Mendiola, T., & Lorenzo, E. (2020). Electrochemiluminescence Biosensors Using Screen-Printed Electrodes. *Biosensors*, 10(9), 118.
- [2] Collings, A. F., & Caruso, F. (1997). Biosensors: recent advances. *Reports on Progress in Physics*, 60(11), 1397-1445.
- [3] <https://www.mdpi.com/1424-8220/19/22/4916/htm>
- [4] Chen, X., Su, B., Song, X., Chen, Q., Chen, X., & Wang, X. (2011). Recent advances in electrochemiluminescent enzyme biosensors. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 30(5), 665-676.
- [5] Guilbault, G. G., & Nanjo, M. (1975). A phosphate-selective electrode based on immobilized alkaline phosphatase and glucose oxidase. *Analytica Chimica Acta*, 78(1), 69-80.
- [6] Kubo, I. (2002): Potentiometric phosphate-sensing system utilizing phosphate-binding protein. *Anal. Bioanal. Chem.* 372, 273-275.
- [7] Ali, M; Shuja, MN; Zahoor, M; Qadri, I (2010). Phytic acid: how far have we come. *African Journal of Biotechnology* 9 (11): 1551-1554.
- [8] N.T. Davies. A. A. Flett. (1978) The similarity between alkaline phosphatase (EC 3.1.3.1) and phytase (EC 3.1.3.8) activities in rat intestine and their importance in phytate-induced zinc deficiency. *Br.J. Nutr*, 39, 307.
- [9] J. M. Ezquerro-Brauer. J. L. Arias-Moscoso. (2015). Fosfatasa alcalina de camarón: Estructura, características y funciones. Departamento de investigación y posgrado en Alimentos/ Universidad de Sonora. Vol 17. Núm. 1.
- [10] G. M. Mercado, N. L. Duarte-Muñoz, E. A. Parrilla, L. A. Rosa y A. W. Medrano. Fosfatasa alcalina (E.C.3.1.3.1): bioquímica y aplicaciones en las ciencias biomédicas, ecológicas y alimentarias. 2012; Vol.VI, No. 2.
- [11] Dai, H., Wu, X., Wang, Y., Zhou, W., & Chen, G. (2008). An electrochemiluminescent biosensor for vitamin C based on inhibition of luminol electrochemiluminescence on graphite/poly(methylmethacrylate) composite electrode. *Electrochimica Acta*, 53(16), 5113-5117.
- [12] Chen, X., Su, B., Song, X., Chen, Q., Chen, X., & Wang, X. (2011). Recent advances in

electrochemiluminescent enzyme biosensors. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 30(5), 665-676.

- [13] Ásgeirsson, B., Markússon, S., Hlynsdóttir, S. S., Helland, R., & Hjörleifsson, J. G. (2020). X-ray crystal structure of *Vibrio* alkaline phosphatase with the non-competitive inhibitor cyclohexylamine. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 24, 100830.
- [14] Zhang, J.-J., Cao, J.-T., Shi, G.-F., Huang, K.-J., Liu, Y.-M., & Ren, S.-W. (2015). A luminol electrochemiluminescence aptasensor based on glucose oxidase modified gold nanoparticles for measurement of platelet-derived growth factor BB. *Talanta*, 132, 65-71.
- [15] Andrzej Kapturkiewicz. (2017). Electrochemical generation of excited intramolecular charge-transfer states, *chemElectrochem*/volume 4, Issue 7 / p. 1604-1638.
- [16] L.Bouffier, N. Sojic, " Introduction and overview of electrogenerated chemiluminescence, in analytical electrogenerated chemiluminescence: From fundamentals to bioassays, pp 1-28, (2019).
- [17] Richter, M. M. Electrochemiluminescence (ECL). *Chemical reviews*, 104(6), 3003-3036 (2004).
- [18] Murthy, K.V.R. & Virk, Hardev. (2013). Luminescence Phenomena: An Introduction. *Defect and Diffusion Forum*. 347. 1-34.
- [19] Ju, H, Lai, G & Yan, F, "Electrochemiluminescent immunosensing" *Immunosensing for detection of protein biomarkers*, 171-206 (2017).
- [20] Khan, P., Idrees, D., Moxley, M. A., Corbett, J. A., Ahmad, F., Hassan, M. I. (2014). Luminol-Based Chemiluminescent Signals: Clinical and Non-clinical Application and Future Uses. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 173(2), 333-355.
- [21] Salgado, G., Navarrete, J., Bustos, C., Sánchez, C., & Ugarte, R. (2006). Quimioluminiscencia electrogenerada del luminol usando electrodos de bajo costo. *Química Nova*, 29(2), 381-384.
- [22] J. C. Cedrón. (2011). El luminol, molécula destacada, *Rev de química PUCP*, vol 25, n1-2.
- [23] The Chemiluminescence of Luminol - Home. (s. f.). <http://www.chm.bris.ac.uk/webprojects2002/fleming/mechanism.htm>
- [24] González-Velasco, Jaime. (2014). *Electroquímica Iónica: Volumen II: Transporte iónico en Diluciones Electrolíticas*. capítulo V. Quimioluminiscencia electrogenerada. Editorial círculo rojo.
- [25] Uliana, C. V., & Yamanaka, H. (2020). Simple, fast, and ultrasensitive method for textile dye determinati

ón based on luminol electrochemiluminescence (ECL) inhibition. Journal of Solid State.

- [26] Electrochemistry. Springer Nature. Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications. (2022) Allen Bard, Larry Faulkner, Henry White Edición: 3rd ed.
- [27] Martínez Lara, C. (2018). Starch and candelilla wax hybrids for slow release of microencapsulated phosphates. [Tesis de maestría, Centro de Investigación en Química Aplicada].
- [28] Lutz, W., Sanderson, W., & Scherbov, S. (2001). The end of world population growth. Nature, 412(6846), 543-545.
- [29] Babar Azeem, KuZilati KuShaari, Zakaria B. Man, Abdul Basit, Trinh H. Thanh. Review on materials & methods to produce controlled release coated urea fertilizer. Journal of controlled release, 181, 11-21 (2014).
- [30] Morari, F., Vellidis, G., & Gay, P. (2011). Fertilizers. Encyclopedia of Environmental Health, 727-737.
- [31] UN Dept. of International Economic and Social Affairs. Long-range World Projections: Two Centuries of Population Growth—1950-2150. ST/ESA/SER.A/125. New York: United Nations, 1992.
- [32] World Fertilizer use manual, IFA, París, pp 632, 1992.
- [33] Bamiki, R.; Raji, O.; Ouabid, M.; Elghali, A.; Khadiri Yazami, O.; Bodinier, J.-L. Phosphate Rocks: A Review of Sedimentary and Igneous Occurrences in Morocco. Minerals 2021, 11, 1137.
- [34] Hernández, I.T., & Héctor Merino, Z. (1971). Composición química de rocas fosfóricas de México y su utilización como fuente de minerales en nutrición animal. Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias, 15-21.
- [35] B.W.Green. “Fertilizers in aquaculture” United states Department of Agriculture, Stuttgart, AR, USA Chapter 2, 2015.
- [36] Chien, S. H. Prochnow, L. I; Tu, S. Snyder, C, S. “Agronomic and environmental aspects of phosphate fertilizers varying in source and solubility: an update review. Nutrient Cycling in Agroecosystems, Dordrecht v.89, n.2, 2011.
- [37] Hertzberger AJ, Cusick RD, Margenot AJ. A review and meta-analysis of the agricultural potential of struvite as a phosphorus fertilizer. Soil Sci. Soc. Am. J. 2020;84:653-671.
- [38] Wu, Y. Chemical fertilizer use efficiency and its determinants in China’s farming sector. China Agric. Econ. Rev. 2011, 3, 117-130.
- [39] Aziz, M. Z., Yaseen, M., Naveed, M., Wang, X.(2020). Polymer-Paraburkholderia phytofirmans PsJN

Coated Diammonium Phosphate Enhanced Microbial Survival, Phosphorous Use Efficiency, and Production of Wheat. *Agronomy*, 10(9), 1344.

- [40] Wei, X., Chen, J., Gao, B., & Wang, A. (2020). Role of controlled and slow release fertilizers in fruit crop nutrition. *Fruit Crops*, 555-566.
- [41] Siafu Ibahati Sempeho, Hee Taik Kim, Egid Mubofu, and Askwar Hilonga. (2014). Meticulous overview of the controlled release fertilizers. *Adv. Chem.*
- [42] Patel, P., Mundrargi, R.C., Babu, V.R., Jain, D., Rangaswamy, V., Aminabhavi, T.M. Microencapsulation of doxycycline into poly(lactide-co-glycolide) by spray drying technique: effect of polymer molecular weight on process parameters. *J. Appl. Polym. Sci.* 108, 4038-4046 (2008).
- [43] Chalk, P. M., Craswell, E. T., Polidoro, J. C., & Chen, D. (2015). Fate and efficiency of ¹⁵N-labelled slow and controlled-release fertilizers. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 102(2), 167-178.
- [44] W. Barthlott, M. Mail, B. Bhushan, and K. Koch. (2017). Plant surfaces: Structures and functions for biomimetic innovations. *Nano-Micro Lett.* 9, 23.
- [45] Madene, A., J. Scher, and S. Desobry. (2006). Flavour encapsulation and controlled release - a review. *International Journal of Food Science and Technology* 4(1):1-21.
- [46] Drusch, S. (2007). Sugar beet pectin: A novel emulsifying wall component for microencapsulation of lipophilic food ingredients by spray-drying. *Food Hydrocolloids* 21(7): 1223-1228.
- [47] A. Poshardi, Aparna Kuna. (2010). "Microencapsulation technology: a review", Nutriplus, international Crops Research Institute for Semi-Arid Tropics, Hyderabad, *J. Res. ANGRAU* 38(1)86-102.
- [48] Chopde, S., Pawar, N., Kele, V., & Changade, S. (2014). Microencapsulation of probiotic bacteria of available techniques, focusing on biomaterials-a review. *Agricultural Reviews*, 35(4), 287.
- [49] Favaro-Trindade, C.S.; de Matos Junior, F.E.; Okuro, P.K.; Dias-Ferreira, J.; Cano, A.; Severino, P.; Zielińska, A.; Souto, E.B. (2021). Encapsulation of Active Pharmaceutical Ingredients in Lipid Micro/Nanoparticles for Oral Administration by Spray-Cooling. *Pharmaceutics*, 13, 1186.
- [50] Pavlović, Živko & Dedijer, Sandra & Stankovic Elesini, Urška & Urbas, Raša. (2014). Structure of microcapsules and its use in the industry, overview. Serbian Ministry of Science and Technological Development, Grant No.: 35027.

- [51] Shaviv, A.; Raban, S.; Zaidel, E. (2003). Modeling controlled nutrient release from polymer coated fertilizers: Diffusión release from single granules. *Environ. Sci. Technol.* 37, 2251-2256.
- [52] Lengyel, M. Kállai-Szabó, N. Antal, V. Laki, A. J. Antal, I. (2019). “Microparticles, Microspheres, Microcapsules for Advanced drug delivery” , Scientia pharmaceutica, Budapest, Hungary.
- [53] Carvalho Arjona, J.; das Graças Silva-Valenzuela, M.; Wang, S.-H.; Valenzuela-Diaz, F.R. Biodegradable Nanocomposite Microcapsules for Controlled Release of Urea. *Polymers* 2021, 13, 722.
- [54] Basu, S.; Kumar, N.; Srivastava, J. Modeling NPK release from spherically coated fertilizer granules. *Simul. Model. Pract. Theory* 2010, 18, 820-835.
- [55] Olad, A.; Zebhi, H.; Salari, D.; Mirmohseni, A.; Tabar, A.R. Slow-release NPK fertilizer encapsulated by carboxymethyl cellulosebased nanocomposite with the función of water retenti3n in soil. *Mater. Sci. Eng. C* 2018, 90, 333-340.
- [56] Uzoh, C.F.; Onukwuli, O.D.; Ozofor, I.H.; Odera, R.S. Encapsulati3n of urea with alkyl resin-starch membranes for controlled N₂ release: Synthesis, characterization, morphology and optimum N₂ release. *Process. Saf. Environ.* 2019, 121, 133-142.
- [57] Babar Azeem, KuZilati, KuShaari, Zakaria Man. Effect of coating thickness on release characteristics of controlled release urea produced in fluidized bed using waterborne starch biopolymers as coating material. *Procedia engineering* 148 (2016) 282-289.
- [58] Al-Zahrani, S. M. Utilizaci3n of Polyethylene and Paraffin Waxes as Controlled Delivery Systems for Different Fertilizers. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 39(2), 367-371 (2000).
- [59] Ni, B., Liu, M., Lü, S., Xie, L., & Wang, Y. Environmentally Friendly Slow-Release Nitrogen Fertilizer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(18), 2011.
- [60] Guilherme, M. R., Aouada, F. A., Fajardo, A. R., Martins. (2015). Superabsorbent hydrogels based on polysaccharides for applicaci3n in agriculture as soil conditioner and nutrient carrier: A review. *European Polymer Journal*, 72, 365-385.
- [61] Gunaratne, A., & Corke, H. (2016). Starch, Analysis of Quality. Reference Module in Food Science.
- [62] Matzinos, P., Bikiaris, D., Kokkou, S. y Panayiotou, C. (2001). Processing and caracterizaci3n of

LDPE/starch products. *Journal of Applied Polymer Science*, 79(14), 2548-2557.

- [63] Orietta León, Diana Soto, Jesús González, Carlos Piña, Alexandra Muñoz-Bonilla, Marta Fernández-García, “Environmentally friendly fertilizer based on starch superabsorbents”, laboratorio de polímeros y reacciones, escuela de ingeniería química facultad de ingeniería Universidad de Suia, Venezuela, Materials, MDPI, Oct 2019.
- [64] Dubey R, Shami TC, Rao Bhasker KU. Microencapsulación technology and applications. *Def Sci J*. 59: 82-95, 2009.
- [65] Fredriksson, H., Silverio, J., Andersson, R., Eliasson, A.-C., & Åman, P. (1998). The influence of amylose and amylopectin characteristics on gelatinization and retrogradation properties of different starches. *Carbohydrate Polymers*, 35(3-4), 119-134.
- [66] Bonding between amylopectin and amylose (2016). Chemistry Stack Exchange <https://chemistry.stackexchange.com/questions/58080/bonding-between-amylopectin-and-amylose>.
- [67] Fritz, H.-G. y Schroeter, J. (1994). Study on production of thermoplastics and fibres based mainly on biological materials: European Commission, Directorate-General XII, Science, Research and Development, Agro-Industrial Research Division.
- [68] Mellema, M., Van Benthum, W. A. J., Boer, B., Von Harras, J., & Visser, A. (2006). Wax encapsulation of water-soluble compounds for application in foods. *Journal of Microencapsulation*, 23(7), 729-740.
- [69] Lewandowska, M., Keyl, A., & Feussner, I. (2020). Wax biosynthesis upon danger: its regulation upon abiotic and biotic stress. *New Phytologist*.
- [70] Tinto, W. F, Wlufioye, T. O. & Rocha, J. Chapter 22 Waxes, pharmacognosy 1st edition, Academic press, 2016.
- [71] Capparelli. (2008) Caracterización cuantitativa de productos intermedos y residuos derivados de alimeos del algarrobo (*Prosopis flexuosa* y *P. chilensis* fabaceae). *Darwinina*. Vol. 46 pp. 175-201.
- [72] López-Franco et al., 2004 *Macromol. Biosci.*, 4, 865.
- [73] Qi W, Fong C, Lamport DTA (1991) Gum arabic glycoprotein is a twisted hairy rope. A new model based on O-Galactosylhydroxyproline as the polysaccharide attachment site. *Plant Physiol*. 96: 848-855.

- [74] Qiao, D., Liu, H., Yu, L., Bao, X., Simon, G. P., Petinakis, E., & Chen, L. Preparation and characterization of slow-release fertilizer encapsulated by starch-based superabsorbent polymer. *Carbohydrate Polymers*, 147, 146-154, 2006.
- [75] N. Navarro-Guajardo et al., Candelilla wax as natural slow-release matrix for fertilizers encapsulated by spray chilling, *J. Renew. Mater.*, vol. 6, núm. 3, pp. 226-236, 2018.
- [76] Asyraf, A. F., & Budianto, E. (2020). Encapsulation efficiency and in-vitro dissolution test of Nifedipine microcapsules coated with polyblend of poly(D-lactic acid) and polycaprolactone. *Proceedings of the 5th international symposium on current progress in mathematics and sciences (ISCPMS2019)*.
- [77] Shaviv, A. (2000). Advances in Controlled Release Fertilizers. *Advances in Agronomy*. 71, 1-49.
- [78] Fredenberg S, Wahlgren M, Reslow M, Axelsson A. The mechanisms of drug release in poly(lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems- A review. *Journal of pharmaceuticals* 415 34-52, (2011).
- [79] Dash, S., Murthy, P. N., Nath, L., & Chowdhury, P. (2010). Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, 67(3), 217-223.
- [80] George, D., Begum, K. M. M. S., & Maheswari, P. U. (2018). Sugarcane Bagasse (SCB) Based Pristine Cellulose Hydrogel for Delivery of Grape Pomace Polyphenol Drug. *Waste and Biomass Valorization*.

Capítulo 3

Panorama global de la tesis

3.1 Justificación

El encapsulamiento permite hacer más eficiente el uso de fertilizantes, disminuye el impacto ambiental en suelos y mantos acuíferos, además de contribuir con la seguridad alimentaria global. El uso de matrices a base de biopolímeros es relevante, ya que, se obtienen de fuentes renovables, son biodegradables y presentan nula o muy baja toxicidad [1]. Las ceras naturales y las matrices de polisacáridos son de gran interés, debido a su disponibilidad y variedad en propiedades funcionales [2]. Diversos estudios han demostrado que la permeabilidad de las matrices ya sea por su naturaleza o por las modificaciones físicas o químicas realizadas, pueden llegar a controlar la liberación del fertilizante [3]. El grupo de investigación de CIQA, ha desarrollado sistemas de fertilizantes base fósforo microencapsulados en matrices de cera de candelilla, donde las micropartículas obtenidas presentan un estructura de poros; también microencapsulados de matrices híbridas de almidón de maíz con nanopartículas de cera de candelilla, mediante procesos de secado por atomización y pulverización por enfriamiento [4] Aún no se han realizado estudios que permitan conocer los perfiles de liberación de estos sistemas encapsulados en función del pH. Definir los perfiles de liberación de estos sistemas y su relación con un modelo matemático, es necesario para validar los sistemas en condiciones de ambiente real; bajo condiciones de temperatura, pH y humedad de suelos. La determinación del ión fosfato por técnicas convencionales, tales como colorimétricas y potenciométricas, presentan una baja selectividad y requiere de pasos complejos de pretratamiento. En este contexto, el desarrollo de un biosensor electroquimioluminiscente (ECL) representa una alternativa viable para la detección del ión fosfato. De manera general los biosensores ECL son de gran interés por su versatilidad, selectividad y sensibilidad en la detección de analitos específicos.

3.2 Hipótesis

La interacción de la enzima fosfatasa alcalina con el grupo fosfato "acoplado a una reacción electroquimioluminiscente de un sistema luminol" resultará viable para desarrollar un biosensor capaz de determinar el perfil de liberación del fertilizante fosfato monoamónico (MAP) a partir de sistemas

microencapsulados.

3.3 Objetivo general

Desarrollar un método electroquimioluminiscente como herramienta selectiva para la determinación y cuantificación del perfil de liberación MAP proveniente de sistemas microencapsulados en una matriz de cera de candelilla y una matriz híbrida de almidón de maíz.

3.4 Objetivos específicos

1. Caracterizar las condiciones para llevar a cabo reacciones electroquimioluminiscente por medio de voltamperometría cíclica.
2. Diseñar y desarrollar un biosensor tipo ECL para la determinación cuantitativa de fosfato acoplado una enzima fosfatasa alcalina.
3. Obtener un sistema de fertilizante base fósforo encapsulado en una matriz híbrida de cera de candelilla y almidón de maíz por la técnica de secado por atomización (Spray-drying) y un sistema encapsulado de cera de candelilla por la técnica de atomización por enfriamiento (Spray-chilling).
4. Caracterizar la morfología y el comportamiento térmico de los sistemas microencapsulados antes y después de llevar a cabo perfil de liberación bajo condiciones de ahogamiento.
5. Determinar el efecto del pH inicial en el medio sobre el perfil de liberación de los sistemas microencapsulados.
6. Realizar análisis cinético de los perfiles de liberación obtenidos con modelos matemáticos de Korsmeyer Peppas, orden cero y primer orden.

3.5 Referencias de panorama global de la tesis.

- [1] C. M. Monreal, M. DeRosa, S. C. Mallubhotla, P. S. Bindraban, y C. Dimkpa, “Nanotechnologies for increasing the crop use efficiency of fertilizer-micronutrients”, *Biol. Fertil. Soils*, vol. 52, núm. 3, pp. 423–437, 2016.
- [2] D. França, L. L. Messa, C. F. Souza, y R. Faez. (2019). “Nano and Microencapsulated Nutrients for Enhanced Efficiency Fertilizer”, en *Polymers for Agri-Food Applications*, Springer. 44.
- [3] Z. Zhou, C. Du, T. Li, Y. Shen, y J. Zhou, “Thermal post-treatment alters nutrient release from a controlled-release fertilizer coated with a waterborne polymer”, *Sci. Rep.*, vol. 5, núm. 1, p. 13820, 2015.
- [4] C. Espinoza-González, N. Navarro-Guajardo, y C. A. Pérez-Torres, “Method for producing porous particles by means of a hybrid process of atomisation via drying-cooling” WO/2019/240568, 2019.

Capítulo 4

Parte experimental

4.1 Diseño y desarrollo de un biosensor electroquimioluminiscente

4.1.1. Electrodo

Se establecieron las condiciones del sistema en medio acuoso y la reacción se lleva a cabo sobre un electrodo serigrafiado. Para este estudio, se utilizó un electrodo de grafito Ag/AgCl (Zensor R&D) sobre láminas de polipropileno y un electrodo de oro Zensor R&D sobre láminas de policarbonato de 0.5 mm de espesor. Dentro del electrodo serigrafiado se pueden diferenciar 3 tipos de electrodos (Figura 22): electrodo de trabajo, contra electrodo y el electrodo de referencia. En el electrodo de trabajo ocurren las reacciones electroquímicas de interés (óxido-reducción) [1].

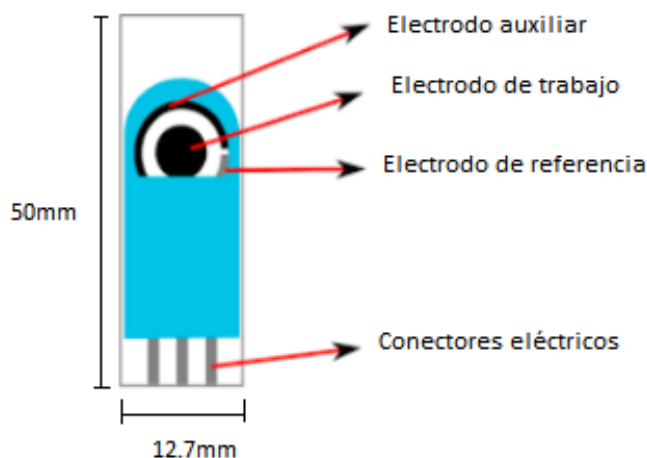


Figura 22 Esquema de un electrodo serigrafiado de carbono [2]

4.1.2. Preparación de electrodos

Los electrodos de oro se mantienen en un desecador, previo a su uso los electrodos se lavan, sumergiéndose en 10 mL de una solución (1:1) de agua desionizada e isopropanol. Posteriormente se someten a un proceso de sonicación por al menos 5 min.

4.1.3. Equipo de Electroquimioluminiscencia

El equipo para generar ECL consta de un porta electrodos donde se colocó la solución acuosa, conectado a un potenciostato (Sensit-Smart) y a su vez a un fotodiodo Thorlabs (Figura 23). Dicho sistema cuenta con un software (Palmsens) donde se establecieron las condiciones para generar voltametría cíclica acoplado a un fotodiodo para la detección de ECL. A través de este sistema se han podido obtener las medidas electroquímicas estudiadas, registradas mediante el software (Thorlabs).

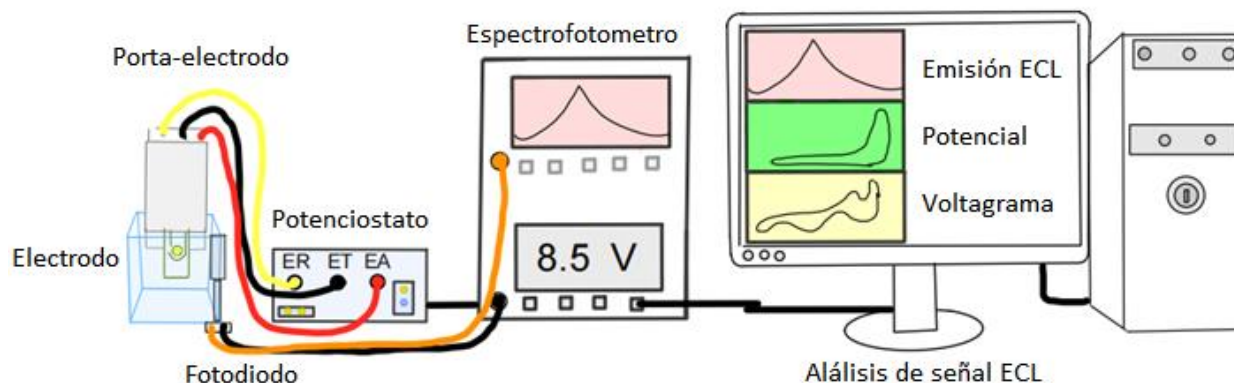


Figura 23 Esquema general del equipo de electroquimioluminiscencia.

4.1.4. Potenciostato y Software

Para generar una respuesta electroquímica mediante el Software (Palmsens) se realizaron estudios por la técnica de voltametría cíclica bajo las siguientes condiciones (Tabla 7): a un rango de corriente de 100nA hasta 100 mA.

Tabla 7. Establecimiento de condiciones para voltametría cíclica

Parámetro	Rango	Unidad
Tiempo de equilibrio (t)	60	s
Potencial de inicio (E begin)	0.0	V
Potencial máximo positivo (E vertex 1)	0.6	V
Potencial máximo negativo (E vertex 2)	-0.2	V
Rango de potencial (E step)	0.01	V
Velocidad de Scan	0.1	V/s
Número de Scan	1	N/A

4.2 Procedimiento para generar ECL control

Se establecen las condiciones básicas para generar emisión de luz, dicho sistema funciona como control garantizando que las condiciones establecidas son adecuadas y reproducibles. A continuación, se hace una descripción de la preparación de las disoluciones buffers utilizadas en este proyecto, el pH de las disoluciones se cuantificó mediante un pH-metro Corning pH/Ion meter modelo 450, los reactivos fueron grado analítico y se utilizó agua ultrapura (18 MΩ cm).

-Buffer PBS al 50 mM, fosfato de sodio monobásico (sigma-aldrich) 0.2 mM y Fosfato de sodio dibásico (Sigma-aldrich) al 0.2 mM y para ajustar el pH se utilizó una solución 0.5 M de NaOH (Macron, Fine chemicals 7708-10) y 5 % de HCl (J.T.Baker) hasta un pH de 9.

-Buffer BX: Se elaboró una solución 0.1 M de ácido bórico (Sigma electrolisis reagent) y 0.1 M de tetraborato de sodio (Analit reactivo, Química Dinámica) y para ajustar el pH se utilizó una solución 0.5 M de NaOH (Macron, Fine chemicals 7708-10) y 5 % de HCl hasta un pH de 9.

-Buffer Glicina: Se elaboró una solución 0.05 M de Glicina (Sigma Aldrich), 0.1 M de Cloruro de potasio KCl (Sigma Aldrich), 0.001 Cloruro de magnesio MgCl (Sigma Aldrich) y para ajustar el pH se utilizó una solución 0.5 M de NaOH y 5 % de HCl hasta un pH de 10.

-El peróxido de hidrógeno funciona como un agente altamente oxidante que, en un sistema de luminol permitirá la generación de radicales para generar la emisión de luz. Para la elaboración de soluciones de peróxido de hidrógeno (Aldrich-7722-84-1) se usó un porcentaje de peróxido del 30, 25, 20, 15, 10 y 5%.

-Para la generación de ECL se probaron diferentes concentraciones de luminol y se prepararon soluciones de luminol (Luminol sodium salt, Sigma-A 4685-1G) a concentraciones de 15,10, 5, 2.5, 1.5 y 0.65 mg/mL.

El sistema control se basa en la combinación de las soluciones previamente mencionadas, el sistema control se establece como el buffer (PBS, BX o Glicina) 10 μL, la solución de luminol 20 μL y la solución de peróxido de hidrógeno 5μL. Estableciendo la máxima emisión de luz para el desarrollo de un biosensor On-Off. Para generar la reacción electroquímica se colocó sobre el electrodo el medio acuoso compuesto por: Buffer, solución de luminol y peróxido de hidrógeno. Se procedió con la técnica de voltametría cíclica

para obtener los potenciales de oxidación y reducción bajo las siguientes condiciones: un rango de potenciales de $E_1 = -0.2$ V a $E_2 = 0.6$ V a un pulso de 0.025 V por 0.07 s a una velocidad de barrido de 0.05 V/s en un rango de corriente promedio de 100 mA.

4.3 Estudio de la actividad enzimática por el método ECL:

La actividad enzimática de la fosfatasa alcalina sobre un sistema de luminol. A continuación, se hace una descripción de la preparación de las disoluciones buffers utilizadas durante el desarrollo de este proyecto, el pH de las disoluciones se cuantificó mediante un pH-metro Corning pH/Ión meter modelo 450, todos los reactivos fueron grado analítico y se utilizó agua ultrapura (18 M Ω cm).

-Fosfatasa alcalina (ALP) de intestino de bovino (MERK-Roche. REF: 11097075001). De la solución concentrada de fosfatasa alcalina de suero bovino intestinal previamente preparado para su uso, se agregó 5 μ L y se mezcló con 40 μ L del buffer para la enzima.

-Buffer de Tris para la enzima ALP: solución tampón TRIS-Cl a base de tris(hydroxymethyl)-aminomethane al 1 M con 20 % de HCl. Posteriormente se ajustó el pH a 9.5 con una solución 0.5 M de NaOH. Se preparó la solución tampón para la ALP (Buffer fosfatasa) y se tomó 4 mL al 5 M de NaCl, 20 mL de una solución al 1 M de TRIS-Cl a un pH de 9.5, 2 mL de solución de al 1 M, 2 mL de Tween 60 y se aforó hasta un volumen de 200 mL.

-Buffer de Glicina para la enzima ALP: para lo cual se añadió: 50 mM de Glicina, 0.1 M KCl y 1.0 mM. La solución resultante se le ajustó el pH utilizando una solución 0.5 M de NaOH y 5 % de HCl hasta un pH de 9.5.

-Para la generación de ECL se probaron diferentes concentraciones de Ácido Fítico (Phytic acid sodium salt hydrate, Sigma-P8810) a concentraciones de 0.3, 0.6 y 0.9 mg/mL.

Se mide la respuesta de la enzima sobre un sistema ECL mediante: Buffer TRIS-Cl y el Buffer de Glicina se diluye en la solución concentrada de (ALP) a diferentes concentraciones de acuerdo con (Tabla 8). De estas mezclas de ALP y Buffer se tomaron 5 μ L y se mezclaron con el buffer Glicina, para posteriormente ser incubadas con Ácido fítico a concentraciones de 0.3, 0.6 y 0.9 mg/ml durante periodos de tiempo de 3, 6, 9 y 12 minutos a 37°C. Posteriormente, se acopló al sistema ECL de luminol con la solución de

peróxido de hidrógeno y se realizó la técnica de voltametría cíclica.

Tabla 8. Concentraciones de ALP para generar actividad enzimática acoplada a ECL.

ALP de suero intestinal bovino (MERK-Roche)	Buffer TRIS-Cl	Buffer Glicina
5 μL	30 μL	30 μL
5 μL	35 μL	35 μL
8 μL	42 μL	42 μL
4 μL	76 μL	76 μL

4.4 Procedimiento para estudiar la inhibición enzimática acoplada a método ECL:

Para llevar a cabo la evaluación de inhibición de la enzima ALP, a continuación, se hace una descripción de la preparación de las disoluciones buffers utilizadas durante el desarrollo de este proyecto, el pH de las disoluciones se cuantificó mediante un pH-metro Corning pH/Ión meter modelo 450, todos los reactivos fueron grado analítico y se utilizó agua ultrapura (18 M Ω cm).

-De la solución concentrada de fosfatasa alcalina de suero bovino intestinal previamente preparado para su uso, se agregó 5 μL y se mezcló con 40 μL del buffer para la enzima.

-Buffer de Glicina para la enzima ALP: para lo cual se añadió: 50 mM de Glicina, 0.1 M KCl y 1.0 mM . La solución resultante se le ajustó el pH utilizando una solución 0.5 M de NaOH y 5 % de HCl hasta un pH de 9.5. Como sustrato de la enzima se utilizó una concentración de 0.3 mg/mL de Ácido Fítico.

-Para estudiar el decaimiento en la emisión de ECL se probaron diferentes concentraciones de fertilizante fosfato monoamónico grado comercial (GreenHow) a concentraciones de 0.9, 0.7, 0.6, 0.4 y 0.25 mg/mL.

-Para la inhibición de la enzima se incubó el sistema 5 U/mL enzima ALP, 10 μL Buffer Glicina-luminol junto con 5 μL de MAP a 37°C por 5 min. Seguidamente se agregaron 5 μL de PA y se incubó nuevamente a 37 °C por 5 min. Se depositaron todos los componentes del sistema en medio acuoso sobre el electrodo, y como un último paso se agregó 10 μL Buffer Glicina y 5 μL de peróxido. Con cada concentración de MAP se realizó la técnica de voltametría cíclica, a potenciales de inicio y de término de: E1=-0.2 V a E2= 0.6V, a una velocidad de barrido de 0.05 V/s y un rango de corriente promedio de 100 mA.

4.5 Microencapsulación

4.5.1 Materiales

-La cera de candelilla consiste principalmente de hidrocarburos, ésteres ácidos, ácidos libres, ésteres hidroxilados, diésteres y alcoholes de cadena larga, dependiendo el grado de refinación [5][6]. En esta investigación la cera de candelilla (Multiceras S.A. de C.V) se utilizó como parte de la matriz de los sistemas encapsulados y como agente emulsificante.

-El fosfato monoamónico (MAP) (GreenHow S.A. de C.V. Jalisco, México). Es un fertilizante granular que contiene dos de los macronutrientes más importantes: fósforo y nitrógeno [7]. MAP tienen la característica de ser altamente soluble en agua, el porcentaje de composición se presenta en (Tabla 9) la composición puede ser variable dependiendo de los fabricantes [8].

Tabla 9. Características del Fosfato monoamónico.

Fórmula química	$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$
Porcentaje de P_2O_5	48-61%
Porcentaje de N	10-12%
Solubilidad en agua (20°C)	370 g/l
pH de la solución	4-4.5

-La goma de mezquite (Multiceras S.A. de C.V.) La goma consiste principalmente de polisacáridos del tipo II y una fracción proteica que oscila entre 2-4.8% [9]. Es altamente soluble en agua, tiene una baja viscosidad, pH entre 6 y 9, compatible, no reactiva, tiene alta capacidad emulsificante y excelente capacidad para encapsular [10].

-En esta investigación se ha utilizado ácido octenil succínico (OSA) que es un almidón modificado (Figura 24). El cual tiene la característica de tener grupos hidrofóbicos, tienen aplicaciones como emulsificante, agente encapsulante, etc [11]. Esta característica le permite gelatinizar a menor temperatura, tiene mayor poder de hinchamiento y aumenta la viscosidad de las formulaciones.

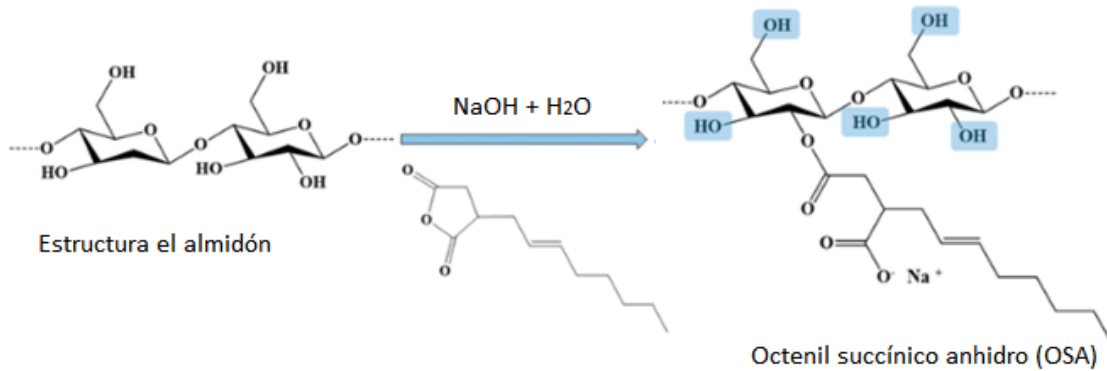


Figura 24 Estructura de OSA [11].

-El Tween 60 (Sigma Aldrich) es un surfactante no iónico, tiene un valor de balance hidrófilo-lipofílico (HLB) de 10,5, lo que lo hace sumamente útil para la generación de emulsiones aceite en agua [12]. Es un surfactante de baja toxicidad, estable en ácidos y bases débiles.

4.6 Metodología

4.6.1 Sistema encapsulado 60% MAP-40% Matriz con Goma de Mezquite

4.6.1.1 Desarrollo de una nanoemulsión de cera de candelilla

Dicha metodología se basó en experimentos realizados por el grupo de investigación en CIQA [14]. Para la obtención de nanopartículas se preparó una emulsión de baja energía al 12 % en peso de cera, dicha metodología fue desarrollada previamente por el grupo de investigación sonomimetikos, haciendo algunos ajustes para el procedimiento utilizado en esta investigación. Para formar la emulsión se mezcló cera de candelilla y Tween 60 como agente surfactante en una proporción 1:0.7. En un vaso enchaquetado a 93.0 ± 1.0 °C 27 g se mezclaron 27 g de cera y 18.9 g de Tween fundiendo hasta su completa homogeneización con agitación magnética a 350 rpm. Una vez teniendo la cera y el Tween homogeneizados, con una bomba peristáltica se adiciona gota a gota agua desionizada previamente calentada a 90.0 ± 1.0 °C a una velocidad de 2 mL/min, durante la adición del agua se mantuvo la agitación constante para facilitar la formación de la emulsión. Una vez finalizada la adición de agua, la emulsión se transfiere mediante una bomba peristáltica a una velocidad de 10 mL/min hasta un contenedor con baño de hielo 10°C. El cambio de

temperatura en agitación magnética constante permite conservar la morfología micelar de la cera en un medio acuoso.

4.6.1.2 **Preparación de una solución de matriz de bpolímero con fertilizante.**

Dicha metodología se basó en experimentos modificados del grupo de investigación en CIQA [14]. Para la obtención de los sistemas microencapsulados a base de una matriz de almidón se desarrolló el siguiente procedimiento: Se sometió el almidón (OSA) a un proceso de gelatinización, para la cual se dispersó el polisacárido en agua a una concentración de 3% en peso. La mezcla se mantuvo en un vaso enchaquetado a una temperatura de 90.0 ± 1.0 °C durante 30 minutos, la mezcla permaneció en agitación constante con una propela de alto corte a 350 rpm. A continuación, se mantuvo la mezcla en agitación constante y se bajó la temperatura hasta alcanzar los 70.0 ± 1.0 °C y se adiciona goma de mezquite, para formar una mezcla en una proporción 70% almidón y 30% goma de mezquite. Simultáneamente, se preparó una disolución de 40 gramos de MAP en 60 ml de agua desionizada a una temperatura de 90°C en una parrilla de calentamiento y se agitó constantemente con ayuda de un agitador magnético por 10 min. La mezcla de almidón gelatinizado con goma de mezquite se transfirió al vaso que contiene la disolución de fertilizante y se mantuvo en agitación durante 10 min a temperatura de 90.0 ± 1.0 °C. La mezcla conteniendo Almidón, Goma de mezquite y MAP se dejó reposar hasta alcanzar una temperatura de 40°C. Una vez a 40 °C se adiciona la emulsión de nanopartículas de cera de candelilla del punto anterior. La emulsión de nanopartículas de cera de candelilla al 12 % se adicionó a la mezcla a una temperatura de 25 °C gota a gota mediante una bomba peristáltica a una velocidad de 10 mL/min y la mezcla se mantuvo en agitación mecánica constante a 450 rpm. La mezcla resultante se dejó retrogradar durante 24 horas a 25°C, para posteriormente someterla a un proceso de secado por atomización.

4.6.1.3 **Obtención de microencapsulado mediante secado por atomización (Spray drying)**

Dicha metodología se basó en experimentos modificados del grupo de investigación en CIQA [14]. El proceso de secado por atomización se llevó a cabo empleando un equipo Spray Dryer marca Büchi modelo B-290 (Figura 25) para la obtención de micropartículas. La emulsión de almidón retrogradado (Almidón, goma de mezquite, fertilizante y nanopartículas de cera de candelilla) fue atomizada a una temperatura de secado de 140 °C, velocidad de aspiración de 35 /h, velocidad de alimentación de 8 mL/min, presión del

aire estándar y flujo del aire de calentamiento de 831 L/h. Al término de la atomización y secado, las partículas obtenidas se recolectaron y se almacenaron en un desecador.



Figura 25 Equipo de secado por atomización, equipo Spray Dryer, Büchi, B-290, ubicado en las instalaciones del Centro de Investigación de Química Aplicada, Saltillo, Coah.

4.6.2 Obtención de un sistema de fertilizante MAP encapsulado en una matriz de Cera de candelilla

4.6.2.1 Desarrollo de la emulsión para generar microencapsulados de cera de candelilla

Dicha metodología se basó en experimentos modificados del grupo de investigación en CIQA [14]. El sistema encapsulado consistió en una mezcla de 50 % de MAP y 50 % de matriz (cera de candelilla) en peso. La metodología fue desarrollada previamente por el grupo de investigación sonomimetikos. Para

ello, se fundió la cera de candelilla en un contenedor a 90 ± 1.0 °C en una parrilla de calentamiento y se agitó constantemente con ayuda de un agitador magnético a 100 rpm durante 30 min. Simultáneamente, en otro contenedor se calientan 160 mL de agua desionizada hasta alcanzar 90 ± 1.0 °C una vez caliente se adicionan 100 gramos de MAP y se agita hasta su completa disolución. Una vez estable la temperatura de ambas soluciones se adiciona la solución de MAP a la matriz fundida (cera de candelilla) gota a gota utilizando una bomba peristáltica con un flujo de alimentación de 4 ml/min. Se aumenta la una velocidad de agitación a 250 rpm durante la incorporación de la solución de MAP a la matriz fundida. Al terminar la incorporación de la solución de MAP, se permitió la evaporación del agua de la emulsión, manteniendo el sistema a una temperatura de 90°C por un periodo de tiempo de 20 minutos y la mezcla puede ser sometida a un proceso de atomización por enfriamiento.

4.6.2.2 **Obtención de microencapsulado mediante el proceso de atomización por enfriamiento (Spray chilling)**

Dicha metodología se basó en experimentos modificados del grupo de investigación en CIQA [14]. Para el encapsulamiento de las matrices con cera de candelilla, se atomiza aire a una temperatura de 115 °C a una presión de 5 bares, formando las gotas de cera que rodean al fertilizante, dichas gotas solidifican al entrar en contacto con la corriente de aire frío (10-13 °C), formando así las micropartículas de MAP. Las condiciones de operación del equipo para el proceso de *Spray Chilling* se muestran a continuación (Tabla 10). Se obtuvieron dos fracciones de microencapsulados aquellas depositadas en la cámara y en el ciclón, posteriormente se mantuvieron en un desecador al vacío a temperatura ambiente.

Tabla 10. Variables para el proceso de *Spray Chilling*.

Temperatura de aire de atomizado	130°C
Temperatura de aire de enfriamiento	10-13°C
Temperatura de la alimentación	115°C
Presión de aire de atomizado	5 bar
Volumen de aire de atomizado	473 l/h

Metodología para la determinación del perfil de liberación de sistemas de MAP encapsulado

4.6.2.3 Preparación de membranas para el perfil de liberación

Dicha metodología se basó en experimentos modificados del grupo de investigación en CIQA [14]. Para las pruebas del perfil de liberación se utilizó una membrana de diálisis de celulosa (Sigma-Aldrich) de alta retención 99.99 %. Las membranas con un diámetro de 4.0 cm y una longitud de 15 cm, fueron tratadas con una solución de 74 mg de EDTA (Sigma-Aldrich) y 4g de Bicarbonato de sodio, la solución se hirvió a 120 °C y se sumergieron las membranas por 10 min. Seguidamente se enjuagaron con abundante agua desionizada. Se preparó una segunda solución con 74 mg de EDTA hirviendo las membranas por 10 min y finalmente son enjuagadas con abundante agua desionizada.

4.6.2.4 Sistemas para el estudio del perfil de liberación

Las pruebas de liberación de sistemas microencapsulados a base de fertilizante se llevaron a cabo introduciendo 1 g de material en las membranas de celulosa previamente tratadas. Posteriormente fueron puestas en un sistema de ahogamiento en un volumen de 350 ml de agua desionizada a pH 4.0, 7.0 y 8.5, en frascos de vidrio con agitación leve durante todo el experimento y los frascos permanecieron dentro de una campana a temperatura ambiente. La toma de muestra se realizó durante el primer día las primeras 5 horas y posteriormente una toma de muestra cada 24 h. La toma de muestra fue de 50 mL mismos que se repusieron al sistema con agua desionizada posterior a la toma de muestra. Todas las pruebas se realizaron por duplicado y el perfil de liberación de cada uno de los encapsulados fue estimado como el porcentaje de liberación acumulada contra el tiempo de incubación. La toma de muestra se realizó en intervalos dentro del primer día y posteriormente una vez al día hasta concluir el experimento. Posteriormente el pH se ajustó hasta 9.5 para poder ser incorporadas al sistema del biosensor sin afectar el rendimiento de la enzima y se procedió con los estudios por la técnica de voltametría cíclica.

Para comparar las concentraciones de MAP en el sistema, se realizó una curva de calibración para determinar la ECL del sistema en función de la concentración de MAP. Se realizaron 8 soluciones a concentración entre 0.2 y 1.5 MAP en mg/mL. Adicionalmente se hizo una curva para determinar el efecto de quenching del ácido fosfórico sobre la emisión de luz.

4.7 Caracterización de los microencapsulados mediante DSC

Las microcápsulas se caracterizaron antes y después de la liberación controlada mediante la técnica de Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) en un equipo DSC DISCOVERY Series. Las condiciones se establecieron en un intervalo de temperatura de 10 a 110 °C con una rampa de calentamiento de 10°C/min la temperatura de equilibrio se fijó a 25°C. Con el fin de observar el comportamiento térmico de los sistemas encapsulados antes y después de la liberación controlada, para identificar la variación en la entalpía.

4.8 Morfología de los encapsulados de MAP mediante SEM

El análisis morfológico de los microencapsulados fue realizado antes y después del proceso de liberación mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) JEOL USA JCM-6000 NeoScope Benchtop. Los sistemas microencapsulados se colocaron sobre una cinta de cobre y se recubren con oro/platino en un equipo Denton Vacuum DESK II por 80 segundos. Las muestras se analizaron bajo condiciones de vacío a un voltaje acelerado de 15 kV a magnificaciones de x1500, x1000, x400 y x170.

4.9 Determinación del tamaño de partícula

A partir de las imágenes obtenidas mediante SEM a bajo vacío, se determinó la distribución de tamaño de partícula utilizando el software Image J, desarrollado por el U.S. National Institute of Health. Se analizaron por lo menos 50 partículas por muestra.

4.10 Espectrometría de masas por plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS)

A partir de esta técnica es posible determinar de forma cuantitativa la mayoría de los elementos de la tabla periódica a niveles de traza, partiendo de una muestra en disolución acuosa, dicha técnica permite hacer un análisis comparativo del fósforo obtenido de los perfiles de liberación. Utilizando un equipo ICAP 7000 series ICP spectrometer Thermo Scientific, modelo iCAP 7400 DUO. Se preparan disoluciones con agua ultrapura (18 MΩ cm) a partir de la muestra del perfil de liberado al 25%. Las muestras se analizaron a una longitud de onda de 178.766 nm estándar para fósforo, mediante una medición axial con tiempos de lectura de 45 segundos por triplicado y un tiempo de lavado de 5 segundos.

4.3 Referencias de la metodología.

- [1] Tominaga, M., Shimazoe, T., Nagashima, M., & Taniguchi, I. (2008). Composition–activity relationships of carbon electrode-supported bimetallic gold–silver nanoparticles in electrocatalytic oxidation of glucose. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 615(1), 51–61.
- [2] Noémie Elgrishi, Kelley J. Rountree, Brian D. McCarthy, Eric S. Rountree, Thomas T. Eisenhart, and Jillian L. Dempsey. (2018). A Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry. *Journal of Chemical Education*, 95 (2), 197-206.
- [3] Abou Samra, M., Chedea, V. S., Economou, A., Calokerinos, A., & Kefalas, P. (2011). Antioxidant/prooxidant properties of model phenolic compounds: Part I. Studies on equimolar mixtures by chemiluminescence and cyclic voltammetry. *Food Chemistry*, 125(2), 622–629.
- [4] Galicia, Monica. (2017). Modificación de Grafito con CNT y biopelículas electroactivas marinas: Caracterización Electroquímica.
- [5] Scora, G. A., M. Ahmed and R. W. Scora. 1995. Epicuticular hydrocarbons of candelilla (*Euphorbia antisiphilitica*) from three different geographical areas. *Industrial Crops and Products*. 4: 179-184.
- [6] Rojas Molina, R.; Saucedo Pompa, S.; De León Zapata, M. A.; Jasso Cantú, D.; Aguilar, C. N. Pasado, presente y futuro de la candelilla. *Rev. Mex. ciencias For.* 2011, 2 (6), 7–18.
- [7] Lombi, E., McLaughlin, M. J., Johnston, C., Armstrong, R. D., & Holloway, R. E. (2004). Mobility and Lability of Phosphorus from Granular and Fluid Monoammonium Phosphate Differs in a Calcareous Soil. *Soil Science Society of America Journal*, 68(2), 682.
- [8] Xu, D., Xiong, X., Yang, L., Zhang, Z., & Wang, X. (2015). Determination of the Solubility of Ammonium Dihydrogen Phosphate in Water–Ethanol System at Different Temperatures from 283.2 to 343.2 K. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 61(1), 78–82.
- [9] López-Franco et al., 2004 *Macromol. Biosci.*, 4, 865.
- [10] Capparelli. (2008) Caracterización cuantitativa de productos intermedos y residuos derivados de alimeos

del algarrobo (*Prosopis flexuosa* y *P. Chilensis* fabaceae). *Darwinina*. Vol. 46 pp. 175-201.

[11] Leon-Bejarano, M., Durmus, Y., Ovando-Martínez, M., & Simsek, S. (2020). Physical, Barrier, Mechanical, and Biodegradability Properties of Modified Starch Films with Nut By-Products Extracts. *Foods*, 9(2), 226

[12] Rao, M. R. P., Aghav, S., Sukre, G., & Kumar, M. (2014). Determination of Required HLB of Capryol 90. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 35(2), 161–167.

[13] Neves, M. M. P. S., Bobes-Limenes, P., Pérez-Junquera, A., González-García, M. B., Hernández, D., & Fanjul-Bolado, P. (2016). Miniaturized analytical instrumentation for electrochemiluminescence assays: a spectrometer and a photodiode-based device. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408(25), 7121–7127.

[14] C. Espinoza-González, N. Navarro-Guajardo, y C. A. Pérez-Torres, “Method for producing porous particles by means of a hybrid process of atomisation via drying-cooling”, WO/2019/240568, 2019.

Capítulo 5

Resultados y Discusión

5.1 Desarrollo del biosensor para la determinación de ECL

La generación experimental de electroquimioluminiscencia (ECL) debe comenzar con un equilibrio entre el ambiente electroquímico y los reactivos luminiscentes, ambos elementos son necesarios para generar las especies reactivas capaces de generar una respuesta de emisión de luz. Los sistemas electroquímicos son altamente sensibles y es común que sustancias ajenas al proceso (principalmente iones metálicos) intervengan de manera negativa evitando la reacción electroquímica. Por consiguiente, las sustancias utilizadas, disoluciones y buffers deben ser de alta pureza [1]. En este sentido, el procedimiento experimental debe favorecer el encuentro entre especies sobre la superficie del electrodo, con el fin de facilitar la reacción al aplicar un potencial eléctrico. Para un sistema de luminol, la luz emitida puede observarse a simple vista en la oscuridad. Sin embargo, para esta investigación se hace uso de un dispositivo fotosensible para cuantificar la emisión de luz. Por tanto, antes del desarrollo de un biosensor, se establecieron los parámetros que tienen influencia sobre la señal analítica. La finalidad de determinar dichos parámetros fue conseguir las condiciones idóneas para generar una respuesta ECL constante y reproducible.

5.1.1 Estudios de estabilidad del electrodo

El oro se ha convertido en un material sumamente atractivo para el análisis electroquímico por sus propiedades conductoras, favoreciendo la transferencia de electrones y suele ser afín al anclaje de moléculas biológicas [2]. Durante el proceso experimental se debe asegurar la integridad del electrodo, es decir, que se encuentre libre de rayones, sin cambio de coloración y con un acabado brillante. La limpieza de los electrodos durante la experimentación toma mayor importancia, ya que, es un proceso simple, pero crucial para la obtención de resultados confiables. La limpieza e integridad del electrodo se comprueban mediante un voltograma, el cual presenta los picos característicos asociados a la óxido-reducción de dicho metal.

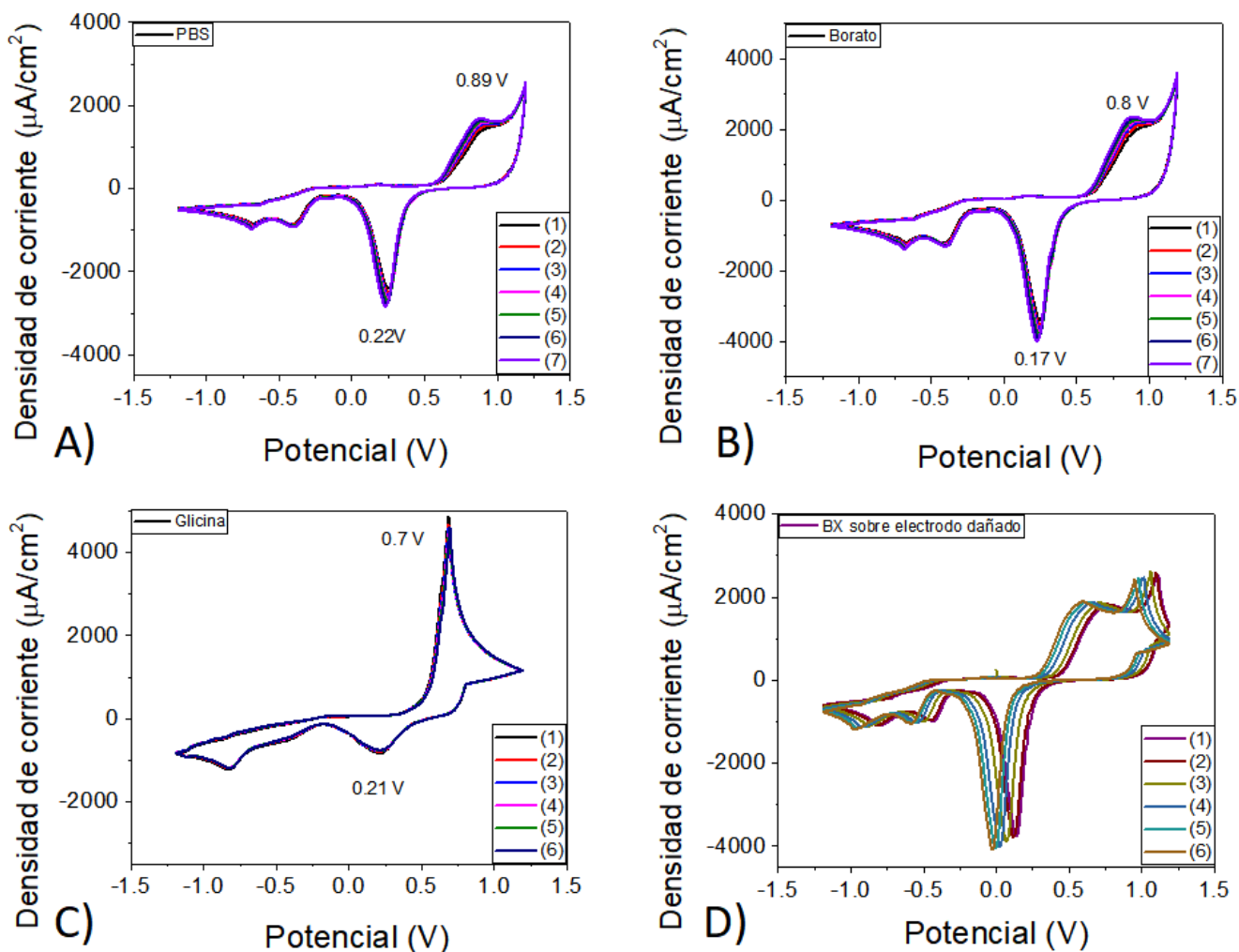


Figura 26 Voltagramas cíclicos A) 7 ciclos con Buffer PBS pH 9.0. B) 7 ciclos con Buffer de borato pH 9.5, C) 6 ciclos con Buffer de Glicina pH 10.0 y D) 6 ciclos con buffer de borato sobre electrodo dañado.

La Figura 26 muestra los voltagramas cíclicos sobre electrodos de oro previamente lavados con una solución 1:1 (isopropanol/agua) en un sonicador por 5 min. El estudio de voltametría se llevó cabo en un intervalo de potencial de -1.2 a 1.2 V con 40 µL del buffer de interés, los resultados obtenidos son similares, teniendo en cuenta que se deben presentar los picos de óxido reducción característicos del oro. A) el PBS, se usó como un buffer control, ya que, es sumamente utilizado por su estabilidad. El voltagrama obtenido muestra un comportamiento invariante de la corriente límite, manteniéndose constante durante 7 ciclos. B) Se buscó la estabilidad del buffer a base de borato, debido a que diversas investigaciones aseguran una respuesta significativamente mejorada de ECL [3]. C) El buffer de glicina muestra alta estabilidad y una corriente invariante dentro de los 8 ciclos de voltametría cíclica. El voltagrama D) es la

excepción, puesto que presenta un desfase negativo en el patrón de ciclos, por tanto, se asume que el electrodo se encuentra dañado y las mediciones electroquímicas estarían desplazadas y serían poco confiables. Por tanto, se descartan de esta investigación todos los electrodos que presentan un comportamiento de desfase durante el proceso de estabilización.

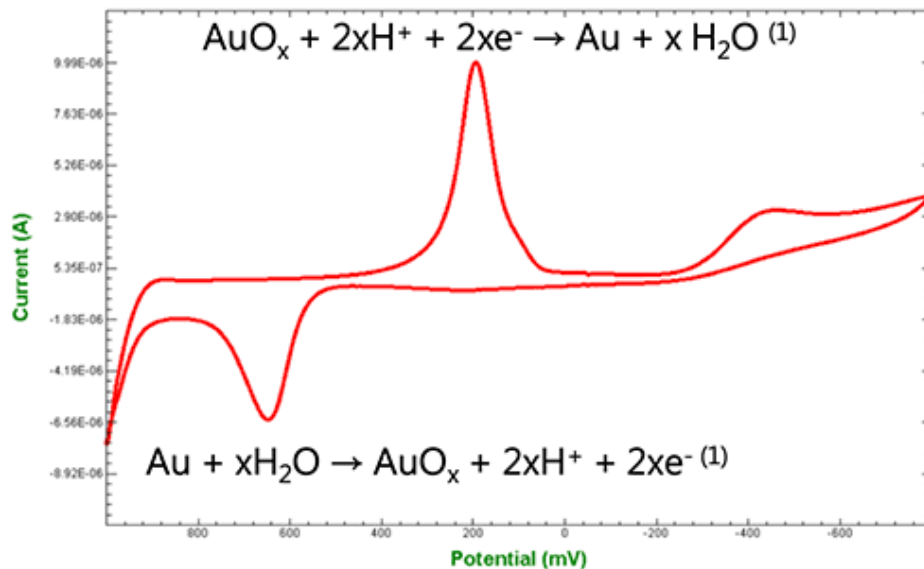
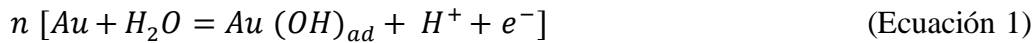
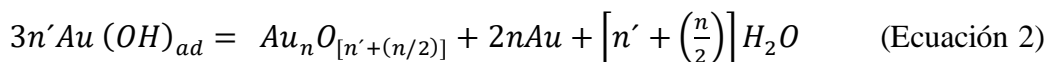


Figura 27 Picos característicos de la oxidación del oro a 200 mV y su reducción a 700 mV [4].

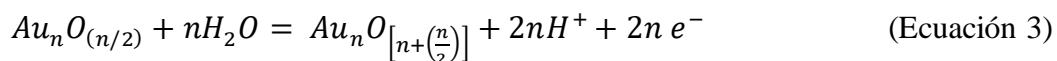
Esta evidencia soporta el comportamiento característico del oro bajo la influencia de un potencial eléctrico. Diversas investigaciones sustentan que una solución tampón de PBS a pH 9.0 durante un barrido positivo presenta un pico de oxidación entre 0.2 y 0.26 V un pico de reducción entre los 0.7 a 0.8 V como se muestra en la Figura 27. La diferencia de potencial entre dichos valores se asocia a la composición de la solución tampón, temperatura y pH [4]. A continuación, se presenta el posible mecanismo de reacción para explicar el comportamiento de la interfase del metal con una solución bajo una perturbación potenciodinámica. Teniendo en cuenta que la composición de la mayoría de los buffers en solución es agua, bajo la influencia de un potencial en un rango variable interrelacionado directamente en la reacción. Es altamente probable que la reacción anódica empiece con la participación de moléculas de agua (Ecuación 1).



Donde "n" es el número de átomos que reaccionan sobre la superficie del electrodo por cm^2 . El valor máximo de "n" involucra el número total de átomos disponibles sobre la superficie. La reacción de la Ecuación 1 alcanza el equilibrio rápidamente, ya que, la concurrencia de moléculas (OH^-) adsorbidas sobre los átomos de oro es dependiente del potencial y de la reacción de desproporción química donde un elemento es al mismo tiempo oxidado y reducido. El primer paso en la (Ecuación 1) da lugar a la siguiente ecuación (Ecuación 2).



El proceso de oxidación involucra la formación de especies estables de óxido de oro sobre la superficie, la relación estequiométrica es comparable a Au_2O_3 y una regeneración parcial del metal libre sobre la superficie.



La formación de especies oxidadas involucra un equilibrio superficial y es probable que proceda del mecanismo consecutivo de la transferencia de un electrón (Ecuación 3). Dicha reacción puede ser postulada como una serie de pasos consecutivos [5].

Existen diversas investigaciones y mecanismos postulados para la reacción de oxidación formada sobre la superficie del electrodo, dicha capa de óxido no es estable. Sin embargo, después de la limpieza de un electrodo la altura del pico anódico de corriente predomina sobre el resto de los picos anódicos; la monocapa de óxido es poco propensa a afectar los procesos de voltametría, pero genera señales claramente visibles y la posición de sus picos está en función del tipo de electrolito, el pH, la rugosidad de la superficie y la temperatura [6]. Por el contrario, la reacción de oxidación de hidrógeno sobre oro, es un proceso irreversible capaz de alterar la cinética del electrodo, la formación de este se da bajo condiciones ácidas fuertes y bajo potenciales arriba de 1000 mV [6].

5.1.2 Optimización de condiciones experimentales para generar ECL

El desarrollo del biosensor se basa en dos partes principales: 1) el receptor o componente biológico, en este caso la enzima ALP, y 2) el transductor, el cual recibe la señal biológica y la transforma a una señal óptica luminiscente. Ambas partes deben tener un balance en el sistema y se deben considerar los factores que podrían tener mayor influencia sobre el sistema. Para obtener una emisión de luz eficiente el pH y la concentración de cada elemento del sistema de luminol, deben ser estudiados minuciosamente para obtener un alto rendimiento y un proceso reproducible. Por esta razón, es importante conocer el valor óptimo de dichos parámetros y su efecto sobre la emisión de luz en el sistema.

5.1.2.1 Efecto del luminol sobre la emisión de luz

Para tener un mejor efecto sobre la intensidad de luz producida en un sistema ECL en un medio acuoso, se mantuvieron todas las variables del sistema constantes y se utilizó la técnica de voltametría cíclica en un rango de potencial de E1 -0.5 a E2 0.6 V como sistema estándar para todas las pruebas. Se decidió probar diferentes concentraciones de luminol sobre el sistema estándar para evaluar la generación de luminiscencia. Se llevó a cabo la ejecución de corridas experimentales de acuerdo con el volumen y concentración presentes a continuación (Tabla 11).

Tabla 11. Relación de volumen experimental de soluciones para la generación de ECL.

Buffer 0.1 M	Luminol	Peróxido de hidrógeno 30%
22 μ L	16 μ L (15 mg/mL)	16 μ L
22 μ L	16 μ L (10 mg/mL)	16 μ L
22 μ L	16 μ L (5 mg/mL)	16 μ L
22 μ L	16 μ L (2.5 mg/mL)	16 μ L
22 μ L	16 μ L (1.5 mg/mL)	16 μ L
22 μ L	16 μ L (0.65 mg/mL)	16 μ L

La Figura 28 muestra los valores obtenidos de ECL variando las concentraciones de luminol sobre un sistema control. En la Figura 28A se utilizó un sistema a base de PBS a pH 9.0 en un intervalo 0.65 a 15 mg/mL de luminol, se observa la mayor respuesta analítica a una concentración de 2.5 mg/mL.

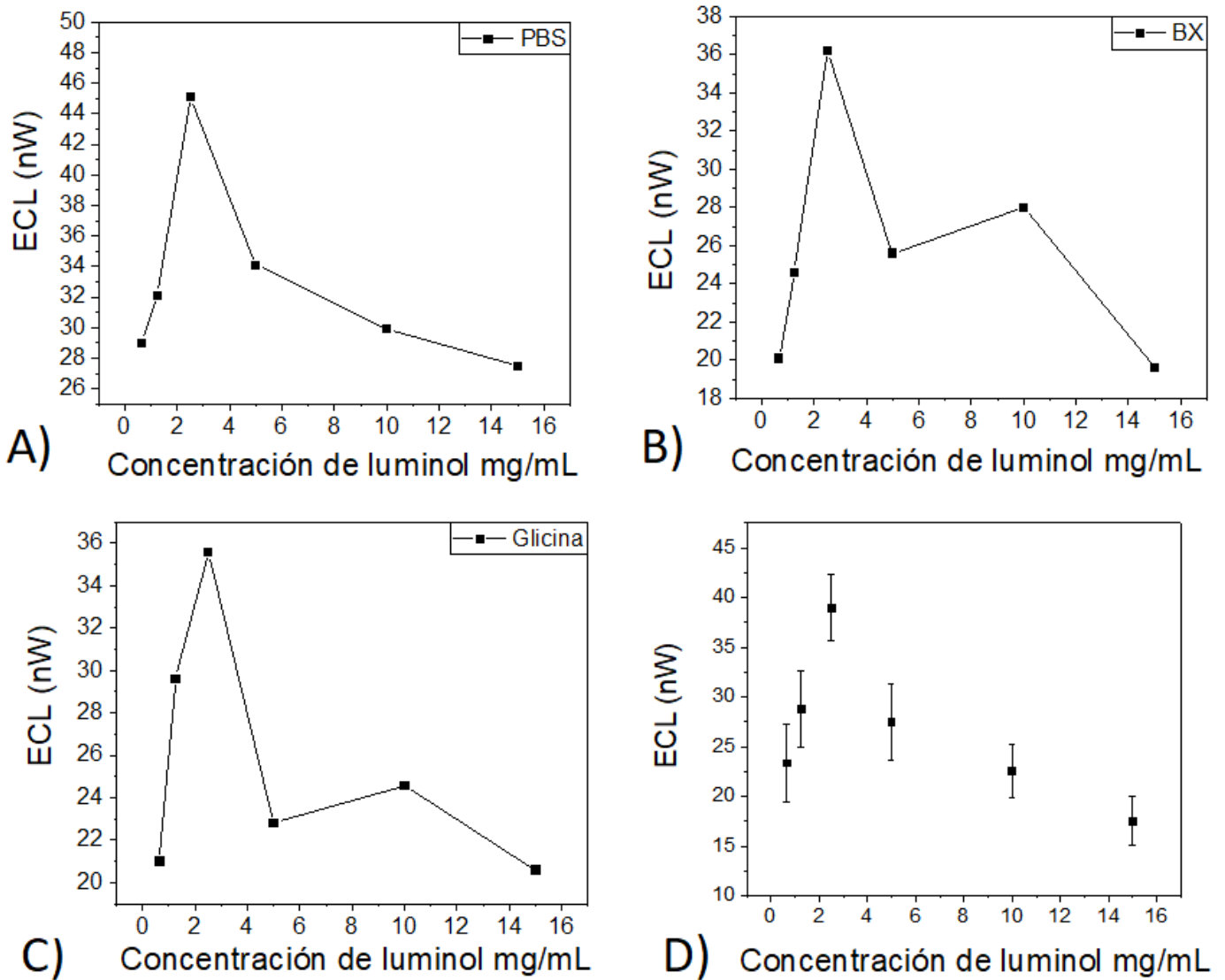


Figura 28 Efecto de las concentraciones de luminol (0.65, 1.25, 2.5, 5, 10 y 15 mg/mL) sobre la emisión de luz en A) PBS a pH 9. En B) buffer de borato a pH 9.5. En C) Buffer de glicina a pH 10. En D) Emisión promedio.

En la Figura 28B se estudia el comportamiento de la emisión utilizando un sistema a base de borato a pH

9.5 en un rango de concentración 0.65 a 15 mg/mL de luminol, observando una disminución en luminiscencia comparado con el sistema A). Ambos sistemas coinciden en que la mayor emisión se da a una concentración de 2.5 mg/mL de luminol. En la Figura 28C se estudia un sistema a base de Glicina a pH 10.0 en un rango 0.65 a 15 mg/mL de luminol, observando que la mayor respuesta analítica apareció a concentración de 2.5 mg/mL. En la Figura 28D se hace una comparación de cada concentración de luminol sobre los tres sistemas estudiados previamente. Todos los sistemas generan luz en mayor o menor medida. Se observa claramente, que en el caso de las concentraciones de 10 y 15 mg/mL se obtienen una menor definición de la ECL. Esto es atribuible a que en soluciones concentradas los fotones emitidos por un luminóforo son absorbidos por otro, generando la superposición de los espectros de emisión y absorción, lo que resulta en la pérdida del fotón dentro del sistema observando una menor emisión de luz; a este fenómeno se le conoce como re-absorción y reincide con altas concentraciones de luminóforos [6]. De manera contraria, a menor concentración de luminol se observa una mayor emisión de ECL. Siendo la concentración de 2.5 mg/ml, la que destaca en todos los sistemas como la mayor intensidad de emisión, generando una emisión promedio de 38.5 nW, es decir, la mayor luminiscencia entre todos los sistemas.

5.1.2.2 Efecto del peróxido de hidrógeno sobre la emisión de luz

El segundo aspecto importante para obtener un mejor efecto de la emisión de luz en un sistema ECL en un medio acuoso, es la concentración de peróxido de hidrógeno. Para dichos experimentos se mantuvieron todas las variables del sistema constantes por medio de la técnica de voltametría cíclica en un intervalo de potencial de E1 -0.5 a E2 0.6 V para todas las pruebas. Se decidió probar diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno para evaluar su efecto sobre la generación de luminiscencia. Se llevó a cabo la ejecución de corridas experimentales de acuerdo con el volumen y concentración presentes a continuación (Tabla 12).

Tabla 12. Relación de Volumen experimental de soluciones para la generación de ECL.

Buffer (M)	Luminol 2.5 mg/mL	Peróxido de hidrógeno
22 μ L	16 μ L	16 μ L 30 %
22 μ L	16 μ L	16 μ L 25 %

22 μ L	16 μ L	16 μ L 20 %
22 μ L	16 μ L	16 μ L 15 %
22 μ L	16 μ L	16 μ L 10 %
22 μ L	16 μ L	16 μ L 5 %

La Figura 35 muestra los valores obtenidos de intensidad de luz por ECL utilizando concentraciones variables de peróxido de hidrógeno sobre diferentes sistemas. En la Figura 35A se utilizó un sistema a base de PBS a pH 9.0 en un rango 5 a 30 % de peróxido de hidrógeno, observando la mayor respuesta analítica apareció a una concentración de 30 %. El sistema PBS no será utilizado para el desarrollo del biosensor por su contenido de especies fosfatadas, por tanto, solo se tomaron en cuenta las características que arrojó dicho sistema. En la Figura 29B se estudia el comportamiento de la emisión utilizando un sistema a base de borato a pH 9.5 en un rango de concentración 5 a 30 % de peróxido de hidrógeno, observando que la mayor respuesta de ECL se da a una concentración del 10 % peróxido de hidrógeno. En la Figura 29C se estudia un sistema a base de Glicina a pH 10.0 en un rango de concentración de 5 a 30 % de peróxido de hidrógeno, observando que la mayor respuesta analítica aparece a una concentración al 10 %. En la Figura 29D se hace una comparación de cada concentración de peróxido de hidrógeno sobre los tres sistemas estudiados previamente. Todos los sistemas generaron luz en mayor o menor medida. Se observa claramente, que en el caso de las concentraciones de (5 %) se obtiene una menor definición de la ECL. También se aprecia que, para las concentraciones de 15, 20, 25 y 30 mg/mL la emisión de luz es similar. De acuerdo con el sistema utilizado en medio acuoso, la concentración al 10 % destaca por generar una emisión de 52.5 nW en promedio, es decir, la mayor luminiscencia entre todos los sistemas.

De estos resultados, se deduce que la emisión de luz es dependiente de las concentraciones de luminol y peróxido según el mecanismo de ECL previamente descrito (sección 2.2.6). Dicho mecanismo estipula que la molécula de luminol (2,3-Aminoftaloilhidracina) debe encontrarse en medio básico, para lo cual se utilizó un pH entre 9.0 y 10.0. Dicha molécula en presencia de un potencial eléctrico se desprotona, el potencial eléctrico actúa como un catalizador, permitiendo la formación de un intermediario Azoquinona, el cual debe ser oxidado para producir 3-aminoftalato; esta es una molécula clave para generar el estado excitado. En este caso, se destaca la participación del peróxido de hidrógeno que interacciona directamente

sobre el intermediario Azoquinona para producir un endoperóxido, el cual decae a su estado fundamental para emitir luz. De este último paso depende la emisión de luz, por esta razón, es de suma importancia adecuar las concentraciones de luminol y peróxido a los sistemas de estudio. El detalle del proceso de ECL y generación de luz se representa en la Figura 30.

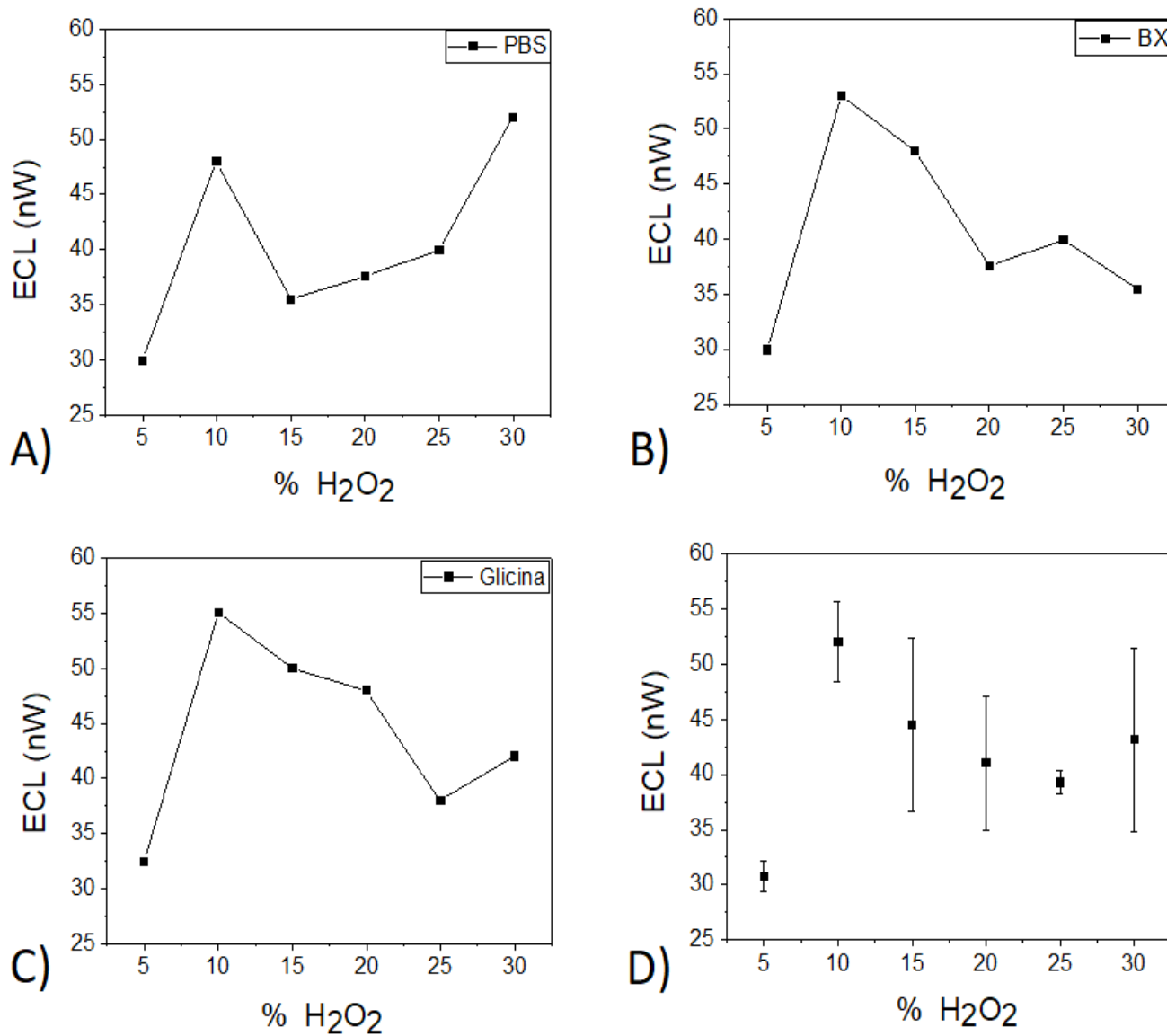


Figura 29 Efecto de las concentraciones de peróxido de hidrógeno (5, 10, 15, 20, 25 y 30 %) sobre la emisión de luz en A) PBS a pH 9. En B) buffer de borato a pH 9.5. En C) Buffer de glicina a pH 10. En D) Emisión promedio.

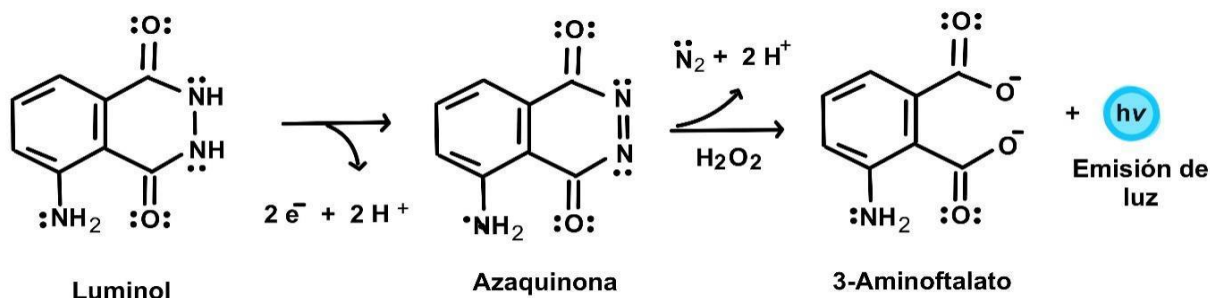


Figura 30 Mecanismo del luminol para la emisión de luz.

5. 1. 3 Determinación del área electroactiva del luminol

A través de la técnica de voltametría cíclica se determinó el intervalo de potenciales negativos y positivos del siguiente sistema: (Buffer, solución luminol 2.5 mg/mL y solución de peróxido al 10 %) bajo las siguientes condiciones: En un intervalo de potenciales de $E_1 = 0V$ a $E_2 = 1.2V$ a un pulso de 0.025 V por 0.07 s a una velocidad de barrido de 0.05 V/s en un intervalo de corriente promedio de 100 mA. Partiendo de dichas condiciones experimentales se hizo un análisis del sistema sobre el barrido lineal de potencial.

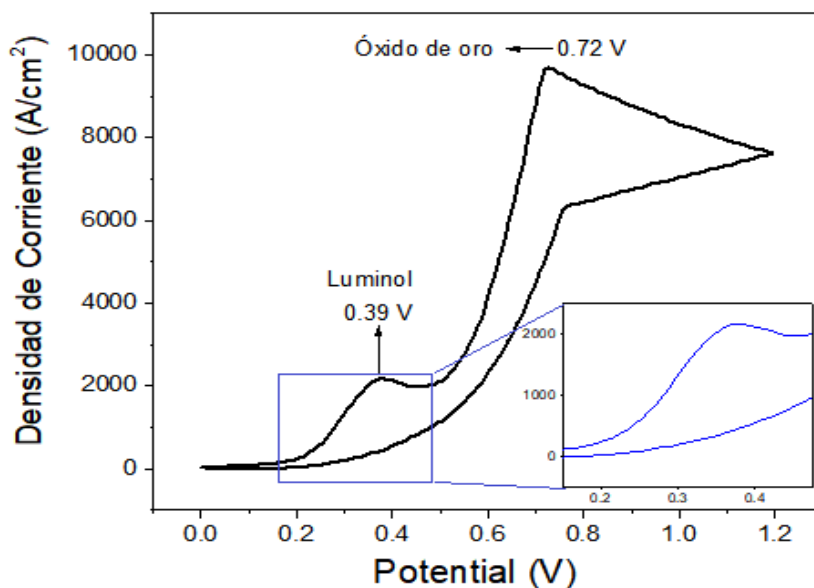


Figura 31 Determinación del intervalo de potencial experimental para la emisión del luminol en un intervalo de potencial de $E = 0V$ a $E_2 = 1.2V$.

En la Figura 31 se presenta la respuesta electroquímica de un electrodo de oro en presencia de un sistema de luminol, en el cual es posible observar la existencia de dos picos de oxidación durante el barrido en el

sentido de barrido anódico marcados por flechas a 0.39 y 0.72 V. El pico localizado en aproximadamente 0.4 V se atribuye a la oxidación del luminol para formar el grupo diazoquinona como se muestra en la Figura 32 [8]. El segundo pico presenta una mayor intensidad de corriente localizado en 0.72 V del barrido anódico, dicho pico está relacionado con la oxidación de especies adsorbidas en la superficie del electrodo. Dicho proceso concurre con la reducción del óxido de oro formado durante el barrido positivo. Sin embargo, se debe mencionar que el proceso de interés en este trabajo destaca en aproximadamente 0.42 V.

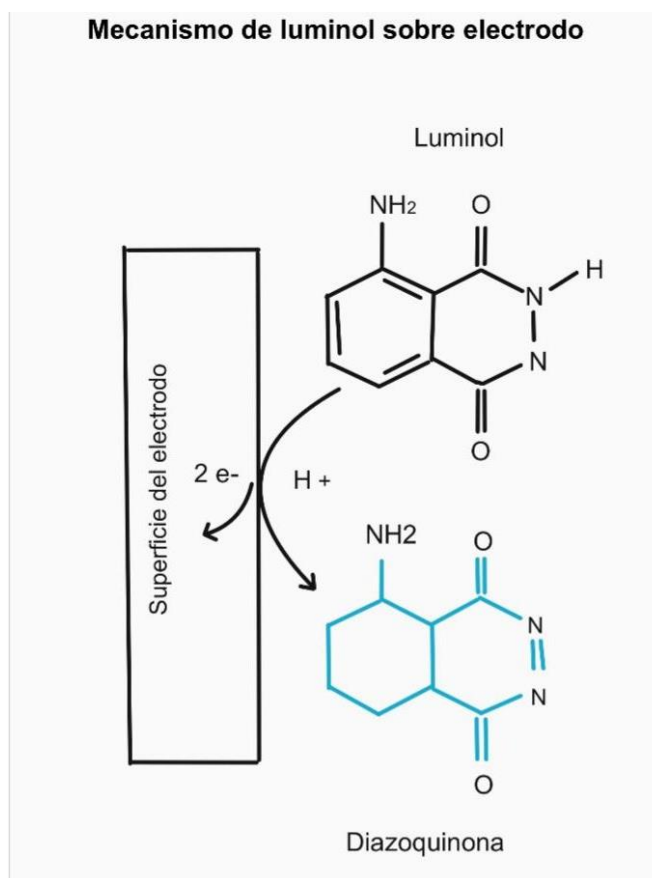


Figura 32 Esquema del mecanismo del luminol sobre un electrodo para producir ECL [8].

5. 1. 4 Efecto de la emisión de luz sobre electrodos

El objetivo de este estudio es obtener un biosensor con las características analíticas adecuadas para la detección del ión fosfato. El desarrollo de este biosensor se basa en la emisión de luz y su decaimiento,

por tanto, para tener un mejor entendimiento del efecto del sistema de luminol sobre la emisión de luz, se probaron dos tipos de electrodos serigrafiados: uno con tinta de carbón y otro con tinta de oro. Es importante analizar el rendimiento del sistema control en un intervalo de potencial para comparar la capacidad de óxido-reducción de ambos electrodos. De acuerdo con los estudios obtenidos anteriormente el sistema control se establece como el buffer a pH básico, solución de luminol al 2.5 mg/mL y peróxido de hidrógeno al 10 %. El estudio se realizó por la técnica de voltametría cíclica en un intervalo de potencial de E1 -0.2 a E2 0.6 V en un intervalo de corriente de 100 nA a 5 A.

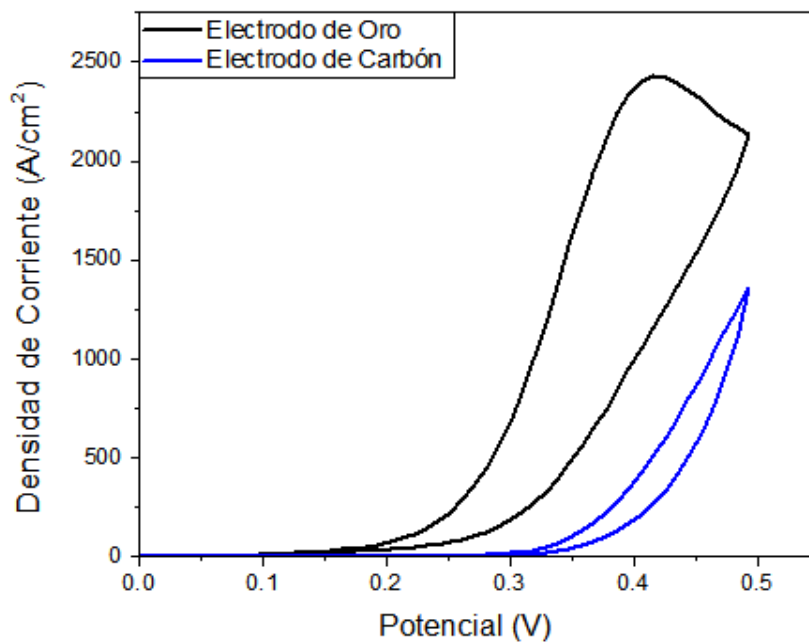


Figura 33 Voltagrama cíclico de un sistema de luminol con electrodo de oro (curva negra) y electrodo de carbón (curva azul).

La Figura 33 muestra la diferencia entre la densidad de corriente de un electrodo de oro y un electrodo de carbón. La curva color negro corresponde al electrodo de oro, es evidente que dicho electrodo presenta una densidad de corriente alta, el pico máximo se observa aproximadamente entre 0.3 y 0.5V. En cambio, la densidad de corriente del electrodo de carbón se ve significativamente decaída en el mismo intervalo de potencial. Es evidente que el sistema de luminol sobre un electrodo de oro es más eficiente.

Asimismo, se evalúan ambos electrodos bajo las mismas condiciones mediante la detección de un fotodiodo, dicho dispositivo permite determinar la cantidad de luz emitida. La Figura 34 muestra la

respuesta ECL para dos electrodos. En A) se presenta el comportamiento de un electrodo de oro, observando una respuesta analítica de 88.6 nW; mientras que en B) se presenta el comportamiento de un electrodo de carbón, el cual presenta una respuesta de 24.2 nW significativamente menor al de oro. La diferencia entre ambos electrodos se basa en la actividad electroquímica de los materiales que los conforman [22]. Los electrodos deben presentar las siguientes características para ser funcionales: un comportamiento de óxido-reducción favorable en presencia del analito, facilidad para llevar a cabo la transferencia de electrones, procesos repetibles y una ventana de potencial útil para el análisis [10].

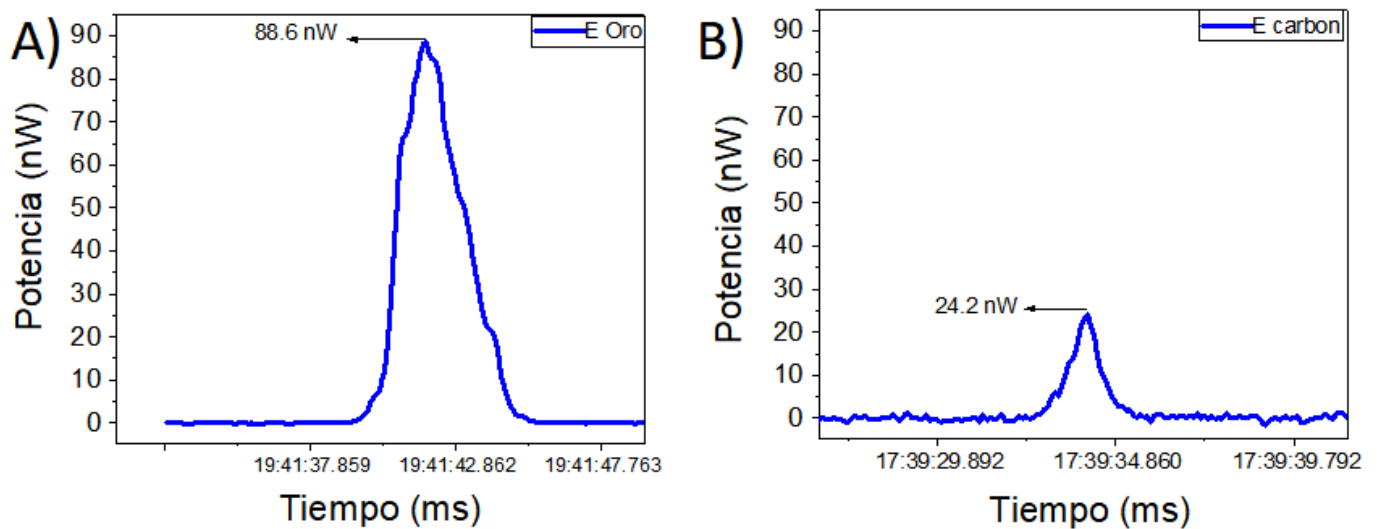


Figura 34 Respuesta de la emisión de luz sobre electrodo A) de oro y B) electrodo de carbón.

Los electrodos de oro presentan las características previamente descritas, a excepción de un uso limitado en el intervalo de potencial positivo por la formación de óxido de oro sobre la superficie. Sin embargo, para esta investigación la formación de óxido de oro no afecta el estudio, ya que, los picos correspondientes al luminol se encuentran entre un potencial de 0.3 y 0.5 V [9]. Por otro lado, los electrodos de carbón permiten el barrido en potenciales más negativos comparado con los electrodos de oro. Sin embargo, los electrodos de carbón a pesar de ser útiles y de bajo costo tienen la desventaja de ser menos conductores, son más propensos a los daños mecánicos durante su uso y existe una variabilidad de la calidad entre electrodos idénticos [10].

Para el sistema de luminol utilizado en esta investigación la luz emitida puede observarse en la oscuridad; la radiación electromagnética ha sido reportada a 425 nm del espectro visible, por tanto, es posible

observarla a simple vista como una coloración azul claro brillante [11]. En la Figura 35 se hace una comparación de la intensidad de emisión de luz ECL de un sistema de luminol sobre un electrodo de oro A) y un electrodo de carbón B) en un ambiente oscuro, observando que la emisión de la luz electrogenerada sobre un electrodo de oro es significativamente más intensa que la luz electrogenerada sobre un electrodo de carbón. Cabe señalar que para esta investigación se hace uso de un dispositivo fotosensible para cuantificar la emisión. Si comparamos los resultados previamente obtenidos al analizar la densidad de corriente (Figura 33) y la emisión ECL a través de fotodiodo (Figura 34) se confirma que el electrodo de oro presenta una respuesta electrogenerada de mayor intensidad.

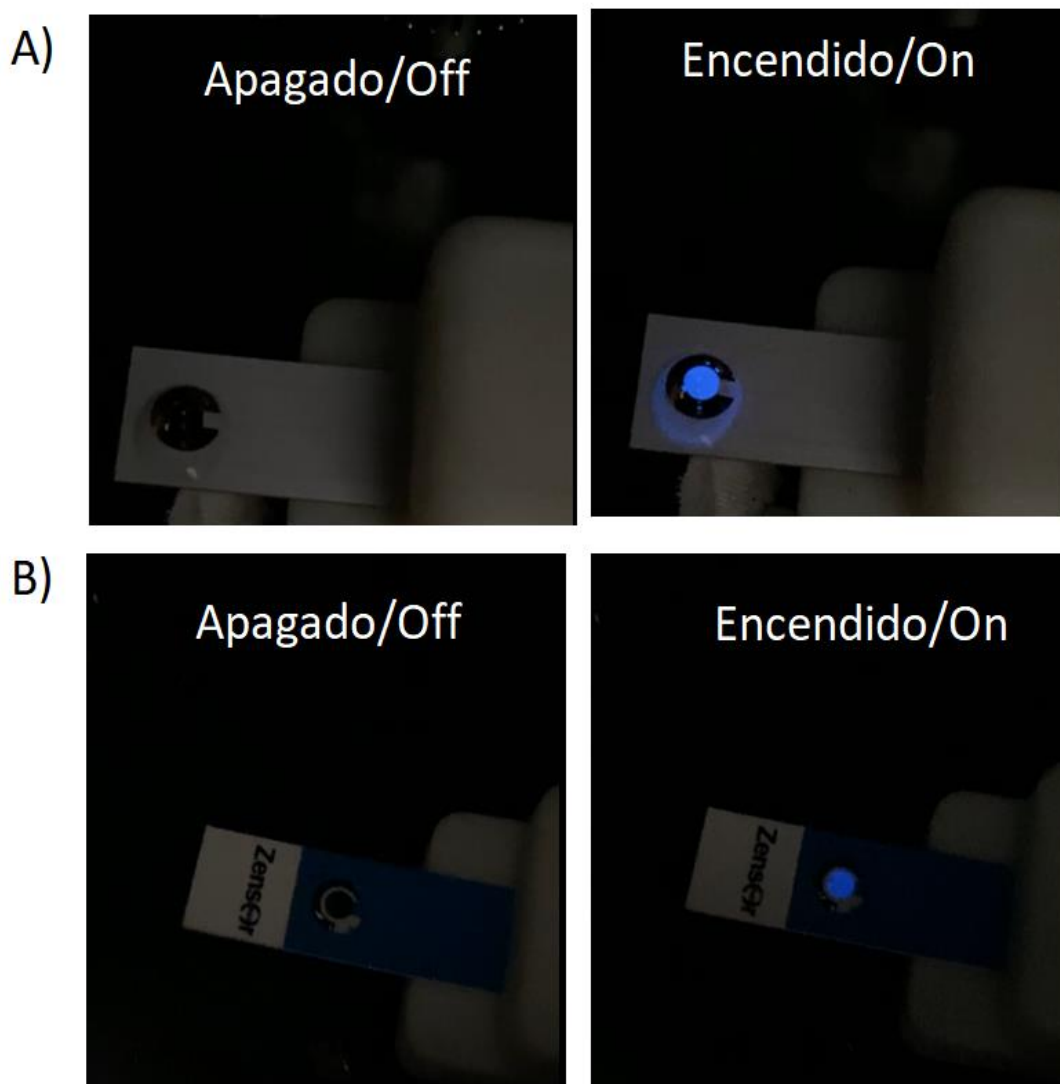


Figura 35 Respuesta de emisión de luz sobre un electrodo A) de oro y B) electrodo de carbón, en un ambiente oscuro.

5. 1. 5 Efecto de la concentración de ácido fosfórico sobre la emisión ECL

Una vez obtenida una interfase electroquímica estable de la reacción ECL del luminol con peróxido de hidrógeno, se procedió a identificar posibles vías y mecanismos para el funcionamiento del biosensor. En función de las condiciones previamente descritas en la sección anterior. Teniendo un mejor entendimiento del efecto de la emisión de luz en un sistema de luminol, se decidió hacer un estudio para probar el efecto del ácido fosfórico sobre el sistema de luminol. La Figura 36 muestra el efecto de la concentración de ácido fosfórico en función del pH; para lo cual se utilizaron concentraciones en un rango de 50 a 300 mM de ácido fosfórico, obteniendo una respuesta en el intervalo de 2.05 y 2.6 pH. Dichos valores concuerdan con el aumento de la concentración de ácido fosfórico.

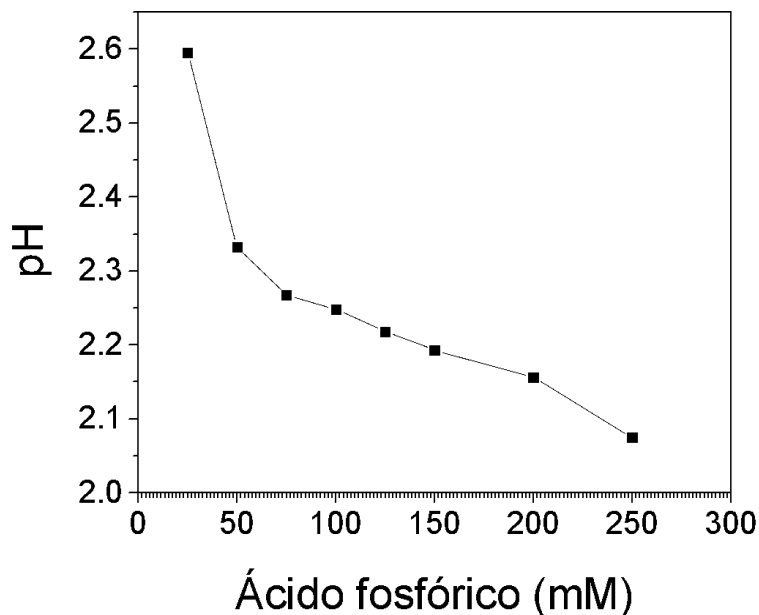


Figura 36 Efecto de la concentración del ácido fosfórico sobre el pH.

Bajo estas concentraciones se estudia la influencia del ácido sobre la emisión de ECL en un sistema de luminol. El sistema base utilizado para dicha prueba fue compuesto por buffer a pH básico, solución de luminol al 2.5 mg/mL y peróxido de hidrógeno al 10 %. El estudio se realizó por la técnica de voltametría cíclica en un intervalo de potencial de E1 -0.2 a E2 0.6 V, en un intervalo de corriente de 100 nA a 5 A para todas las pruebas. La Figura 37A muestra las curvas de la detección de ECL bajo la influencia creciente de una concentración de ácido fosfórico, la curva color negro representa la curva control del

sistema a concentración sin ácido fosfórico. La respuesta electroquímica se observa entre los potenciales 0.3 y 0.5 V como picos definidos, los cuales son correspondientes a la emisión de luminol [8]. Las curvas del voltograma presentan una disminución progresiva de la emisión ECL conforme aumenta la concentración de ácido. La Figura 37B muestra la emisión de luz (I) respecto a la emisión de luz inicial (I_0), conforme aumenta la concentración de ácido fosfórico. Es claro que se ejerce un efecto que resulta en una menor emisión de luz ECL. Diversas investigaciones han estudiado el efecto de quenching que tienen diferentes sustancias y especialmente el pH ácido sobre el luminol, concentraciones altas de ácido llevan a la descomposición del intermediario 3-aminoftalato, por tanto, no se logra alcanzar el estado excitado y no se genera el desprendimiento de un fotón [53]. Esto explica el comportamiento de decaimiento en la Figura 37A.

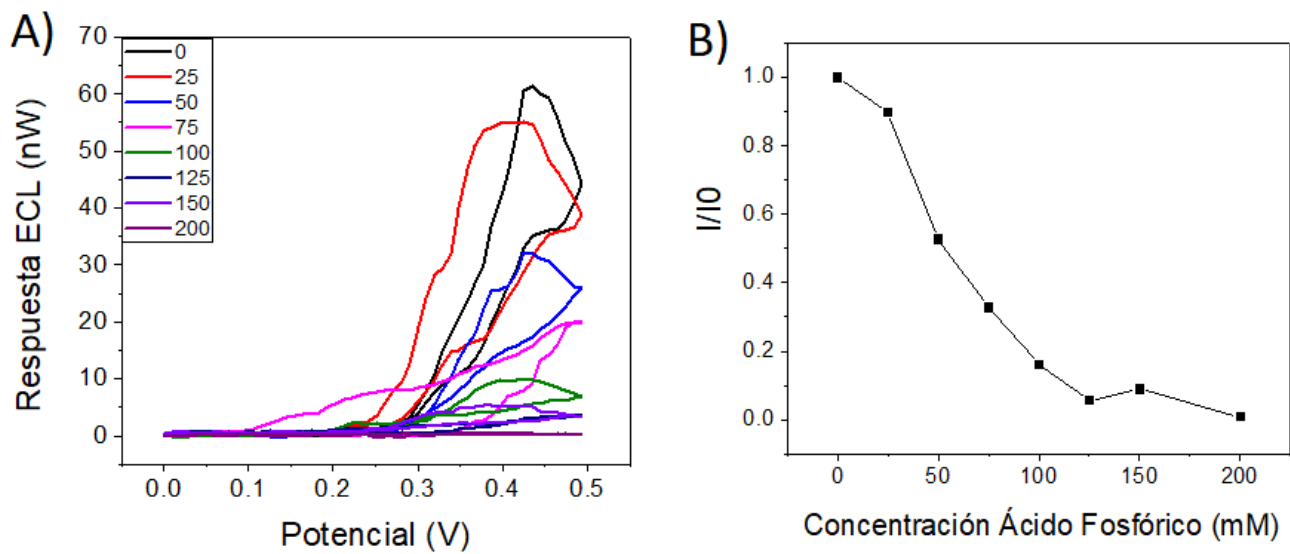


Figura 37 Efecto de la concentración del ácido fosfórico sobre la emisión de luz ECL. A) Voltograma cíclico del efecto de la concentración de ácido fosfórico sobre el sistema luminol. B) Emisión de luz obtenida bajo la influencia de la concentración de ácido fosfórico.

Es claro que la adición de compuestos ácidos tiene una influencia significativa sobre el sistema de luminol, esto se explica porque en condiciones alcalinas la molécula de luminol es capaz de desprotonarse para llevar a cabo la cascada subsecuente de pasos para generar una respuesta ECL como se explicó anteriormente en la sección (2.2.6). Ha sido ampliamente investigado y probado que el pH juega un papel vital en la electroquímica del luminol. A pH bajos la intensidad de emisión de luz del luminol es drásticamente reducida, mientras que a pH significativamente mayores la respuesta electroquímica del

luminol aumenta [12].

5.2 Desarrollo de un biosensor electroquimioluminiscente

5.2.1 Componentes del sistema

Los biosensores acoplados a ECL constan de un elemento biológico, en cuyo caso para esta investigación, se utiliza la enzima Fosfatasa Alcalina (ALP) como catalizador de una reacción. Dicha enzima está acoplada a un elemento transductor capaz de producir una respuesta óptica, para lo cual, se utilizó un sistema de luminol. Este tipo de biosensores combinan las ventajas de los métodos electroquímicos con la especificidad de las enzimas para obtener una respuesta determinada. Al utilizarse como componente biológico la enzima ALP, es necesario tener en cuenta que las enzimas son proteínas con una estructura terciaria, las cuales pueden bajar su actividad enzimática o desnaturalizarse y perder su estructura ante diferentes condiciones químicas y físicas.

Se deben tener en cuenta los dos factores que influyen sobre la actividad catalítica de las enzimas:

-Temperatura: Las enzimas tienen un rango específico de funcionamiento, si la temperatura es menor no se presenta actividad enzimática y si la temperatura es mayor la enzima se desnaturaliza y no regresará a un estado funcional.

-pH: Estructuralmente las enzimas poseen cadenas de aminoácidos, las cuales pueden ser fácilmente ionizadas. Cada enzima presenta su actividad máxima a cierto pH, si este no es el adecuado la enzima estará en estado de ionización y la estructura no será funcional para catalizar una reacción química.

Por esta razón, es importante determinar las condiciones a las cuales va a trabajar la enzima y determinar el medio en el cual se va a desarrollar el biosensor, el cual debe ser adecuado para evitar disminuir la actividad de la enzima o su inhibición.

5.2.2 Efecto de los componentes del biosensor sobre la emisión ECL

Se estudió el efecto de los elementos que conforman el biosensor sobre la respuesta ECL, haciendo pruebas del sistema con cada elemento por la técnica de voltametría cíclica y bajo las condiciones previamente utilizadas en la sección anterior. Para la construcción de un biosensor se utiliza una combinación de

sustancias a base de agua. El sistema consta de un sistema de luminol conformado por: El buffer de interés a pH alcalino, una disolución de luminol y una disolución de peróxido de hidrógeno, donde dichos componentes permiten la emisión de luz. Se realizaron una serie de pruebas para comprobar que los elementos del sistema son compatibles y no interfieren en la emisión de luz; para lo cual se estudia la respuesta amperométrica de los biosensores conforme a los distintos elementos que conforman el sistema.

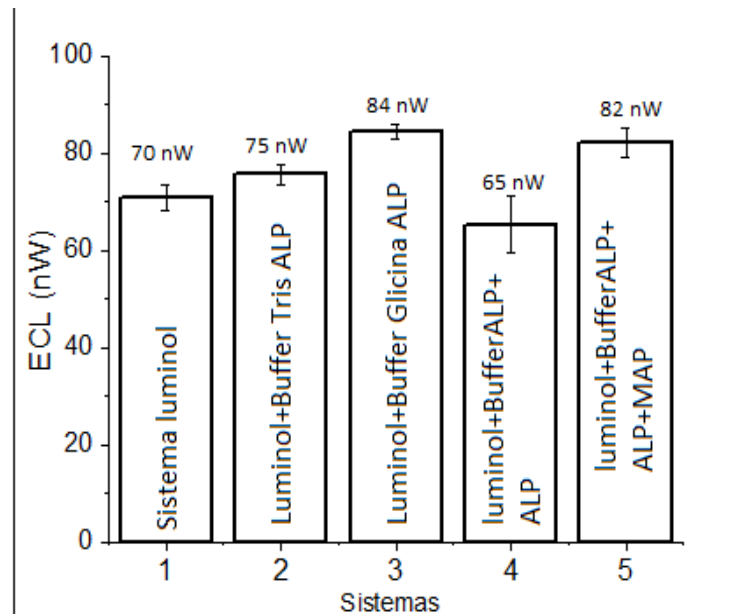


Figura 38 Elementos del sistema que conformarán el biosensor: columna 1 sistema control de luminol.

La Figura 38 muestra la comparación sobre la emisión de luz conforme se agregan los elementos que conforman al biosensor. El sistema 1 se toma como una condición estándar conformado por: (buffer+luminol+peróxido de hidrógeno) con el cual se alcanza una emisión de 70 nW. Al sistema 2 se agrega además del sistema 1, el buffer Tris de la enzima para asegurar que no existe interferencia o inhibición de los componentes del buffer Tris en la emisión de luz. En la Figura 38 columna 2 se observa un ligero aumento en la emisión de luz, por tanto, se asume que no existe interferencia al usar este buffer. El sistema 3 se agrega el sistema 1 junto con el buffer de glicina ALP, en la Figura 38 columna 3 se observa un aumento significativo de la emisión de luz alcanzando un valor de hasta 84 nW, lo que indica que dicho buffer es adecuado para la emisión de luz y no interfiere con la disolución de la enzima. Una vez comprobado que el buffer de la enzima no interfiere en la emisión de luz se agrega el sistema 1 más la enzima, en la Figura 38 columna 4, se observa una disminución de la emisión de luz. Diversas

investigaciones han concluido que la adición de componentes, la viscosidad y el volumen puede resultar en una señal alterada en la emisión de luz [49]. Finalmente, al sistema 1 se adiciona una disolución del fertilizante MAP, la Figura 38 columna 5 muestra una buena intensidad de emisión a 82 nW, lo que indica que el fertilizante no tiene efecto de interferencia o un efecto inhibitorio sobre la emisión de la luz.

Estos resultados son satisfactorios para la generación de luz mediante la técnica de ECL, la cual servirá de base para el desarrollo de un biosensor ECL. Es claro que ninguno de los componentes tiene un efecto inhibitorio o una reducción significativa en la emisión de luz. Por tanto, se procedió a evaluar el volumen de cada elemento, ya que, los sistemas miniaturizados deben funcionar con una cantidad de muestra entre 1-5 μL , se sabe que existe influencia en la concentración de cada elemento [49]. Para esta investigación se determinaron las concentraciones mínimas requeridas para generar un sistema reproducible.

Tabla 13. Volumen de las concentraciones de los elementos que conforman el biosensor.

Sistema	A	B	C	D
Buffer Borato BX (μL)	10	10	10	10
Luminol 2.5mg/mL (μL)	10	10	10	5
Buffer Fosfatasa + Enzima (μL)	5	5	2.5	2.5
Fertilizante MAP (μL)	5	5	2.5	2.5
Peróxido de hidrógeno 10% (μL)	10	5	5	5
Volumen total de sistema (μL)	40	35	30	25
ECL (nW)	83	93	80	74

Un electrodo serigrafiado soporta un volumen máximo recomendable de 50 μL , el volumen es un parámetro importante para obtener una respuesta luminiscente eficiente y reproducible. En la Tabla 13 se muestran los sistemas A, B, C y D donde todos los estudios exhibieron más del 88 % de emisión de luz, lo cual se considera aceptable para esta investigación. Sin embargo, el biosensor a diseñar se basa en un mecanismo on/off. El sistema es dependiente de la emisión de luz, por tanto, se selecciona el sistema con mayor emisión. El sistema que mostró una mayor emisión de luz electrogenerada fue el B con 93 nW, consecutivamente los sistemas A y C mostraron una emisión en un rango aceptable de 83 y 80 nW respectivamente y finalmente el sistema D con 74 nW. Este experimento comprueba que no existe

interferencia en los componentes del sistema para que disminuyan la emisión de luz.

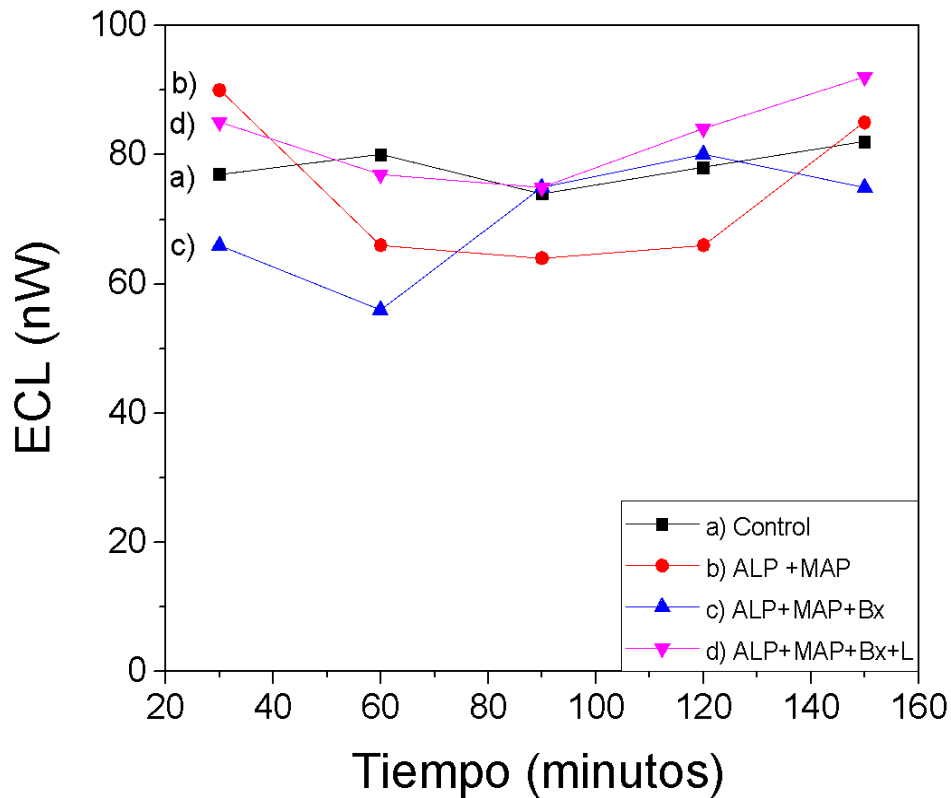
5. 2. 3 **Influencia de los componentes del biosensor sobre la actividad enzimática**

Como ya se mencionó anteriormente, las enzimas son proteínas complejas sensibles a diferentes condiciones tanto físicas como químicas; por tanto, se desarrollaron una serie de experimentos donde se incubó a 37 °C la enzima ALP a diversos tiempos. Posterior a la incubación se lleva a cabo la reacción electroquímica para disminuir interferencias sobre la actividad enzimática. Los sistemas estudiados corresponden a: sistema 1, control; sistema 2, con el fertilizante; sistema 3, con el buffer y el fertilizante; y sistema 4, fertilizante, buffer y luminol. La Figura 39 muestra los cuatro sistemas establecidos, a) el sistema control (línea negra) se mantiene constante durante el tiempo de incubación. El sistema b) (línea roja) dentro de la primera media hora presenta una emisión de luz mayor al sistema control y después de la hora la emisión decae ligeramente. En el sistema c) (línea azul) presenta un decaimiento inicial dentro de la primera hora; sin embargo, posteriormente el sistema c) parece estabilizarse y presenta un comportamiento similar al control. El sistema d) (línea rosa) presenta un comportamiento similar al control.

e incluso parece presentar mayor ECL.

Figura 39 Influencia de los componentes del biosensor sobre la actividad enzimática, incubando los sistemas a 37°. a) Sistema de luminol, b) sistema 2 (ALP+MAP), c) sistema (ALP+MAP+Bx) y d) sistema (ALP+MAP+Bx+L).

En estos experimentos, no se observó una interacción congruente entre la enzima y el fertilizante, es decir, no se observó el comportamiento de decaimiento esperado en el tiempo. Este fenómeno se atribuyó a las



siguientes causas: 1) El fertilizante (MAP) no interacciona con la enzima ALP, 2) El fertilizante ejerce un efecto inhibitorio sobre la enzima ALP, 3) El medio es inadecuado para que la enzima ejerza su actividad. La primera posible causa plantea que no existe una interacción directa entre la enzima y el fertilizante, sin embargo, se sabe que la enzima fosfatasa alcalina interacciona con una vasta diversidad de sustratos que contienen fósforo [20]. En relación con la segunda causa, existen diversas investigaciones donde se estudia el efecto inhibitorio del fosfato sobre la enzima ALP [19][21]; sin embargo, no hay una investigación donde se utiliza fosfato monoamónico como inhibidor específico de la enzima. La tercera posible causa planteada, sugiere que, en la mezcla de componentes elementales del sistema compuesto por buffer de borato, solución

de luminol, peróxido de hidrógeno y el medio de la enzima, podrían existir fuertes interacciones moleculares o intermoleculares que impiden la unión del sustrato con la enzima. Tomando en cuenta las causas anteriores se planteó la manera de eliminar interferencias entre la enzima con el medio, y adicionalmente se buscó un sustrato que permitiera un efecto sobre la emisión de luz.

5. 2. 4 **Búsqueda de solución tampón para sistema enzimático y sistema de luminol**

La actividad de las enzimas depende de numerosos factores incluyendo el pH, la concentración de la enzima, la pureza de la enzima, el ambiente iónico, la temperatura y la solución tampón como se mencionó previamente en la Sección (2.2.2.1). Durante este estudio nos enfocamos en la solución tampón, ya que, diversas investigaciones la señalan como un elemento clave para el reconocimiento específico del sustrato [22]. El uso de un buffer capaz de tener un efecto sobre la enzima y sobre el sistema luminol para la generación de la emisión de luz ECL, evitará el uso combinado de buffers e interferencia de sus componentes y la reducción de la actividad enzimática. De acuerdo con lo estipulado anteriormente, se realizaron pruebas con el buffer de glicina, el cual es específico para la enzima ALP; sin embargo, se utilizó para de igual manera medir la respuesta electroquímica en un sistema de luminol. En la Figura 40 se muestra la respuesta de la solución tampón de glicina a una concentración de 50 mM en un sistema electroquimioluminiscente a base de luminol. La Figura 40A muestra la respuesta de emisión de luz del sistema durante 5 ciclos de voltametría bajo la detección del fotodiodo, el primer pico tiene una respuesta considerable y conforme pasa el tiempo la intensidad de luz decae. La Figura 40B presenta los voltagramas cíclicos del sistema en general, los cuales muestran características atribuibles a una buena interacción entre el buffer de glicina y el sistema de luminol especialmente en la primera curva.

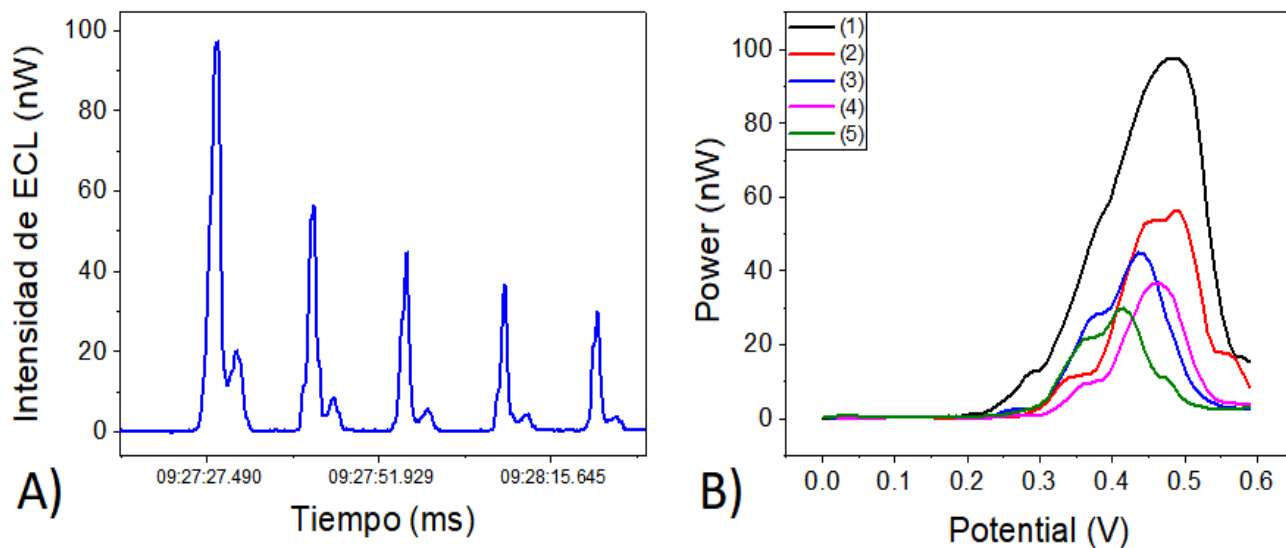


Figura 40 Influencia de la solución tampón de glicina al 50mM sobre la emisión de luz en un sistema de luminol. A) detección de respuesta fotosensible, B) 5 ciclos de voltametría cíclica.

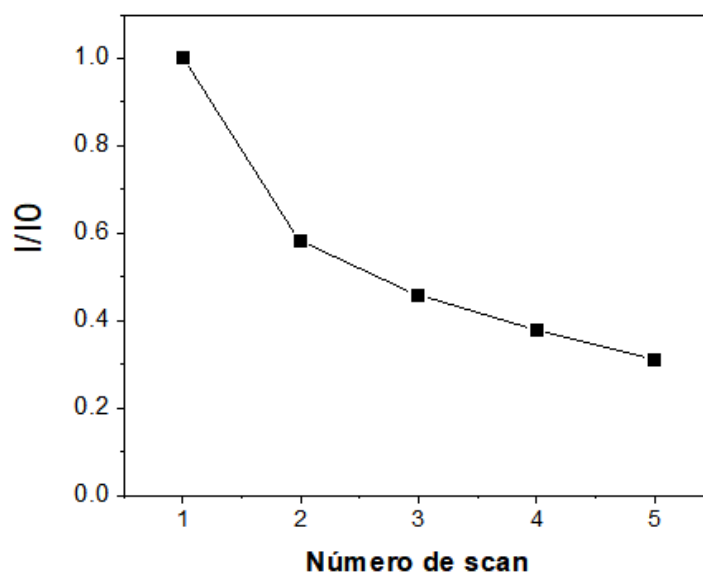


Figura 41 Análisis de la influencia de la solución tampón de glicina al 50mM sobre la relación I/I_0 de emisión de luz en un sistema de luminol.

En la Figura 41 se muestra la emisión de luz (I) sobre la emisión de luz inicial (I_0) del sistema de luminol con un buffer de glicina. En el ciclo número 1 se muestra una respuesta favorable, sin embargo, consecutivamente se observa una disminución significativa en la emisión de luz correspondiente a la oxidación del luminol.

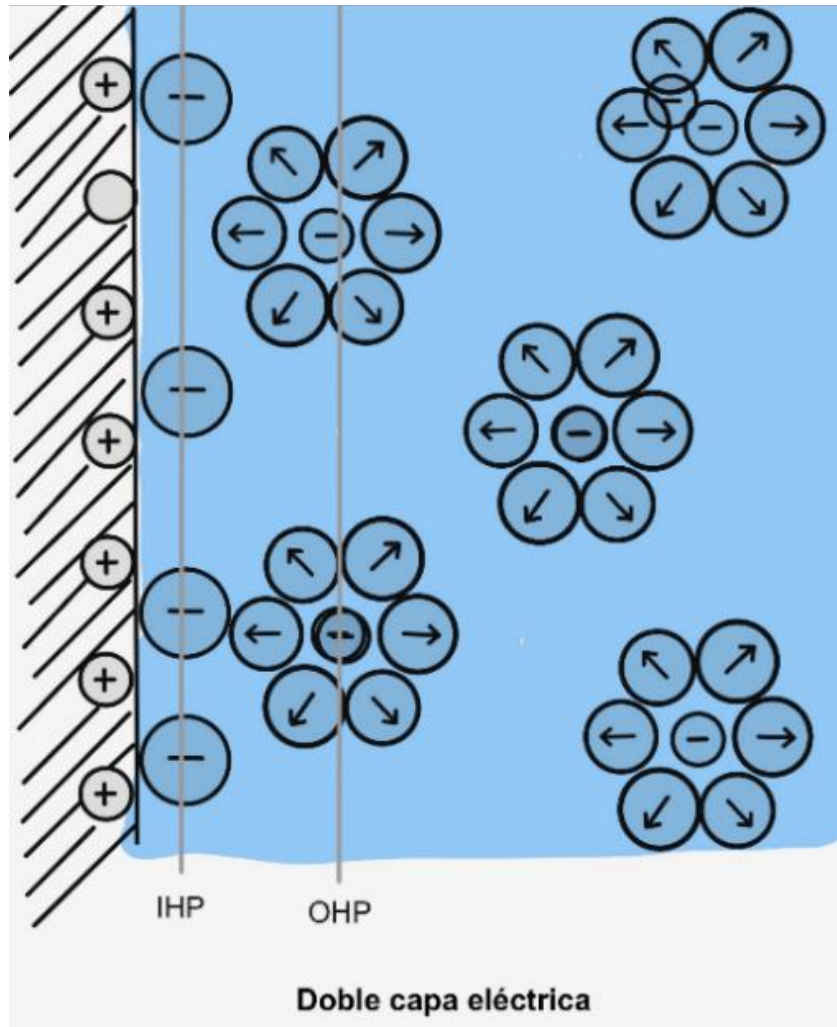


Figura 42 Representación esquemática de la doble capa eléctrica [19].

El comportamiento sucesivo de decaimiento se explica debido al arreglo de la doble capa eléctrica característica de una solución sobre el electrodo. La solución tampón se encarga de permitir la transferencia de electrones en el medio, pero no es capaz de reaccionar con la molécula de interés y tampoco neutraliza las cargas del sistema. Al aplicar un potencial positivo sobre el electrodo, la solución que está en contacto con el electrodo atrae iones negativos a la superficie del electrodo; dichos aniones se adhieren a la superficie y forman una capa uniforme la cual se conoce como plano interno de Helmholtz (IHP). Dicha capa IHP atrae las moléculas solvatadas de cationes, formando lo que se conoce como “capa difusa” la cual funciona como almacenamiento de energía en un campo eléctrico interno. A pesar de la proximidad entre moléculas en la capa difusa el sistema no puede ser neutralizado (Figura 42). Una vez

teniendo una capa difusa estable y un potencial lo suficientemente positivo, la molécula con capacidad de óxido reducción (luminol) será capaz de donar un electrón a la superficie del electrodo, lo que provoca un flujo de corriente en el sistema [19]. Conforme se barre el potencial se observa un aumento en la corriente, siendo directamente asociada a la oxidación del sistema, infiriendo que un mayor número de moléculas han donado electrones. El decaimiento observado en la Figura 40 está en función del tiempo, ya que la formación de IHP requiere el movimiento de las moléculas hasta la superficie del electrodo y el acercamiento de las moléculas con capacidad de óxido-reducción para llevar a cabo la transferencia de electrones. Por tanto, la Figura 40A revela que el tiempo entre cada ciclo es demasiado corto para dar tiempo al movimiento de moléculas en la capa difusa observando un decaimiento progresivo sobre la emisión de luz.

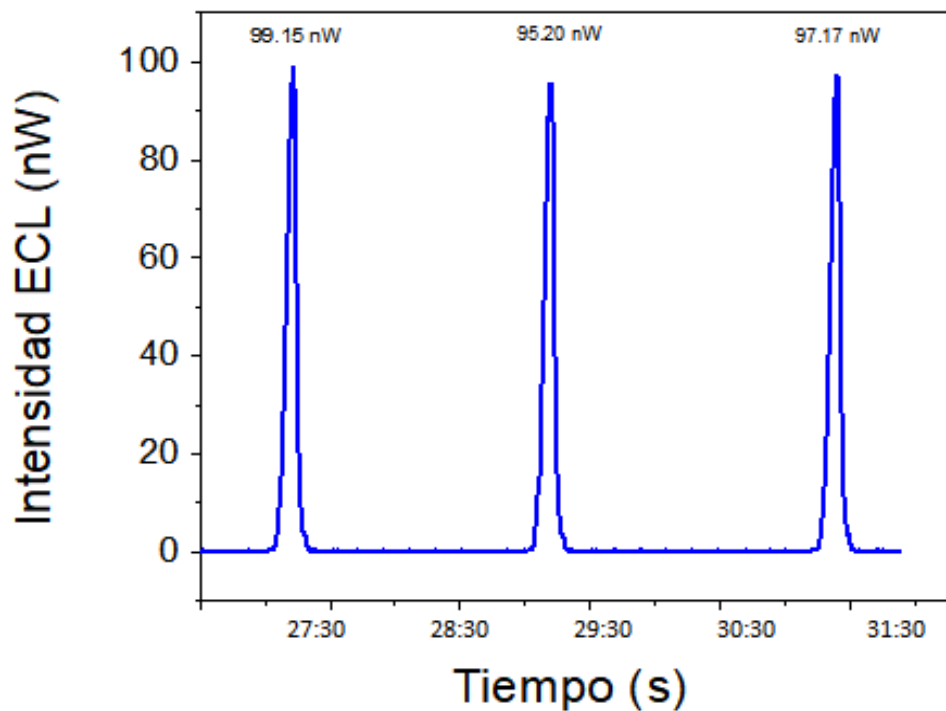


Figura 43 Respuesta de la emisión de luz en el tiempo con una solución tampón a base de glicina.

Se realizaron estudios para probar la estabilidad del sistema a base de luminol con una solución tampón de glicina. Como se mencionó previamente el tiempo es clave para la formación de la capa difusa, por tanto, las pruebas se corrieron con una diferencia de tiempo de al menos 1.5 minutos entre cada ciclo. En la Figura 43 se observan tres picos con una intensidad similar, el primer pico con una emisión de 99.15

nW, el segundo pico con una emisión de 95.20 nW y el tercero con una emisión de 97.17 nW con un promedio de 97.17 ± 1.95 nW. Es claro que el sistema es capaz de restablecer la emisión de luz. Con base en los datos obtenidos es posible mantener ciclos de emisión reproducibles y confiables, para los experimentos posteriores realizados en esta investigación se toman los primeros dos ciclos de voltametría con una diferencia entre el barrido de potencial de al menos un tiempo de 1.5 minutos.

5. 2. 5 Comportamiento de la enzima con solución tampón de glicina

De lo expuesto anteriormente, se sugiere que la solución tampón para la enzima ALP a base de glicina, es la más adecuada para llevar a cabo los estudios de electroquimioluminiscencia en el sistema luminol. En vías de descifrar cambios en la interacción entre la enzima se prueban ácido fólico y MAP bajo las mismas condiciones experimentales: Buffer de glicina, luminol al 2.5 mg/ml, peróxido de hidrógeno al 10%, 5 μ L enzima incubados a 37°C. La Figura 44 muestra un comportamiento totalmente opuesto entre ambos sistemas. La línea roja referente al sistema incubado con el fertilizante MAP muestra un comportamiento lineal en el tiempo, lo que sugiere dos mecanismos: 1) El fertilizante no tiene interacción con la enzima o 2) el fertilizante ejerce un efecto inhibitorio sobre la enzima. Por el contrario, la línea negra referente al sistema incubado con ácido fólico presenta un decaimiento en la emisión de luz, lo que indica que el sustrato junto con la enzima genera condiciones ácidas sobre el sistema permitiendo el decaimiento de la luz.

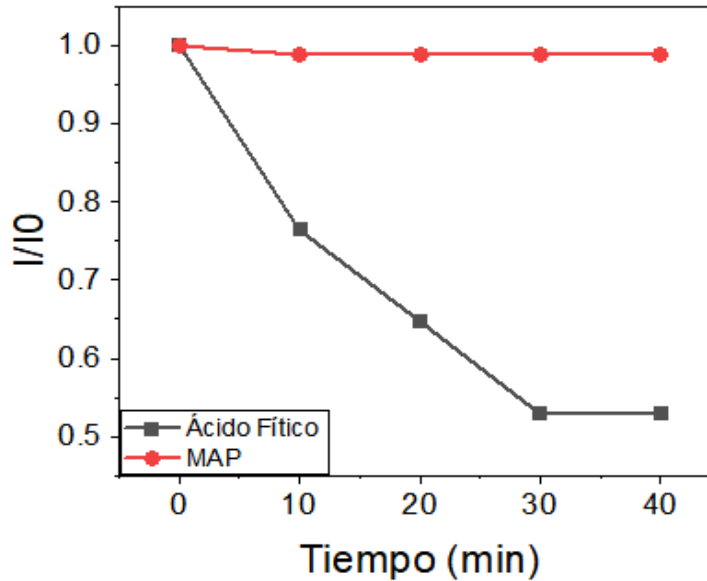


Figura 44 Comparación de la emisión de luz de un sistema con fertilizante MAP (línea roja) y ácido fítico (línea negra) bajo las mismas condiciones de prueba.

5. 2. 6 Substrato de la enzima

De acuerdo con la prueba previamente realizada, se estudia el efecto y la concentración del ácido fítico sobre el sistema de luminol para determinar la concentración idónea para establecer el mecanismo base del biosensor, a partir de 30 min la actividad de la enzima presenta un comportamiento similar, por tanto, las pruebas se ejecutan durante los primeros 3, 6, 9 y 12 minutos. La Figura 45 muestra el efecto del ácido fítico como sustrato de la enzima ALP a diversas concentraciones. Para el sistema a una concentración 0.3 mg/ml (línea negra) se observa una pendiente pronunciada conforme avanza el tiempo, pues al minuto 9 se observa el decaimiento máximo y posteriormente se mantiene e incluso sube un poco la emisión al minuto 12. El sistema a una concentración 0.6 mg/ml (línea roja) tiene un comportamiento de decaimiento menor y la pendiente se observa ligeramente pronunciada. En el sistema concentración 0.9 mg/ml (línea azul) presenta una pendiente ligeramente más pronunciada, sin embargo, durante el minuto 9 y 12, alcanza una emisión similar a la concentración 0.6 mg/mL. Para esta investigación se busca un rango amplio en el decaimiento enzimático, ya que, este será proporcional a la cantidad de enzima inhibida posteriormente, por tanto, la concentración ideal para esta investigación es a una concentración 0.3 mg/ml (línea negra).

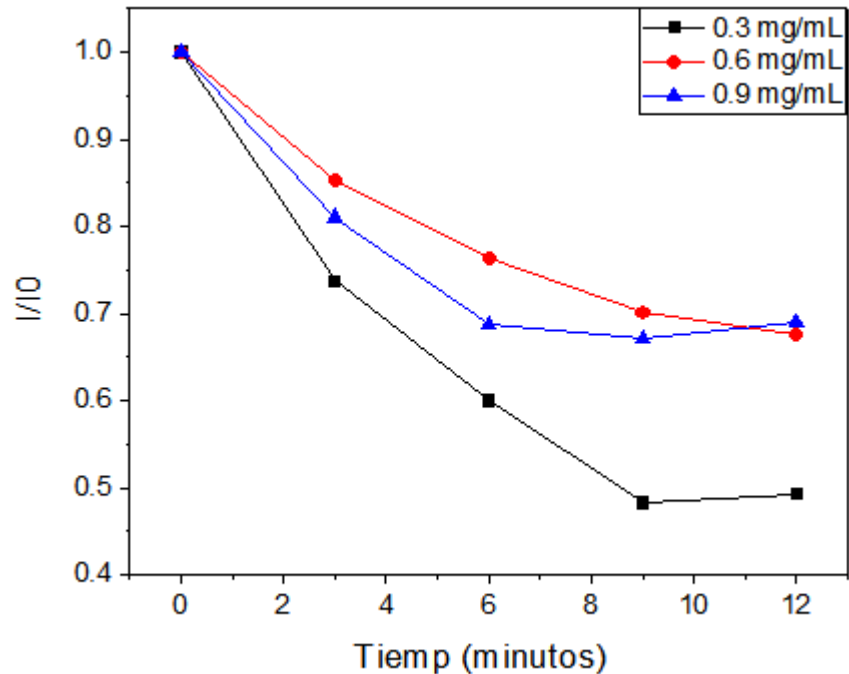


Figura 45 Actividad de la enzima bajo la influencia de ácido fólico. a) 0.3 mg/mL, b) 0.6 mg/mL y c) 0.9 mg/mL. El comportamiento entre la concentración 0.6 y 0.9 mg/mL se puede explicar por el hecho de que diversas investigaciones han encontrado que el producto de reacción de la fosfatasa alcalina, así como fosfato inorgánico (Pi) y el producto de substratos como el p-nitro fenol, son inhibidores competitivos de la fosfatasa alcalina [36]. Igualmente, un aumento en la concentración de sustrato no aumenta la velocidad de la actividad enzimática, por tanto, el comportamiento esperado conforme a una mayor concentración de sustrato, en este caso pudiera presentar una respuesta fluctuante de la enzima, al generar mayor producto de reacción también existe mayor posibilidad de inhibir a la enzima.

5. 2. 7 Mecanismo de detección del biosensor

Los resultados previos revelan que el ácido fólico actúa como sustrato de la enzima, sin embargo, el papel del fertilizante frente a la enzima no se encuentra completamente elucidado. Por tanto, se decidió combinar los sistemas para generar un modelo general que permita interpretar de manera más concreta el posible mecanismo de MAP sobre la enzima para la generación de un biosensor. La estrategia que se siguió en este trabajo para lograrlo se muestra en la Figura 46. Incubando 5 μ L de la solución stock de la enzima, junto con 10 μ L de una solución tampón de glicina donde se disolvió 2.5 mg/mL de luminol, dicho sistema

se incubó a 37 °C por 5 minutos. Posteriormente, se agregó 5 μL de una solución conocida de ácido fítico y se incubó a 37 °C por 5 minutos. Para realizar las pruebas por voltametría cíclica la solución previamente incubada se colocó sobre el electrodo junto con 5 μL de solución tampón a base de glicina al 0.5 mM y 5 μL de peróxido de hidrógeno al 10%.

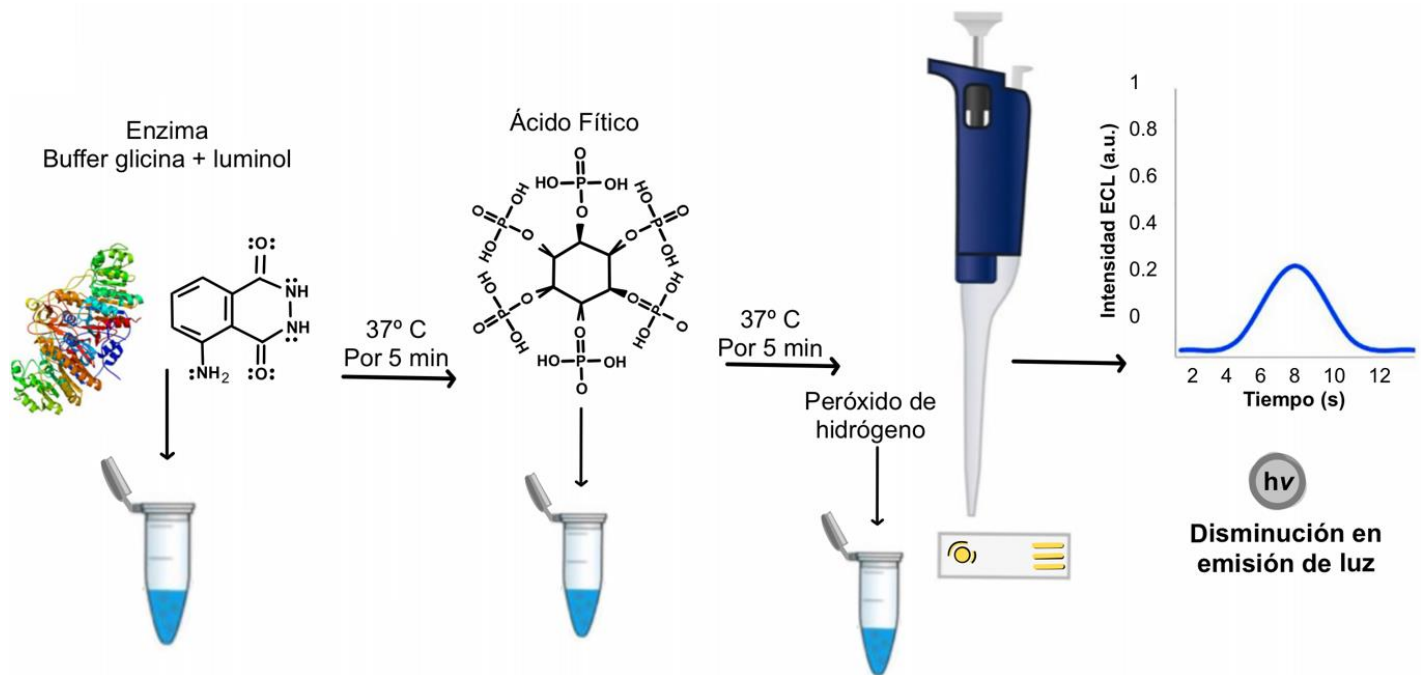


Figura 46 Diagrama esquemático del sistema bajo la influencia del ácido fítico.

Para la detección de fosfato, se siguió un procedimiento similar al mostrado en la (Figura 46). Como primer paso, se incubaron 5 μL de la solución stock de la enzima, junto con 10 μL de una solución tampón de glicina donde se disolvió 2.5 mg/mL de luminol y 5 μL de MAP a una concentración conocida; dicho sistema se incubó a 37°C por 5 minutos, con la finalidad de aumentar las probabilidades de que las moléculas del fertilizante interaccionen con la enzima Figura 47. Posteriormente, se agregó 5 μL de una solución conocida de ácido fítico y se incubó a 37°C por 5 minutos. En última instancia la solución se colocó sobre el electrodo junto con 5 μL de solución tampón a base de glicina al 0.5 mM y 5 μL de peróxido de hidrógeno al 10 %.

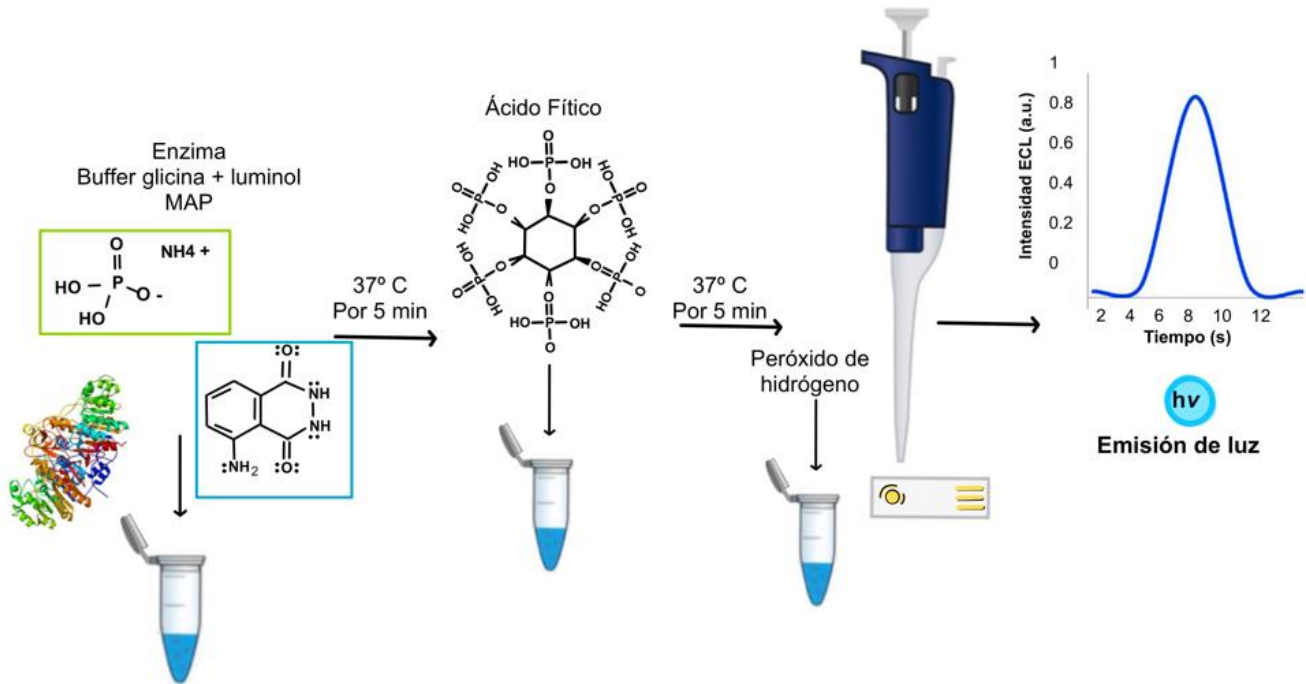


Figura 47 Diagrama esquemático del sistema bajo una concentración conocida de MAP sobre el sistema de luminol.

La Figura 48 muestra el esquema general del mecanismo del biosensor, donde se teoriza que el fertilizante a base de fósforo se une al sitio activo de la enzima ALP y ejerce un efecto inhibitorio, por tanto, el funcionamiento en presencia de un sustrato (ácido fíttico) altera la generación de especies ácidas en el medio resultando en un efecto de quenching sobre la emisión de luz del luminol. El efecto de quenching sobre el luminol se verá disminuido conforme aumenta la concentración de fertilizante MAP, dicha reacción permitirá la cuantificación de fosfato mediante la detección de luz por ECL.

Ying Li y colaboradores en 2020 reportaron la detección de fosfatasa alcalina mediante el decaimiento de luminol. Estipulando que la enzima ALP es capaz de catalizar ascorbil fosfato de magnesio y como producto de reacción se genera ácido ascórbico, el cual tiene un efecto de quenching sobre el luminol [37]. La hipótesis planteada con anterioridad sobre el efecto que ejercen las moléculas de fertilizante sobre la enzima, aunado a la información presentada permite establecer dicha reacción como base para desarrollar un biosensor ON/OFF que relaciona cuantitativamente la inhibición de la enzima con la sustancia de

interés [24].

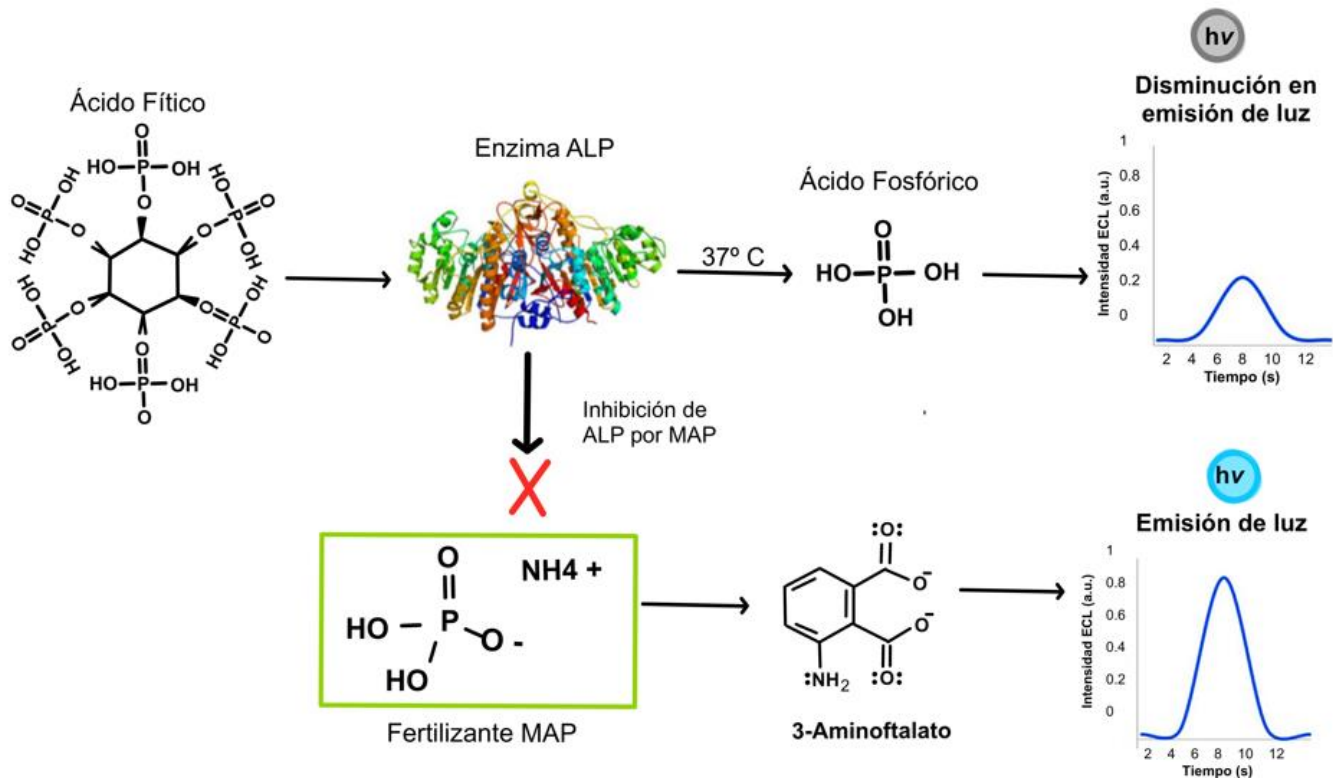


Figura 48 Diagrama esquemático del funcionamiento del biosensor.

5. 2. 8 Determinación de la concentración inhibitoria de MAP sobre la actividad enzimática en un sistema de luminol

Con base en el modelo previamente establecido se realizaron las pruebas correspondientes para obtener una curva de calibración a concentraciones conocidas de MAP. De manera que cuando no existe MAP en el sistema, la enzima interacciona con el sustrato de ácido fítico generando productos ácidos, los cuales acidifican el medio de la reacción electroquimioluminiscente, por tanto, la emisión de luz se verá disminuida. Cuando MAP se encuentra en el sistema, se ejerce una inhibición competitiva sobre la enzima, impidiendo la interacción con el sustrato de ácido fítico, por consiguiente, el medio de la reacción electroquimioluminiscente no se verá afectada y la emisión de luz será mayor. La Figura 49A muestra una pendiente lineal que representa la inhibición competitiva que ejerce el fertilizante sobre la enzima ante un

sustrato de ácido fítico, conforme aumenta la concentración del fertilizante en el medio. La Figura 49B representa la concentración de fósforo que contienen las concentraciones analizadas del fertilizante MAP para la curva de calibración.

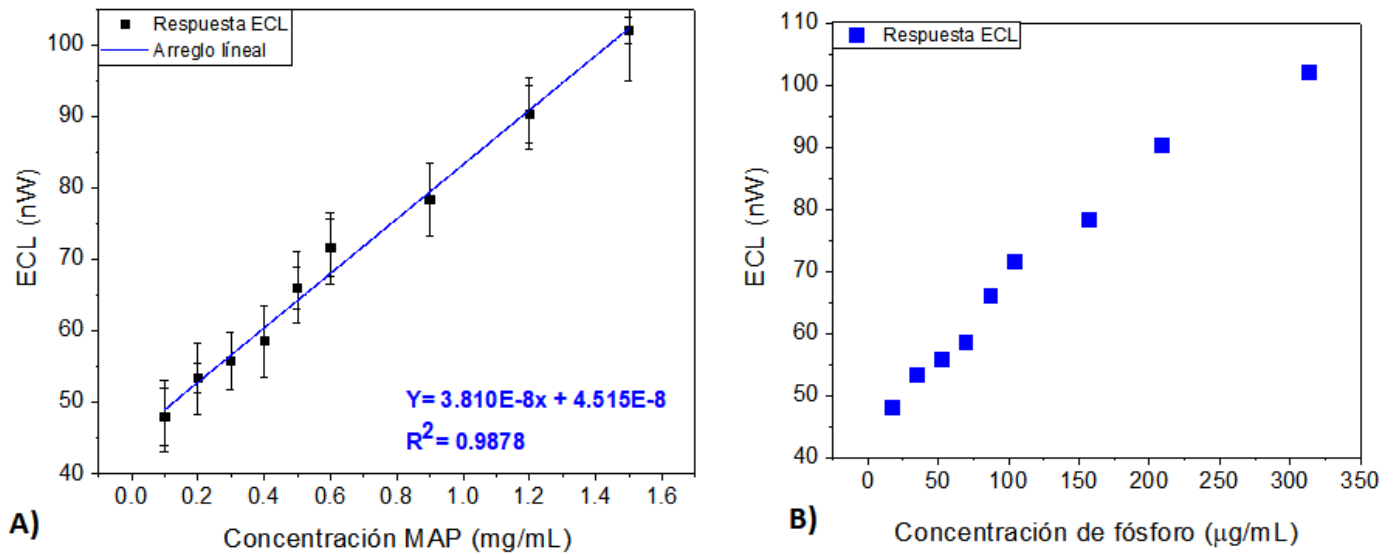


Figura 49 Curva de concentración contra respuesta ECL, A) Curva respecto a concentración de fertilizante MAP. B) curva respecto a concentración de fósforo.

5.3 Determinación de perfil de liberación de MAP mediante ECL.

5.3.1 Análisis de la distribución de tamaños de los microencapsulados obtenidos por las técnicas de spray-drying y spray-chilling.

Mediante microfotografías tomadas por SEM de los sistemas micro-encapsulados se analizó la morfología de los sistemas encapsulados. En la Figura 50A se observan los microencapsulados obtenidos a partir de la técnica de spray chilling a base de una matriz de cera de candelilla CeraC50/50. En la morfología de las partículas obtenidas predomina la forma esférica, las partículas presentan poros sobre la superficie, se teoriza que en su interior se encuentran poros que más tarde podrían actuar como canales de difusión para acelerar la liberación o de manera contraria, si los poros son pequeños se teoriza que podrán retardar la liberación del fertilizante. Igualmente se estudió la distribución del tamaño de partícula mediante el programa Image J, el análisis de la Figura 50C arroja una distribución donde es claro que predominan los tamaños de partícula entre (10-20 µm) consecutivamente el segundo tamaño que predomina es el tamaño

de partícula entre (20-30 μm) y en promedio de 100 mediciones de tamaño de partícula se obtiene un tamaño promedio de 30 μm .

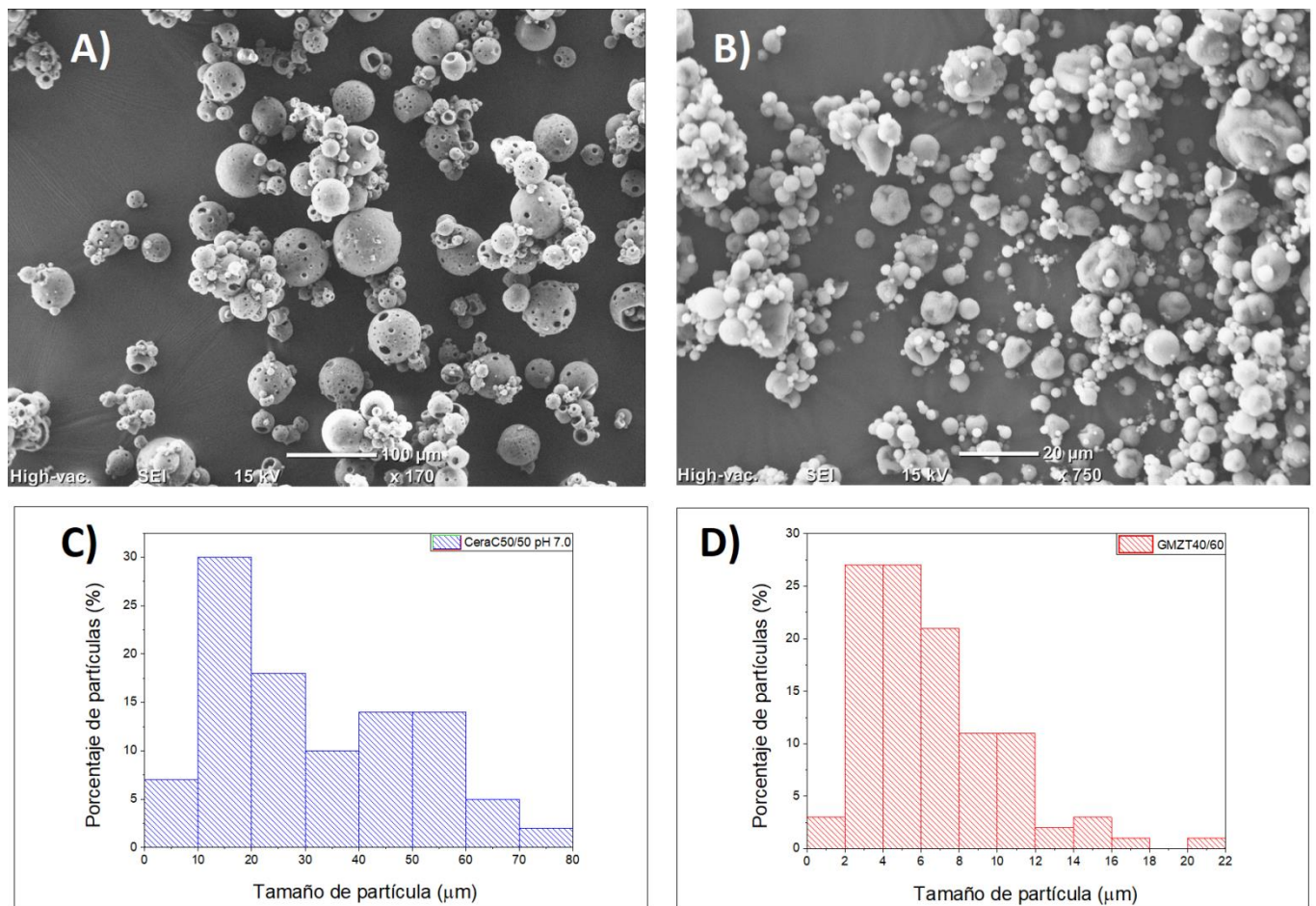


Figura 50 Micrografía SEM de A) Microcapsulas por técnica Spray Chilling CeraC50/50, B) Microcapsulas por técnica Spray Drying GMZT40/60, C) Distribución de tamaño de partícula del sistema CeraC50/50, D) Distribución de tamaño de partícula del sistema GMZT40/60.

En la Figura 50B se observan los microencapsulados obtenidos a partir de la técnica de spray drying a base de una matriz de goma de mezquite y almidón GMZT40/60. Los cuales presentan una morfología cuasi esférica con una superficie lisa y uniforme, de acuerdo con la morfología obtenida se teoriza que la liberación del fertilizante será por medio del hinchamiento del almidón el cual eventualmente se irá desplazando hasta lograr un tipo de erosión de la partícula o un efecto de disolución de la matriz. Igualmente se estudia la distribución del tamaño de partícula mediante el programa Image J. El análisis de la Figura 50D arroja una distribución donde predominan tamaños de partícula en promedio menores al

sistema de cera de candelilla alrededor de los (2-6 μm) mediante dicho análisis, se observa que la mayoría de las microcápsulas obtenidas por esta técnica se encuentran en un tamaño menor a las 12 μm , con un tamaño promedio de 6 μm . Con base en los resultados obtenidos se teoriza que el tamaño de partícula, al ser menor tendrá una influencia sobre el perfil de liberación, es decir, la liberación del fertilizante se llevará a cabo en un menor tiempo.

5.3.2 Efecto de la liberación del fertilizante sobre el pH del medio.

Se sabe que el fertilizante MAP es una excelente fuente de fósforo y nitrógeno, este compuesto en su forma de sal es altamente soluble y se disuelve rápidamente en medios acuosos. Mediante las técnicas de microencapsulación se pretende vislumbrar el efecto que ejerce el medio, ya que, la función de las matrices utilizadas es retener las moléculas de fertilizante luego de que la matriz haya sido puesta bajo condiciones de ahogamiento, la composición de la matriz o su hinchamiento promueven la retención de material y por tanto, la difusión del fertilizante al medio será más lenta [28]. Es interesante analizar la dependencia que resulta de los perfiles de liberación bajo ciertas condiciones de pH inicial, ya que, midiendo dichas dependencias las condiciones se aproximan considerablemente a la liberación real. En esta investigación 1 gramo de los sistemas microencapsulados se sometieron a condiciones de ahogamiento para determinar el perfil de liberación, a las muestras obtenidas del perfil se midió el pH y es importante resaltar los hallazgos subyacentes a la liberación. Las pruebas de ahogamiento iniciaron estudios con valores de pH que pueden encontrarse en los suelos mexicanos, los cuales incluyen medios neutros a $\text{pH} = 7.0$, medios levemente alcalinos a $\text{pH} = 8.5$ y levemente ácidos a $\text{pH} = 4.0$ [27]. Los resultados obtenidos permiten elucidar una relación entre los valores de pH y el tiempo transcurrido de liberación. Los cambios en el pH están directamente relacionados a la liberación del fertilizante en el medio, considerando que el fertilizante al disolverse alcanza un pH alrededor de 4.0 dependiendo de la concentración [54]. En la Tabla 14 se observan los valores de pH obtenidos en cada medición durante el perfil de liberación de los sistemas encapsulados de cera de candelilla y los sistemas encapsulados a base de almidón y goma de mezquite a un pH inicial de 7.0. Conforme a las mediciones obtenidas se podría inferir que los microencapsulados a base de cera de candelilla retienen durante más tiempo el fertilizante comparado con los encapsulados a base de almidón y goma de mezquite. Cabe señalar que para esta investigación las mediciones de pH son simplemente una vía que indica cambios de concentración en el medio, sin embargo, se debe de considerar

que se encuentran involucrados todos los iones del medio, por tanto, el comportamiento presentado es útil para corroborar que los elementos N y P en la forma de iones son liberados de la partícula, sin embargo, representan una medición general y no específica respecto al elemento de interés.

Tabla 14. Valores de pH de un sistema de liberación de fertilizante a base de CeraC50/50 y GMZT40/60 en función del tiempo.

Muestra	Tiempo (horas)	CeraC (pH promedio)	GMZT40/60 (pH promedio)
1.1	0.5	4.53 ± 0.022	5.12 ± 0.248
1.2	1	4.49 ± 0.011	4.46 ± 0.053
1.3	2	4.48 ± 0.002	4.34 ± 0.002
1.4	4	4.45 ± 0.004	4.30 ± 0.002
1.5	6	4.40 ± 0.009	4.28 ± 0.002
1.6	24	4.32 ± 0.018	4.24 ± 0.005
1.7	48	4.23 ± 0.019	4.11 ± 0.020
1.8	72	4.12 ± 0.017	3.94 ± 0.003
1.9	96	4.04 ± 0.010	3.73 ± 0.005
1.10	120	3.96 ± 0.008	3.62 ± 0.025

De acuerdo con los resultados previamente obtenidos, es notorio que los sistemas de almidón con goma de mezquite presentan valores de pH ligeramente menores a los sistemas de cera de candelilla promedio, lo que indica un mayor flujo de iones en el medio, por tanto, se toman dichos sistemas para estudiar las diferencias en el perfil de liberación bajo un medio de pH inicial de 4.0, 7.0 y 8.5. En la Tabla 15 se observan los valores de pH obtenidos durante el perfil de liberación de los sistemas encapsulados bajo

condiciones de ahogamiento junto con el valor de la desviación (SD). Los experimentos solamente consideran las concentraciones hasta las 120 h, ya que, posterior a este periodo el medio presentó turbidez y se descartaron dichos resultados para evitar interferencias en los resultados.

Tabla 15. Valores de pH de un sistema de liberación de fertilizante de GMZT40/60 en función del tiempo.

Muestra	Tiempo (horas)	pH=7.0 promedio	pH=4.0 promedio	pH=8.5 promedio	Valor SD
2.1	0.5	5.12	4.32	4.36	0.448
2.2	1.5	4.46	4.28	4.34	0.089
2.3	2.5	4.34	4.22	4.29	0.058
2.4	3.5	4.30	4.18	4.27	0.060
2.5	5	4.28	4.16	4.21	0.058
2.6	24	4.24	4.13	4.08	0.082
2.7	48	4.11	3.94	3.96	0.093
2.8	72	3.94	3.78	3.8	0.084
2.9	120	3.73	3.6	3.61	0.072
2.10	144	3.62	3.5	3.48	0.073

La Figura 51 revela que la liberación de los sistemas microencapsulados conteniendo en su formulación almidón y goma de mezquite (línea azul) corresponden a valores más bajos de pH, este método no asegura como tal la liberación de fertilizante, sin embargo, si existe una liberación de iones, los cuales pueden ser provenientes del fertilizante e incluso de la matriz. La goma de mezquite es un polisacárido que contiene

al menos un 23.27% de ácido glucurónico responsable de la carga negativa, igualmente se sabe que el pH tiene influencia sobre los complejos solubles de la goma de mezquite, es decir, sobre los complejos de menores fuerzas electrostáticas que conforman el polímero [55]. Contrario a esto, en los sistemas a base de cera de candelilla (línea color negro) se observa una tendencia más constante en el tiempo, lo que podría indicar una mayor retención de iones dentro de la matriz. Esto se debe a que el grado de cristalinidad del polímero afecta la permeabilidad y la difusión de la sustancia encapsulada [56].

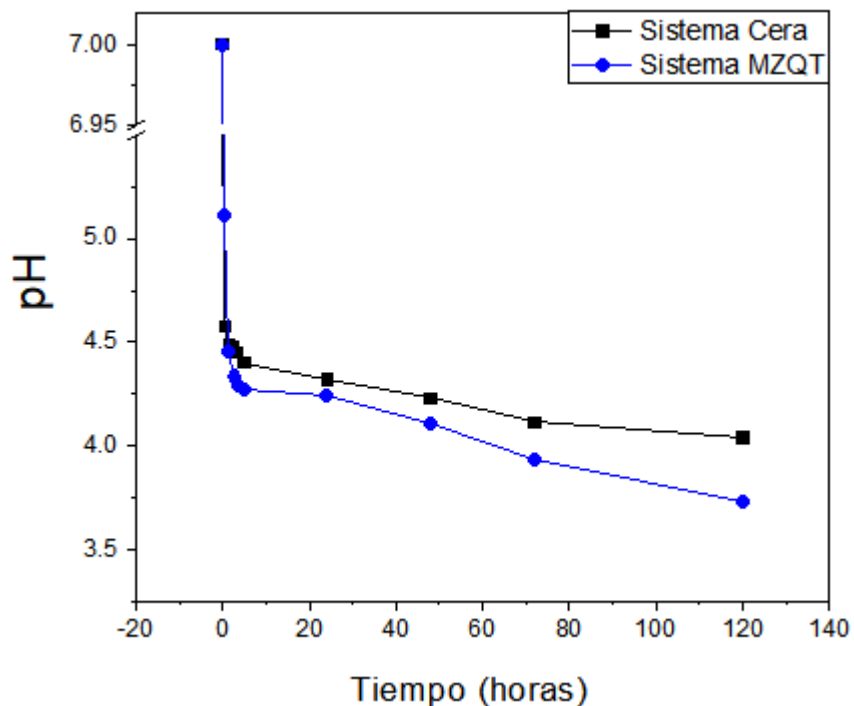


Figura 51 Efecto del pH sobre el perfil de liberación de un sistema microencapsulado CeraC-40 y GMZT40/60a pH 7.0.

Se estudian las tendencias en la liberación de sistemas microencapsulados a base de almidón de maíz y goma de mezquite bajo la influencia de condiciones iniciales neutras a $\text{pH}=7.0$, levemente ácidas a $\text{pH}=4.5$ y levemente alcalinas a $\text{pH}=8.5$. El pH con el que se parte es distinto y se pretende dilucidar si un sistema libera más que otro o si se alcanza un equilibrio hasta llegar a valores similares de pH. Los resultados obtenidos en la Figura 52 demuestran que dentro de la primera hora existen diferencias en la tasa de liberación entre las tres condiciones de pH. A pH 4 se observan medidas de pH menor, lo que indica una mayor liberación de iones al medio. A pH 8.5 se observa un comportamiento similar que al pH

4.0 lo que indica que el pH podría tener un efecto sobre la matriz y sobre la tasa de difusión de los iones al medio exterior. A pH 7.0 se observan valores de pH mayores lo que indica una liberación disminuida de iones al medio o una mayor retención comparado con los sistemas a pH 4.0 y 8.5. Se demuestra que el pH tiene influencia sobre la liberación de sistemas encapsulados. Igualmente se revela que los sistemas son estables, ya que, la probabilidad de falla de los sistemas encapsulados no se podrá dar bajo las condiciones experimentales en medios levemente ácidos y alcalinos.

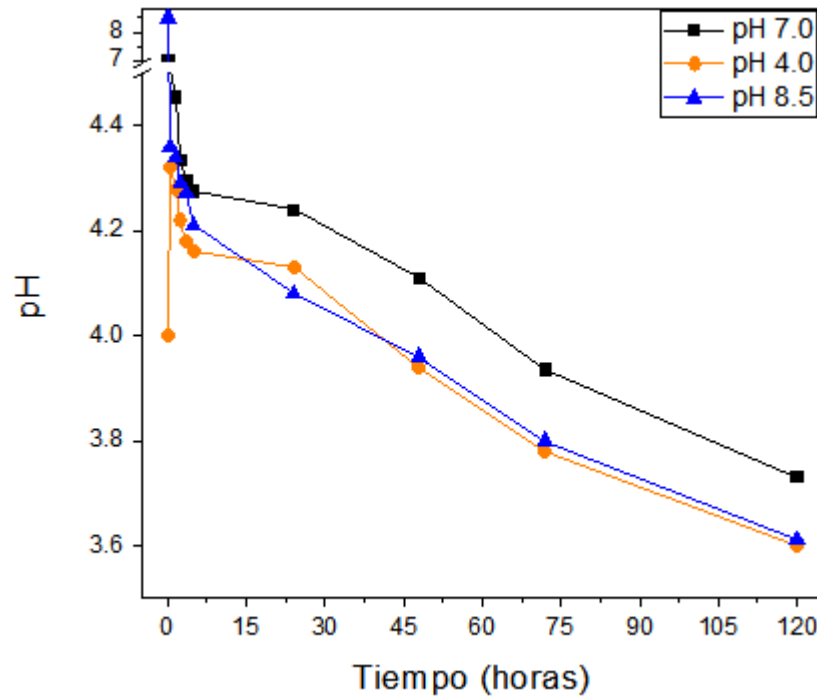


Figura 52 Efecto del pH sobre el perfil de liberación de un sistema microencapsulado GMZT40/60a pH 4.0, 7.0 y 8.5.

5.3.3 Determinación del perfil de liberación del ión fosfato mediante ECL

De acuerdo con lo planteado en la Figura 48 se pone a prueba tanto el instrumento diseñado como el entorno necesario para el correcto funcionamiento del biosensor con muestras provenientes de los perfiles de liberación de sistemas microencapsulados CeraC50/50 por la técnica de spray chilling y sistema GMZT40/60 por la técnica de spray drying.

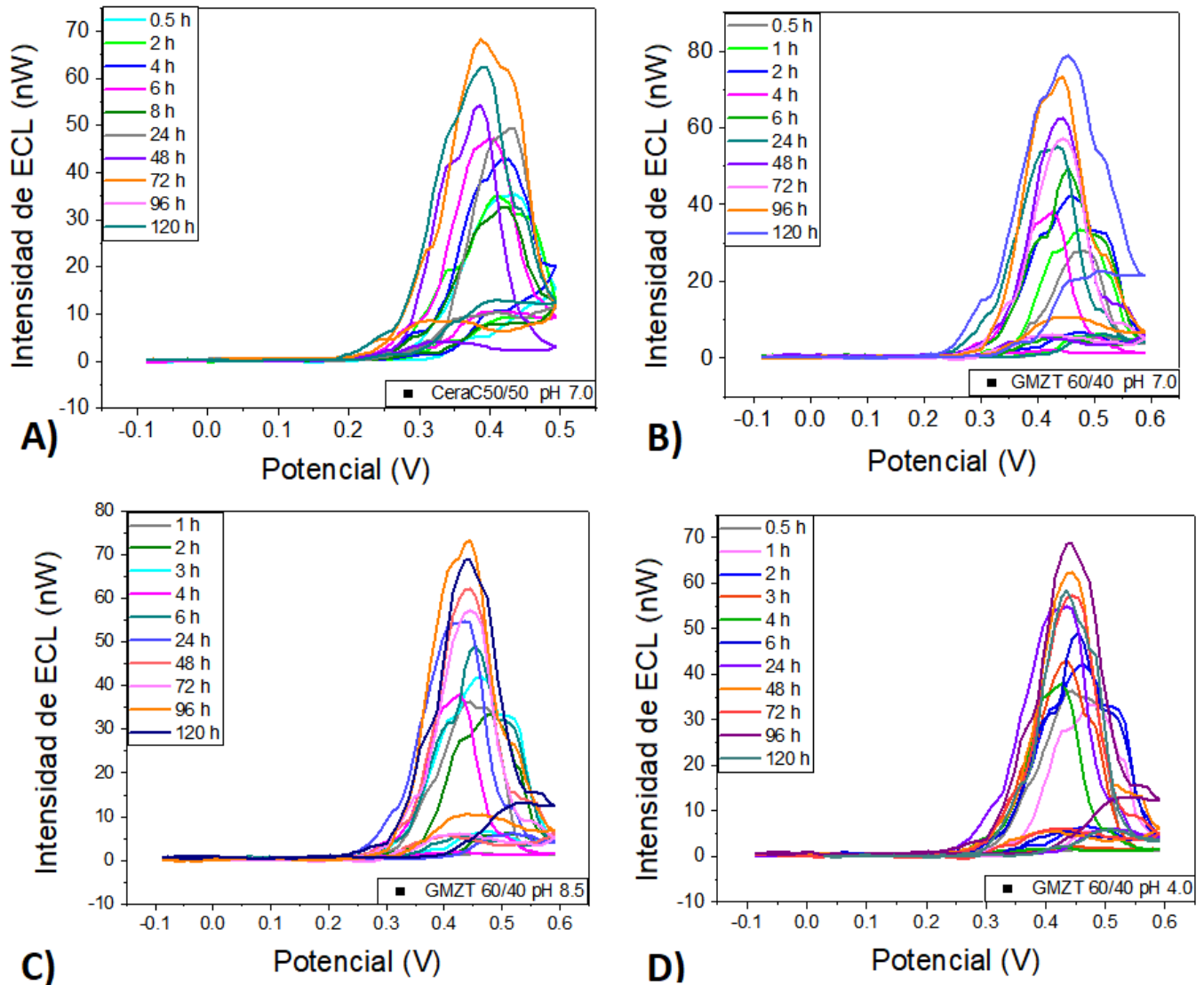


Figura 53 Respuesta electroquimioluminiscente del biosensor a la liberación del MAP en función del tiempo de muestreo: A) sistema microencapsulado CeraC50/50A a pH = 7.0. B) sistema microencapsulado GMZT40/60 a pH = 7.0. C) sistema microencapsulado GMZT40/60 a pH = 8.5. D) sistema microencapsulado GMZT40/60 a pH = 4.0.

De manera general todos los sistemas dan respuesta al sistema del biosensor diseñado y propuesto en esta investigación, la Figura 53 representa las curvas de intensidad de luz vs potencial, donde se identifican los picos máximos y mínimos de los perfiles de liberación, cabe mencionar que las intensidades se encuentran alrededor de 0.3 y 0.5 V, la cual es correspondiente a la oxidación del luminol. Igualmente se observan ligeros corrimientos atribuidos a las condiciones experimentales durante la medición.

La Figura 53A muestra la respuesta ECL obtenida del perfil de liberación del sistema CeraC50/50A. De acuerdo con las curvas obtenidas es claro que durante las primeras 24 horas se presentó un efecto de liberación ráfaga, este efecto ráfaga puede ser atribuido al fertilizante que se encuentra sobre la superficie de las microcápsulas. Se puede observar que el biosensor responde conforme al modelo propuesto, ya que, es claro que a mayor concentración de MAP mayor será la emisión de luz como se demuestra a partir de las 72 horas (línea naranja) del experimento de liberación.

La Figura 53B muestra que la respuesta del sistema GMZT 40/60 pH 7.0, donde se observa el pico máximo de emisión ECL en 77 nW a las 120 h, lo que indica que tienen una mayor capacidad de retención del ión fosfato en la microcápsula por un tiempo más prolongado. Los sistemas GMZT 40/60 pH 8.5 y 4.0 presentan un comportamiento similar en cuanto al perfil de liberación, es decir, presentan una liberación más rápida en el tiempo. De los sistemas estudiados, el sistema CeraC50/50 comparado con los sistemas GMZT 40/60 presenta de manera global las emisiones más bajas, sin embargo, el contenido de fertilizante en dichos encapsulados es del 50% lo que podría indicar una mayor retención del fertilizante en la matriz de cera comparado con las matrices a base de almidón y goma de mezquite.

El biosensor desarrollado debe funcionar como una herramienta para aproximar la concentración del ión fosfato proveniente de las muestras tomadas del perfil de liberación mediante una respuesta ECL. La Figura 54 A, presenta el perfil de liberación del fertilizante MAP del sistema CeraC50/50 de acuerdo con los picos máximos de emisión ECL analizados mediante la aproximación de funciones. El perfil permite evaluar cambios conforme aumenta la concentración en el medio, ya que, la tendencia de los valores de emisión de luz se mantiene crecientes en el tiempo. Las propiedades morfológicas tienen influencia sobre la liberación especialmente si la partícula está compuesta por poros, ya que, dichos espacios alojan alta concentración de fertilizante, por tanto, la liberación será dependiente de la tasa de disolución y del movimiento de los iones al exterior de la matriz.

Las Figuras 54 B, C y D presentan el perfil de liberación del sistema encapsulado GMZT40/60 a diferente pH. Durante las primeras 8 horas se presenta una liberación constante de fertilizante, esto se puede explicar debido a que sobre la superficie de las microcápsulas es posible encontrar fertilizante adherido a la superficie, el cual se disolverá rápidamente y representa los primeros puntos en la liberación. Para el sistema GMZT40/60 a pH 7.0 la Figura 54B se observan valores de emisión con una tendencia creciente,

lo que indica que a este pH se retiene de mejor manera al fertilizante. Comparando la liberación del sistema CeraC50/50 y GMZT40/60 se teoriza que la liberación de los sistemas GMZT40/60 es mucho más rápida, ya que, se alcanzan valores por encima de 70 nW antes de las 120 h, esto podría ser atribuido a la estructura morfológica que se observa en la Sección 5.5.

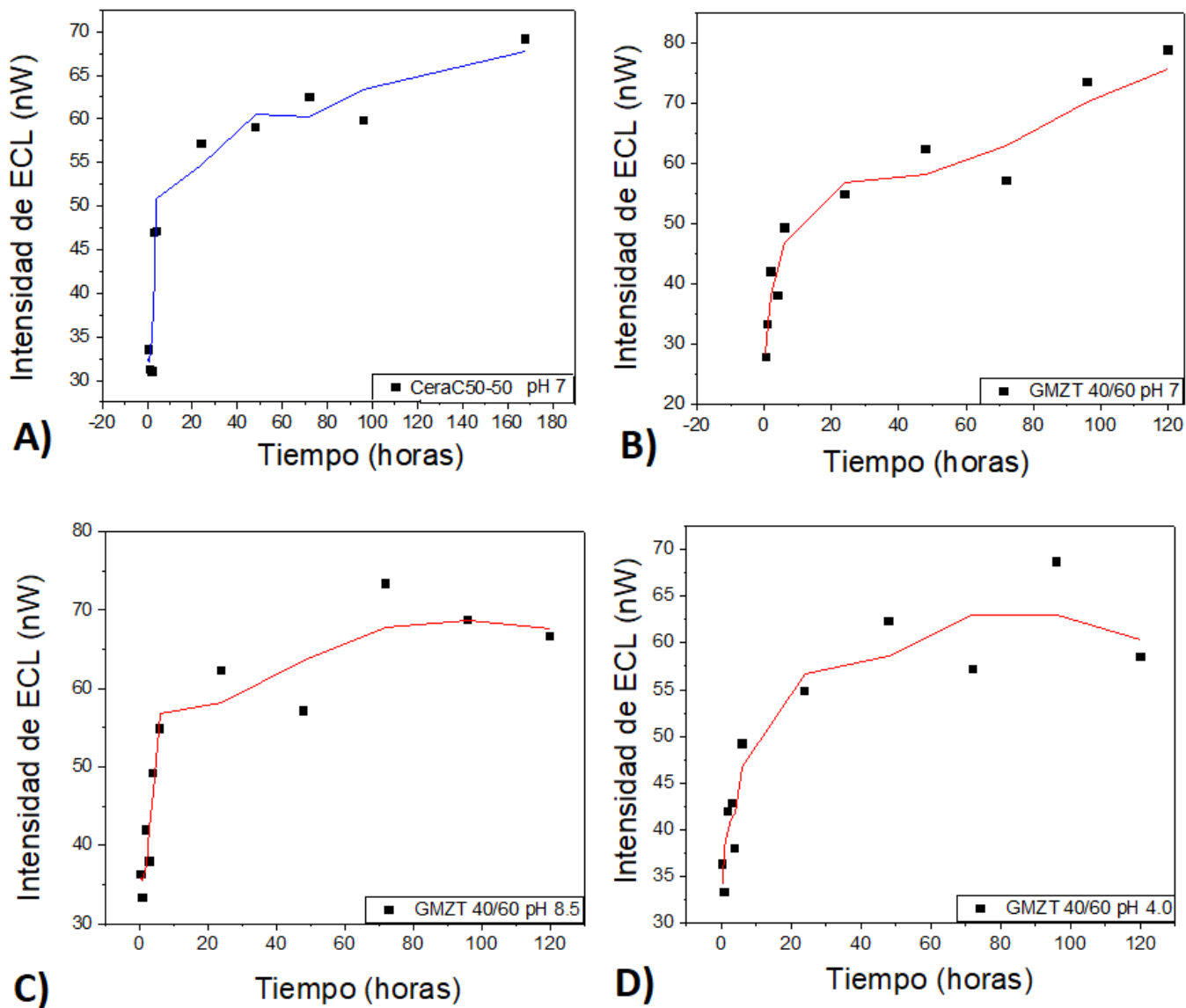


Figura 54 Tendencia de la respuesta ECL del perfil de liberación: A) sistema CeraC50/50A a pH = 7.0, $SD=1.40E^{-08}$. B) sistema GMZT40/60 a pH = 7.0, $SD=1.68E^{-08}$ C) sistema GMZT40/60 a pH = 8.5, $SD=1.40E^{-08}$. D) sistema GMZT40/60 a pH = 4.0, $SD=1.17E^{-08}$.

5.3.4 Perfil de liberación acumulativo del fertilizante MAP de sistemas encapsulados bajo una respuesta ECL

De acuerdo con los resultados previamente obtenidos de la emisión de ECL mediante el biosensor desarrollado, se hacen los cálculos para obtener el perfil acumulado para aproximar el porcentaje de fosfato liberado al medio según la siguiente ecuación: $(Q_t = \frac{M_t}{M_T} \times 100)$ donde M_t es la cantidad acumulada de fosfato del perfil de liberación, t es el tiempo y M_T es la cantidad total liberada.

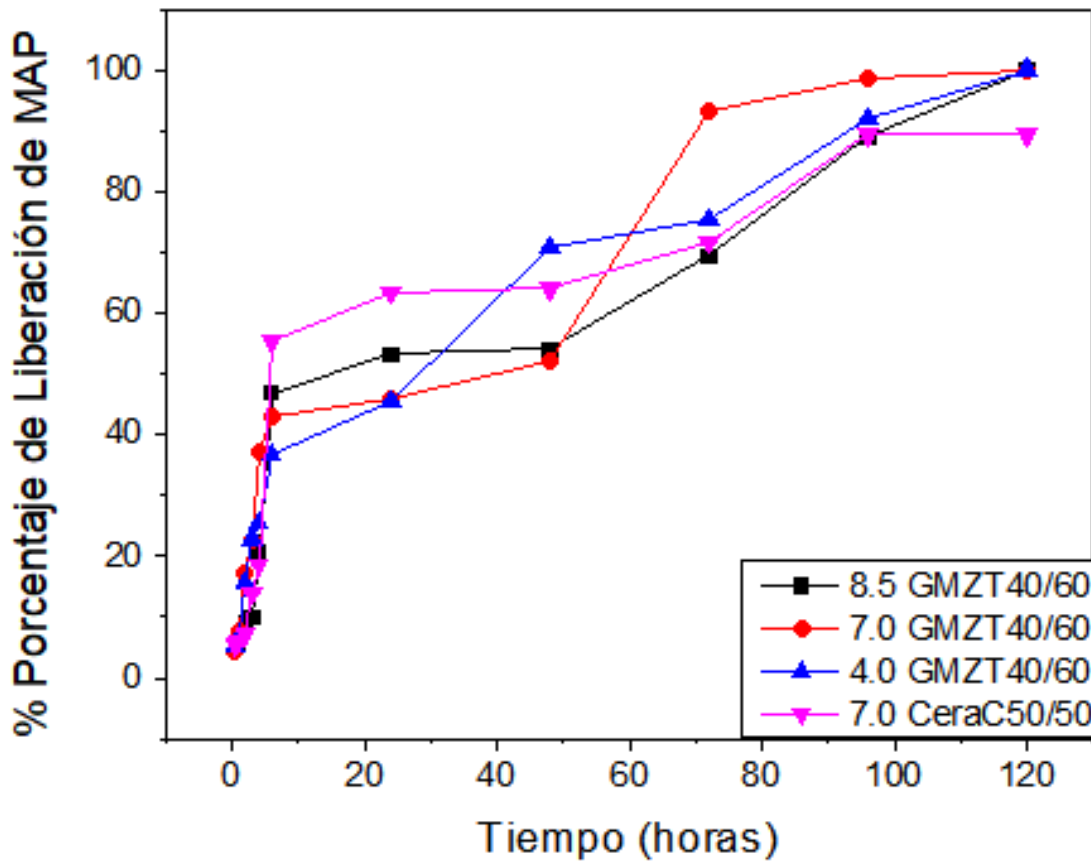


Figura 55 Perfil acumulado de sistemas microencapsulados de GMZT40/60 a pH = 8.5 (Negra, GMZT40/60 a pH = 7.0 (Roja), GMZT40/60 a pH = 4.0 (Azul) y CeraC50/50A a pH = 7.0 (Rosa).

La Figura 55 muestra el perfil acumulado de MAP de los sistemas utilizados para esta investigación. Para los sistemas a base de almidón de maíz y goma de mezquite antes de las primeras 20 horas, se observa que la liberación del contenido difunde de una manera más rápida para los perfiles GMZT 40/60 a pH 8.5 y

4.0. Lo que indica que las condiciones levemente alcalinas y levemente ácidas del medio tienen una influencia inmediata sobre la liberación de fertilizante. Posterior a las 50 horas el perfil acumulado del sistema GMZT 40/60 pH 7.0 línea roja, comparado con los sistemas a pH 8.5 línea color negro y pH 4.0 línea color azul, es ligeramente más acelerado, pero los tres sistemas alcanzan su liberación total alrededor de las 120 horas. El mecanismo por el cual el almidón permite la liberación controlada es mediante el hinchamiento, difusión del contenido y finalmente erosión o ruptura de la partícula si se excede la presión interna [39]. Aunado a los factores intrínsecos de la matriz, el fertilizante (MAP) es altamente soluble en agua, lo que explica el comportamiento inicial de los sistemas GMZT 40/60.

El sistema de CeraC50/50 a pH 7.0 a base de cera de candelilla comparado con los sistemas GMZT 40/60 a base de almidón de maíz y goma de mezquite, presentan una pendiente menos pronunciada y la liberación parece ser más constante en el tiempo, lo cual revela que estos sistemas podrían ser más eficientes para la liberación controlada, ya que, a las 120 horas solamente se liberó el 85% del contenido. Esto se puede explicar, ya que, las ceras son capaces de formar partículas esféricas con poros, los cuales limitan la difusión de la sustancia de interés al medio [38]. Es interesante notar que el sistema CeraC50/50 antes de las 4 horas presenta una liberación de 17%, esto puede ser atribuido al fertilizante adsorbido en la superficie del microencapsulado o el que se encuentra de manera más superficial en los poros.

5.4 Análisis térmico de los sistemas microencapsulados previo y posterior a las pruebas de liberación

Para este trabajo se realizaron estudios térmicos por la técnica calorimetría diferencial de barrido (DSC) a los sistemas microencapsulados CeraC50/50 y GMZT40/60, para estudiar transiciones de fase y el proceso de fusión de la matriz previo y posterior a la liberación controlada. Los análisis se realizaron con base en la cristalinidad de una emulsión de cera de candelilla con Tween60 1:1. Se sabe que los materiales semicristalinos presentan un grado de cristalinidad de entre 40 a 75%, sin embargo, diversas investigaciones demuestran que el uso de surfactantes disminuye la cristalinidad [40]. La Figura 56D corresponde a una emulsión de cera con surfactante Tween60 1:1, se observa un endoterma a 66.33 °C y junto a este otro pico a 67.31°C. El orden molecular de la mayoría de las ceras está empacado de manera simétrica que resultan en una forma ortorrómbica. También hay ceras que se acomodan hasta una formación triclinica y la formación hexagonal ocurre a altas temperaturas antes del punto de fusión [42]. Desde 1994 se estudió la composición de diversas ceras y se sabe que no solamente la composición

química de la cera contribuye a formar la morfología, sino también influyen los procesos térmicos que haya sufrido y la recristalización, por tanto, es claro que variando las condiciones de cristalización se obtienen diferentes morfologías [41]. Esto podría explicar los picos característicos de una emulsión a base de cera de candelilla, la cual difiere en comparación con una cera pura o sin modificaciones térmicas.

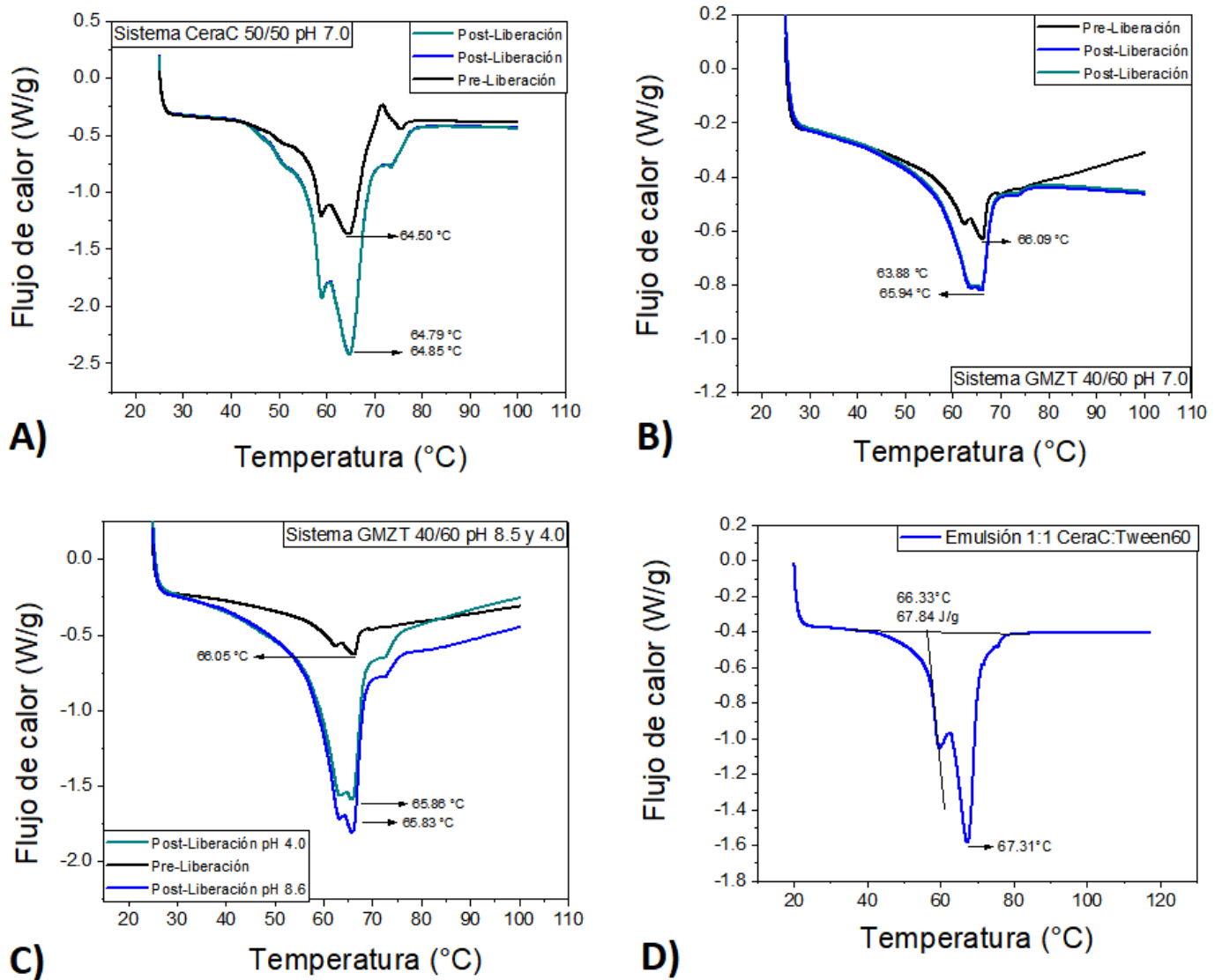


Figura 56 Respuesta Termograma obtenido mediante DSC del sistema A) CeraC50/50 a pH 7.0. B) sistema GMZT40/60 a pH 7.0. C) sistema GMZT40/60 post liberación a pH 4.0 y sistema GMZT40/60 post liberación a pH 8.5 y D) Emulsión cera de candelilla tween60 1:1.

En la Figura 56A se presentan los termogramas obtenidos de los sistemas microencapsulados CeraC50/50 control los cuales fueron analizados previo a la liberación del fertilizante. Este sistema presenta un pico endotérmico de fusión a 64.50 °C con una entalpía de fusión de 68.8 J/g línea color negro y un hombro a una temperatura de 71.47°C, este último pico podría generarse debido a un reacomodo de cristales dando como resultado una cristalización de mayor estabilidad [30]. Algunos compuestos de bajo peso molecular como parafinas y ceras presentan transiciones de fase cerca de los puntos de fusión, es decir, durante períodos de calentamiento constantes se logra un re-acomodo estructural de orden molecular en planos simétricos y esto sucede antes o después el punto de fusión [32]. Los estudios de DSC posteriores a la liberación línea color azul y línea color verde presentan su pico máximo de fusión a 64.79 °C y 64.85 °C dichos picos presentan una ligera variación respecto a los microencapsulados antes de la liberación. El desplazamiento en la intensidad de los picos indica regiones menos ordenadas, es decir, menor grado de cristalinidad sin llegar al estado amorfo [43]. La cera está compuesta principalmente por ésteres de ácidos grasos saturados e insaturados de cadena larga con alcoholes grasos [44]. Los ésteres de ácidos grasos en su forma no disociada son insolubles en agua, sin embargo, la solubilidad de cadenas largas es difícil de determinar porque está influenciada por el pH del medio y porque las cadenas tienden a asociarse y forman monocapa o micelas. Generalmente la extracción de ésteres de ácidos grasos se da bajo la influencia de solventes no polares a pH bajo para formar grupos carboxilos sin carga neta. En contraste, el aumento de pH genera la hidrólisis de éster e incluso se pueden formar sales [45][46]. Por tanto, se podría asumir que las condiciones del medio tienen influencia en la estructura de la cera y la relación de intensidades se ve afectada.

En la Figura 56B se presentan los termogramas obtenidos de los sistemas microencapsulados GMZT40/60 a pH 7.0. Previo a la liberación de fertilizante se presenta un pico máximo de fusión a 66.09 °C con una entalpía de fusión de 16.53 J/g línea color negro. Los sistemas microencapsulados GMZT40/60 posteriores a los perfiles de liberación línea color azul y línea color verde presentan su pico máximo de fusión a 63.88 °C y 65.94°C. Como se explicó previamente, el medio en donde se lleva a cabo la liberación controlada tiene influencia sobre la estructura de la cera y la relación de intensidades se ve afectada. Igualmente, la formulación contiene OSA, el almidón es insoluble en agua, sin embargo, las microcápsulas son capaces de absorber agua y provocan el hinchamiento de la partícula. La absorción de agua por regiones amorfas es capaz de desestabilizar las regiones cristalinas. Se ha reportado que las partículas de almidón pueden

modificar su estructura cristalina en presencia de humedad, lo que podría derivar en una disolución parcial del gránulo [47].

En la figura 56C se presentan los termogramas obtenidos de los sistemas microencapsulados GMZT40/60 a pH 4.0 y 8.5. Los picos máximos de fusión antes de la liberación fueron a 66.05 °C línea color negro. Los picos posteriores a los perfiles de liberación línea color azul a 65.86 °C a pH 4.0 y (línea verde) a 65.83 °C pH 8.5. Aunado a que la formulación contiene OSA, se ha reportado que existe disminución en el tamaño de partículas a base de OSA cuando son expuestas a condiciones de pH ácidas por un tiempo aproximado de 12 h [48]. Está claro que las regiones amorfas están más expuestas al ataque ácido. Igualmente, en medio alcalino es posible que los grupos hidroxilo rompan los enlaces de hidrógeno del almidón. Por tanto, se podría asumir que el medio en donde se lleva a cabo la liberación bajo condiciones levemente ácidas y alcalinas tienen influencia sobre la estructura cristalina de la cera y del almidón OSA.

5.5 Análisis de la morfología de los microencapsulados previo y posterior a las pruebas de liberación.

La Figura 57 muestra las partículas microencapsulados antes y después de llevar a cabo el perfil de liberación, en general la morfología de la mayor parte de los microencapsulados es esférica y presentan una superficie uniforme con poros, dichos poros pueden variar de tamaño desde grandes hasta aquellos que apenas son perceptibles a simple vista. También se puede observar algunos cristales embebidos sobre la superficie de algunos microencapsulados atribuidos a la presencia de MAP (Figura 57A, C y E). En las Figuras 57B, D y F se observan partículas correspondientes al estudio posterior a la liberación, donde se aprecia que los poros de algunas partículas son ligeramente más grandes que los poros de las partículas previos a la liberación, esto se atribuye a que las partículas tenían en su interior gránulos de fertilizante. El fertilizante MAP se disuelve rápidamente en agua, por tanto, al disolver los gránulos de fertilizante se pudieron generar nuevos poros o se dejan al descubierto poros que no eran visibles inicialmente. Adicionalmente el medio de pH por la naturaleza del fertilizante se acidifica el medio hasta un pH promedio de 4.0, por tanto, se debe considerar que los encapsulados estuvieron sumergidos en estas soluciones por más de 120 horas, pudiendo generar ligeros cambios estructurales sobre las partículas.

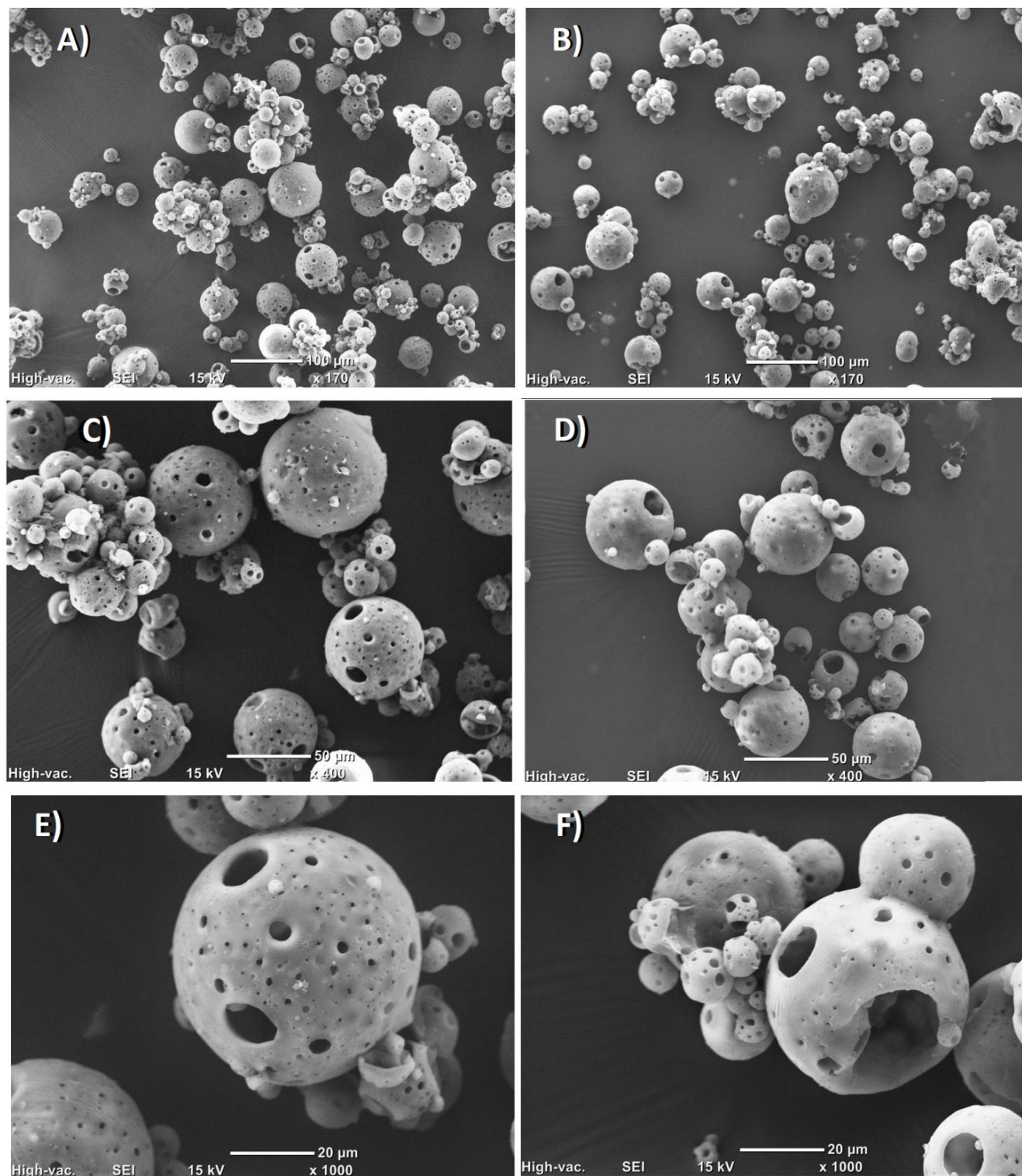


Figura 57 Micrografía SEM de sistema microencapsulado CeraC50/50. Fracción correspondiente a Pre-liberación A) x170, C) x400, E) x1000. Fracción correspondiente a Post-liberación B) x170, D) x400, F) x1000.

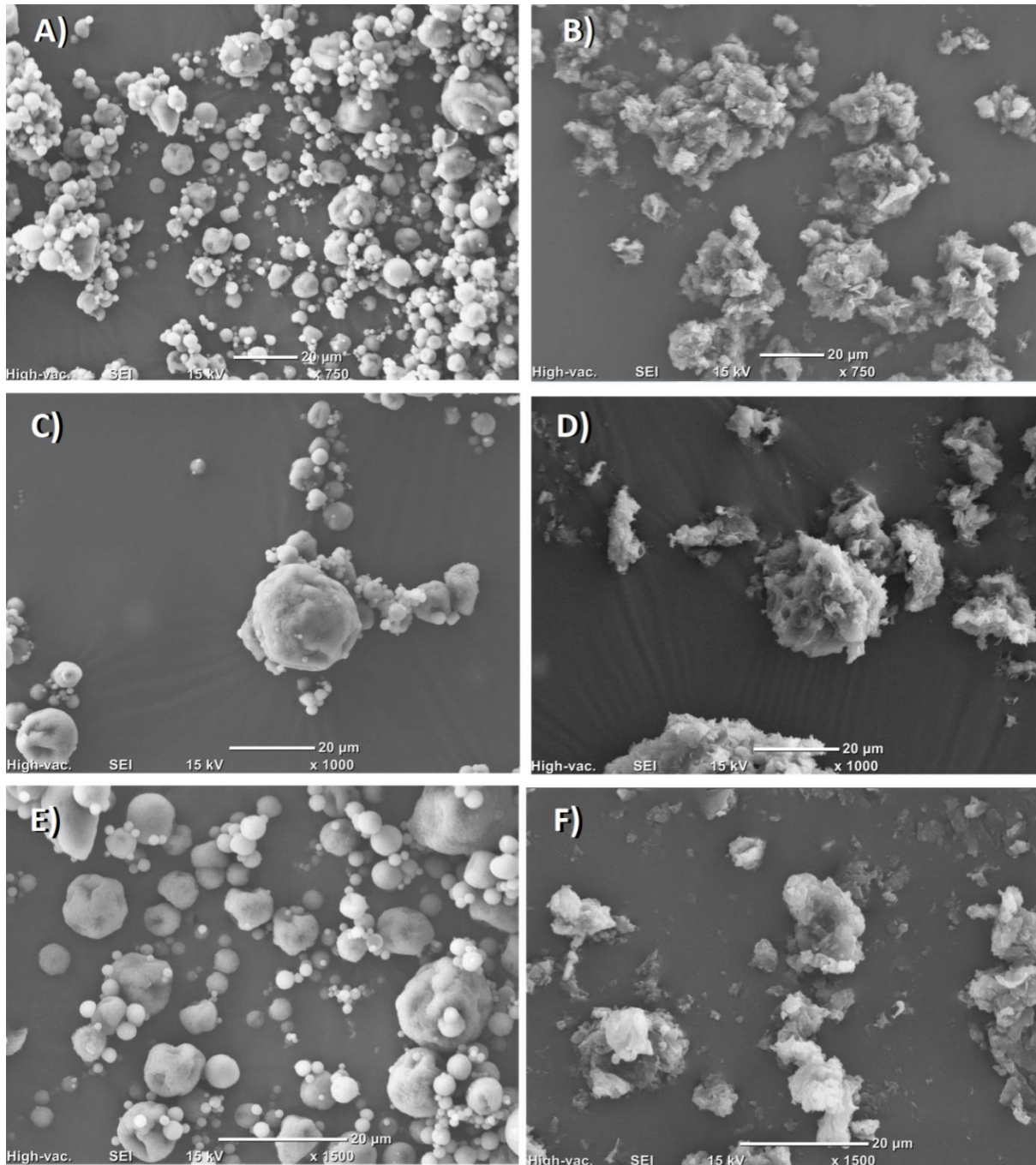


Figura 58 Micrografía SEM de sistema microencapsulado GMZT40/60. Fracción correspondiente a Pre-liberación A) x750, C) x1000, E) x1500. Fracción correspondiente a Post-liberación B) x750, D) x1000, F) x1500.

En la Figura 58 se muestra una imagen SEM de las partículas microencapsuladas del sistema GMZT40/60 y su efecto antes y después de ser sometidas a condiciones de ahogamiento por un periodo de al menos 120 horas. Las Figura 58A, C y F estudiadas previo al estudio del perfil de liberación presentan una forma

cuasi esférica en comparación con las microcápsulas obtenidas por el método de spray chilling, dichas partículas presentan una superficie lisa y sin poro en la superficie. Dichos microencapsulados tienen un promedio de 6 μm en proporción 5 veces más pequeñas comparadas con las micropartículas de CeraC50/50. La Figura 58B, D y E presenta a las microcápsulas posterior a ser sometidas a condiciones de ahogamiento, es decir, estuvieron sumergidas en un medio acuoso por más de 120h. Se observa que dichas partículas presentan una morfología totalmente diferente a lo previamente expuesto. Lo primero que se puede observar es que se ha perdido la forma cuasi esférica, la estructura inicial se pierde por completo, se observa una reducción del tamaño de las partículas y se observa que las estructuras ahora son amorfas. La Figura 58D llama la atención al conservar ligeramente la morfología de la microcápsula, sin embargo, es claro que ha sufrido un cambio estructural y superficial drástico. Este fenómeno se puede explicar porque el almidón consta de dos componentes estructurales básicos: amilosa y amilopectina como se estudió previamente (sección 2.3.8.1). La amilopectina contribuye a la formación de la zona cristalina, es decir, es una zona compacta y ordenada, mientras que la amilosa forma las regiones amorfas y se caracteriza por no tener un orden específico [33]. A pesar de que el almidón no es soluble en agua, al mantener la estructura del almidón bajo un medio acuoso, primero el agua es absorbida por las regiones amorfas del almidón y se hidrata formando un gel, a dicho proceso se le conoce como gelatinización. La gelatinización se presenta como una de las transiciones más importantes que puede sufrir el almidón, a partir de los 21 °C se pueden observar cambios en las propiedades y en su estructura. Durante la gelatinización la estructura cristalina pierde su ordenamiento, por tanto, se verá reflejado en cambios estructurales, orden molecular y birrefringencia [34][35]. Se ha sugerido que el grado en que ocurre el proceso de gelatinización es dependiente del tipo de almidón de origen y los componentes que conforman la formulación [35]. Aunado al esto el fertilizante acidifica el medio hasta un pH 4.0 promedio contribuyendo en mayor medida a los cambios estructurales. Esto puede explicar en mayor medida el cambio morfológico que sufren los microencapsulados GMZT40/60, ya que, la formulación de estas microcápsulas contiene un 56% de OSA.

5.6 Cinética de la liberación del fertilizante mediante modelado matemático

Con el objetivo de explicar y profundizar un poco más sobre el funcionamiento de los perfiles de liberación de los sistemas microencapsulados se utilizaron modelos matemáticos, los cuales sirven como una

herramienta para aproximar de manera más concreta la cinética de liberación. En esta investigación se evaluaron los modelos de: Korsmeyer Peppas (KP), orden cero y primer orden.

Tabla 16. Modelos cinéticos de liberación.

Modelo	Modelo de Korsmeyer Peppas		Modelo orden cero		Modelo primer orden	
Ecuación	$F = (M_t / M) = K_m t^n$		$[Q] = -kt + [Q]_0$		$\log[Q - Q_t] = kt + \log[Q]$	
Variable	n	R^2	k_0	R^2	k_1	R^2
Sistema MQZT pH 8.5	0.3190	0.9163	0.1677	0.8597	0.0240	0.8455
Sistema MQZT pH 7.0	0.7689	0.8769	0.1616	0.8884	0.0182	0.7851
Sistema MQZT pH 4.0	0.3156	0.9807	0.1961	0.9033	0.0294	0.8943
Sistema CeraC 50/50 pH 7.0	0.2684	0.9841	0.1468	0.8637	0.0201	0.9340

En la Tabla 16 se observan los valores de los principales parámetros que determinan el mecanismo de liberación, de acuerdo con los modelos evaluados. El modelo de KP tiene el coeficiente de correlación más alto entre todos los modelos con un valor máximo de 0.9841 para el sistema de CeraC 50/50. Los valores en este modelo presentan valores promedio mayores al modelo de orden cero y al de primero orden. Del modelo KP se reportan 3 sistemas con un valor de n menores a 0.5; MQZT pH 8.5 con un coeficiente n= 0.3190, MQZT pH 4.0 con un coeficiente n= 0.3156 y CeraC 50/50 con un coeficiente n= 0.2684. El modelo indica que este tipo de sistemas combinan los mecanismos de difusión parcial de dos maneras, por medio del hinchamiento de la matriz, correspondientes a los modelos a base de almidón de maíz y goma de mezquite; esto sugiere que la liberación es controlada por la relajación de las cadenas poliméricas y el medio tiene gran influencia sobre el proceso de formación de poros y consecuentemente se generan procesos de erosión [50]. Y el otro mecanismo por medio de difusión parcial a través de poros llenos de agua. Adicional a la difusión se denotan procesos simultáneos para que la sustancia de interés llegue al exterior de la partícula. De los resultados obtenidos se observa que para el modelo de KP se presenta un coeficiente de correlación de (R^2) de 0.9841 para el sistema CeraC 50/50 pH 7.0 indicando que de los sistemas estudiados es el que se ajusta en gran medida y corresponde a un mecanismo de

difusión parcial a través de poros llenos de agua. De acuerdo a las observaciones obtenidas por la técnica de SEM se esperaría una liberación de primer orden o de KP con un valor de $n = 0.5$; sin embargo, los mecanismos asociados a este modelo son complicados respecto a la base teórica, ya que, existe una relación múltiple entre la disolución y diferentes variables como son la temperatura, humedad, textura del encapsulamiento, peso del recubrimiento y volumen de la disolución [51]. Por tanto, las líneas de ajuste presentadas en la Figura 59 no elucidan completamente la difusión del fertilizante, ya que, no se ajustan en gran medida a ninguno de los modelos presentados; esto se puede deber a múltiples mecanismos de liberación ocurriendo a diferentes tiempos, es decir, al inicio se podrá ajustar a un modelo y posteriormente ajustar mejor a otro modelo.

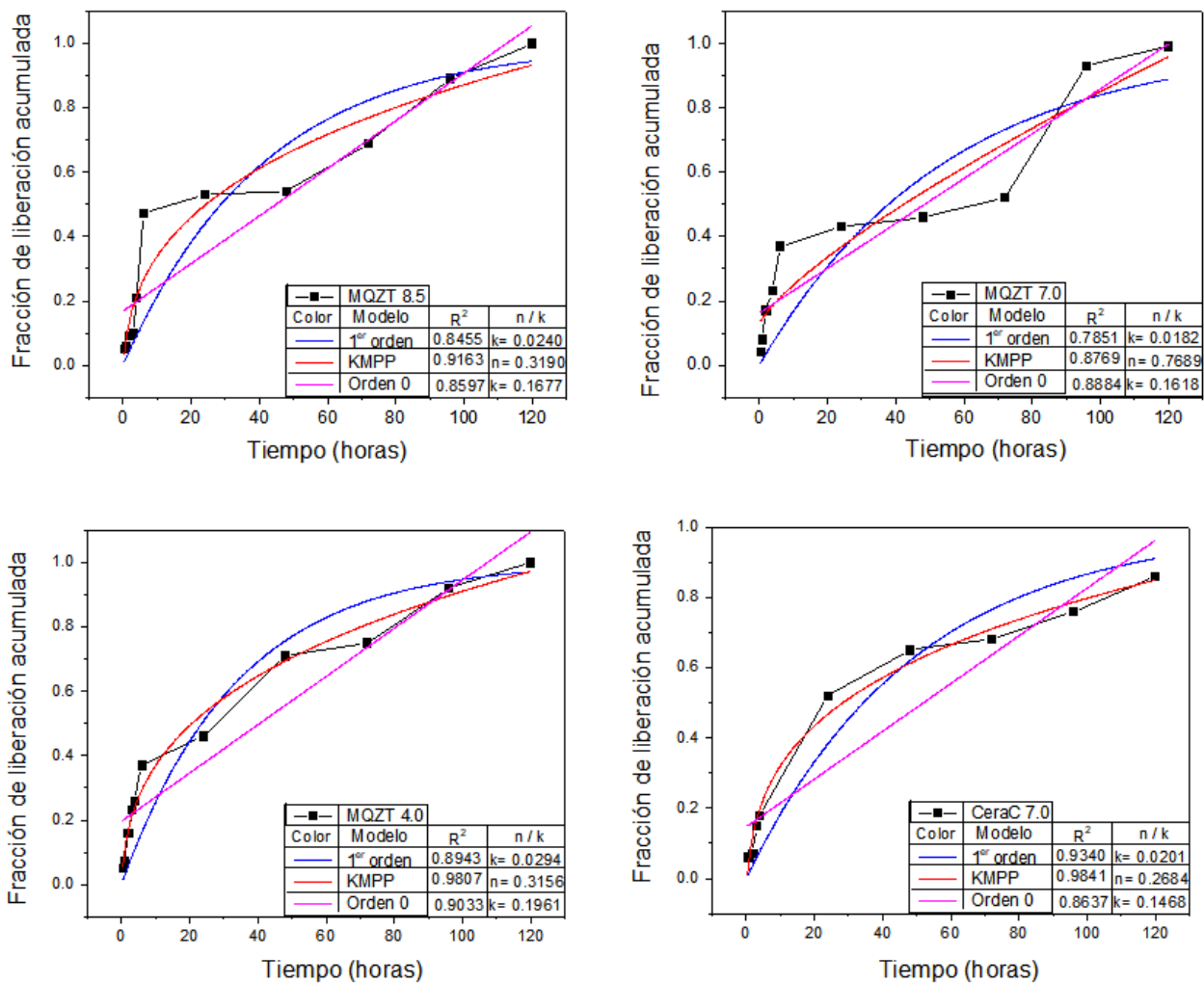


Figura 59 Gráficas de ajuste a los modelos cinéticos de liberación: Rojo, Korsmeyer peppas; Rosa, orden cero; Azul, modelo de primer orden.

5.7 Comparación del biosensor desarrollado para la detección de fosfato mediante (ICP-MS)

Para estudiar la eficiencia del biosensor desarrollado en esta investigación, se compara el perfil de liberación de sistemas microencapsulados a base de cera de candelilla y almidón de maíz con goma de mezquite, por medio de la técnica de espectrometría de masas por plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS). Dicha técnica es específica para la cuantificación elemental, utilizando un estándar de P (fósforo). Mediante la siguiente ecuación se calcula el porcentaje de liberación de iones de pentóxido de difósforo obtenidos del biosensor y de (ICP-MS).

$$\%P_2O_2 = \text{concn } P (\mu\text{g/mL}) \times \frac{100 \text{ mL}}{\text{g de fertilizante}} \times 10^{-6}(\text{g}/\mu\text{g}) \times \frac{\text{Mr de } P_2O_2}{\text{g de wt de P}} \times 100$$

Donde *g de fertilizante* es el peso total del fertilizante utilizado, *Mr* es el peso molecular del pentóxido de difósforo y *g de wt de P*, es el peso molecular del fósforo (P). Mediante esta ecuación se pudo calcular el porcentaje de pentóxido de difósforo y se pudo comparar con los valores obtenidos mediante las mediciones del biosensor desarrollado. En la Tabla 17 se observan los valores de las primeras 4 mediciones del perfil de liberación, de acuerdo con los resultados obtenidos del biosensor y la técnica de (ICP-MS) en ambas se observa una tendencia creciente lo cual correlaciona con una liberación escalonada en el tiempo; sin embargo, existe un porcentaje de error alto respecto a los valores obtenidos por (ICP-MS). En promedio se tiene un error total de 28.81 %, de acuerdo a lo observado el error se aminora a concentraciones de fosfato mayores a 3 ppm, lo que indica que el biosensor desarrollado podría ser una herramienta útil para aproximar los valores de fosfato de un perfil de liberación de MAP proveniente de sistemas microencapsulados.⁹

Tabla 17. Comparación del biosensor desarrollado (BS) con espectrometría de masas por plasma (ICP-MS).

Muestra	Ppm (ICP-MS)	% P2O5 (ICP-MS)	% P2O5 BS pH 8.5	% P2O5 BSpH 7.0	% P2O5 BSpH 4.5	% error promedio
Agua desionizada	0.209	0.98	n.a	n.a	n.a	n.a
1 ^a	2.804	13.15	21.26	25.49	25.48	45.38
2 ^a	4.723	22.15	25.49	27.79	27.78	18.02
3 ^a	6.041	28.33	37.23	42.71	32.14	24.17
4 ^a	7.102	33.31	42.71	47.23	48.24	27.68

5.1 Referencias de los resultados.

- [5] Pyati, R., & Richter, M. M. (2007). ECL—Electrochemical luminescence. *Annu. Rep. Prog. Chem., Sect. C: Phys. Chem.*, 103, 12–78.
- [1] Itamar Willner, Eugenio Katz. (2005). *Bioelectronics: From Theory to Applications*. John Wiley & Sons. Pp. 194.
- [2] Wheatley, R. A., Sariahmetoğlu, M., & Çakıcı, I. (2000). Enhancement of luminol chemiluminescence by cysteine and glutathione. *The Analyst*, 125(11), 1902–1904.
- [3] Chung-Wei Yang, Jyh-Myng Zen, Yu-Lin Kao, Cheng-Teng Hsu, Tung-Ching Chung, Chao-Chin Chang, Chi-Chung Chou, *Analytical Biochemistry* 395 (2009) 224–230.
- [4] Ferro, C. M., Calandra, A. J., & Arvia, A. J. (1975). Transient changes of intermediate species formed during the electrooxidation and surface electroreduction of gold within a monolayer thickness range. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 59(3), 239–253.
- [5] Sustersic, Zanon, Albano, von Mengershausen. “Deposición de Hidrógeno a Subpotencial sobre Oro Policristalino y con Orientación Preferida”. *Información Tecnológica*; 19:49–60. 2008.
- [6] MacQueen, R. W., Cheng, Y. Y., Clady, R. G. C. R., & Schmidt, T. W. (2010). Towards an aligned luminophore solar concentrator. *Optics Express*, 18(S2), A161.
- [7] Hiramoto, K.; Villani, E.; Iwama, T.; Komatsu, K.; Inagi, S.; Inoue, K.Y.; Nashimoto, Y.; Ino, K.; Shiku, H. Recent Advances in Electrochemiluminescence-Based Systems for Mammalian Cell Analysis. *Micromachines* 2020, 11, 530.
- [8] Liu, X., Qi, W., Gao, W., Liu, Z., Zhang, W., Gao, Y., & Xu, G. (2014). Remarkable increase in luminol electrochemiluminescence by sequential electroreduction and electrooxidation. *Chem. Commun.*, 50(93), 14662–14665.
- [9] Wang, R., Li, X., Nie, Z., Zhao, Y., & Wang, H. (2021). Metal/Metal Oxide Nanoparticles-Composited Porous Carbon for High-Performance Supercapacitors. *Journal of Energy Storage*, 38, 102479. doi:10.1016/j.est.2021.102479.
- [10] Yang, X., Yuan, T., Yang, J., Dong, B., Liu, Y., Zheng, Y., & Yuan, L. (2013). In-fiber integrated chemiluminescence online optical fiber sensor. *Optics Letters*, 38(17), 3433.

- [11] Cui H, Shi MJ, Meng R, Zhou J, Lai CZ, Lin XQ. *Photochemistry and Photobiology*. 2004;79(3):233–241.
- [12] Kokado, A., Arakawa, H., & Maeda, M. (2002). Chemiluminescent assay of alkaline phosphatase using dihydroxyacetone phosphate as substrate detected with lucigenin. *Luminescence*, 17(1), 5–10.
- [13] Upadhyay, Lata Sheo Bachan; Verma, Nishant (2015). Alkaline phosphatase inhibition based conductometric biosensor for phosphate estimation in biological fluids. *Biosensors and Bioelectronics*, 68(), 611–616
- [14] Kahveci, Zehra; Martínez-Tomé, Maria José; Mallavia, Ricardo; Mateo, C. Reyes (2017). Fluorescent Biosensor for Phosphate Determination Based on Immobilized Polyfluorene–Liposomal Nanoparticles Coupled with Alkaline Phosphatase. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 9(1), 136–144.
- [15] Cosnier, Serge; Gondran, Chantal; Watelet, Jean-Christophe; De Giovanni, Wagner; Furriel, Rosa P. M.; Leone, Francisco A. (1998). A Bienzyme Electrode (Alkaline Phosphatase–Polyphenol Oxidase) for the Amperometric Determination of Phosphate. *Analytical Chemistry*, 70(18), 3952–3956.
- [16] Bauer, C. G., Eremenko, A. V., Ehrentreich-Förster, E., Bier, F. F., Makower, A., Halsall, H. B., ... Scheller, F. W. (1996). Zeptomole-Detecting Biosensor for Alkaline Phosphatase in an Electrochemical Immunoassay for 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid. *Analytical Chemistry*, 68(15), 2453–2458.
- [17] Emine Yorganci & Erol Akyilmaz (2011) Alkaline Phosphatase Based Amperometric Biosensor Immobilized by Cysteamine-Glutaraldehyde Modified Self-Assembled Monolayer, *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, 39:5, 317-323.
- [18] Dai, H., Wu, X., Wang, Y., Zhou, W., & Chen, G. (2008). An electrochemiluminescent biosensor for vitamin C based on inhibition of luminol electrochemiluminescence on graphite/poly(methylmethacrylate) composite electrode. *Electrochimica Acta*, 53(16), 5113–5117.
- [19] Guilbault, G. G., & Nanjo, M. (1975). A phosphate-selective electrode based on immobilized alkaline phosphatase and glucose oxidase. *Analytica Chimica Acta*, 78(1), 69–80.
- [20] Gilberto Mercado-Mercado, Norma L. Duarte-Muñoz, Emilio Álvarez-Parrilla, Laura A. De La Rosa, Abraham Wall-Medrano: Fosfatasa alcalina (E.C.3.1.3.1): bioquímica y aplicaciones en las ciencias biomédicas, ecológicas y alimentarias. 2012; Vol.VI, No. 2.
- [21] Hethy J, Lal J, Loutet S, Martin M, Tang V. (2002). Effects of Tricine, Glycine and Tris Buffers on Alkaline Phosphatase Activity. *Experimental Microbiology and Immunology (JEMI)* Vol. 2:33-38.

- [22] Wang J. (2006) *Analytical Electrochemistry*, third edition. Copyright John Wiley & Sons, Inc. Pp 19.
- [23] Dai, H., Wu, X., Wang, Y., Zhou, W., & Chen, G. (2008). An electrochemiluminescent biosensor for vitamin C based on inhibition of luminol electrochemiluminescence on graphite/poly(methylmethacrylate) composite electrode. *Electrochimica Acta*, 53(16), 5113–5117.
- [24] Ali, M; Shuja, MN; Zahoor, M; Qadri, I (2010). Phytic acid: how far have we come. *African Journal of Biotechnology* 9 (11): 1551-1554.
- [25] N.T. Davies. A. A. Flett. (1978) The similarity between alkaline phosphatase (EC 3.1.3.1) and phytase (EC 3.1.3.8) activities in rat intestine and their importance in phytate-induced zinc deficiency. *Br.J. Nutr*, 39, 307.
- [26] Fuentes, M., Govaerts, B., De León, F., Hidalgo, C., Dendooven, L., Sayre, K. D., and Etchevers, J. (2009). Fourteen years of applying zero and conventional tillage, crop rotation and residue management systems and its effect on physical and chemical soil quality. *European Journal of Agronomy* 30, 228-237.
- [27] Benlamlih, F. Z., Lamhamedi, M. S., Pepin, S., Benomar, L., & Messaddeq, Y. (2021). Evaluation of a New Generation of Coated Fertilizers to Reduce the Leaching of Mineral Nutrients and Greenhouse Gas (N₂O) Emissions. *Agronomy*, 11(6), 1129.
- [28] Lombi, E., McLaughlin, M. J., Johnston, C., Armstrong, R. D., & Holloway, R. E. (2004). Mobility and Lability of Phosphorus from Granular and Fluid Monoammonium Phosphate Differs in a Calcareous Soil. *Soil Science Society of America Journal*, 68(2), 682.
- [29] Pivette, P., Faivre, V., Daste, G., Ollivon, M. y Lesieur, S. Rapid cooling of lipid in a prilling tower. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 98 (2009) 47-55.
- [30] Menczel, J. D., & Kohl, W. S. (2020). Differential scanning calorimetry (DSC) in fiber research. *Thermal Analysis of Textiles and Fibers*, 17–69.
- [31] Dorset, D.L. Development of lamellar structures in natural waxes – an electron diffraction investigation. *Journal of Physics D: Applied Physics*. 32 (1999) 1276-1280
- [32] Saari, H., Heravifar, K., Rayner, M., Wahlgren, M., & Sjöö, M. (2016). Preparation and Characterization of Starch Particles for Use in Pickering Emulsions. *Cereal Chemistry Journal*, 93(2), 116–124.
- [33] Altay, F., & Gunasekaran, S. (2006). Influence of Drying Temperature, Water Content, and Heating Rate on Gelatinization of Corn Starches. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(12), 4235–4245.

- [34] BeMiller, J. N. (2011). Pasting, paste, and gel properties of starch–hydrocolloid combinations. *Carbohydrate Polymers*, 86(2), 386–423.
- [35] Dean, R. L. (2002). Kinetic studies with alkaline phosphatase in the presence and absence of inhibitors and divalent cations. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 30(6), 401–407.
- [36] LI, Y., WANG, R., & FAN, A. (2020). Gold Nanoclusters-catalyzed Luminol Chemiluminescent Sensing Method for Sensitive and Selective Detecti3n of Alkaline Phosphatase. *Analytical Sciences*.
- [37] Navarro-Guajardo, N., Garc3a-Carrillo, E. M., Espinoza-Gonz3lez, C., T3llez-Zablah, R., D3vila-Hern3ndez, F., Romero-Garc3a, J. Pariona, N. (2017). Candelilla Wax as Natural Slow-Release Matrix for Fertilizers Encapsulated by Spray Chilling. *Journal of Renewable Materials*.
- [38] Lawrenc3a, D., Wong, S. K., Low, D. Y. S., Goh, B. H., Goh, J. K., Ruktanonchai, U. R., ... Tang, S. Y. (2021). Controlled Release Fertilizers: A Review on Coating Materials and Mechanism of Release. *Plants*, 10(2), 238.
- [39] Shor, S.M. (1970). Effect of surfactants and inorganic additives on nucleati3n kinetics in mixed suspensi3n crystallization. *Retrospective Theses and Dissertations*. Iowa State University.
- [40] Jetter, R., Riederer, M., 1994. Epicuticular crystals of nonacosan-10-ol: in vitro reconstituti3n and factors influencing crystal habits. *Planta* 195, 257–270.
- [41] Ensikat, H. J., Boese, M., Mader, W., Barthlott, W., & Koch, K. (2006). Crystallinity of plant epicuticular waxes: electron and X-ray diffracti3n studies. *Chemistry and Physics of Lipids*, 144(1), 45–59.
- [42] Sokar M, Hanafy A, El-Kamel A, El-Gamal S. (2013). Pulsatile core-in-cup cal sartan tablet formulatons: in vitro evaluation. *Asian J pharm Sci*, 8:234-43.
- [43] Alvarez-P3rez, O.B., Mont3ñez, J., Aguilar, C.N. y Rojas, R. Pectin-Candelilla Wax: An Alternative Mixture for Edible Films. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*. 5:2 (2015) 167-171.
- [44] Percy, K. E., & Baker, E. A. (1987). Effects of Simulated Acid Rain on Production, Morphology and Compositi3n of Epicuticular Wax and on Cuticular Membrane Development. *The New Phytologist*, 107(3), 577–589.
- [45] Rustan, A. C., & Drevon, C. A. (2005). Fatty Acids: Structures and Properties. *Encyclopedia of Life Sciences*.
- [46] Ratnayake, W. S., & Jackson, D. S. (2006). Gelatinizaci3n and Solubility of Corn Starch during Heating in Excess Water: New Insights. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(10), 3712–3716.

- [47] Han, H., Zhang, H., Li, E., Li, C., & Wu, P. (2018). Structural and functional properties of OSA-starches made with wide-ranging hydrolysis approaches. *Food Hydrocolloids*.
- [48] Guan M, Garabedian MV, Leutenegger M, Schuster BS, Good MC, Hammer DA. (2021). Incorporación and Assembly of a Light-Emitting Enzymatic Reaction into Model Protein Condensates. *Biochemistry*. 26;60(42):3137-3151
- [49] Yarce, C. J., Pineda, D., Correa, C., & Salamanca, C. H. (2016). Relationship between Surface Properties and In Vitro Drug Release from a Compressed Matrix Containing an Amphiphilic Polymer Material. *Pharmaceuticals*, 9(34), 1-20
- [50] K. W. King, & J. C. Balogh. (2000). Development of a nitrogen-release algorithm for slow release fertilizers. *Transactions of the ASAE*, 43(3), 661–664.
- [51] Rocha-García, D., Guerra-Contreras, A., Rosales-Mendoza, S., & Palestino, G. (2016). Role of porous silicon/hydrogel composites on drug delivery. *Open Material Sciences*, 3(1).
- [52] Khajvand, T., Akhoondi, R., Chaichi, M. J., Rezaee, E., & Golchoubian, H. (2014). Two new dinuclear copper(II) complexes as efficient catalysts of luminol chemiluminescence. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 282, 9–15.
- [53] B.W.Green. “Fertilizers in aquaculture” United states Department of Agriculture, Stuttgart, AR, USA Chapter 2, 2015.
- [54] Cuevas-Bernardino, J. C., Leyva-Gutierrez, F. M. A., Vernon-Carter, E. J., Lobato-Calleros, C., Román-Guerrero, A., & Davidov-Pardo, G. (2018). Formation of biopolymer complexes composed of pea protein and mesquite gum – Impact of quercetin addition on their physical and chemical stability. *Food Hydrocolloids*, 77, 736–745.
- [55] Jeong J.C., Lee J. y Cho K. Effects of crystalline microstructure on drug release behavior of poly(ϵ -caprolactone) microspheres. *Journal of Controlled Release*. 92 (2003) 249-258.

Capítulo 6

Conclusiones

De acuerdo con los resultados obtenidos en el desarrollo de esta investigación, puede concluirse que se ha validado la hipótesis planteada inicialmente. El trabajo realizado demuestra que el desarrollo del biosensor para detección de fosfato proveniente del perfil de liberación de sistemas microencapsulados a base de fertilizante es funcional.

Concluyendo los siguientes puntos:

- El buffer de glicina presenta una capacidad electrolítica para llevar a cabo mediciones electroquímicas con un sistema de luminol y fue igualmente útil para la incubación de la enzima por periodos de tiempo de 10 minutos a 37°C, siendo la base electrolítica para el desarrollo del biosensor.
- El fertilizante MAP a base de fosfato presenta un efecto inhibitorio sobre la enzima fosfatasa alcalina, dicha interacción resultó beneficiosa para la investigación, ya que, basándose en esta reacción se diseña el modelo que permite la generación de un biosensor On/Off para la detección de grupos fosfato.
- Las mediciones de pH estudiadas denotan cambios congruentes de la medición en el tiempo, asumiendo que los encapsulados presentan una liberación lenta del fertilizante.
- El biosensor desarrollado responde ante la presencia de grupos fosfato provenientes de sistemas microencapsulados de fertilizante a base de fósforo.
- Los resultados obtenidos mediante DSC exhiben un desplazamiento en la intensidad de los picos característicos antes y posterior a la liberación del fertilizante, lo que indica que no existen cambios estructurales sobre la cristalinidad de la cera de candelilla.
- Los resultados obtenidos a través de SEM demuestran que las partículas de CeraC50/50 permanecen estructuralmente integras posterior a la liberación controlada.
- Las características físicas y cinéticas de los microencapsulados a base de almidón y goma de mezquite

se ven influenciadas por el pH del medio y el tiempo, observando por la técnica de SEM mayores cambios en la estructura de la microcápsula.

- En cuanto a los modelos cinéticos, los perfiles de liberación se ajustan en mayor grado al modelo de Korsmeyers Peppas. El cual revela que la liberación es controlada por la relajación de las cadenas poliméricas e hinchamiento para los sistemas MQZT y por medio de difusión parcial a través de poros llenos de agua para el sistema CeraC 50/50.
- Comparando el biosensor desarrollado con una técnica analítica de espectrometría de masas por plasma, se demuestra que el biosensor es útil para aproximar la cantidad de grupos fosfato provenientes de un perfil de liberación, sin embargo, existe un error de 28%.

Perspectivas y trabajo futuro

- Fijar la enzima al electrodo, junto con nanopartículas metálicas o nanorods se podrá aumentar la eficiencia en la transferencia de electrones, mejorando el proceso electroquimioluminiscente.
- Realizar nuevas formulaciones de microencapsulados con cera de candelilla y evaluar el perfil de liberación durante periodos de tiempo prolongados.
- Hacer perfiles de liberación bajo condiciones reales para evaluar la eficiencia del biosensor o si existe interferencia de las reacciones electroquímicas con los componentes del suelo.
- Utilizar modelos cinéticos adicionales para la evaluación de los mecanismos de liberación para determinar si existe algún otro modelo que se ajuste de mejor manera a la liberación.