



Liberación de fertilizantes a través de biomembranas de quitosano

Alia Baroudi Guijarro^a, Carmen García Payo^a, Victoria Fernández^b, Mohamed Khayet^{a,c}

^aDepartamento de Física Aplicada I, Facultad de Ciencias Físicas, Universidad Complutense, 28040 Madrid

^bDepartamento de Genética Forestal y Ecofisiología, Facultad de Ingeniería Forestal, Universidad Politécnica, 28040 Madrid

^cInstituto Madrileño de Estudios Avanzados (IMDEA Agua), Alcalá de Henares, 28805, Madrid

^a E-mail: abaroudi@ucm.es

1 Introducción

Desde la Antigüedad, la agricultura y la ganadería han sido dos actividades que han ido unidas, ya que los desechos de la ganadería eran los abonos de los cultivos. Sin embargo, a día de hoy, son dos actividades independientes. En la actualidad, hay una búsqueda constante de fertilizantes y abonos para optimizar el uso de los suelos. La fertilización es, por definición, el conjunto de técnicas que mantienen los sustratos y las plantas en su estado más óptimo, ya que facilita a los sustratos los nutrientes necesarios para optimizar las propiedades de los cultivos y plantas. Dependiendo de la administración que se haga de ellos se puede acelerar o retrasar el crecimiento, manipular la capacidad de arraigo a un terreno, la resistencia a la falta de agua, a los cambios de temperatura y a enfermedades [1].

Tradicionalmente, los fertilizantes se han añadido directamente a los sustratos o a las plantas o se han disuelto en agua, lo cual ha supuesto una mala administración de la cantidad necesaria, Tanto la falta como el exceso de nutrientes tiene un efecto negativo sobre el crecimiento de las plantas. Otro problema debido a la administración directa de los fertilizantes es que los elementos fertilizantes sufren la volatilización, lixiviación y drenaje, que contribuyen a la contaminación del medio y de las aguas subterráneas.

En la actualidad, la tendencia es a reemplazar los fertilizantes tradicionales por los de liberación controlada, ya que reducen el exceso de sustancias activas en el medio ambiente que puedan resultar tóxicas, optimizando el uso de los nutrientes y abaratando costes. Estos sistemas se denominan así ya que liberan los nutrientes minerales hacia el sustrato de forma continua en el tiempo evitando los problemas antes mencionados y reduciendo los riesgos de una mala fertilización [1-4].

Los sistemas de liberación controlada de fertilizantes suelen ser cubiertas poliméricas superabsorbentes [4, 5], los cuales cuando se degradan pueden dejar residuos en el suelo que pueden causar salinización [6]. Por ese motivo, la tendencia actual es utilizar polímeros biodegradables que no dejen residuos que puedan ser perjudiciales.

Uno de estos polímeros es el quitosano, biopolímero de origen natural procedente de la cáscara de los crustáceos. Debido a sus propiedades como biocompatibilidad, biodegradabilidad, permeabilidad y no toxicidad ha sido ampliamente utilizado como



biopolímero para la liberación controlada [7-9]. Además, se puede utilizar en la fabricación de fibras, membranas, geles y microesferas.

1.1 Elementos fertilizantes

Los fertilizantes son compuestos que suministran a las plantas y cultivos las sales minerales imprescindibles para su desarrollo, u otros elementos inorgánicos que, aún no siendo esenciales, estimulan o inhiben la absorción de otros nutrientes en la cantidad necesaria.

La clasificación de los nutrientes esenciales de las plantas se hace teniendo en cuenta la cantidad necesaria para un buen desarrollo. Los elementos que se necesitan en más cantidad se denominan macronutrientes y son: hidrógeno, oxígeno y carbono, que son obtenidos del agua y el dióxido de carbono, y nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, magnesio y azufre que se encuentran en los suelos [10, 11]. Los demás elementos que también son indispensables pero en menor cantidad se denominan micronutrientes y son: hierro, manganeso, boro, molibdeno, cobre, zinc y cloro. Otros micronutrientes pero que no son necesarios en todas las plantas son: sodio, silicio, cobalto y vanadio [11, 12]. Actualmente, otros elementos como rubidio, estroncio, aluminio y bario, se consideran beneficiosos para las plantas, ya que pueden estimular la absorción de iones que se encuentran en menor cantidad, o inhiben la absorción de los que están en exceso [11]. Estos elementos, en su mayor proporción, son absorbidos por las plantas cuando se encuentran en forma de iones en los suelos [13].

De forma natural, el fósforo, el potasio, el calcio y el cloro proceden de la erosión de minerales y de la descomposición de la materia orgánica, mientras que el nitrógeno proviene de los microorganismos de los suelos [11, 14]. Debido a las cosechas, lixiviación, volatilización y erosión de los suelos, gran parte de estos elementos desaparecen, y la fertilización es la encargada de reponer la falta de los nutrientes necesarios en los cultivos.

El nitrógeno forma parte de procesos metabólicos y enzimáticos de las plantas [10]. Es absorbido por la raíz en forma de nitrato NO_3^- o amonio NH_4^+ , aunque la más habitual es como nitrato [11]. El amonio de los suelos puede ser transformado por microorganismos en nitratos, o volatilizado a la atmósfera en forma de amoníaco NH_3 , lo que implica pérdidas de amonio de los suelos y problemas ambientales. El amoníaco al ser un gas, puede llegar a terrenos vecinos y causar daños en la vegetación. Respecto a los nitratos, si se encuentran en exceso, son lixiviados a capas acuíferas subterráneas que quedan contaminadas [4].

El fósforo es absorbido por las plantas como iones H_2PO_2^- o como HPO_4^{2-} , y es necesario para la formación del ADP y ATP de las plantas, de los ácidos nucleicos, coenzimas, fosfolípidos y la fosforilación de azúcares [10, 14]. Los fosfatos son iones con alta capacidad de reacción y pueden reaccionar con otros compuestos de los suelos y no ser absorbidos por la planta. Además, un exceso de fertilizantes fosfatados puede ser lixiviado, acelerando la eutrofización en los medios acuáticos y aumentando el número de



algas, provocando la desaparición del oxígeno del agua y llevando a los peces a la muerte [4].

El potasio es absorbido por las plantas en su forma iónica K^+ , y participa en procesos enzimáticos, como activador de enzimas, además de encargarse de la apertura y cierre de los estomas y participar en la fotosíntesis [10]. Las pérdidas de potasio se deben principalmente a la lixiviación, lo que contribuye a la eutrofización, al igual que el fósforo [15].

El calcio es absorbido por las plantas como Ca^{2+} , y forma parte de las paredes celulares, es un regulador de membrana y de las actividades enzimáticas y reduce los excesos de NO_3^- [10]. El calcio se encuentra, de forma natural, en los suelos calcáreos.

El cloro, absorbido por las plantas en su forma de ión Cl^- , es el encargado de los procesos de ósmosis y equilibrio iónico [10]. Normalmente, la cantidad de cloro que se encuentra en los suelos es suficiente para los cultivos, ya que se necesitan en poca cantidad. Es un elemento altamente soluble, lo que facilita que cuando está en exceso sea drenado. Puede reaccionar con otros elementos, como el sodio, formando sales que salinizan los suelos.

Algunos de los fertilizantes que contienen estos elementos son el nitrato amónico (NH_4NO_3), el nitrato potásico (KNO_3) y el cloruro de calcio ($CaCl_2$). El NH_4NO_3 , es el fertilizante más utilizado junto con el amoníaco líquido. Es compatible con la mayoría de los fertilizantes, a excepción de la urea, y su reacción en el suelo es adificante, por lo que se recomienda para terrenos salinos o neutros. Además, es aconsejable añadirlo al suelo tapado o enterrado para evitar la volatilización [16]. El KNO_3 es una sal idónea para mezclar con otros fertilizantes, recomendándose su uso en suelos con tendencia a la salinidad ya que tiene un bajo índice de salinidad [16]. El $CaCl_2$ es una sal neutra muy utilizada como fertilizante puesto que aporta calcio y no tiene efecto alcalinizante [17].

Cuando se decide hacer un fertilizante con distintos elementos, hay que tener en consideración las compatibilidades entre ellos, ya que no deben reaccionar entre ellos ni antes ni después de la formulación. Si los fertilizantes no son compatibles entre ellos, pueden emitir calor, gas o humedad, degradando el gránulo, aglutinándose y cambiando la composición química de la mezcla [16]. Además, hay que tener en cuenta las interacciones iónicas entre los diferentes iones en el suelo, ya que provocan el aumento (sinergismo) o la reducción (antagonismo) de la absorción en una planta. Se ha observado que un aumento de potasio en suelos, reduce la absorción de calcio y magnesio. También que el calcio en exceso insolubiliza los fosfatos del suelo y el exceso de cloro reduce la absorción de NO_3^- . Al contrario, un aumento de nitrógeno en los suelos mejora la absorción de potasio [11, 18].



1.2 Quitosano

Este biopolímero es un polisacárido derivado de la quitina, que se encuentra en los caparazones de algunos crustáceos e insectos, a los que les confiere rigidez e impermeabilidad, y en las paredes celulares de algunas plantas y hongos [8, 19].

De forma industrial, el quitosano se obtiene a través de la desacetilación alcalina de la quitina. Ambos polímeros son químicamente similares a la celulosa, de la que difieren en que el grupo hidroxilo del carbono 2 de la unidad de anhidroglucosa, ha sido sustituido por un grupo acetamido (quitina) o amino (quitosano) [20-22], como se observa en Figura 1. A partir de la quitina, se obtiene quitosano cuando éste ha perdido al menos el 50% de los grupos acetilo [23].

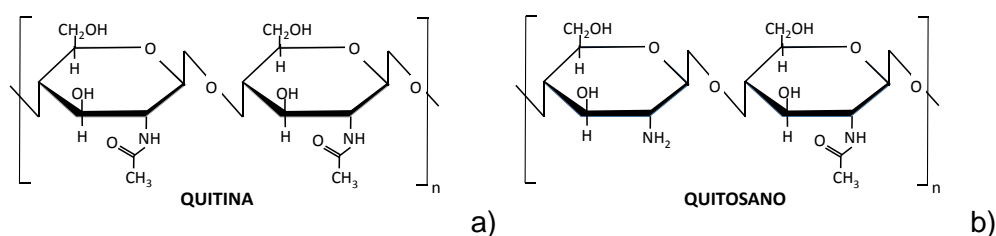


Figura 1. Estructura química de a) quitina y b) quitosano.

El porcentaje de grupos amino, que están libres en la molécula de quitosano, es el responsable de las propiedades que hacen tan eficiente al quitosano. Debido a la hidrólisis del grupo N-acetilo, es soluble en disoluciones ácidas diluidas (acético, fórmico o clorhídrico, entre otros), que protonan los grupos amino y le confiere un carácter altamente reactivo [24] y, a su vez, biocompatible y biodegradable, que lo hace polivalente en todo tipo de industrias [8, 9, 25, 26]. Además, está incluido y aprobado en la cuarta edición de la Farmacopea Europea de 2002 [27].

En el área de la agricultura, su uso se está extendiendo ya que tiene propiedades inhibitoras ante bacterias y hongos [9] evitando su crecimiento. Además, es un polímero válido para la liberación controlada ya que su modificación con agentes reticulantes, que refuerzan los enlaces entre las distintas cadenas de quitosano, hace más resistente a la matriz polimérica. El tripolifosfato de sodio, el ácido cítrico o la glutaraldehído [9, 28, 29] y otros aditivos, como arcillas y/o nanopartículas [6, 30], permiten modificar la velocidad de liberación del principio activo.

El uso del quitosano en fertilizantes se utiliza tanto para la fabricación de micro y nano partículas de quitosano, que contienen los fertilizantes dentro de la matriz polimérica [2, 6, 9], como en encapsulación [28].

El tripolifosfato de sodio (TPP) es, en la actualidad, uno de los agentes reticulantes más utilizados con el quitosano debido a su baja toxicidad y compatibilidad con el quitosano [31, 32]. La reacción entre el quitosano y el TPP está descrita en la bibliografía y es dependiente del pH [33, 34].



Cuando el TPP se disuelve en agua (pH 9), se disocia en iones tripolifosfóricos y en OH^- , que coexisten en la disolución. Cuando el quitosano entra en contacto con dicha disolución de TPP, al ser la disolución de quitosano ácida, los iones de $\text{P}_3\text{O}_{10}^{-5}$ y $\text{HP}_3\text{O}_{10}^{-4}$ compiten con los OH^- por reaccionar con los grupos NH_3^+ del quitosano por entrecruzamiento iónico, en el caso de los iones tripolifosfóricos, o por desprotonación, en el caso de los OH^- . Por consiguiente, habrá grupos amino neutralizados por los grupos hidroxilo y grupos amino entrecruzados iónicamente, como se observa en la *Figura 2 a)*. Sin embargo, como puede verse en la *Figura 2 b)*, si el pH del TPP es ajustado a un pH ácido, sólo existirán iones tripolifosfóricos. En este caso, el complejo quitosano-TPP se forma exclusivamente por entrecruzamiento iónico entre los grupos NH_3^+ y los aniones de TPP.

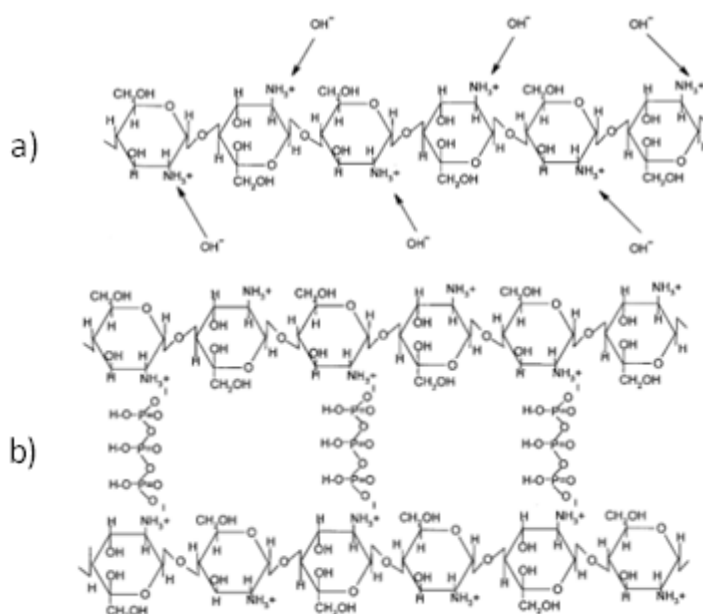


Figura 2: Esquema de la reacción entre el quitosano en disolución ácida y los iones de TPP: a) neutralización de los grupos amino y b) entrecruzamiento iónico [33].

2 Objetivo principal

El objetivo de este trabajo es fabricar biomembranas de quitosano con post-tratamientos de TPP, para estudiar su viabilidad como barrera de liberación de tres fertilizantes: NH_4NO_3 , KNO_3 y CaCl_2 .

Se ha estudiado cómo se libera cada uno de estos fertilizantes cuando están aislados para biomembranas con post-tratamientos de TPP a dos pH (4 y 9) y las interacciones entre los fertilizantes cuando están los tres fertilizantes.



3 Experimental

3.1 Materiales

Para la fabricación de las biomembranas, se ha utilizado quitosano comercial de alta viscosidad de la casa Sigma-Aldrich procedente del caparazón del cangrejo (se denotará como CA), ácido acético ($C_2H_4O_2$) con una pureza de 99,8% de la marca Sigma-Aldrich y agua destilada.

Las biomembranas se han sometido a post-tratamientos con sodio trifosfato pentabásico (TPP) de la casa Sigma-Aldrich. En algunas de las disoluciones de post-tratamiento se ajustó el pH de la disolución con HCl de la casa Sigma-Aldrich.

Los experimentos de transporte se realizaron con las sales que hacen de fertilizantes una vez disueltas en agua destilada: nitrato de amonio (NH_4NO_3), nitrato de potasio (KNO_3) y cloruro de calcio ($CaCl_2$) de Panreac.

3.2 Fabricación de las biomembranas

Las biomembranas se fabricaron a partir de una disolución de 1% w/w de quitosano en una disolución al 2% w/w de ácido acético en agua destilada. El protocolo que se siguió para la fabricación de las membranas fue el siguiente:

Para homogeneizar las disoluciones de quitosano con ácido acético se agitaron, debidamente tapada para minimizar la evaporación del ácido acético, durante 6 horas en un rotor de la marca Heidolph modelo 2021 a una velocidad de 400 rpm. A continuación, se introdujeron en un baño de ultrasonidos (marca FisherBrand modelo FB15050) durante 1 hora para eliminar todas las burbujas de aire formadas.

Para fabricar las biomembranas, se vertieron las disoluciones biopoliméricas sobre unas placas de vidrio con moldes circulares de 10 cm de diámetro. Se dejaron secar (evaporación del disolvente) debidamente tapadas a temperatura ambiente. Las biomembranas se sometieron a un post-tratamiento al 3% w/w de TPP a dos valores de pH diferentes (4 y 9) y durante dos tiempos de post-tratamiento (3 y 20 h)

La notación de las biomembranas será CA por el tipo de quitosano, seguido del tiempo de post-tratamiento (3 o 20h), la concentración de la disolución de TPP (3TPP) y por último el pH de la disolución de TPP (4 o 9).

4 Técnicas experimentales

4.1 Espesor de las biomembranas

Para la fabricación de biomembranas planas, la cantidad de disolución biopolimérica depositada en cada molde es diferente dependiendo del grosor de membrana que se quiera obtener. Dado que se buscan espesores entre 30 y 40 μm , se ha realizado un calibrado previo a partir de la fabricación de biomembranas de diferentes espesores para saber la masa de la disolución necesaria para obtener esos espesores. Se han tomado medidas de los espesores sin post-tratamiento y con los diferentes post-tratamientos realizados en este trabajo.



Los espesores de las biomembranas se midieron con un micrómetro digital de la casa ISOCONTROL. Se han tomado al menos 40 medidas a lo largo de diferentes diámetros, determinándose los espesores a partir de los valores medios medidos con un error correspondiente a sus desviaciones típicas (σ_n).

4.2 Grado de hinchamiento o “swelling”

Este término hace referencia al porcentaje de líquido que es capaz de absorber una biomembrana. Estas medidas se realizaron con trozos de biomembranas con espesores alrededor de 35 μm , que son las que se utilizaron en los experimentos de difusión. El grado de hinchamiento o *swelling* (%DS) viene definido como [35]:

$$\%DS = \frac{W_s - W_d}{W_d} \quad (1)$$

Donde W_s es la masa del trozo de biomembrana mojado, y W_d es la masa del trozo de biomembrana seco antes de sumergirla en el líquido.

Los trozos se pesaron en una balanza de precisión de la casa *Sartorius*, que tiene una precisión de ± 0.0001 g. Una vez pesado el trozo en seco (W_d), se introduce en el líquido durante un cierto intervalo de tiempo, se saca, se le quita con papel de filtro el exceso de líquido superficial y finalmente se pesa. Esta operación se repite varias veces a lo largo del tiempo hasta que se alcanza un valor estable o comienza a haber pérdidas de masa.

4.3 Medidas de transporte

La cinética de liberación de fertilizantes se realiza habitualmente en agua [28, 36], ya que no existe un método normalizado para determinar el paso de nutrientes a la disolución suelo, por lo que no se han tenido en cuenta las condiciones de campo como lo son el tipo de suelo, textura, contenido de materia orgánica, acidez y humedad. Sí se ha tenido en cuenta el pH de la disolución suelo y como ha variado en función de la liberación de los fertilizantes.

El dispositivo experimental utilizado ha sido una célula de difusión como la que se muestra en la Figura 3. La biomembrana se coloca entre dos depósitos, cada uno con una capacidad de 150 mL. Uno de ellos se llena de agua destilada y el otro con la disolución de fertilizantes que se quiere liberar. Para homogeneizar los líquidos se utilizan agitadores magnéticos. Los depósitos tienen dos orificios en la parte superior, uno para su llenado y poder introducir la sonda de medida y el otro para la medida del pH. Todos los ensayos se realizaron a temperatura ambiente.

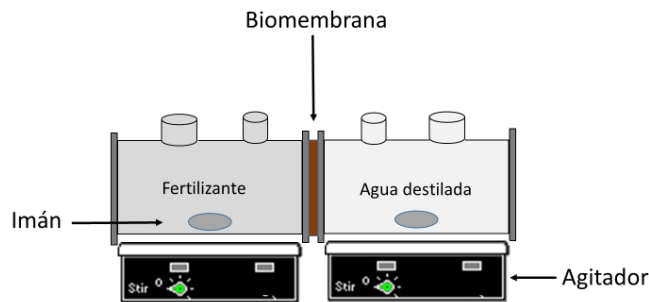


Figura 3: Esquema de la célula utilizada para realizar las medidas de transporte de fertilizantes.

Los tipos de fertilizantes y las concentraciones utilizadas fueron:

- 1 mM de NH_4NO_3
- 1.1mM de KNO_3
- 9 mM de CaCl_2
- Mezcla de los tres anteriores en las mismas concentraciones. Estos experimentos de transporte se denotarán como MEZ seguido del elemento.

Las medidas se realizaron con una sonda imaCimus de NT Sensors que permite medir los iones de NH_4^+ , NO_3^- , K^+ , Ca^{2+} , Cl^- y el pH de la disolución de forma simultánea.

Se realizaron medidas de todos los iones y del pH en función del tiempo en el lado del alimento (fertilizante) como en el lado del permeado (agua destilada). Debido a la diferencia de concentraciones, se origina un flujo constante de soluto desde el depósito con la concentración de fertilizantes (alimento) hacia el depósito que contiene agua destilada (permeado), que es directamente proporcional al gradiente de concentración, siendo D , el coeficiente de difusión:

$$J_x = -D \frac{dc}{dx} \quad (2)$$

5 Resultados experimentales

5.1 Espesor de las biomembranas

Se han medido los espesores de diferentes biomembranas fabricadas sin y con post-tratamiento de TPP a dos diferentes valores de pH y para dos tiempos de post-tratamiento. Los resultados se muestran en la Figura 4. En todas las biomembranas se aprecia una dependencia lineal del espesor en función de la masa de la disolución biopolimérica depositada en los moldes.

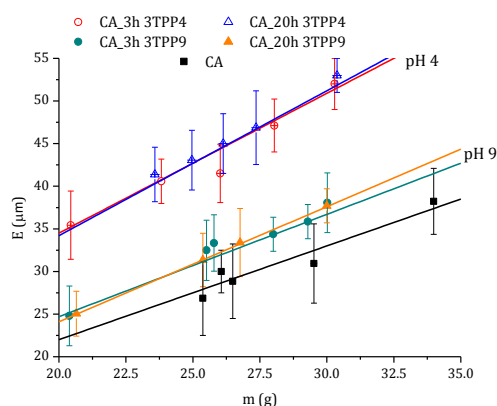


Figura 4: Dependencia del espesor de las biomembranas sin y con diferentes post-tratamientos con TPP a diferentes valores de pH en función de la disolución de quitosano. Los símbolos vacíos corresponden a pH 4 y los símbolos llenos a pH 9.

Los post-tratamientos de TPP aumentan el espesor de las biomembranas independientemente del tiempo que estuvieron inmersas. En los post-tratamientos de TPP a pH 9, tanto las biomembranas sumergidas durante 3 h como las de 20 h, aumentan su espesor un 16%. Las biomembranas sometidas a post-tratamiento a pH 4, aumentaron mucho más su espesor, un 48%. Esto se atribuye a que como la disolución polimérica (quitosano+ ácido acético/agua) que es ligeramente ácida, y un post-tratamiento con TPP a pH 4 favorece el entrecruzamiento iónico, formando uniones entre las cadenas polisacáridas y, por tanto, una estructura que hace que aumente el espesor. Sin embargo, cuando se realiza el post-tratamiento a TPP 9 hay grupos amino neutralizados que no contribuyen a la unión de las cadenas polisacáridas (Figura 2). Por lo tanto, el espesor no aumenta tanto.

Velickova et al [37] fabricó películas de quitosano con glicerol y Tween80 en la disolución, y un post-tratamiento en TPP a pH 9 de 5 min, obteniendo películas más delgadas que las de quitosano solo. Al contrario, las biomembranas obtenidas en este trabajo muestran que los espesores aumentan considerablemente con los post-tratamientos de TPP, para tiempos de post-tratamientos largos y sin incluir ningún aditivo en la disolución de quitosano.

5.2 Grado de hinchamiento o “swelling”

Se realizaron ensayos para evaluar el grado de hinchamiento de las biomembranas sometidas a los diferentes post-tratamientos. Los resultados se muestran en la Figura 5.

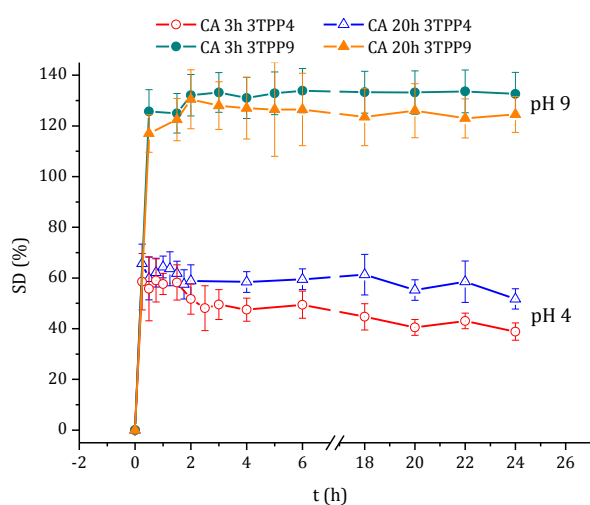


Figura 5: Grado de hinchamiento de las biomembranas sometidas a los post-tratamientos de TPP a pH 4 y pH 9 durante 3 h y 20 h. Los símbolos vacíos corresponden a pH 4 y los símbolos llenos a pH 9.

No se muestran las medidas de *swelling* de la biomembrana CA, ya que los valores obtenidos fueron de 500% en la primera media hora y 380 % a 1 h y la biomembrana comenzaba a deshacerse. Esto es debido a que las cadenas polisacáridas no están interconectadas entre ellas (reticulación) y, por lo tanto, el agua puede introducirse fácilmente.

Las biomembranas con post-tratamientos de TPP presentan valores de *swelling* menores que las biomembranas sin reticulación, siendo estos valores estables durante, al menos, las 24 h de medida. Además, se observa que el *swelling* es el mismo para los dos tiempos de post-tratamiento elegidos, lo que demuestra que en las 3 h de post-tratamiento ya se ha alcanzado la reticulación máxima en la biomembrana fabricada con el espesor antes del post-tratamiento de 35 μm .

Los resultados obtenidos están de acuerdo con la bibliografía. Aranaz et al [38], Velickova et al [37] y Gierszewska et al [39] obtuvieron valores de *swelling* menores en las biomembranas reticuladas que en las que no lo están. Además, Aranaz et al [38] comenta que para diferentes concentraciones de TPP (entre 1 y 5%) en distintos tiempos de post-tratamiento (entre 1 y 4 h), el *swelling* de las biomembranas que fabrican fue el mismo, lo que demuestra que, en nuestro estudio, las 3 h elegidas de post-tratamiento es tiempo suficiente para que la biomembrana se reticule.

En la Figura 5 se observa, que el *swelling* es mayor en las biomembranas con post-tratamiento de TPP a pH 9. Este resultado se debe a que, la biomembrana fabricada procede de una disolución de quitosano ácida, por lo que presenta mayor afinidad por la disolución de TPP a pH 4, lo que facilita la penetración de los iones tripolifosfóricos en el interior de la biomembrana produciendo solo entrecruzamiento iónico y dificultando que el agua penetre en la biomembrana. Cuando se realiza un post-tratamiento con TPP a pH básico, los grupos amino neutralizados por los iones OH^- no forman puentes iónicos con los iones tripolifosfóricos, por lo que el porcentaje de unión entre las cadenas



polisacáridas es menor. Esto favorece que el agua puede introducirse entre las cadenas de quitosano [33]. Estos resultados verifican lo publicado por Gierszewska et al [39], que obtiene valores de absorción de agua menores a pH ácido que básico.

5.3 Medidas de transporte de fertilizantes a través de biomembranas de quitosano

Se ha medido la liberación de los fertilizantes por separado para las biomembranas sometidas a post-tratamientos de TPP a pH 4 y pH 9 para estudiar y conocer con cuál de los dos post-tratamientos es más lenta la liberación.

Además, se han medido los tres fertilizantes mezclados utilizando biomembranas con post-tratamientos de TPP a pH 4 a los dos tiempos de post-tratamiento, para saber cuál de los dos tiempos era más adecuado para la liberación de iones.

5.3.1 Transporte en función del pH del post-tratamiento de la biomembrana

A continuación, se comparan los resultados de las medidas de transporte de las biomembranas con post-tratamientos de 3 h en TPP a pH 4 y a pH 9 para los fertilizantes NH_4NO_3 y CaCl_2 . Como puede observarse en la Figura 6 y en la Figura 7, no se aprecia una diferencia significativa en la liberación de los iones NH_4^+ , NO_3^- , Ca^{2+} y Cl^- en función del pH del post-tratamiento de la biomembrana. Sin embargo, sí se observan comportamientos diferentes dependiendo del tipo de ión.

En la Figura 6 se muestra el transporte de iones NH_4^+ y NO_3^- a través de la biomembrana de quitosano con post-tratamientos a pH 4 y a pH 9. Las curvas de variación de la concentración de cada ión en el lado del alimento y en el lado del permeado no son simétricas, lo que indica que los iones son fijados rápidamente a la superficie de la biomembrana, difundiéndose después más lentamente a través de ella.

Esta adsorción es mucho más acusada en el caso del ión NH_4^+ observándose una disminución del 72% en la concentración de NH_4^+ del alimento en las primeras 5 h, mientras que en el del permeado solo aumentó un 5%. A partir de las 24 horas se aprecia una liberación más significativa en el lado del permeado, cuando en el lado del alimento se ha llegado la concentración estacionaria.

Para los iones de NO_3^- , la liberación en el lado del permeado empieza desde el primer momento y tiene un comportamiento lineal durante las 50 h de experimento, si bien se observa también adsorción de los iones en las primeras medidas. Los iones NO_3^- alcanzan la concentración de equilibrio ($\Delta c = c_{\text{alimento}} - c_{\text{permeado}} \approx 0$) antes que para los iones NH_4^+ debido a que la biomembrana es más afín a los iones NH_4^+ y, por tanto, su coeficiente de difusión es menor.

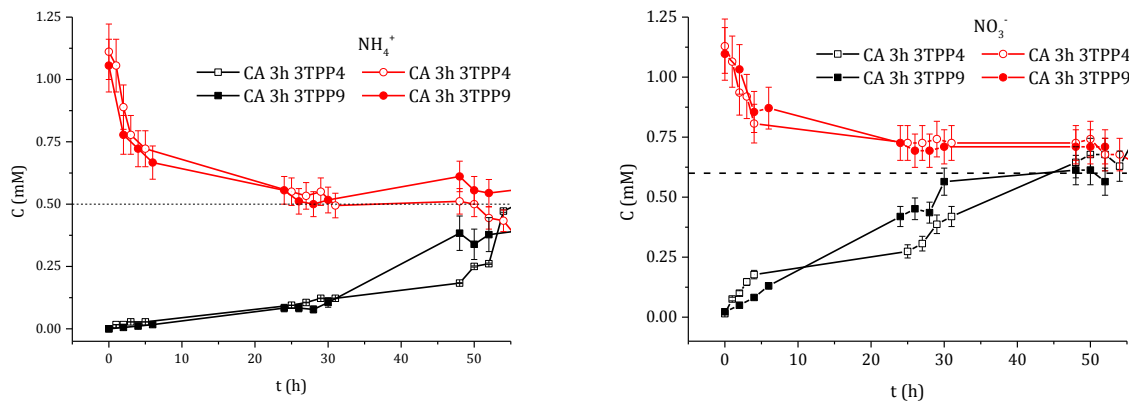


Figura 6: Representación de la liberación y adsorción de iones de NH_4^+ y NO_3^- en función del post-tratamiento de la biomembrana de quitosano utilizando NH_4NO_3 como fertilizante. En rojo se representan las medidas en el lado del alimento y en negro las del lado del permeado. Los símbolos vacíos corresponden a pH 4 y los símbolos llenos a pH9.

Las medidas de transporte de $CaCl_2$ se muestran en la Figura 7. Se observa que después de 76 h las concentraciones de Ca^{2+} y Cl^- no alcanzan la concentración de equilibrio. Por tanto, la liberación de estos iones a través de la biomembrana es muy lenta.

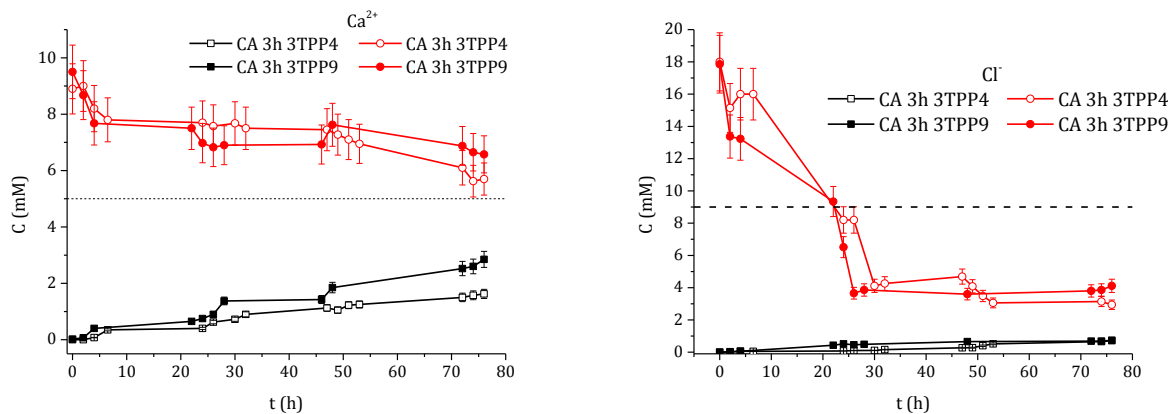


Figura 7: Representación de la liberación y adsorción de iones de Ca^{2+} y Cl^- en función del post-tratamiento de la biomembrana de quitosano utilizando $CaCl_2$ como fertilizante. En rojo se representan las medidas en el lado del alimento y en negro las del lado del permeado. Los símbolos vacíos corresponden a pH 4 y los símbolos llenos a pH9.

Para los iones de Ca^{2+} se observa una adsorción en el lado del alimento aproximadamente un 40%, apreciándose una pequeña diferencia con el pH del TPP. El paso de iones a través de la biomembrana, es decir, el coeficiente de difusión, es bajo. Sin embargo, es ligeramente mayor en CA 3h TPP.9.

La concentración de iones Cl^- en el lado del alimento disminuye muy rápidamente, incluso muy por debajo de la concentración de equilibrio estacionario a 9mM. En las



primeras 24 h del experimento, la concentración de iones Cl^- disminuye de 18 mM a 3 mM; sin embargo, en el lado del permeado apenas aumenta hasta 0.1 mM. La sonda de medida permite medir la cantidad de iones Na^+ que se encuentran en la disolución, observándose que a medida que el tiempo del experimento avanza, la cantidad de iones Na^+ que se encuentran en la disolución en ambos depósitos aumenta, siendo mayor en el lado del alimento. Esto lleva al razonamiento de que gran parte de los iones Cl^- reaccionan con los Na^+ procedentes del TPP y formen sal NaCl , lo que justifica que el Cl^- no se difunda a través de la biomembrana.

Mi et al [33] observaron que el pH del TPP afecta a la liberación, ya que a pH más bajo el grado de entrecruzamiento iónico entre el TPP y el quitosano es mayor, lo que hace más lenta la liberación de diferentes medicamentos. En relación a la liberación de los fertilizantes en función del pH del post-tratamiento, no se verifica lo propuesto en ese artículo, ya que se observa que las concentraciones de iones liberadas no dependen del pH de la biomembrana, son del mismo orden de magnitud. Se puede concluir, que los perfiles de liberación y adsorción de los iones NH_4^+ , NO_3^- , Ca^{2+} y Cl^- en la biomembrana no dependen del pH de post-tratamiento.

5.3.2 Transporte en función de la composición del fertilizante

Se ha realizado una comparación de los resultados de liberación de los fertilizantes cuando se miden por separado, y mezclados los tres, para conocer si las diferentes interacciones entre los iones que forman parte de los fertilizantes elegidos afectan a la liberación. La concentración elegida de cada uno es 1 mM de NH_4NO_3 , 1.1 mM de KNO_3 y 9 mM de CaCl_2 . Los experimentos se hacen en una duración de 70 h para buscar diferencias entre los iones por separado y juntos. Los resultados se muestran en la Figura 8.

En los resultados obtenidos de la mezcla respecto al NH_4NO_3 , se observa un comportamiento ligeramente diferente para los iones de NH_4^+ . El equilibrio entre ambos depósitos se alcanza, tanto para la mezcla de fertilizantes como para las medidas de NH_4NO_3 , a las 50 h, pero los perfiles de liberación son diferentes, ya que en la mezcla de fertilizantes la liberación inicialmente es más rápida que la liberación de los iones NH_4^+ procedentes del NH_4NO_3 . También se observan unos perfiles de concentración más simétricos entre el lado del alimento y del permeado cuando se utiliza mezcla de fertilizantes. Esto puede ser debido a que la presencia de otros iones positivos (Ca^{2+} y K^+) haga disminuir la interacción entre los iones NH_4^+ y la superficie de la biomembrana, disminuyendo, por tanto, la adsorción.

La liberación de los iones NO_3^- , tanto en la mezcla como medido por separado relativos a NH_4NO_3 y KNO_3 siguen la misma tendencia. Cuando se hacen medidas en la mezcla de fertilizantes, el perfil es el mismo que cuando se miden por separado, produciéndose el equilibrio en los tres casos a las 50 h. No se observan cambios



significativos debido a la presencia de iones Cl^- , posiblemente se atribuye a su reacción con los iones de NaCl , que hacen que el cloro se neutralize.

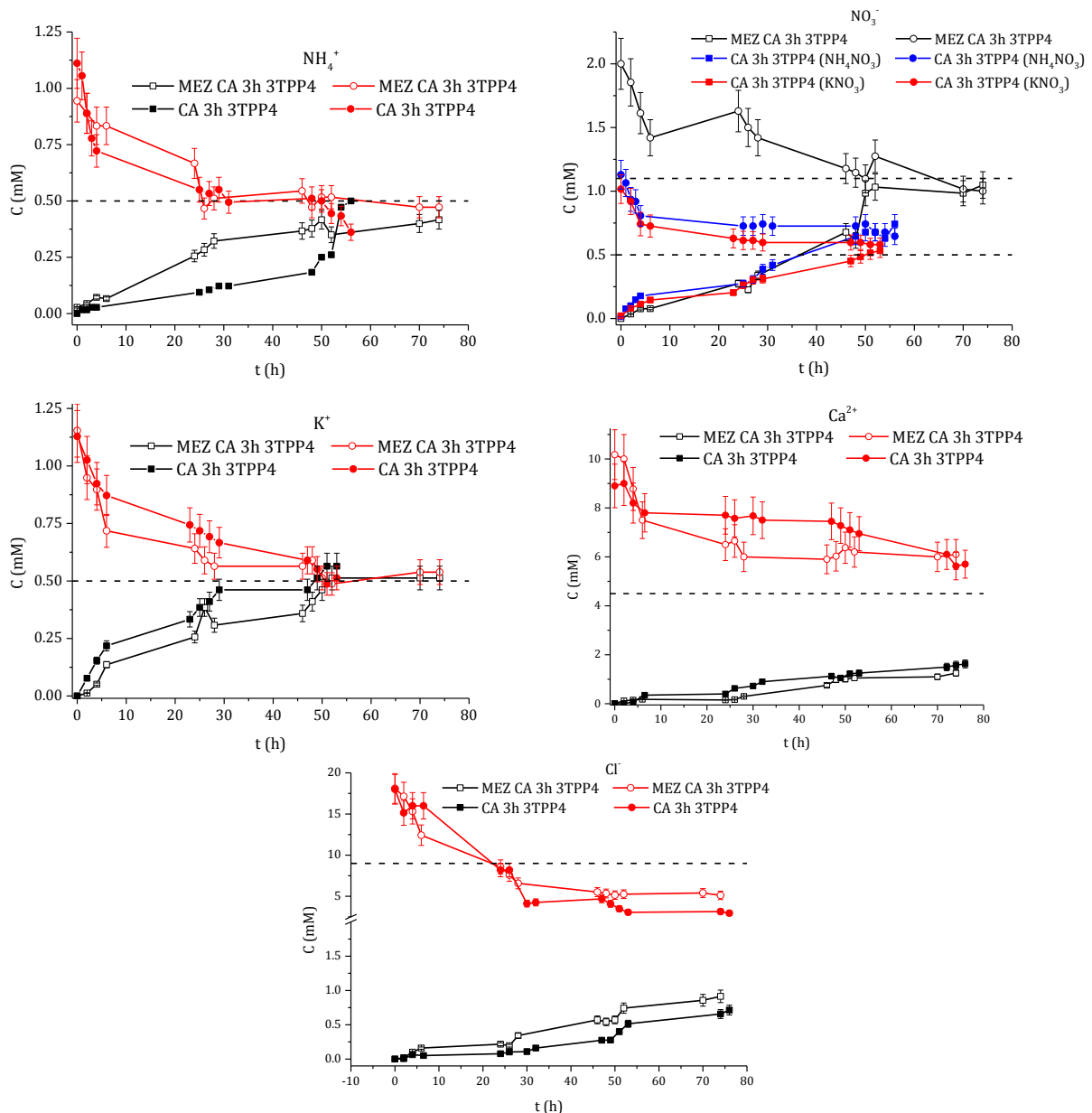


Figura 8: Representación de la liberación de los diferentes iones, cuando los tres fertilizantes están mezclados en la disolución y cuando se miden por separado. En rojo se representan las medidas en el lado del alimento y en negro las del lado del permeado. Los símbolos vacíos corresponden a la mezcla de fertilizantes y los símbolos llenos a las medidas por separado.

La mezcla de fertilizantes hace que el comportamiento de los iones de K^+ sea igual que cuando no se encuentran en mezcla, siendo el tiempo en el que alcanza el equilibrio 50 h en los dos casos, aunque en la mezcla de fertilizantes la liberación es más lenta.



El comportamiento de los iones de Ca^{2+} es el mismo encontrándose en mezcla que por separado, aunque la adsorción es ligeramente mayor cuando Ca^{2+} se encuentra en la mezcla. Los iones de K^+ y Ca^{2+} cuando están en la mezcla presentan perfiles de concentración menos simétricos respecto a la concentración de equilibrio que cuando están los fertilizantes por separado (Figura 8). Los iones de K^+ y Ca^{2+} podrían estar interaccionando con la biomembrana de forma competitiva al NH_4^+ y, por tanto, reducir ligeramente su adsorción.

Respecto a los iones Cl^- sucede lo mismo que con los iones NO_3^- , no observándose una variación significativa entre la mezcla de fertilizantes y las medidas por separado. Estos resultados parecen indicar una interacción tipo iónica de los fertilizantes con la biomembrana cargada aniónicamente. Esto justificaría que para los cationes (NH_4^+ y Ca^{2+}) se aprecien las diferencias en la liberación cuando se utiliza la mezcla de fertilizantes respecto a cada fertilizante por separado.

5.3.3 Transporte en función del post-tratamiento

En la Figura 9 se muestran los resultados de los experimentos de transporte utilizando la mezcla de fertilizantes para las biomembranas de quitosano con post-tratamiento de TPP a pH 4 durante 3 horas y 20 horas.

Se observa que la liberación y la adsorción de los iones por parte de la biomembrana es la misma para las biomembranas de CA 3h 3TPP4 y CA 20h 3TPP4. Esto demuestra que las 3 h de post-tratamiento son suficientes para reticulizar la biomembrana. Este resultado está de acuerdo con los resultados mostrados de las medidas de *swelling*.

Los resultados de la biomembrana con post-tratamiento de 20 h, corrobora la disminución significativa de la adsorción de los iones NH_4^+ en la superficie de la biomembrana cuando se utiliza la mezcla de fertilizantes. De igual forma, sucede con los iones Ca^{2+} , ya que los resultados obtenidos tanto de adsorción como de liberación son los mismos.

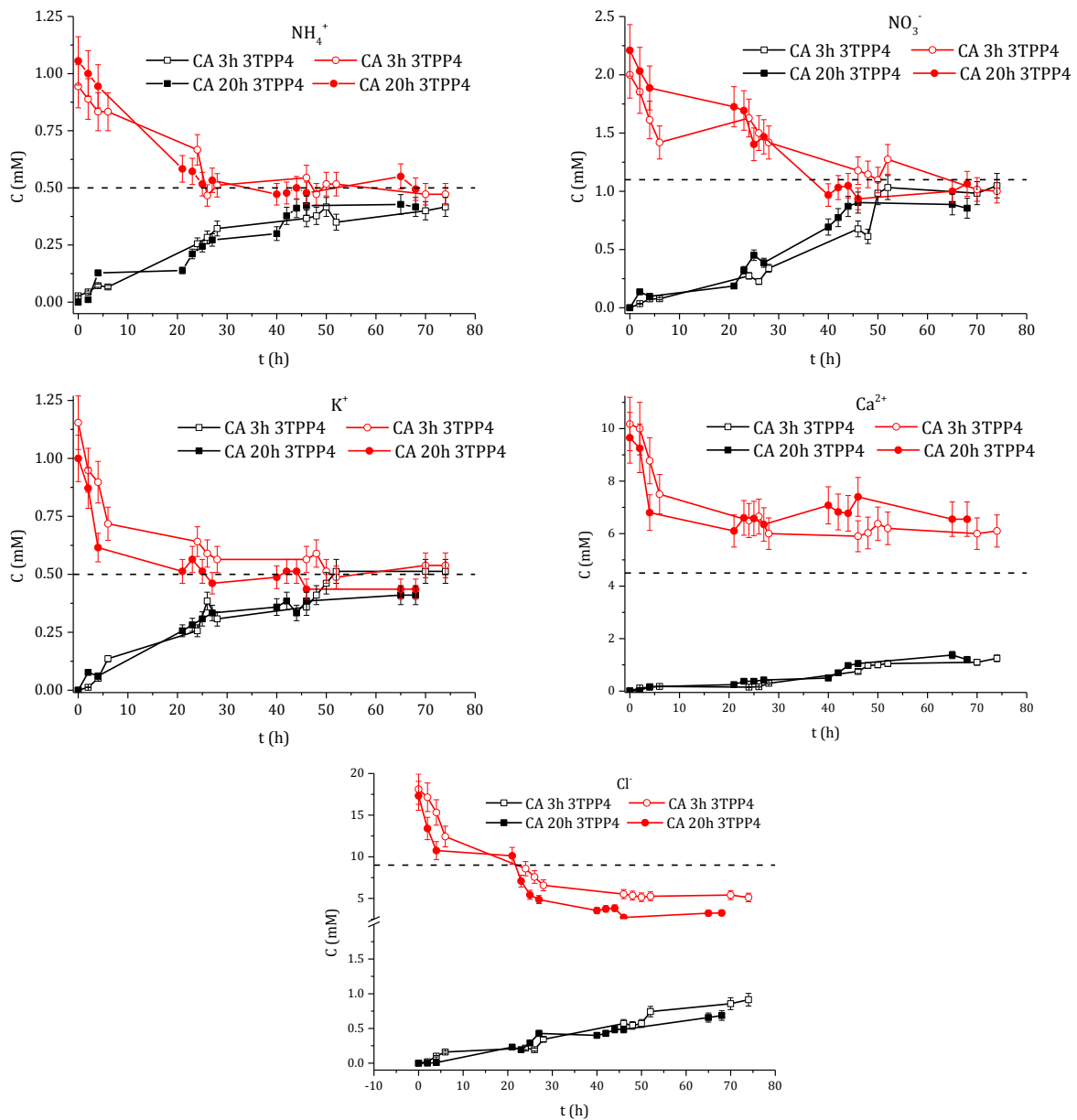


Figura 9: Representación de la liberación y adsorción de los diferentes iones, cuando los tres fertilizantes están mezclados en la disolución, en función del tiempo de post-tratamiento de la biomembrana de quitosano. En rojo se representan las medidas en el lado del alimento y en negro las del lado del permeado. Los símbolos vacíos corresponden a 3 h de post-tratamiento y los símbolos llenos a 20 h de post-tratamiento.

Respecto al resto de los iones, NO₃⁻, K⁺ y Cl⁻, se verifican los comportamientos de adsorción y liberación ya estudiados, no observándose diferencias.



6 Conclusiones

En el presente estudio, se han fabricado biomembranas de quitosano que se han sometido a post-tratamientos de TPP variando su pH para estudiar su viabilidad como barrera de liberación de fertilizantes.

Se ha observado que cuando el post-tratamiento se hace a pH ácido, los espesores de las biomembranas son un 48% mayores que en las biomembranas sin post-tratamiento. Sin embargo, cuando el post-tratamiento se hace a pH 9, los espesores aumentan solo un 10%. Las medidas de *swelling* muestran que, la reticulación de la biomembrana reduce el hinchamiento, siendo éste menor cuando el post-tratamiento se realiza a pH ácido. Tanto las variaciones del espesor como los resultados del *swelling* están relacionadas con el pH de la disolución de post-tratamiento. El quitosano, a ser un biopolímero catiónico, tiene afinidad por las disoluciones ácidas, lo que facilita al TPP penetrar en el interior de la biomembrana, haciendo que su espesor sea mayor y que el *swelling* se reduzca en relación a los post-tratamientos a pH básico.

Se han realizado medidas de la concentración de los diferentes electrolitos en función del tiempo, para los diferentes fertilizantes por separado y mezclados. Se ha observado que no hay diferencias significativas cuando se miden las concentraciones por separado y con el fertilizante en mezcla, y que el pH de la disolución de post-tratamiento tampoco afecta a la liberación. Por tanto, estos iones disueltos en agua, a estas concentraciones, no interaccionan significativamente entre ellos.

Los tiempos en los que se alcanza el equilibrio de cada ión es diferente. Mientras que los iones Ca^{2+} tienden a quedarse dentro de la biomembrana, los iones de Cl^- reaccionan con los iones Na^+ del TPP y no se produce liberación. Por otro lado, los iones NH_4^+ , K^+ NO_3^- alcanzan la concentración de equilibrio entorno a las 50 h.

Se ha observado que los iones de NH_4^+ , tanto en mezcla como en NH_4NO_3 , tienden a ser adsorbidos por la biomembrana en las primeras horas del experimento. En cambio, su liberación depende de si el fertilizante está mezclado o no, ya que cuando se libera sólo NH_4NO_3 la liberación es más lenta que cuando se encuentra en mezcla. Lo mismo sucede con los iones K^+ , cuando se encuentran en mezcla su liberación es más lenta. En cambio, los iones de Ca^{2+} cuando se encuentran en mezcla siguen teniendo el mismo comportamiento, siendo la adsorción ligeramente mayor. Se piensa que cuando los iones de K^+ y Ca^{2+} están en mezcla compiten con los iones NH_4^+ por atravesar la biomembrana y por ese motivo su adsorción es menor. En cambio, el comportamiento de los iones NO_3^- es el mismo, independientemente de la composición del fertilizante. Lo mismo sucede con los iones Cl^- , que independientemente del fertilizante a liberar, en mezcla o por separado, los iones Cl^- no son liberados por la biomembrana, pero se observa una disminución drástica de su concentración en el permeado.



7 Referencias

- [1] Oliet, J., Segura, M. L., Domínguez, F. M., Blanco, E., Arias, M. L. and Artero, F. Los fertilizantes de liberación controlada lenta aplicados a la producción de planta forestal de viver. Efectos de dosis y formulaciones sobre la calidad de *Pinus halepensis* mill. *Investigación agraria. Sistemas y recursos forestales*, 8, 1 (1999), 208-228.
- [2] Corradini, E. A preliminary study of the incorporation of NPK fertilizer into chitosan nanoparticles. *eXPRESS Polymer Letters*, 4, 8 (2010), 509-515.
- [3] Gómez, S. J. *Fertilizantes de liberación lenta: introducción*. Mundi Prensa Libros SA, City, 1992.
- [4] Shaviv, A. *Advances in controlled-release fertilizers*. Academic Press, City, 2001.
- [5] Guo, M., Liu, M., Zhan, F. and Wu, L. Preparation and properties of a slow-release membrane-encapsulated urea fertilizer with superabsorbent and moisture preservation. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 44 (2005), 4206-4211.
- [6] Santos, B. R., Bacalhau, F. B., Pereira Tdos, S., Souza, C. F. and Faez, R. Chitosan-Montmorillonite microspheres: A sustainable fertilizer delivery system. *Carbohydrate Polymers*, 127 (2015), 340-346.
- [7] Shukla, S. K., Mishra, A. K., Arotiba, O. A. and Mamba, B. B. Chitosan-based nanomaterials: a state-of-the-art review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 59 (2013), 46-58.
- [8] Aranaz, I., Mengibar, M., Harris, R., Paños, I., Miralles, B., Acosta, N., Galed, G. and Heras, Á. Functional characterization of chitin and chitosan. *Current Chemical Biology*, 3, 2 (2009), 203-230.
- [9] Kashyap, P. L., Xiang, X. and Heiden, P. Chitosan nanoparticle based delivery systems for sustainable agriculture. *International Journal Biological Macromolecules*, 77 (2015), 36-51.
- [10] Raven, P. H., Evert, R. F. and Eichhorn, S. E. *Biología de las plantas*. Reverté, 1992.
- [11] Navarro Blaya, S. and Navarro García, G. *Química agrícola: El suelo y los elementos químicos esenciales para la vida vegetal*. Mundi-Prensa Libros, 2003.
- [12] Taiz, L. and Zeiger, E. *Fisiología vegetal*. Universidad Jaume I, 2006.
- [13] Fernández, G. and Johnston, M. *Fisiología vegetal experimental*. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA), San José, Costa Rica, 1986.
- [14] Oliveira, J., Afif, K. and Mayor, M. *Análisis de suelos y plantas y recomendaciones de abonado*, 2006.
- [15] Manahan, S. E. and Leyva, I. M. *Introducción a la química ambiental*. Reverté, 2006.
- [16] Navarro García, G. and Navarro García, S. *Fertilizantes: química y acción*. Ediciones Paraninfo, SA, 2014.
- [17] Thompson, L. M. and Troeh, F. R. *Los suelos y su fertilidad*. Reverté, 1988.
- [18] Navarro García, G. and Navarro García, S. *Química agrícola del suelo y de nutrientes esenciales* Mundi-Prensa, 2013.
- [19] Berger, J., Reist, M., M. Mayer, J., O. Felt, A. Peppas, N. and R. Gurny Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 57, 1 (2004), 19-34.
- [20] Gacén, J. and Gacén, I. Quitina y quitosano. Nuevos materiales textiles. *Boletín Intexter*, 110 (1996), 67-71.
- [21] Rinaudo, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*, 31, 7 (2006), 603-632.



- [22] Cunha, R. A., Soares, T. A., Victor H. Rusu, Pontes, F. J. S., Franca, E. F. and Lins, R. D. *The molecular structure and conformational dynamics of chitosan polymers: An integrated perspective from experiments and computational simulations*. Intech, 2012.
- [23] Knaul, J. Z., Hudson, S. M. and Creber, K. A. M. Crosslinking of chitosan fibers with dialdehydes: Proposal of a new reaction mechanism. *J Polym Sci Pol Phys*, 37, 11 (1999), 1079-1094.
- [24] Mohammed, M. H., Williams, P. A. and Tverezovskaya, O. Extraction of chitin from prawn shells and conversion to low molecular mass chitosan. *Food Hydrocolloids*, 31, 2 (2013), 166-171.
- [25] Zainal, Z., Hui, L. K., Hussein, M. Z., Abdullah, A. H. and Hamadneh, I. M. Characterization of TiO₂-chitosan/glass photocatalyst for the removal of a monoazo dye via photodegradation-adsorption process. *Journal Hazardous Materials*, 164, 1 (2009), 138-145.
- [26] No, H. K. and Meyers, S. P. *Application of chitosan for treatment of wastewaters*. Springer, City, 2000.
- [27] *Consejo de Europa. Farmacopea Europea*, 2002.
- [28] Ahmad, N. N. R., Fernando, W. J. N. and Uzir, M. H. Parametric evaluation using mechanistic model for release rate of phosphate ions from chitosan-coated phosphorus fertiliser pellets. *Biosystems-Engineering*, 129 (2015), 78-86.
- [29] Dubey, S., Jhelum, V. and Patanjali, P. K. Controlled release agrochemicals formulations: A review. *Journal of Scientific & Industrial Research*, 70 (2011), 105-112.
- [30] Santos, D. E. S., Neto, C. G. T., Fonseca, J. L. C. and Pereira, M. R. Chitosan macroporous asymmetric membranes—Preparation, characterization and transport of drugs. *Journal of Membrane Science*, 325, 1 (2008), 362-370.
- [31] Azeredo, H. M. C. and Waldron, K. W. Crosslinking in polysaccharide and protein films and coatings for food contact – A review. *Trends in Food Science & Technology*, 52 (2016), 109-122.
- [32] Bhumkar, D. R. and Pokharkar, V. B. Studies on effect of pH on crosslinking of chitosan with sodium tripolyphosphate: A technical note. *AAPS PharmSciTech* 7, 2 (2006).
- [33] Mi, F. L., Shyu, S. S., Lee, S. T. and Wong, T. B. Kinetic study of chitosan-tripolyphosphate complex reaction and acid-resistive properties of the chitosan-tripolyphosphate gel beads prepared by in-liquid curing method. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 37, 14 (1999), 1551-1564.
- [34] Paños, I., Acosta, N. and Heras, A. New drug delivery system sbased on chitosan. *Current Drug Discovery Technologies*, 5, 4 (2008), 333-341.
- [35] Park, S. B., You, J. O., Park, H. Y., Haam, S. J. and Kim, W. S. A novel pH-sensitive membrane from chitosan-TEOS IPN; preparation and its drug permeation characteristics. *Biomaterials* 22, 4 (2001), 323-330.
- [36] Wu, L. and Liu, M. Preparation and properties of chitosan coated NPK compound fertilizer with controlled release and water retention. *Carbohydrate Polymers*, 72 (2008), 240-247.
- [37] Velickova, E., Winkelhausen, E., Kuzmanova, S., Alves, V. D. and Moldão-Martins, M. Impact of chitosan-beeswax edible coatings on the quality of fresh strawberries (*Fragaria ananassa* cv Camarosa) under commercial storage conditions. *Food Science and Technology*, 52, 2 (2013), 80-92.
- [38] Aranaz, I., Harris, R., Navarro-Garcia, F., Heras, A. and Acosta, N. Chitosan based films as supports for dual antimicrobial release. *Carbohydrate Polymers*, 146 (2016), 402-410.



[39] Gierszewska, M. and Ostrowska-Czubenko, J. Chitosan-based membranes with different ionic crosslinking density for pharmaceutical and industrial applications. *Carbohydrate Polymers*, 153 (2016), 501-511.