

**LIBERACIÓN CONTROLADA DE CARBOFURANO DESDE MICROPARTÍCULAS
DE QUITOSANO PARA EL CONTROL DE NEMÁTODOS EN CULTIVOS DE
TOMATE**



FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
SANTIAGO DE CALI, 2019

**LIBERACIÓN CONTROLADA DE CARBOFURANO DESDE MICROPARTÍCULAS
DE QUITOSANO PARA EL CONTROL DE NEMÁTODOS EN CULTIVOS DE
TOMATE**

Tesis Doctoral

Presentada por

RUBÉN ALBEIRO SÁNCHEZ ANDICA

Dirigida por

MARTHA ISABEL PÁEZ MELO, Ph.D.

Universidad del Valle

UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA ACADÉMICO DE DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS
SANTIAGO DE CALI, 2019

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mis más sinceros agradecimientos a todas las personas que hicieron parte de esta investigación, desde lo académico y profesional hasta las personas cercanas que me acompañaron. A todos, gracias...y, especialmente a:

A la Dra. Martha Isabel Páez, directora del proyecto, y a quien le agradezco profundamente por el acompañamiento en todo este proceso formativo, porque ha creído en mí, porque con muy poco se han hecho grandes cosas, pero lo más importante, es que ha sido un soporte en mi vida.

A la persona más importante en mi vida: María Joaquina Andica, mi madre, porque sin saberlo, me ha enseñado más que cualquier otra persona en este mundo. Además de mi familia, mi hermano Oscar, Laura Marcela, Juan Manuel, Soraida

Al profesor Jaime Restrepo, un gran amigo y quien ha sido un gran apoyo desde siempre.

A mi segunda familia, todos los que conforman el Laboratorio de Industriales, Jenny, Yimizon, José Eduardo, Claudia, María Teresa, y especialmente, a Nancy García, que sin estar físicamente, sigue presente en el laboratorio y, a todos los que han pasado de forma transitoria por este espacio.

A Duván Castillo un gran amigo y quien me ha acompañado en situaciones fáciles y difíciles, de manera incondicional.

A Jorge Saavedra, persona de gran apoyo en una gran parte del trabajo.

Y a todos mis amigos que han sido parte de mi vida, todos me han ayudado, apoyado sin saberlo.

A la Dra Margarita Sánchez Domínguez, investigadora del Centro de Investigación de Materiales Avanzados (CIMAV) en la ciudad de Monterrey México, por su gran hospitalidad y toda su colaboración durante mi estancia en CIMAV.

RESUMEN

Se preparó una formulación de liberación controlada (FLC) mediante el encapsulamiento de carbofurano en micropartículas de quitosano para ser usado como nematicida en cultivos de tomate. Las partículas se prepararon mediante la técnica de entrecruzamiento iónico. La eficiencia de encapsulamiento (EE) del plaguicida fue de 67 % y la capacidad de carga (CC) del quitosano para encapsular carbofurano fue de 24 %. Se evaluaron diferentes tipos de agentes Entrecruzantes (sulfato, fosfato, pirofosfato y tripolifosfato) encontrándose que no hay diferencia estadística en la EE, sin embargo, se utilizó sulfato por presentar la mejor precisión.

El pH necesario para que haya interacción entre quitosano, sulfato y carbofurano debe estar entre 3 y 6; se obtuvo una mayor EE y menor desviación a pH 4. Las imágenes de SEM para las micropartículas vacías (MPV) mostraron una superficie rugosa y porosa, con un tamaño de partícula de 1023 nm, mientras que la FLC presentó una superficie lisa con tamaño de partícula de 1127 nm. La FLC mostró un perfil de liberación en agua más lento que el carbofurano libre (CAB-L). Después de tres días, la liberación de carbofurano desde la FLC se estabiliza con una liberación acumulada máxima del 70 % y de 100 % para CAB-L. EL coeficiente de difusión (n) resultó ser 0.603 implicando que la difusión es de tipo anómalo o no fickiano. El efecto nematicida de la FLC logró disminuir las afecciones de las raíces de plántulas de tomate causada por nemátodos del género *Meloidogyne spp* en un 50 % usando la FLC. La aplicación de la nueva formulación de carbofurano ayudaría a disminuir el impacto ambiental, disminuir el impacto sobre trabajadores y consumidores de alimentos, reducir costos de agroquímicos, así como también, aporte en el entendimiento del entrecruzamiento iónico de quitosano con sulfato cuando se encapsula un ingrediente activo como el carbofurano.

ABSTRACT

Chitosan microparticles containing carbofuran were prepared by ionic cross-linking technique. Carbofuran encapsulation efficiency (EE) was 67%, and Pesticide Loading (PL) was 24 %. Four cross-linkers were evaluated for the encapsulation process, finding that there were no statistical differences in the EE due to the high deviation; however, sulfate presented the lowest variation and, hence, it was chosen as the cross-linker agent. The interaction pH of chitosan, carbofuran, and sulfate must be between 3.0 and 6.0; the highest EE was obtained at pH 4.0. The minimum sulfate/chitosan molar ratio for the crosslinking interaction was 0.4. SEM images for empty microparticles (EMP) showed a

rough and porous surface with a particle size of 1023 nm whereas microparticles with encapsulated carbofuran (controlled release formulation, CRF) the surface found to be smoother with a particle size of 1127 nm. The CRF showed a slower carbofuran release profile in water in contrast with free carbofuran (Cab). After the first three days, the carbofuran release was stabilized with a maximum cumulative release of 70% for CRF and 100% for Cab. The diffusion coefficient (n) turned out to be 0.603, meaning that the release was not governed by Fick's laws of diffusion, but by an anomalous transport. The nematocidal effect of the FLC was able to reduce the root affections of the tomato seedlings caused by nematodes of the genus *Meloidogyne spp* by 50% using the FLC. The application of the new carbofuran formulation would help to reduce the environmental impact, reduce the impact on food workers and consumers, reduce agrochemical costs, as well as contribute to the understanding of the ionic cross-linking of chitosan with sulfate when an active ingredient is encapsulated such as carbofuran.

PRÓLOGO

El uso continuo y en ocasiones sin control de los productos usados en la fertilización y el control de plagas, ha traído como consecuencia la contaminación de suelos agrícolas por compuestos y elementos persistentes. Estudios realizados sobre aplicación de plaguicidas y fertilizantes en diversos cultivos han determinado que sólo un porcentaje, en algunos casos muy pequeño, tienen un efecto real sobre el control de plagas y la fertilización, tomando en cuenta la manera como se aplican hoy en día; los excedentes de estos compuestos toman diferentes vías de distribución como, aire, aguas superficiales, aguas subterráneas y alimentos, afectando seriamente la economía del agricultor y el medio ambiente. Mucho se ha investigado sobre qué se debe hacer para que haya un control efectivo de plagas sin que afecte el medio ambiente y al ser humano, pero aún no se tienen soluciones que sean realmente llevadas al campo. La investigación científica ha llevado a la búsqueda de soluciones que permitan la aplicación controlada de plaguicidas y otros agroquímicos con el fin de ayudar a aumentar la efectividad y reducir los daños, especialmente para aquellos plaguicidas que ya han sido prohibidos por su toxicidad, pero que fueron muy efectivos para controlar las plagas.

En este sentido, la aplicación de los sistemas de liberación controlada de plaguicidas es una alternativa plausible en la cual se ha venido trabajando desde hace tiempo pero, a pesar de los resultados que se han encontrado, falta seguir indagando sobre formulaciones para los diferentes tipos de plaguicidas.

El desarrollo de este trabajo se basó en la premisa expuesta anteriormente, ya que, aunque el carbofurano ha sido prohibido, no se ha encontrado un sustituto efectivo como nematicida, así que proponer una nueva formulación para este compuesto, encontrar que a concentraciones muy bajas tiene efecto nematicida del 60% y conocer que las cantidades del plaguicidas son muy bajas como para causar un daño potencial, son los mayores logros de esta investigación, con la cual se podría pensar en aplicación en campo.

Los anteriores hallazgos están explicados en el presente documento, el cual se dividió en cuatro capítulos para una mejor explicación de los mismos:

CAPÍTULO UNO. Introduce al lector en la base teórica de los temas principales del trabajo, con una breve explicación sobre los plaguicidas, la tecnología de liberación controlada y la plaga, objeto de aplicación, los nematodos.

CAPÍTULO DOS. En este capítulo se expone la metodología usada para la obtención de la nueva formulación a base del microencapsulamiento de carbofurano en partículas de quitosano entrecruzado iónicamente con sulfato, se presentan las evidencias del encapsulamiento del plaguicida en la matriz polimérica y se calcula la cantidad de plaguicida que las micropartículas son capaces de albergar, las cuales serán usadas en los experimentos para la evaluación del efecto nematicida y en estudios de lixiviación.

CAPÍTULO TRES. En esta parte del trabajo se encontrarán dos aspectos fundamentales para la aplicación de la nueva formulación: los estudios que determinan si la nueva formulación presenta liberación controlada y cuáles serían sus limitaciones, y la evaluación de la lixiviación del compuesto desde la nueva formulación, con el fin de determinar si estas cantidades tienen potencial riesgo de contaminación.

CAPÍTULO CUATRO. Aquí el lector encontrará cuáles fueron los resultados de la aplicación de la nueva formulación en un cultivo real y, aunque los ensayos se hicieron *in vitro*, el lector podrá darse cuenta de los efectos que puede tener la nueva formulación que, en síntesis, son muy alentadores como para pensar en usarlos en experimentos de campo.

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1.1	Propiedades fisicoquímicas de carbofurano 5
Tabla 2.1	EE de carbofurano utilizando diferentes agentes entrecruzantes 24
Tabla 2.2	Comparación cuantitativa de la EE de carbofurano a diferentes pH 28
Tabla 2.3	Efecto del tiempo y la velocidad en la EE de carbofurano 30
Tabla 2.4	ANOVA del efecto del tiempo y la velocidad de agitación en la obtención de MPC 30
Tabla 2.5	Condiciones experimentales finales para la obtención de la FLC 31
Tabla 2.6	Tamaño hidrodinámico de partícula de MPV y MPC 34
Tabla 2.7	Valores de EE y CC en función de la masa de carbofurano 41
Tabla 3.1	Características fisico-químicas y texturales de los suelos de estudio 55
Tabla 3.2	Parámetros cinéticos para la adsorción de carbofurano en los suelos 56
Tabla 3.3	Resultados del ajuste de los modelos de Langmuir y Freundlich en la adsorción de carbofurano en los suelos 58
Tabla 3.4	Coeficientes de difusión para la liberación en agua de la FLC a pH 4, 7 y 8 62
Tabla 3.5	coeficientes de la linealización de las ecuaciones de Korsmeyer y Peppas 65
Tabla 4.1	Resultados del daño a la raíz causado por Meloidogyne spp. en el suelo de ST 79
Tabla 4.2	Resultados del daño a la raíz causado por Meloidogyne spp. en el suelo de PAL 79
Tabla 4.3	Resultados del análisis de varianza utilizando como control el blanco positivo 80
Tabla 4.4	Resultados del análisis de varianza utilizando como control el CAB libre 80
Tabla 4.5	Prueba de rangos múltiples de Fisher de los tratamientos respecto al blanco para suelo de ST y PAL 81
Tabla 4.6	Prueba de rangos múltiples de Fisher de los tratamientos respecto al blanco para suelo de Santander y Palmira 81

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1.1	Principales familias de plaguicidas	3
Figura 1.2	Tipos de encapsulados	6
Figura 1.3	Gelificación iónica del quitosano y el tripolifosfato	8
Figura 1.4	Estructura de la red de quitosano formada por entrecruzamiento iónico	9
Figura 1.5	Relación entre una formulación de plaguicida convencional y una FLC	10
Figura 1.6	Cuerpo completo de tres géneros de nematodos fitoparásitos	12
Figura 2.1	Estructura química del quitosano protonado y los agentes entrecruzantes	23
Figura 2.2	Diagrama de cajas de la EE de carbofurano con diferentes entrecruzantes	24
Figura 2.3	Titulación potenciométrica de quitosano	26
Figura 2.4	Especies de ion sulfato en dependencia con el pH	26
Figura 2.5	Espectros de RMN-1H de carbofurano y carbofurano acidulado	27
Figura 2.6	Titulación potenciométrica de carbofurano	27
Figura 2.7	Diagrama de cajas de la EE de carbofurano a diferentes pH	28
Figura 2.8	Titulación turbidimétrica de la relación molar para MPV y MPC	29
Figura 2.9	Espectros de infrarrojo de carbofurano (a), quitosano (b), sulfato (c), MPV (d) y MPC (e)	32
Figura 2.10	Ampliación en la zona de interacción entre el quitosano, sulfato y carbofurano en MPV y MP	33
Figura 2.11	Distribución de tamaño de partícula para MPV y MPC	35
Figura 2.12	Potencial Z y conductividad para MPV y MPC	36
Figura 2.13	Micrografías de las micropátículas vacías y micropartículas con carbofurano	37
Figura 2.14	TGA de las MPV y MPC	38
Figura 2.15	DSC de las MPV y MPC	39
Figura 2.16	Capacidad de encapsulamiento del quitosano en términos de la EE	40
Figura 2.17	Espectros de infrarrojo de las diferentes FLC a diferentes cantidades de carbofurano	42
Figura 2.18	Capacidad de encapsulamiento del quitosano en términos de la CC	42
Figura 3.1	Columna de lixiviación usada para el estudio de movilidad	53
Figura 3.2	Perfiles de liberación en agua a pH 4, 7 y 8 de la FLC y	60
Figura 3.3	Linealización de la ecuación de Korsmeyer y Peppas para los perfiles de liberación en agua (a) pH 4 y (b) 7 de la FLC	62
Figura 3.4	perfiles de liberación de carbofurano en suelos a) suelo ST, b) suelo PAL	63

Figura 3.5	Linealización de la ecuación de Korsmeyer y Peppas para los perfiles de liberación en suelo de ST de la FLC y CAB	64
Figura 3.6	Porcentajes de carbofurano recuperados y retenidos por lixiviación	67
Figura 3.7	Lixiviación de Carbofurano libre en los suelos de ST y PAL	68
Figura 3.8	Lixiviación de Carbofurano libre y encapsulado en los suelos de ST	69
Figura 3.9	Lixiviación de carbofurano encapsulado en los suelos de ST y PAL	70
Figura 3.10	Lixiviación de carbofurano libre y encapsulado en los suelos de PAL	70
Figura 4.1	Bandejas de Whitehead utilizadas para la extracción de nematodos	73
Figura 4.2	Extracción de huevos de <i>Meloidogyne spp.</i> lavando con NaClO 1 %	73
Figura 4.3	Cultivo experimental de plántulas de tomate	75
Figura 4.4	Ilustración de la clasificación del índice de nudosidad en raíces por daño de <i>Meloidogyne spp.</i> Las partes de color negro se representan como agallas en la raíz	76
Figura 4.5	Conteo al microscopio de nematodos	77
Figura 4.6	Gráfica de toxicidad del carbofurano	78
Figura 4.7	Raíces infestadas	79
Figura 4.8	Gráfica de mejoramiento de las formulaciones frente al blanco frente a los mg de carbofurano encapsulados dentro de estas	82
Figura 4.9	Cantidad de carbofurano liberado respecto a la cantidad de carbofurano encapsulado en las diferentes formulaciones a los 30 días (a) y 10 días (b)	83

CAPÍTULO I CONSIDERACIONES TEÓRICAS

	Página
1.1	INTRODUCCIÓN
1.2	PLAGUICIDAS Y SU APLICACIÓN
1.2.1	Clasificación de los plaguicidas
1.2.2	Los plaguicidas en la agricultura
1.2.3	Riesgos de los plaguicidas
1.2.4	Carbofurano
1.3	TECNOLOGÍA DE LIBERACIÓN CONTROLADA
1.3.1	Microencapsulamiento
1.3.2	Liberación controlada desde matrices poliméricas
1.4	PLAGAS: NEMÁTODOS
1.4.1	Nemátodos de nudo de la raíz
1.4.2	Control de nemátodos
1.4.2.1	Control cultural
1.4.2.2	Extracto de plantas
1.4.2.3	Control Biológico
1.4.2.4	Resistencia al Hospedador
1.4.2.5	Nematicidas de origen sintético: carbamatos
1.5	PLANTEAMIENTO GLOBAL DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN
1.6	OBJETIVOS
1.6.1	Objetivo General
1.6.2	Objetivo Específicos

1.1 INTRODUCCIÓN

La permanente necesidad de tener sistemas agrícolas eficientes hace que sea necesaria la constante intervención humana creando, en muchas ocasiones, ecosistemas artificiales. Frecuentemente, esta intervención consiste en la introducción de agroquímicos que, además de elevar la producción, dan lugar a numerosos costos ambientales y sociales indeseables (Rigby y Cáceres, 2001). Conforme progresa la modernización agrícola, los principios ecológicos son continuamente ignorados o desestimados y, en consecuencia, los agroecosistemas modernos se vuelven inestables, generando desequilibrios que se manifiestan como brotes recurrentes de plagas. Estas plagas pueden atacar la parte aérea de las plantas (insectos), pero también pueden afectar la parte radicular (nemátodos), siendo estas las más difíciles de erradicar por encontrarse subterráneas (Brechelt, 2004). Los métodos más utilizados en el control de las plagas usan plaguicidas sintéticos, con la consecuente contaminación del aire, suelos y aguas (Altieri y Nicholls, 2009). Se ha intentado abordar el problema del ataque de las plagas mediante el uso de nuevas tecnologías; una de ellas son los sistemas de liberación controlada de compuestos con actividad plaguicida encapsulados en nano o micromateriales, la cual toma cada vez más fuerza (Ghormade *et al.*, 2011).

Las formulaciones de entrega lenta o de liberación controlada (FLC) se han convertido en estructuras prometedoras por su potencial uso en la protección y nutrición de plantas, debido a las cualidades dependientes del tamaño, el medio y la relación volumen-superficie (Gogos *et al.*, 2012).

1.2 PLAGUICIDAS Y SU APLICACIÓN

Los plaguicidas son compuestos químicos sintéticos usados, principalmente, en la mayoría de los cultivos de producción industrial con el objetivo de minimizar las infestaciones por plagas y, así, evitar las pérdidas de cosechas y reducción de la calidad de los productos (Ortiz *et al.*, 2013).

1.2.1 Clasificación de los plaguicidas

El término plaguicida cubre una amplia gama de compuestos que incluyen insecticidas, fungicidas, herbicidas, rodenticidas, molusquicidas, nematocidas, reguladores del crecimiento de plantas, entre otros (Aktar *et al.*, 2009). Existen varias maneras para clasificar pesticidas, pero las más populares son aquellas basadas en (i) el modo de entrada, (ii) la función plaguicida y el organismo de la plaga que controlan, y (iii) la

familia química a la que pertenece el plaguicida. La clasificación de los plaguicidas de acuerdo al modo de entrada se basa en la forma que el plaguicida entra en contacto con la plaga objetivo; estos incluyen sistémicos, de contacto, venenosos estomacales, fumigantes, y repelentes. Aquellos que se clasifican de acuerdo a la plaga que controlan, se basan en el tipo de organismo diana y toman nombres específicos para reflejar su actividad; así, se tienen insecticidas para controlar insectos, fungicidas para hongos, herbicidas para malezas, rodenticidas para roedores, molusquicidas para moluscos y nematocidas para nemátodos. La clasificación de los plaguicidas por la familia química se basa en su estructura, la cual tiene grupos funcionales bien identificados, y que comprenden cuatro grupos principales: organoclorados, organofosforados, carbamatos y piretroides, cuya estructura molecular se muestra en la figura 1.1 (Yadav y Devi, 2017).

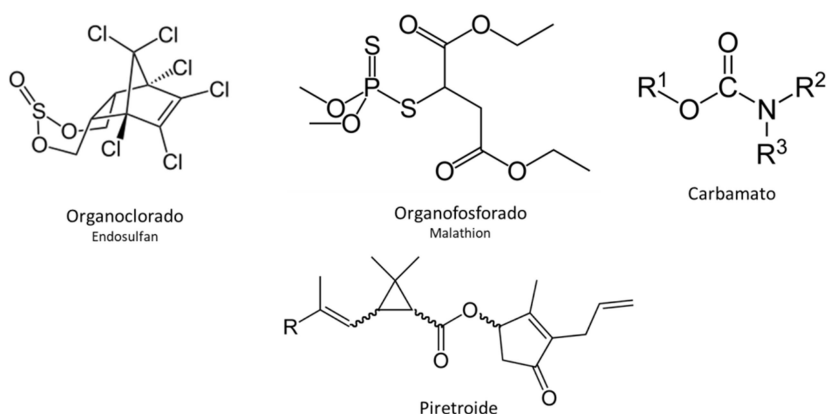


Figura 1.1 Principales familias de plaguicidas: organoclorados, organofosforados, piretroides y carbamatos

1.2.2 Los plaguicidas en la agricultura

Los plaguicidas han sido una parte integral de la producción agrícola al controlar el aumento de malezas, enfermedades y plagas de insectos que pueden reducir notablemente la cantidad de productos que se pueden cosechar, por lo que son una parte esencial en los sistemas actuales de producción. Sin embargo, hay dos tendencias respecto a su uso; por un lado aquellos países que restringen cada vez más su uso por los efectos tóxicos que se pueden generar en las comunidades expuestas y, por el otro, aquellos que defienden su uso por la prevención de las pérdidas económicas que representan las plagas, llegándose a considerar a los plaguicidas como un mal necesario

(Aktar *et al.*, 2009). En regiones tropicales, donde las plagas de insectos y las enfermedades de las plantas son más frecuentes, los pesticidas generalmente se aplican en cantidades masivas, tanto en fincas pequeñas como en plantaciones industriales como banano, café, maíz y algodón (Carvalho, 2006), siendo este el real problema de todos los plaguicidas: las cantidades usadas y la forma de aplicación.

1.2.3 Riesgos de los plaguicidas

El objetivo de los plaguicidas es controlar plagas, sin embargo, también tienen efecto, en algunos casos graves, en especies no objetivo. Además, los residuos de plaguicidas contaminan suelos y el agua, permanecen en los cultivos, entran a la cadena alimenticia y, finalmente, son ingeridos por humanos en los alimentos y en las aguas. El riesgo de los plaguicidas radica en que su efecto tóxico se produce a bajas concentraciones y, además, su estabilidad química los hace persistentes en el medio ambiente, por lo que su efecto se puede mantener en el tiempo; en consecuencia, se han encontrado concentraciones relativamente altas de compuestos organoclorados y organofosforados en suelos, aire y fuentes acuíferas tiempo después de su aplicación (Kim *et al.*, 2017). La idea de aumentar la producción de alimentos mediante el uso de mayores cantidades de agroquímicos ha resultado ser, probablemente, la causante de daños irreparables al medio ambiente y afectaciones al ser humano que originalmente no se pensaron que ocurrirían; esto no implica que los agroquímicos, incluyendo los plaguicidas, sean totalmente dañinos o inútiles, pero los problemas actuales requieren de formulaciones diferentes con los cuales se puedan controlar las cantidades necesarias para el control de las plagas y las que van al medio ambiente (Carvalho, 2006).

1.2.4 Carbofurano

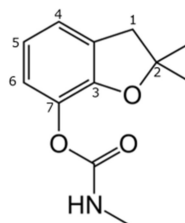
El carbofurano o 2,3-dihidro-2,2-dimetilbenzofuran 7-il-N-metilcarbamato es un compuesto químico perteneciente a la familia de los carbamatos, con actividad nematocida e insecticida de amplio espectro, que actúa a través del suelo. Sus propiedades insecticidas fueron descritas por McEwen y Davis (McEwen y Davis, 1965). Fue introducido a mediados de los años 60 por la *Food Machinery Corporation* (FMC) bajo el nombre comercial de Furadan.

Sus propiedades químicas se resumen en la tabla 1.1

--

Tabla 1.1 Propiedades fisicoquímicas de carbofurano

Estructura química



Nombre IUPAC	2,3-dihidro-2,2-dimetilbenzofuran 7-il-N-metilcarbamato.
No. CAS	1563-66-2
Fórmula	C ₁₂ H ₁₅ NO ₃
Estado	Sólido cristalino
Olor	Inodoro
Polaridad	Relativamente no polar
Peso molecular (g/mol)	221.26
T _f (°C) ^a	150-152
Solubilidad en agua (mg/L) a 20 °C	320
Log K _{OW} ^b	2,3007
Log K _{OC} ^c	1,75 a 2,17
Estabilidad	Estable en medio neutro o ácido. Se hidroliza en condiciones alcalinas o fuertemente ácidas. Es estable a la oxidación.
Otras propiedades	No inflamable, no corrosivo
DT ₅₀ (días) ^d	29

^aTemperatura de fusión, ^bCoeficiente de partición octanol-agua, ^cLogaritmo del coeficiente de distribución normalizado sobre carbono orgánico, ^dtiempo de vida media del plaguicida en suelo. (PPDB; US EPA)

El carbofurano actúa sobre el sistema enzimático colinesterasa dando lugar a alteraciones en la transmisión de los impulsos nerviosos en insectos y ácaros, incluso en otras especies, incluyendo el hombre, en caso de ingestión. De acuerdo al modo de entrada se clasifica como sistémico, lo que significa que las plantas lo absorben mediante las raíces y desde allí la planta lo distribuye al resto de sus órganos, donde se han encontrado las mayores concentraciones residuales del compuesto en tallos y hojas (Mora, 1992).

En el suelo, los procesos de transformación química del carbofurano son influenciados por factores tales como el pH, la temperatura, el contenido de arcilla, contenido de materia orgánica, contenido de humedad, los cuales tienen grupos funcionales que se pueden unir a la molécula transformándola mediante reacciones de óxido-reducción o hidrólisis en sus tres principales derivados: 3-hidroxicarbofurano, 3-cetocarbofurano y fenol-carbofurano, los cuales presentan actividad insecticida, pero no nematicida. Estas reacciones químicas son catalizadas por los elementos que componen el suelo, por ejemplo, las reacciones de óxido-reducción se ven catalizadas por superficies de arcilla,

óxidos metálicos e iones metálicos en el suelo; así mismo, los compuestos que determinan el pH del suelo afectan la velocidad de hidrólisis química del carbofurano, por ejemplo los suelos alcalinos hidrolizan fácilmente el plaguicida, mientras en suelos ácidos tiende a ser más estable, de aquí que el pH es uno de los principales factores que determinan la persistencia de los plaguicidas en los suelos (Donovan *et al.*, 2012).

Por lo tanto, debe tenerse en cuenta todas las características fisicoquímicas del plaguicida, pues condiciona y determina el éxito de cualquier formulación que se diseñe.

1.3 TECNOLOGÍA DE LIBERACIÓN CONTROLADA

1.3.1 Microencapsulamiento

El encapsulamiento es un proceso mediante el cual compuestos activos son atrapados o cubiertos por un material de soporte para formar partículas o cápsulas cuya escala de tamaño se establece, de tal manera que las partículas menores a 1 μm se denominan nanopartículas o nanocápsulas, partículas entre 3 a 800 μm se conocen como micropartículas o microcápsulas y partículas más grandes que 1000 μm se designan como macropartículas (Jyothi *et al.*, 2010). Regularmente la sustancia activa hace parte del núcleo, fase de llenado o fase interna de la partícula, mientras que el material soporte determina la pared, membrana, capsula, matriz o fase externa; de acuerdo a lo anterior se pueden diferenciar dos tipos de morfologías: cápsulas y partículas (esferas) (figura 1.2) (Vincekovic *et al.*, 2017; Shishir *et al.*, 2018).

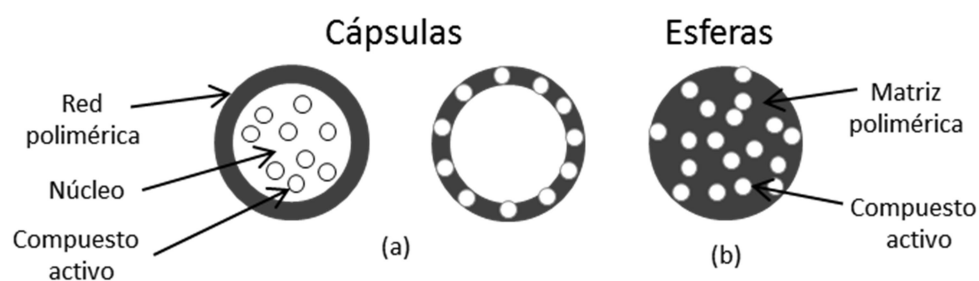


Figura 1.2 Tipos de encapsulados a) cápsula b) partícula o esfera (Vincekovic *et al.*, 2017)

La ingeniería para la obtención de cápsulas o partículas puede clasificarse en: (i) procesos fisicoquímicos (coacervación simple o compleja, gelificación iónica, emulsificación, encapsulación en liposomas, evaporación de disolventes), (ii)

métodos mecánicos (secado por aspersión, enfriamiento, revestimiento de lecho fluido, extrusión-esferonización, extrusión centrífuga, procedimientos de fluidos supercríticos), y (iii) procesos químicos (policondensación interfacial, polimerización y reticulación; y polimerización *in situ*) (Vincekovic *et al.*, 2017).

La fase externa de las micropartículas o material de soporte es un factor determinante en el proceso de encapsulamiento, y regularmente está hecha de compuestos que puedan polimerizar alrededor de los compuestos a encapsular; su selección depende de varios factores: (i) el proceso de encapsulación en sí mismo, (ii) que provea la funcionalidad deseada para la cápsula, (iii) que tenga la tasa de liberación del compuesto activo especificada o deseada, (iv) que tenga reactividad química limitada con el núcleo, y (v) que el costo del material de soporte sea asequible (Vincekovic *et al.*, 2017). Los polímeros usados como material de soporte para encapsular pueden ser de origen natural, como el quitosano, albúmina, alginato, etc., o sintéticos, como los metacrilatos, polietilenglicol, etc. Debido a su tamaño y características fisicoquímicas, los polímeros de origen sintético pueden generar formulaciones con varias ventajas, tales como: (i) encapsulamiento de compuestos de diferentes polaridades, (ii) baja toxicidad, (iii) protección y conservación del activo encapsulado, y (iv) liberación controlada de activos incorporados (Armendáriz *et al.*, 2016), sin embargo, la lenta biodegradabilidad es un aspecto que preocupa de estos materiales, por lo que se han abierto nuevas líneas de investigación sobre el desarrollo de partículas biodegradables como sistemas de liberación de componentes activos con la misma o mejor eficacia que los sintéticos; el quitosano y el alginato están recibiendo un gran interés en la encapsulación de compuestos bioactivos debido a su biocompatibilidad, baja toxicidad, biodegradabilidad y estabilidad química y térmica (Li *et al.*, 2018; Hosseini *et al.*, 2013; Chan *et al.*, 2010).

La microencapsulación se ha desarrollado con los siguientes objetivos, a) liberación controlada de compuestos activos, b) protección de compuestos activos sensibles para ser protegidos contra las influencias externas como la oxidación, la luz, el agua, la evaporación etc., c) combinación de materiales incompatibles, d) enmascaramiento de propiedades organolépticas como sabores u olores desagradables, y e) manejo seguro de materiales tóxicos (Hack *et al.*, 2012).

En aplicaciones agrícolas ha ido tomando fuerza la gelificación iónica como método de encapsulamiento de agroquímicos (fertilizantes, plaguicidas y coadyuvantes) ya que es considerado como un proceso suave donde se evita el uso de agentes tóxicos como

disolventes orgánicos y tensoactivos, lo cual contribuye al cuidado del medio ambiente (Armendáriz *et al.*, 2016). Básicamente, una solución polimérica o hidrocoloide, que contiene el compuesto activo a encapsular, se gotea o se atomiza en una solución de un compuesto en estado iónico, bajo agitación constante, formando la red polimérica con el activo encapsulado. El procedimiento no requiere de equipo especializado, alta temperatura o solvente orgánico y puede considerarse de bajo costo, sin embargo, la aparición de partículas de gel heterogénea es una de sus desventajas (Kurozawa y Hubinger, 2017).

El principio básico de este método es la interacción electrostática entre un polímero que se encuentra en estado iónico y un compuesto iónico con carga opuesta para formar las partículas; a esta interacción se le denomina gelificación ionotrópica. Las reacciones de entrecruzamiento se ven afectadas por el tamaño del entrecruzante y la carga global del polímero durante la reacción, entre más bajo el peso molecular del entrecruzante más rápido se da la reacción de entrecruzamiento, debido a que la difusión en la red polimérica es más fácil (Berger *et al.*, 2004); esto tiene un importante efecto en las propiedades de las partículas formadas, como por ejemplo la fuerza mecánica, la capacidad de encapsulamiento y la liberación de los compuestos activos, entre otros.

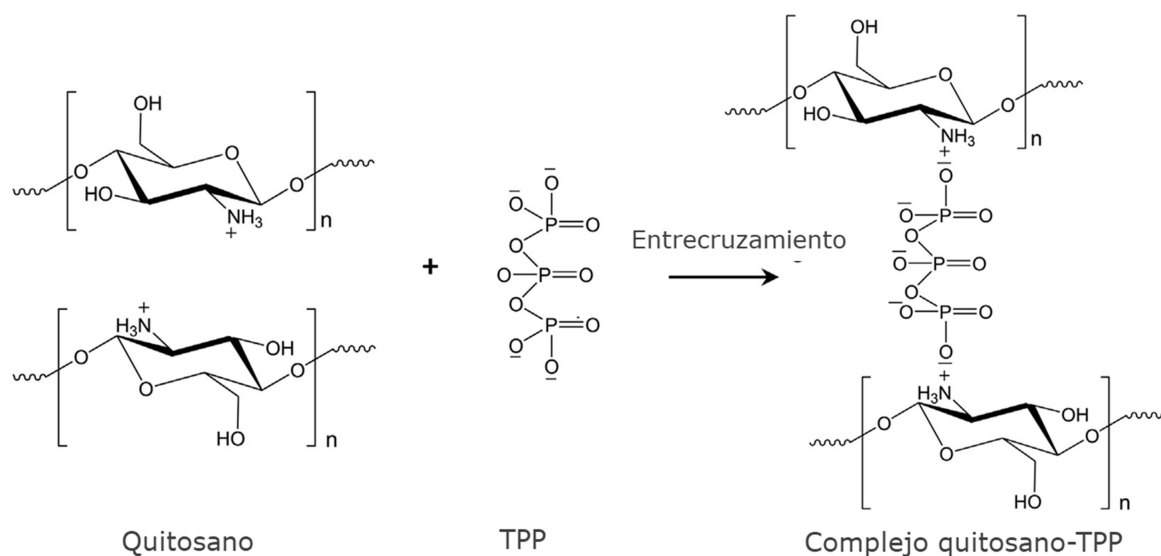


Figura 1.3 Gelificación iónica entre el quitosano y el tripolifosfato (TPP) (Mwangi *et al.*, 2016).

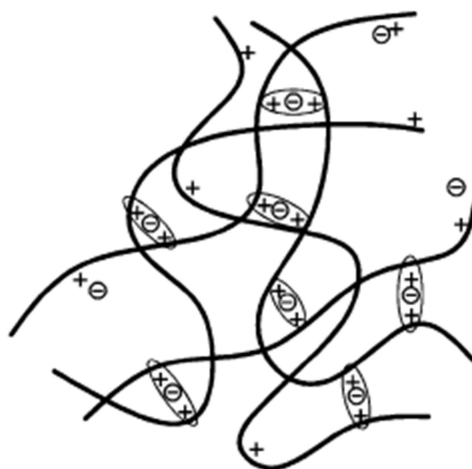


Figura 1.4 Estructura de la red de quitosano formada por entrecruzamiento iónico (Berger *et al.*, 2004).

La interacción o entrecruzamiento iónico es el principio con el cual se preparan nano y micropartículas de quitosano para con las que se encapsulan compuestos activos en el diseño de formulaciones de liberación controlada. La interacción electrostática ocurre entre el quitosano cargado positivamente (en medio ácido) y un entrecruzante cargado negativamente (ver figura 1.3), que regularmente es tripolifosfato, pirofosfato, sulfato, citratos, etc, formando puentes de unión iónica con el entrecruzante resultando una estructura en red polimérica (figura 1.4), dentro de la cual quedan atrapados los principios activos. (Armendáriz *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2018; Sao Pedro *et al.*, 2013).

Dado que la interacción electrostática depende del grado de carga de las dos entidades, el pH es uno de los principales factores que determinan el entrecruzamiento iónico y, en consecuencia, la obtención de la formulación de liberación controlada.

1.3.2 Liberación controlada desde matrices poliméricas

Se entiende por formulación de liberación controlada (FLC) al producto que resulta de la mezcla de un compuesto con actividad biológica dentro de una matriz polimérica, de la cual se libera el compuesto activo a velocidades controladas durante un tiempo específico, mientras que la liberación controlada describe el mecanismo mediante el cual el activo es liberado de la matriz (Lewis y Cowsar, 1977; Neri y Chakraborty, 2019). Basado en lo anterior, las técnicas de encapsulamiento de activos (microencapsulamiento

o nanoencapsulamiento) se han convertido en los dispositivos que mejor se ajustan a los requerimientos para una FLC (Kashyap *et al.*, 2015).

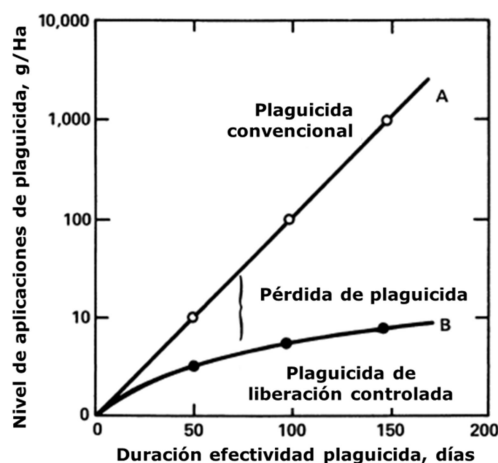


Figura 1.5 Relación entre una formulación de plaguicida convencional y una FLC (Lewis y Cowsar, 1977).

Inicialmente las FLC se desarrollaron para ser aplicadas en el campo de la salud, sin embargo, su aplicación en otras áreas ha ido en aumento, incluyendo en las ciencias agrícolas donde se ha usado para dosificación de agroquímicos, como los plaguicidas, con grandes ventajas frente a las aplicaciones convencionales. En la figura 1.5 se puede observar cómo con el perfil de liberación de una formulación convencional se desperdicia una cantidad importante de plaguicida, responsable de la contaminación del medio ambiente, mientras que la FLC establece un perfil de liberación con menores descargas en el tiempo lo que garantiza una disminución del efecto medioambiental sin perder efectividad como plaguicida (Lewis y Cowsar, 1977).

Las primeras FLC de plaguicidas se basaron en la liberación de los activos por desorción de los plaguicidas de materiales como sílica gel, mica y carbón activado, sin embargo, la mayoría de los sistemas actuales se basan en mecanismos más controlables como la difusión a través de medios de control de velocidad (dispositivos de membrana), erosión o destrucción física de materiales de barrera biodegradables (destrucción mecánica) y destrucción química o reacciones químicas retardantes (hidrólisis, biodegradación, termodegradación, etc.) (Tsuji, 2001). Desde el punto de vista de la liberación, los dispositivos de membrana controlada por difusión son los que más se han trabajado como FLC de plaguicidas (Kashyap *et al.*, 2015). Los dispositivos de membrana controlados por difusión se pueden dividir en dos categorías principales: sistemas de

reservorio, en los que el pesticida está totalmente encapsulado dentro de una membrana que controla la velocidad, y sistemas monolíticos en los que el pesticida se dispersa o disuelve en una matriz que controla la velocidad (Lewis y Cowsar, 1977). La difusión en este tipo de dispositivos, como mecanismo de liberación, se basa en la segunda ley de difusión de Fick, la cual tiene la siguiente relación matemática semiempírica (ecuación 1.1), descrita por Ritgers y Peppas y Korsmeyer y Peppas (Ritgers y Peppas, 1987; Korsmeyer *et al.*, 1983):

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \quad (\text{Ecuación 1.1})$$

Donde M_t/M_∞ es la relación de ingrediente activo liberado a un tiempo t , K es una constante que incorpora características (porosidad, tortuosidad) del sistema de la red macromolecular y el ingrediente activo y n es un parámetro difusional que indica el mecanismo de transporte (Choudhary *et al.*, 2006).

El uso de las FLC de agroquímicos, principalmente de plaguicidas, tiene varias ventajas, entre las que se pueden citar: i) prolongación de la actividad plaguicida, ya que provee, de manera continua, bajas cantidades del plaguicida sin perder su efectividad en el tiempo, ii) reducción del número de aplicaciones al lograr un período largo de actividad con una sola aplicación, iii) reducción de los costos, ya que se eliminan las aplicaciones innecesarias, y iv) reducción de la contaminación ambiental, ya que se reducen las cantidades que regularmente van al medio ambiente por evaporación, escorrentía o lixiviación (Akelah, 1996).

1.4 PLAGAS: NEMÁTODOS

La palabra nemátodo, proviene de los vocablos griegos nema que significa "hilo" y eídés u oídos, que significan "con aspecto de", siendo definidos como animales filiformes con cuerpo sin segmentos y más o menos transparentes, cubiertos de una cutícula hialina, la cual está marcada por estrías u otras marcas; son redondeados en sección transversal, con boca, sin extremidades u otros apéndices, muchos son parecidos a lombrices o con forma de anguila. Las hembras de algunas especies cuando llegan al estado adulto son abultadas con forma de pera o esfera (figura 1.6).



Figura 1.6 Cuerpo completo de tres géneros de nemátodos fitoparásitos. a. *Helicotylenchus*, b. *Criconemoides*, c. *Meloidogyne*, d. *Estomatoestilete* de *Helicotylenchus*, e. *Odontoestilete* de *Xiphinema*, y f. *Onchioestilete* de *Trichodorus* (Guzmán, 2011)

La mayoría de los nemátodos son microscópicos y miden entre 300 y 1000 μm de largo y 15 a 35 μm de ancho; su tamaño los hace invisibles a simple vista. Los nemátodos fitoparásitos, según el género, tienen en la región anterior (cabeza) un estilete hueco (estomatoestilete u odontoestilete) también llamado “lanza”, pero hay algunos con estilete sólido modificado (onchioestilete). El estilete es usado para penetrar las células de las plantas y, a través de él, extraer los nutrientes, causando las enfermedades en los cultivos (Guzmán, 2011).

Los nemátodos que se alimentan dentro de las raíces son endoparásitos, y los que se alimentan desde fuera de la raíz son los ectoparásitos. Aunque algunos nemátodos ectoparásitos, pueden ser devastadores para las plantas en los cultivos, los tipos endoparásitos son generalmente mucho más perjudiciales, en términos de pérdidas

económicas, ya que pasan la mayor parte de su vida dentro de raíces de las plantas, lo que interfiere con la estructura y función de la raíz (Niblack, 2009).

1.4.1 Nemátodos de nudo de la raíz

Los nemátodos de nudo de la raíz (RKN, por sus siglas en inglés *root knot nematode*; *Meloidogyne* spp.), nemátodos del quiste (*Heterodera* y *Globodera* spp.) y nemátodos de la lesión (*Pratylenchus* spp.) son los tres grupos más importantes de nemátodos que pueden infectar, alimentarse y reproducirse en una amplia gama de especies de plantas. Los nemátodos del nudo de la raíz, en particular *Meloidogyne* spp. y, la más prominente, *M. incognita*, exhibe un amplio rango de hospedantes y afecta a una multitud de plantas y cultivos silvestres como el tomate, la papa y la soja. Esta especie polífaga incluso ha sido considerada como uno de los patógenos más dañinos del mundo (Ibrahim *et al.*, 2019). Las especies del género *Meloidogyne* crecen en climas tropicales, subtropicales y templados. El género incluye cerca de 80 especies y once razas, sin embargo, *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* y *M. hapla*, se consideran las especies más comunes e importantes del género y son responsables del 90% o más del daño a cultivos agrícolas (Navas *et al.*, 2003).

De todos los nemátodos, los del género *Meloidogyne* spp son los que representan la mayor amenaza a los cultivos. El ciclo de vida de *Meloidogyne* spp involucra cuatro etapas de desarrollo que incluyen la etapa larvaria 1 (dentro del huevo), la etapa larvaria 2 (migratoria), la etapa larvaria juvenil 3 (sedentaria), la etapa larvaria 4 (sedentaria) y la etapa adulta (sedentaria), el ciclo de vida se completa cuando los huevos se liberan en el suelo desde la matriz de huevo gelatinosa formada en el tejido de la raíz epidérmica. La infección por nemátodos en los nudos de las raíces se caracteriza típicamente por retraso en el crecimiento, marchitamiento, desgaste de las raíces y anomalías en la formación de las raíces (Ibrahim *et al.*, 2019), las cuales se agravan por la simbiosis, que sucede en ocasiones, de los nemátodos con otros agentes causantes de enfermedades como son hongos, bacterias y virus fitopatógenos (Guzmán *et al.*, 2011).

1.4.2 Control de nemátodos

A continuación se describen las estrategias utilizadas en el control de los nemátodos.

1.4.2.1. Control cultural

La rotación de cultivos y la utilización de cultivos de cobertura se utilizan a menudo en los protocolos de manejo integrado de plagas para reducir la incidencia de nemátodos

parásitos de plantas y reponer los niveles de nutrientes del suelo. Aunque los niveles de nemátodos en el suelo se han reducido efectivamente por la rotación de cultivos no hospedantes, el amplio rango de hospedadores de *Meloidogyne spp*, a menudo, disminuye su efectividad (Chen y Tsay, 2006).

1.4.2.2. Extracto de plantas

Una técnica que ha resultado ser efectiva para el control de nemátodos, en algunos casos, es el uso de extractos de plantas. Entre estos, se ha estudiado el efecto que tienen los terpenos, metabolitos secundarios presentes en los aceites esenciales de las plantas, como supresores de nemátodos con buenos resultados. También se ha reportado que la eclosión de los huevos de nemátodo y el desarrollo larvario se ha reducido drásticamente gracias a los extractos de hojas de *Hunteria umbellata* y *Mallotus oppositifolius*, que coincidieron con un mayor crecimiento de las plantas de anacardo (Okeniyi *et al.*, 2013)

1.4.2.3 Control Biológico

Se encuentran documentos donde reportan la eficacia de bacterias y hongos como nematófagos para el control de algunos géneros de nemátodos, incluyendo los nemátodos formadores de quistes y los formadores de agallas. En algunos casos estos nematófagos han sustituido con éxito a los plaguicidas sintéticos. Un ejemplo son las bacterias parasitarias de *Pasteuria spp*, sobre las cuales se ha reportado la infestación de 323 especies de nemátodos, incluidos los nemátodos parásitos de plantas y los nemátodos de vida libre (Gan *et al.*, 2007).

1.4.2.4 Resistencia al Hospedador

Otra forma de control de ataques por nemátodos es utilizar genotipos específicos de las plantas resistentes a la enfermedad, contribuyendo a aumentar la agresividad del patógeno dando como resultado condiciones epifitóticas; por lo tanto, la identificación de variedades resistentes adicionales se hace cada vez más necesaria para el control a largo plazo. Los genes resistentes a nemátodos que se encuentran en algunas variedades de plantas, se han introducido en los genomas de cultivos económicamente importantes con susceptibilidad natural a través de tecnologías transgénicas como la transformación mediada por agrobacterium (Vishnudasana *et al.*, 2005)

1.4.2.5 Nematicidas de origen sintético: carbamatos

Los carbamatos inhiben la acetilcolinesterasa en la sinapsis nerviosa causando el mal funcionamiento de los sistemas musculares y otros sistemas orgánicos en el nemátodo. La interrupción de estos sistemas puede afectar en gran medida el movimiento y el comportamiento de los nemátodos y, en última instancia, alterar el proceso de infección del parásito, ya sea retrasando o evitando la penetración. Los efectos del carbamato sobre los nemátodos son reversibles. La actividad del nemátodo se restaura después de la degradación o dilución de los carbamatos en la rizosfera y el nemátodo puede penetrar y dañar la raíz (Sikora y Hartwing, 1991).

Dentro del grupo de los carbamatos, el carbofurano es el más utilizado en el control de nemátodos, tanto en suelos como a nivel foliar, afectando los mecanismos de orientación y alimentación. La reducción de las poblaciones de nemátodos en el suelo puede atribuirse a la inanición, o más probablemente a una combinación de inanición y toxicidad subletal. El uso de carbofurano como nematicida, se encuentra bien documentados, por ejemplo, su aplicación en plantas de soja en el suelo, redujo el número de huevos de *M. incognita* que se incubaron en juveniles, lo cual se evidenció por la reducción de la incidencia y la gravedad del índice de agallamiento y el factor de reproducción, previniendo o limitando la incubación de los huevos y el movimiento de las larvas hacia las raíces (Jada *et al.*, 2011).

1.5 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

A pesar de los grandes esfuerzos por controlar las plagas de cultivos industriales, las pérdidas económicas por los daños ocasionados siguen siendo un problema que preocupa a productores y a entidades gubernamentales. Particularmente, los nemátodos generan pérdidas anuales de USD 80 millones a la economía mundial (Guzmán *et al.*, 2011). A pesar de que el carbofurano es un nematicida altamente efectivo, su efecto tóxico sobre especies no objetivo, ha causado que la Agencia de Protección Ambiental (EPA por sus siglas en inglés) lo haya prohibido en los Estados Unidos en el año 2009 y en Colombia el ICA ha cancelado su registro de venta en el año 2014 (González, 2018; EPA, 2011). Las concentraciones de carbofurano residuales encontradas en cuerpos de agua, suelos y aire, como consecuencia de su movilidad, sugiere que aún se sigue usando de forma clandestina, y en algunos países como Panamá, Argentina y Costa Rica tienen uso restringido, agravando el problema de la contaminación ambiental. El daño que puede presentar el carbofurano sobre especies no objetivo, como las abejas, insectos de la cual

depende la polinización de muchas especies vegetales, genera, además del problema ambiental, un problema social por la escasez de alimentos que pueda tener. No obstante, la contaminación ambiental y el daño que puede causar el carbofurano a especies no objetivo sugiere que el problema no es el compuesto en sí mismo, sino las cantidades usadas y los métodos de aplicación del plaguicida. En este sentido, la investigación en nuevas tecnologías para encontrar alternativas de aplicación de carbofurano, usando el microencapsulamiento, ha dado como resultado formulaciones de liberación controlada, las cuales han mostrado ser efectivas por la entrega de los plaguicidas de manera paulatina, sin embargo, la investigación ha reportado formulaciones con cantidades relativamente altas del nematicida, con cual se mantiene el problema ambiental. Adicionalmente, los excesos de nematicida que resulta de altas concentraciones aplicadas generan un problema social por el riesgo asociado a los efectos en la salud que tienen trabajadores, responsables directos de la aplicación, y consumidores por las concentraciones residuales de plaguicida en los alimentos por las vías de transporte del exceso de plaguicida.

1.6 OBJETIVOS

1.6.1 Objetivo General

Generar una nueva formulación de liberación controlada a base de carbofurano encapsulado en partículas de quitosano, que exhiba una alta efectividad nematicida en cultivos de tomate, pero manteniendo un bajo impacto ambiental

1.6.2 Objetivos Específicos.

- 1.6.2.1 Determinar la capacidad del quitosano para encapsular carbofurano mediante entrecruzamiento iónico y establecer las condiciones óptimas para obtener la mayor capacidad de encapsulamiento.
- 1.6.2.2 Determinar la liberación controlada, en agua y suelos de carbofurano encapsulado en partículas de quitosano.
- 1.6.2.3 Determinar los perfiles de lixiviación residual como medida potencial de impacto ambiental.
- 1.6.2.4 Determinar el efecto plaguicida con nemátodos del género *Meloidogyne spp* del carbofurano encapsulado en partículas de quitosano en cultivos de tomate.

CAPÍTULO II Preparación y caracterización de carbofurano encapsulado en micropartículas de quitosano

	Página
2.1 METODOLOGÍA	18
2.1.1 Reactivos químicos	18
2.1.2 Procedimiento general para la preparación de carbofurano encapsulado en micropartículas de quitosano	19
2.1.3 Determinación de la Eficiencia de la encapsulamiento (EE) y la capacidad de carga (CC) del plaguicida en las MPC	19
2.1.4 Evaluación de Fosfato, pirofosfato, tripolifosfato y sulfato como agentes entrecruzantes	20
2.1.5 Titulación potenciométrica de quitosano	20
2.1.6 Determinación de la relación molar sulfato/quitosano (titulación turbidimétrica)	20
2.1.7 Efecto de la velocidad y el tiempo de agitación en la preparación de las MPC.	21
2.1.8 Caracterización de las MPC.	21
2.1.8.1 Análisis FTIR	21
2.1.8.2 Distribución de tamaño y análisis de potencial zeta (ζ)	21
2.1.8.3 Determinación de la morfología mediante microscopía electrónica de barrido	22
2.1.8.4 Análisis de termogravimetría y calorimetría de barrido diferencial	22
2.1.9 Determinación de la capacidad de encapsulamiento del quitosano	22
2.1.10 Análisis de datos	22
2.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
2.2.1 Evaluación de Fos , Pyr, TPP y Sul como agentes entrecruzantes.	23
2.2.2 Determinación del pH para la obtención de micropartículas de quitosano y sulfato	25
2.2.3 Determinación de la relación molar sulfato/quitosano	28
2.2.4 Efecto de la velocidad y el tiempo de agitación en la encapsulación de carbofurano	30
2.2.5 Caracterización del producto encapsulado de carbofurano	32
2.2.6 Determinación de la EE y la CC del quitosano en función de la masa de carbofurano	39
2.3 CONCLUSIONES	43

2.1 METODOLOGÍA

2.1.1 Reactivos químicos

Se partió de carbofurano grado técnico para todos los experimentos, donado amablemente por Tecnoquímicas S.A. (Cali, Colombia), el cual se purificó mediante recristalización con metanol. A una masa de carbofurano se le adicionó un volumen de metanol grado analítico (Sigma Aldrich, St Louis, MO, EEUU) con agitación constante por 30 minutos, posteriormente, se filtró y las impurezas insolubles se lavaron varias veces con metanol. Al filtrado se le adicionó agua desionizada en una proporción 9:1 (agua:metanol) dejando en reposo toda la noche hasta cristalización completa del carbofurano, el cual se filtró y se lavó con agua desionizada varias veces. Cuando fue necesario se repitió el proceso hasta obtener cristales de carbofurano, en forma de agujas de color blanco. El carbofurano cristalizado se secó a 40 °C durante toda la noche, se caracterizó y se almacenó para todos los experimentos posteriores (Shukla *et al.*, 1991). El carbofurano cristalizado se caracterizó mediante punto de fusión (153.3 °C), espectroscopía de infrarrojo con reflectancia totalmente atenuada (FTIR-ATR) en un equipo Shimadzu IRAffinity-1, (ν , cm^{-1}): 3350, 2972, 2906, 1712, 1681, 1222 y 1107 y resonancia magnética nuclear protónica RMN- ^1H (CDCl_3 ; 400 MHz) en un espectrómetro Bruker Ultrashield Advance II 400 (δ , ppm): 1.41 (-C-(CH_3) $_2$), 2.74 (-NH- CH_3), 3.01 (- CH_2 -), 5.0 (-NH-) y 6.79 (protones aromáticos), lo cual corrobora los resultados ya publicados (Shukla *et al.*, 1992). Se utilizó carbofurano estándar (Pestanal © Riedel de Haen, Suiza) para fines analíticos. Se usó quitosano de bajo peso molecular (190 kDa) y un grado de desacetilación de 82.6 %, de la casa Sigma-Aldrich Co (St Louis, MO, EE. UU.). Como agentes entrecruzantes se usaron pirofosfato de sodio ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, Pyr) de Sigma-Aldrich (St Louis, MO, EE. UU.), fosfato ácido de sodio (Na_2HPO_4 , Fos) de Merck Co, tripolifosfato de sodio ($\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$, TPP) y sulfato de sodio (Na_2SO_4 , Sul) de Sigma-Aldrich (St Louis, MO, EE. UU.), todos ellos de grado analítico, y utilizados sin tratamientos adicionales. Los solventes que se usaron en las determinaciones cromatográficas fueron grado HPLC, adquiridos de Sigma-Aldrich (St Louis, MO, EE. UU.). El ajuste del pH (ácido o básico) se realizó con ácido clorhídrico grado analítico o hidróxido de sodio (Sigma-Aldrich Co, St Louis, MO, EE. UU.). Se utilizó agua desionizada (18,2 M Ω) en todos los experimentos.

2.1.2 Procedimiento general para la preparación de carbofurano encapsulado en micropartículas de quitosano

El carbofurano encapsulado en micropartículas de quitosano se preparó mediante la técnica de entrecruzamiento iónico. Todos los reactivos se midieron en masa para evitar posibles variaciones de las concentraciones debido a la temperatura. Se disolvió una masa específica de carbofurano en una mezcla de 500 mg de etanol y 1000 mg de propilenglicol, luego se agregaron, con agitación vortex, 5.0 g de solución de quitosano (2.0 % de quitosano en HCl al 2% y ajustado a pH 4.0 con NaOH), obteniéndose una suspensión homogénea, luego, se añadieron gota a gota 5.0 g de solución de agente entrecruzante (Fos, Pyr, TPP o Sul) al 6.0 % con agitación magnética constante en un máximo de 5 minutos; La mezcla se agitó durante 30 minutos con agitación magnética (1.100 rpm), seguidamente se filtró utilizando un filtro de 0.45 μm ; el filtrado se transfirió a un matraz aforado para la cuantificación de carbofurano, y el sólido se transfirió a un molde en forma de tableta. El producto encapsulado se secó en un horno a 40 ° C y se almacenó para experimentos adicionales. La cuantificación de carbofurano se realizó por HPLC en un instrumento Shimadzu 2010A HT, con bomba cuaternaria y detector UV de doble longitud de onda. Las separaciones se realizaron en una columna XDB - C18 de 150 mm, 4,6 mm, 5 μm , Zorbax eclipse de Agilent (Santa Clara, CA, EE. UU.), elución isocrática, volumen de muestra 20 μL , caudal 1.0 mL/min, λ (275 nm), y metanol-agua (50% - 50%) como fase móvil. La cuantificación se hizo por triplicado y se usó calibración estándar externa como técnica de cuantificación. De esta manera se obtuvieron las micropartículas con carbofurano encapsulado (MPC), que se usaron durante todos los experimentos posteriores; paralelamente se prepararon micropartículas sin carbofurano o micropartículas "vacías" (MPV) usadas en los experimentos posteriores como blanco. Al producto obtenido, una vez determinadas las condiciones para obtener las MPC, se le denominó formulación de liberación controlada (FLC).

2.1.3 Determinación de la Eficiencia de encapsulamiento (EE) y la capacidad de carga (CC) del plaguicida en las MPC

La EE corresponde a la cantidad de carbofurano encapsulado del total de carbofurano agregado, expresada como porcentaje (%). La CC implica la cantidad de carbofurano encapsulado en una determinada masa de micropartículas de quitosano, en términos porcentuales (%). En ambos casos se cuantificó el carbofurano no encapsulado en el filtrado, en la etapa de filtración en el procedimiento descrito en el numeral 2.2.2 para la

preparación de las MPC. La EE y la CC se calcularon de acuerdo a las ecuaciones (2.1 y 2.2) reportadas por Kumar *et al.* (Kumar *et al.*, 2014):

$$EE, \text{ en } \% = \frac{\text{Total carbofurano adicionado} - \text{carbofurano no encapsulado}}{\text{Total carbofurano adicionado}} \times 100 \quad (\text{Ecuación 2.1})$$

$$CC, \text{ en } \% = \frac{\text{Total carbofurano adicionado} - \text{carbofurano no encapsulado}}{\text{Total masa de microparticulas}} \times 100 \quad (\text{Ecuación 2.2})$$

2.1.4 Evaluación de Fos , Pyr, TPP y Sul como agentes entrecruzantes

Se determinó el efecto que tienen diferentes agentes entrecruzantes (Fos , Pyr, TPP y Sul) en la obtención de las MPC en términos de la eficiencia de encapsulamiento (EE). Se siguió el procedimiento descrito en el numeral 2.2.2 para la preparación de las MPC, donde sólo se varió el agente entrecruzante. Para evitar posibles desviaciones debido a las condiciones de reacción, se utilizaron las mismas condiciones experimentales en el encapsulado de carbofurano con cada agente entrecruzante. Para la evaluación del efecto del entrecruzante se aplicó un diseño experimental completamente aleatorio, donde cada entrecruzante corresponde a cada tratamiento y se tomó la EE, expresada en porcentaje, como variable de respuesta.

2.1.5 Titulación potenciométrica de quitosano

El pH de interacción de quitosano para la formación de las micropartículas con carbofurano encapsulado se determinó mediante valoración potenciométrica. Se preparó una solución de quitosano al 2.0 % en HCl a la cual se adicionó la cantidad suficiente de HCl 0,1 N para ajustar el pH hasta 2.0, seguidamente, se tituló con NaOH 0,1 N hasta alcanzar un pH aproximadamente de 10.0, registrando valores de pH después de cada adición de base.

2.1.6 Determinación de la relación molar sulfato/quitosano (titulación turbidimétrica)

La relación molar, sulfato/quitosano, para la formación de las MPC fue evaluada mediante titulación turbidimétrica, la cual se basó en el trabajo publicado por Mayyas y Remawi (Mayyas y Remawi, 2012). Se prepararon dieciséis viales con diferentes relaciones molares sulfato/quitosano mezclando 0.54 mmol de quitosano con la cantidad requerida

de sulfato para lograr relaciones molares (sulfato/quitosano) de 0.05, 0.10, 0.20, 0.31, 0.42, 0.48, 0.62, 0.72, 0.83, 0.93, 1.00, 1.55, 2.03, 3.07, 4.07 y 5.08; se midió el pH de cada solución, se ajustaron a pH 4,0 con NaOH 0,1 N o HCl 0,1 N según fuera el caso, se agitaron durante 5 minutos y, finalmente, se tomaron las mediciones de turbidez, en un espectrofotómetro marca Shimadzu, a una longitud de onda de 600 nm y reportada como (100-%T). Inicialmente se realizó el experimento con las MPV y luego se repitió con las MPC.

2.1.7 Efecto de la velocidad y el tiempo de agitación en la preparación de las MPC.

Se evaluó el efecto de la velocidad y el tiempo de agitación en la obtención de las MPC mediante un diseño experimental completamente aleatorio en arreglo factorial 3^2 , donde los factores fueron tiempo y velocidad de agitación, los tratamientos del tiempo fueron 30, 60 y 90 minutos y los de la velocidad de agitación fueron 1100, 5000 y 10000 rpm, todos por triplicado y 9 ensayos en total. Se calculó la EE como variable de respuesta y se aplicó análisis de varianza (ANOVA por sus siglas en Inglés) de dos factores para el tratamiento de los resultados.

2.1.8 Caracterización de las MPC.

2.1.8.1 Análisis FTIR

Los espectros de infrarrojo se tomaron en un espectrómetro FTIR (Shimadzu IRAffinity-1) equipado con un dispositivo MIRacle™ ATR con un cristal de diamante de reflexión única (tamaño de punto de 1,8 mm) y un detector MCT (HgCdTe). En cada toma de los espectros, la muestra se coloca en la parte superior del cristal de diamante, se tapó con una abrazadera de alta presión y se registraron los espectros en el rango de 500 a 4000 cm^{-1} . Se tomaron espectros de infrarrojo a las materias primas (quitosano, sulfato, carbofurano), a las MPV y a las MPC.

2.1.8.2 Distribución de tamaño y análisis de potencial zeta (ζ)

Se determinó el tamaño de partícula y el potencial zeta a las MPV y a las MPC. Las medidas se tomaron utilizando un Zetasizer Nano ZSP (Malvern Instruments, Reino Unido) con un láser rojo (633 nm) He/Ne. El tamaño de partícula se midió mediante la técnica de DLS (Dynamic Light Scattering), con un ángulo de dispersión de 90 ° a 25 ° C y el potencial zeta de las partículas se midió a través de la movilidad electroforética (μ).

2.1.8.3 Determinación de la morfología mediante microscopía electrónica de barrido

Se determinó la morfología de las MPV y a las MPC mediante microscopía de barrido electrónico (SEM por sus siglas en inglés). Cada muestra fue colocada en una cinta de carbón conductor para ser analizadas en un microscopio electrónico de barrido modelo Nova Nano 200 SEM de la marca FEI Company, para ser observadas en modalidad bajo vacío utilizando un detector Helix.

2.1.8.4 Análisis de termogravimetría y calorimetría de barrido diferencial

El análisis termogravimétrico (TGA por sus siglas en Inglés) y de calorimetría de barrido diferencial (DSC por sus siglas en Inglés) de la FLC se llevaron a cabo utilizando un calorímetro PerkinElmer® DSC 6 (PerkinElmer, Massachusetts, EE. UU.). Se pesaron aproximadamente $12,0 \pm 0,1$ mg de MPV y MPC en una cápsula de aluminio abierta y se calentaron desde 30 °C hasta 550 °C en atmósfera inerte (N_2), registrando los cambios en masa y los cambios energéticos en cada caso.

2.1.9 Determinación de la capacidad de encapsulamiento del quitosano

Se determinó la capacidad de carga máxima del plaguicida que una cierta masa de quitosano puede encapsular, siguiendo el procedimiento descrito en el numeral 2.2.2 usando como entrecruzante sulfato de sodio y una masa constante de quitosano. Se tomaron 5.0 g de solución de quitosano y se adicionaron cantidades variables de carbofurano entre 0, 1, 5, 10, 20, 30, 50 y 100 mg con lo cual se determinó la CC para cada caso.

2.1.10 Análisis de datos

Las diferencias o similitudes estadísticas de los resultados se determinaron mediante pruebas de significancia estadística: comparación de medias, comparación de desviaciones, ANOVA o comparación de rangos múltiples (Tukey, Duncan o Fisher) utilizando el software Minitab® 18 con un nivel de significación de $p < 0,05$. También se usó Excel® como software de cálculo cuando fue necesario.

2.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.2.1 Evaluación de Fos, Pyr, TPP y Sul como agentes entrecruzantes.

Las MPV y las MPC se obtuvieron mediante la técnica de entrecruzamiento iónico o gelificación iónica, que se basa en la interacción electrostática entre un polímero, que se encuentra en su forma catiónica, y aniones o moléculas aniónicas. Para que se produzca esta interacción, tanto el quitosano como la entidad aniónica deben tener un número suficiente de cargas positivas y negativas respectivamente, con las cuales se obtienen partículas con diferentes características. En este trabajo se utilizaron agentes entrecruzantes con diferente número de cargas negativas (entre paréntesis): Sul (2), Fos (3), Pyr (4) y TPP (5), que se entrecruzan generando nano y micropartículas con el quitosano cargado (figura 2.1). La preparación, caracterización y principales propiedades de estas partículas, utilizando estos entrecruzantes, se encuentran publicadas y ampliamente discutidas (Shu y Zhu, 2002; Sacco *et al.*, 2016; Cai y Lapitsky, 2014; Berth *et al.*, 2002); sin embargo, las condiciones de preparación de estas partículas cambian si se incorporan o encapsulan moléculas que actúan como compuestos activos.

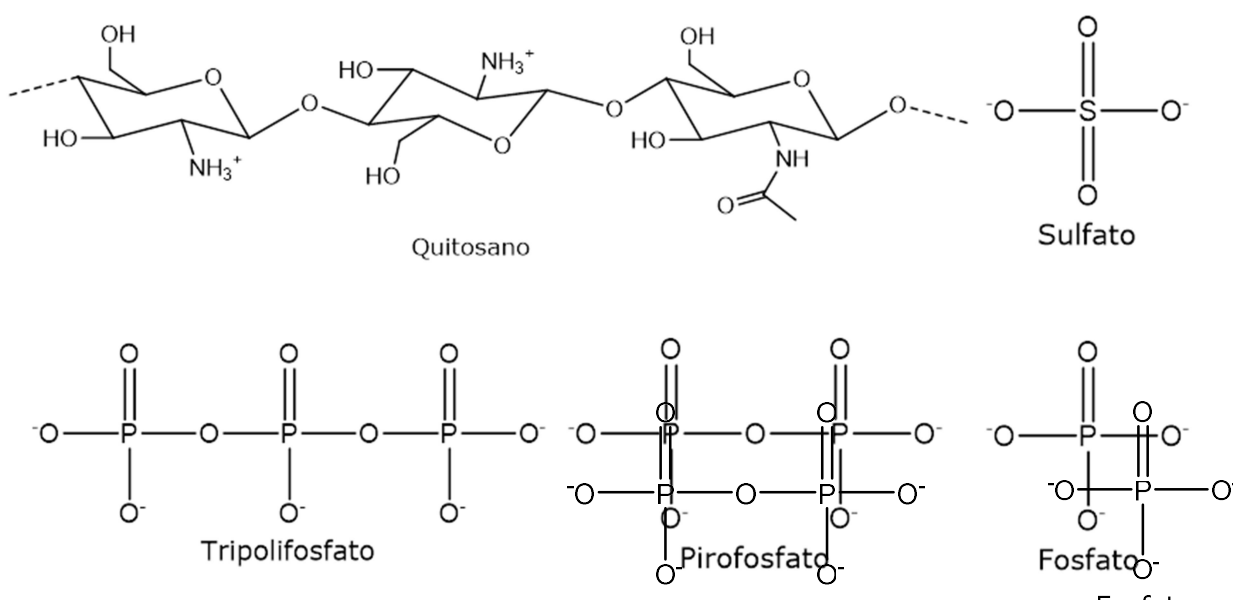


Figura 2.1. Estructura química del quitosano protonado y los agentes entrecruzantes

Debido a que no se ha reportado el encapsulamiento de carbofurano en partículas de quitosano, se debieron evaluar los principales factores que afectan el encapsulamiento del plaguicida: tipo de entrecruzante, relación entrecruzante/quitosano, pH, velocidad y tiempo de agitación, manteniendo constante la cantidad de propilenglicol y etanol.

La tabla 2.1 muestra los resultados de la EE de carbofurano usando los diferentes agentes entrecruzantes. Con base en el análisis de varianza, se deduce que no hay diferencia significativa en la EE ($p > 0.05$), lo cual significa que independientemente del agente entrecruzante se obtienen valores estadísticamente similares. Este resultado se puede inferir debido a las altas desviaciones obtenidas. Es de notar que la menor desviación y la EE de mayor valor numérico se obtuvieron con el entrecruzante de menor carga (Sul), gráficamente se puede observar en la figura 2.2.

Tabla 2.1. EE de carbofurano utilizando diferentes agentes entrecruzantes

Parámetro	Fos	Pyr	TPP	Sul
EE Promedio, en % (n=5)	39.8	35.3	37.7	47.3
CV, en %	31.5	37.0	25.4	10.7
p (0,05)	0.351			

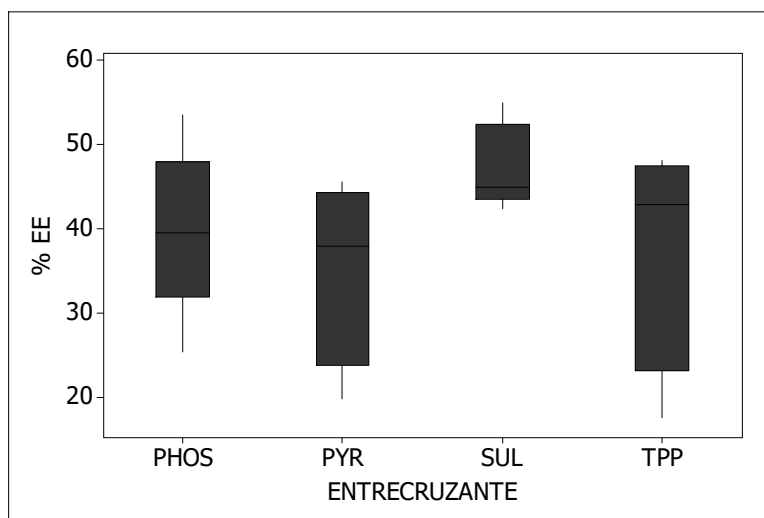


Figura 2.2. Diagrama de cajas de la EE de carbofurano con diferentes entrecruzantes

Shu *et al.* había discutido que en el proceso de obtención de micropartículas de quitosano mediante entrecruzamiento iónico, cuanto más pequeño es el agente entrecruzante más rápida es la difusión dentro de las partículas y en consecuencia más efectivo es el entrecruzamiento del polímero (Shu y Zhu, 2002; Berger *et al.*, 2004), en este sentido el ion sulfato, por ser más pequeño, puede difundir más fácilmente que el TPP por lo que la velocidad de entrecruzamiento con Sul es mayor que con TPP. Con base en esto, se podría inferir que la mayor velocidad de formación de las partículas con sulfato hace que

el carbofurano tenga menor probabilidad de salir de la red polimérica y, en consecuencia, la cantidad del plaguicida encapsulado tendría menor desviación en comparación con los demás entrecruzantes. Caso contrario con el TPP, cuyo tamaño es mayor y la velocidad de difusión en las partículas es menor y, en consecuencia, la formación de las partículas es más lenta teniendo el carbofurano mayor posibilidad de entrar y salir, obteniéndose una mayor desviación. En el caso de Pyr y Fos, las desviaciones observadas se le pueden atribuir a la misma razón, de hecho se encuentran en intermedio entre los dos extremos de los entrecruzantes con carga más alta y más baja, así como el peso molecular, de tal manera que la selección del agente entrecruzante puede hacerse con base en el que presente la menor desviación.

De aquí se concluye que, en términos de la EE, el sulfato es el entrecruzante con el que se obtuvieron los mejores resultados. Para nuestros fines, este resultado es conveniente debido a que, de acuerdo a la literatura, las interacciones del ion sulfato con quitosano producen partículas con menor fuerza mecánica, siendo una ventaja en formulaciones de liberación en corto tiempo (Shu y Zhu, 2002).

2.2.2. Determinación del pH para la obtención de micropartículas de quitosano y sulfato

Debido a que los compuestos de partida pueden presentar cambios estructurales en relación con el pH y la interacción de entrecruzamiento se produce dependiendo de su estructura, por lo tanto, se debe determinar el rango de pH global de la solución que arroje los mejores resultados en términos de la EE.

El grado de desacetilación determina el número de grupos aminos libres en la molécula de quitosano (figura 2.1), y su carga depende del pH en la cual se encuentre la solución; de igual manera, el pH de los entrecruzantes condiciona su carga, de tal manera, que la carga neta de la solución de reacción condiciona el grado de reactividad (Berger *et al.*, 2004). En la curva de titulación potenciométrica del quitosano (figura 2.3) se puede observar que antes del primer punto de inflexión, es decir a un $\text{pH} < 4$, los grupos aminos están completamente protonados y, en consecuencia, el quitosano tiene una carga positiva alta; entre $\text{pH} 4$ y $\text{pH} 6.5$ el quitosano comienza a desprotonarse, pero tiene carga suficiente para que haya entrecruzamiento, mientras que a $\text{pH} > 6.5$ los grupos amino se desprotonan, hay menor probabilidad de que haya entrecruzamiento iónico y el quitosano se precipita por coacervación debido a su baja solubilidad a pHs altos (Shu y Zhu, 2002; Mazancová *et al.*, 2018).

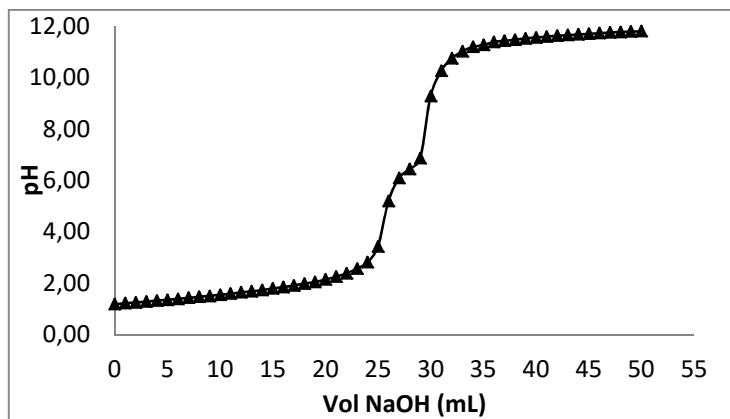


Figura 2.3. Titulación potenciométrica de quitosano

El segundo punto de inflexión que se observa en la gráfica corresponde a la valoración del ácido en el cual se disolvió el quitosano, y que coincide con el perfil de valoración realizada por Balazs y Sipos (Balazs y Sipos, 2007).

En conclusión, el entrecruzamiento del quitosano con especies con carga opuesta debe darse a un pH por debajo de 6.5.

El perfil de las especies del sulfato en función con el pH determina que a un valor superior a 3 el ion sulfato (estado divalente, SO_4^{2-}) es la especie predominante (Base de datos en línea de Chemicalize) (ver figura 2.4). Cabe anotar que la especie bisulfato no genera entrecruzamiento con quitosano por tener una sola carga (Shu y Zhu, 2002).

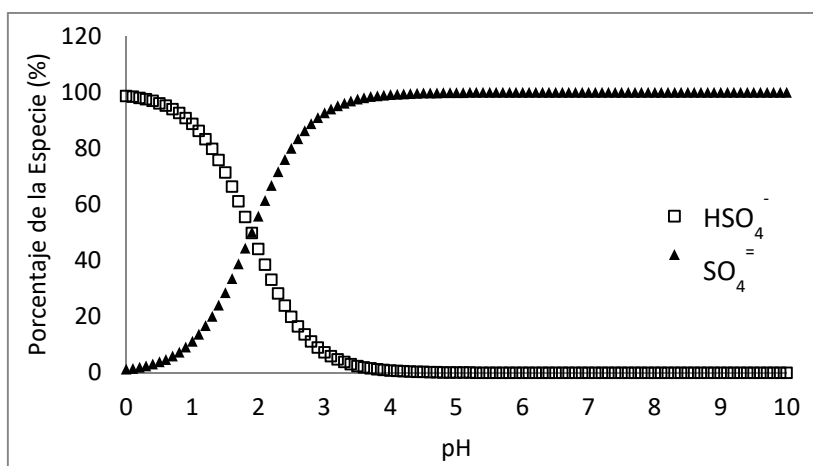


Figura 2.4. Especies de ion sulfato en dependencia con el pH

En la figura 2.6 se puede observar la titulación de carbofurano desde pH 3 hasta pH 10. Al inicio de la titulación el carbofurano, en medio ácido, el protón de la amina del grupo carbamato se encuentra protonado y, por tanto, cargado positivamente. Esta especie del carbofurano ionizado por la protonación del grupo amino se puede evidenciar en el espectro de RMN- ^1H del carbofurano en medio ácido a diferencia del espectro de RMN- ^1H tomado en medio neutro (ver figura 2.5). A pH 4, aproximadamente, el carbofurano comienza a desprotonarse y a partir de pH 6.5 la molécula sufre hidrólisis produciendo compuestos de descomposición menos persistentes y, aparentemente, sin actividad pesticida (Evert, 2002; Eisler, 1985). Con base en lo anterior, se puede decir que el rango útil de pH para el encapsulamiento de carbofurano en micropartículas de quitosano debe estar entre 3.0 y 6.0.

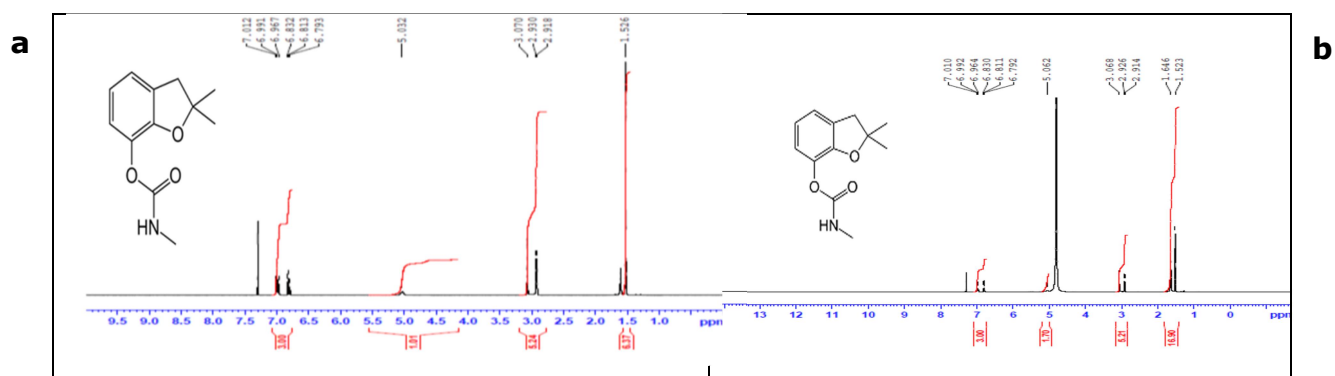


Figura 2.5. Espectros de RMN- ^1H de carbofurano neutro (a) y carbofurano acidulado (b)

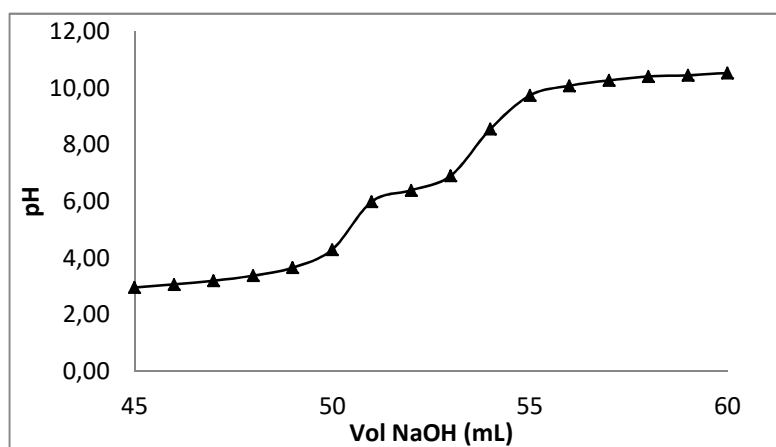


Figura 2.6. Titulación potenciométrica de carbofurano

Con el fin de determinar cuantitativamente el pH apropiado para la obtención de las MPC, se evaluó la EE en el rango de pH entre 3.0 y 6.0 (determinado anteriormente). De los resultados de la ANOVA (tabla 2.2) se infiere que existe una diferencia estadística entre las EE a diferentes pHs ($p < 0.05$), lo cual se puede observar en la figura 2.7 donde las medias de la EE a pH 5 y 6 se encuentran en desfase con los demás resultados, mientras que a pH 3 y 4 se obtienen las medias de EE más altas, pero con mayor desviación.

Tabla 2.2. Efecto del pH en la EE de carbofurano en quitosano a diferentes pHs

Parámetro	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6
EE promedio, en %	46,08	47,40	44,16	38,82
CV, en %	11,16	8,23	6,05	9,34
p (0.05)	0,0064			

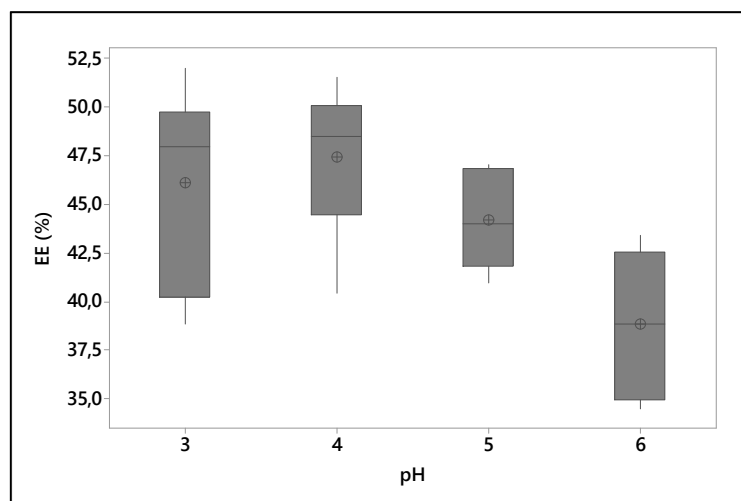


Figura 2.7. Diagrama de cajas de la EE de carbofurano a diferentes pH

Con base en lo anterior, se toma 4.0 como el valor de pH en el cual se preparan las MPC para ser utilizada en experimentos posteriores.

2.2.3. Determinación de la relación molar sulfato/quitosano

En el proceso de formación de partículas de quitosano entrecruzado iónicamente, la relación de agente entrecruzante/polímero determina el tamaño de partícula y, por lo tanto, el tipo de coloide. Las características de las partículas que se forman, en cuanto a cantidad, tamaño, agregación, etc., se derivan de la relación entrecruzante/polímero,

además, de la naturaleza del agente entrecruzante (Lapitsky, 2014). La figura 2.8 ilustra la turbidez generada (expresada como 100-%T) por el efecto de la relación molar sulfato/quitosano.

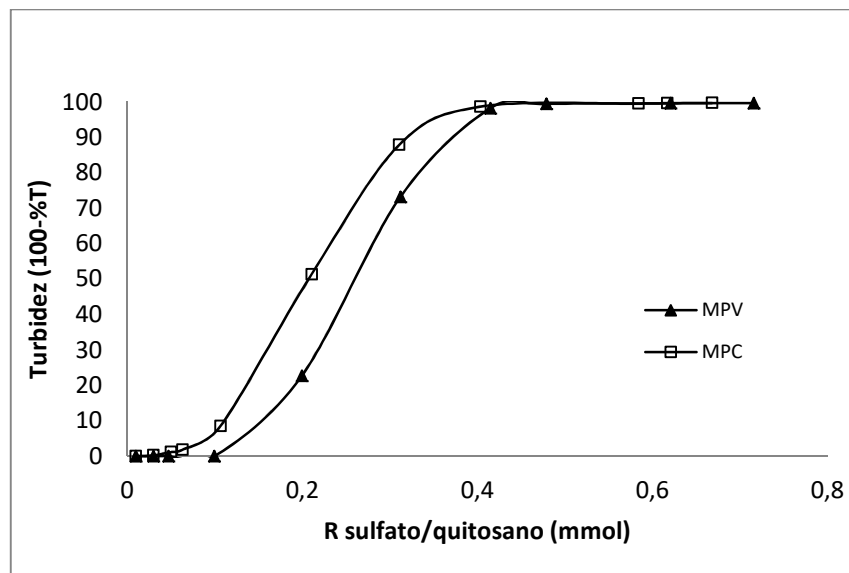


Figura 2.8. Titulación turbidimétrica de la relación molar para MPV y MPC

Se observa que a una relación molar baja, no se observa turbidez significativa, lo que sugiere un sistema coloidal compuesto por nanopartículas de quitosano. Por encima de aproximadamente 0,1, se observa un aumento rápida en la turbidez; en este sistema macroscópico se forman partículas de mayor tamaño por agregación a coloides de un orden superior (microgel). Cuando la valoración alcanza una relación de Sul/quitosano de 0.4 no se observan cambios en la turbidez lo cual sugiere que no se forman más sólidos por agotamiento del reactivo límite; este comportamiento ya se ha reportado utilizando otros entrecruzantes (Huang y Lapitsky, 2013; Sacco *et al.*, 2016). La relación molar de Sul/quitosano de 0.4 (o 2.5 quitosano/Sul) obtenida en este experimento es consistente con aquella alcanzada por Mayyas *et al.*, en la preparación de micropartículas de quitosano utilizando Sul como agente entrecruzante (Mayyas y Remawi, 2012).

La titulación turbidimétrica de la formación de las MPC (figura 2.8) muestra una mayor turbidez a la misma relación sulfato/quitosano que para las MPV, lo que sugiere un mayor tamaño de partícula (probablemente por agregación), sin embargo, la turbidez se estabiliza a la misma relación molar para las MPC y las MPV y, en este caso, se puede toar como una evidencia de encapsulamiento del carbofurano en las micropartículas de quitosano.

2.2.4 Efecto de la velocidad y el tiempo de agitación en la encapsulación de carbofurano.

El proceso de formación de partículas involucra la agitación como energía para lograr tamaños de partícula a nivel de las micras o menores, de tal manera que la velocidad y el tiempo que permanezca en agitación determinan la formación de partículas y en consecuencia el encapsulamiento de carbofurano, en este caso.

Se ha reportado el efecto que tiene la velocidad de agitación sobre la formación de nano y micropartículas de quitosano tomando como variable de respuesta el tamaño de partícula, encontrándose una relación inversa entre el tamaño y la velocidad de agitación (Peniche *et al.*, 2003; Abdel *et al.*, 2014). En nuestro caso se tomó la EE como variable de respuesta (tabla 2.3) encontrándose un promedio global de EE de 41% con interesantes observaciones dentro de cada factor evaluado.

Tabla 2.3. Efecto del tiempo y la velocidad de agitación en la EE de carbofurano

		Velocidad de agitación, en rpm		
Tiempo de agitación, en min		1100	5000	10000
	15	44,2	38,7	30,5
	30	48,5	40,8	40,0
	60	46,6	40,5	38,0

El análisis de varianza de los resultados (tabla 2.4) muestra que existe un efecto significativo en los resultados de la velocidad de agitación, mientras que los del tiempo de agitación no mostraron diferencia estadística.

Tabla 2.4. ANOVA del efecto del tiempo y la velocidad de agitación en la obtención de MPC

Factor evaluado	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Tiempo	2.483	0.102	3.354
Velocidad	8.864	0.001	3.354
Interacción	0.464	0.762	2.728

Patel y colaboradores publicaron un trabajo en el cual hallaron reducción en el encapsulamiento de rifampicina, un antibiótico hidrofóbico usado en el tratamiento de infecciones bacterianas, atribuida a la posible difusión del compuesto hacia fuera de la matriz polimérica durante el proceso de encapsulamiento debido a la reducción de tamaño de las partículas causado por la alta velocidad de agitación (Patel *et al.*, 2013; Fan *et al.*, 2012). Un argumento similar podría explicar la baja EE del carbofurano a alta velocidad de agitación, pues su hidrofobicidad y facilidad para cristalizar en agua, aumentaría su velocidad de difusión en las partículas con tamaño muy pequeñas (que se obtienen a alta velocidad).

El ANOVA (tabla 2.4) muestra que no se halló efecto del tiempo de agitación en la EE de carbofurano ($p > 0.05$), infiriéndose la independencia del tiempo. Resultados similares se han encontrado en la determinación del tamaño de partícula evaluándolo a diferentes tiempos de agitación (Nair *et al.*, 2019).

Los valores p de la interacción (tabla 2.4) muestran que no hubo interacción entre los dos factores evaluados ($p > 0.05$), implicando una independencia de su efecto sobre el encapsulamiento.

Teniendo en cuenta que la velocidad de agitación con la que se produjo más EE de carbofurano fue a 1100 rpm y que, aunque los tiempos de agitación evaluados la EE son estadísticamente igual en todos, a 30 minutos se observan valores ligeramente superiores, por lo que se tomaron estas condiciones para obtener las MPC.

Las condiciones experimentales encontradas para la obtención de las MPC para ser usadas como FLC se encuentran en la tabla 2.5

Tabla 2.5. Condiciones experimentales finales para la obtención de la FLC

Parámetro evaluado	Condición experimental
pH del quitosano	3.0 a 6.5
pH sulfato	>3.0
pH carbofurano	4.0 a 6.0
pH global de la solución	4.0
Relación molar mínima de sulfato/quitosano	0.4
Relación molar mínima de quitosano/sulfato	2.5
Velocidad de agitación (rpm)	1100
Tiempo de agitación (min)	30

2.2.5 Caracterización del producto encapsulado de carbofurano.

La Figura 2.9 muestra los espectros FTIR de carbofurano, quitosano, sulfato, las partículas de quitosano vacías (sin carbofurano) y las micropartículas de quitosano con carbofurano encapsulado.

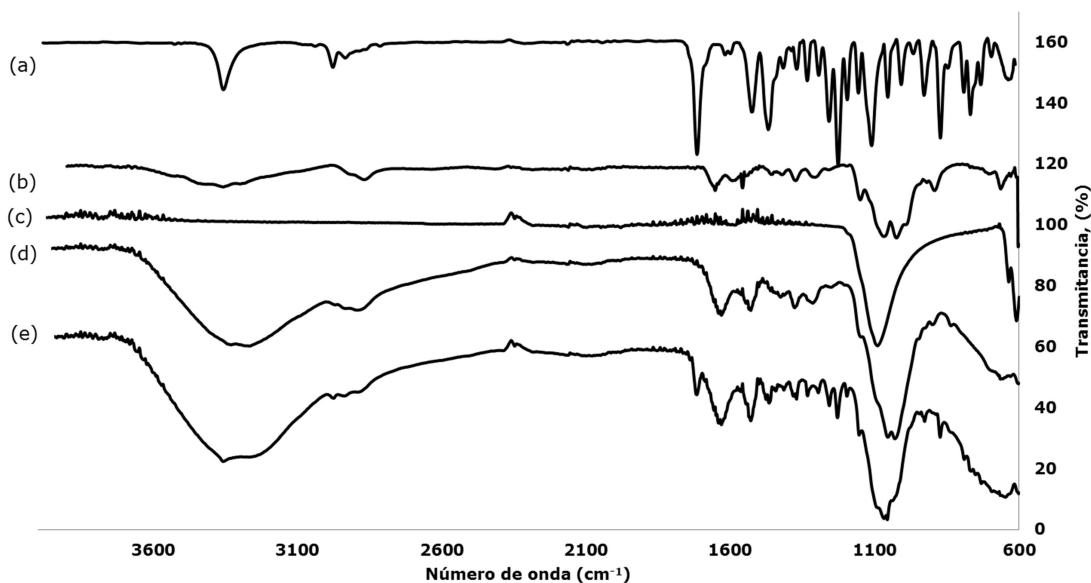


Figura 2.9. Espectros de infrarrojo de carbofurano (a), quitosano (b), sulfato (c), MPV (d) y MPC (e).

Las principales señales del carbofurano (figura 2.9a) en el espectro de IR se observan a 3352 cm^{-1} (estiramiento N-H), 2974 cm^{-1} (estiramiento C-H aromático), 2924 cm^{-1} (estiramiento C-H alifático), 1714 cm^{-1} (estiramiento C=O), 1683 cm^{-1} (estiramiento C=C), 1226 cm^{-1} (estiramiento C-O) y 1109 cm^{-1} (estiramiento C-N) (Atifi *et al.*, 2013; Shukla *et al.*, 1992). El quitosano (figura 2.9b) utilizado presentó las siguientes señales principales en el espectro de IR a 3406 cm^{-1} se presenta una banda ancha la cual tiene sobrepuestas las señales debidas al estiramiento O-H y al estiramiento N-H (NH_2), 2897 cm^{-1} y 2850 cm^{-1} estiramiento de los enlaces C-H, 1652 cm^{-1} (estiramiento C=O de la amida), 1589 cm^{-1} (doblamiento N-H (NH_2)), 1375 cm^{-1} (vibración C-H (CH_3)), 1564 cm^{-1} (doblamiento N-H de la amida), 1068 cm^{-1} (estiramiento C-O-C), 1026 cm^{-1} (vibración C-O), 885 cm^{-1} (doblamiento C-H del grupo CH_3COH), las cuales son coherentes con los espectros de IR en la literatura (Moitiei y Kashanian, 2017; Zou *et al.*, 2015; Brugnerotto *et al.*, 2001). El espectro de IR del sulfato de sodio (figura 2.9c) exhibe las siguientes bandas principales: a 1091 cm^{-1} (estiramiento simétrico del enlace S-O del Na_2SO_4), 609 cm^{-1} (estiramiento asimétrico del enlace S-O del Na_2SO_4) (Mayyas y Remawi, 2012). En

el caso de las micropartículas de quitosano vacías (figura 2.9d), es decir sin el plaguicida, se puede observar en el espectro que se encuentran presentes las principales bandas del quitosano: 3246 cm^{-1} (estiramiento OH), 2868 cm^{-1} y 2924 cm^{-1} (estiramiento C-H alifático), 1379 cm^{-1} (vibración C-H (CH_3)), 1029 cm^{-1} (vibración C-O-C), mientras hay algunas que sí sufrieron cambios.

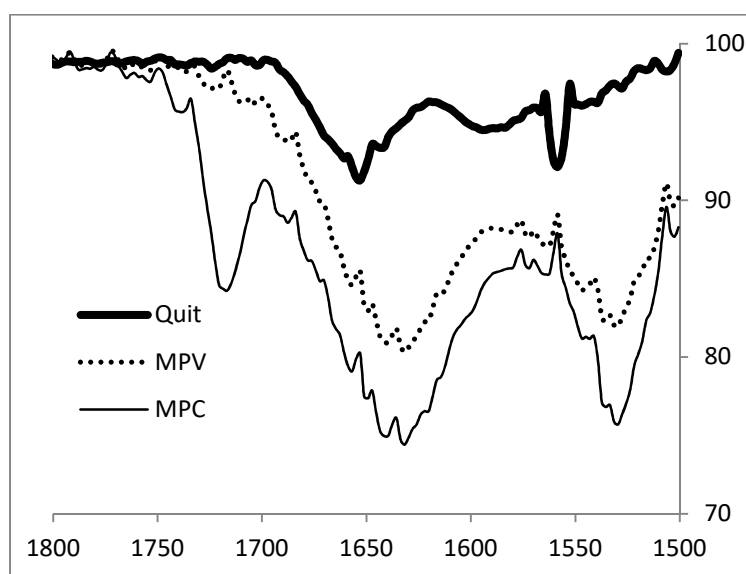


Figura 2.10. Ampliación en la zona de interacción entre el quitosano, sulfato y carbofurano en MPV y MP

Debido a que el quitosano sufre entrecruzamiento iónico entre la amina protonada y una especie aniónica, se debe buscar la evidencia de entrecruzamiento en la región del espectro de infrarrojo entre 1500 cm^{-1} y 1800 cm^{-1} , frecuencias donde aparece las vibraciones de la amina del quitosano (Mayyas y Remawi, 2012; Dimzon y Knepper, 2015). En la ampliación de la región de los espectros entre 1500 cm^{-1} y 1800 cm^{-1} (figura 2.10) se puede observar que la banda debido al estiramiento C=O (amida del quitosano) a 1652 cm^{-1} aparece en el espectro de las micropartículas vacías (a 1654 cm^{-1}) y en las micropartículas con carbofurano (a 1654 cm^{-1}) lo cual indica que la porción acetilada del quitosano no se ve afectada, mientras que la banda de la amina (N-H en el quitosano) a 1589 cm^{-1} (doblamiento N-H NH_2) se desplaza a una mayor frecuencia en los espectros de ambas micropartículas (vacías y con carbofurano); Mayyas y Remawi observaron este desplazamiento en la síntesis de nanopartículas de quitosano entrecruzado con sulfato de sodio, atribuyendo este desplazamiento de la banda del N-H a la interacción electrostática entre el ion sulfato con la amina del quitosano debido a que la restricción

del doblamiento del enlace N-H conlleva a un desplazamiento a mayores frecuencias de la banda, lo cual se toma como evidencia del entrecruzamiento del quitosano con el ion sulfato (Mayyas y Remawi, 2012). Además, en los dos espectros se observa la aparición de varias señales en la región entre 1527 cm^{-1} y 1541 cm^{-1} que no se encuentran en el espectro de quitosano; la aparición de estas bandas sugiere cambios estructurales derivados de la interacción iónica entre el quitosano y el entrecruzante (Antoniou *et al.*, 2015), en este caso, el sulfato. Adicionalmente, se observa, en el espectro de las micropartículas con carbofurano, la aparición de señales propias del plaguicida que no aparecen en el espectro de las micropartículas vacías, siendo las más relevantes 3358 cm^{-1} (estiramiento de N-H de la amina del carbofurano), 2976 cm^{-1} (estiramiento de C-H aromático) y 1714 cm^{-1} (estiramiento C=O) (ver figura 2.10). En general, los resultados del FTIR confirman la presencia de carbofurano atrapado en las micropartículas de quitosano.

Los resultados de la medición de la distribución de tamaño de partícula, por el método de DLS, se pueden ver en la tabla 2.6.

Tabla 2.6. Tamaño hidrodinámico de partícula de MPV y MPC

	MPV	MPC
Tamaño hidrodinámico de partícula (nm)	1127	1023
Índice de polidispersidad	0.381	0.427

El tamaño hidrodinámico promedio del diámetro de las partículas (d.nm) resultó ser estadísticamente iguales debido a su alta desviación, sin embargo, las MPC tuvieron un tamaño un poco menor que las MPV (1023 nm (0.427 IP) y 1127 nm (0.381 IP) respectivamente).

Esta alta polidispersidad en la distribución de los tamaños de partícula, se evidencia en valores desde 35 nm hasta 2416 nm para MPV y desde 93 nm hasta 1931 nm para MPC (ver figura 2.11.) en la repetición de las medidas.

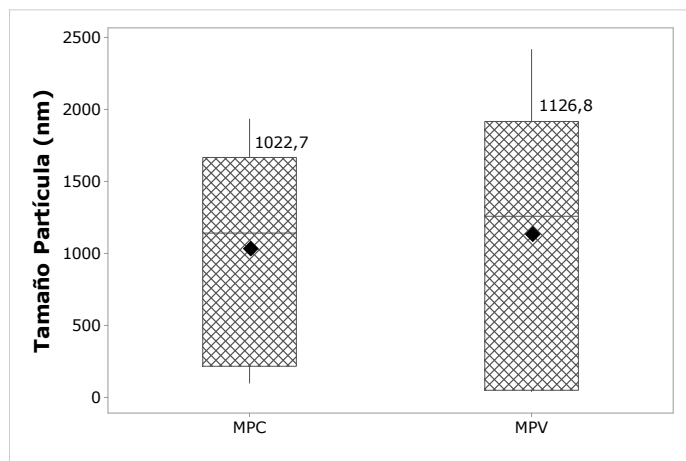


Figura 2.11. Distribución del tamaño del diámetro de partícula para MPV y MPC

Para entender la alta polidispersidad causada por la diversidad en los tamaños de partículas se debe tener en cuenta al potencial zeta (PZ) de este tipo de polielectrolitos, pues se encuentran estrechamente relacionados. Se han reportado valores de PZ de nano o micropartículas de quitosano entre 40 mV a 50mV debido al número de aminas protonadas disponibles que generan un estado catiónico (Yang *et al.*, 2018; Motiei y Kashanian, 2017; Dong *et al.*, 2013). Una vez se inicia el proceso de entrecruzamiento de las aminas ($-\text{NH}_3^+$) del quitosano con una especie aniónica, el PZ comienza a decrecer debido a la disminución de los grupos amino protonados libres; cuando se han neutralizado la mayoría de las aminas, el PZ cae a valores cercanos a cero; con cantidades adicionales de entrecruzante, la difusión de los aniones en la estructura de quitosano genera un exceso de carga negativa y, por lo tanto, valores negativos de PZ (Espinosa *et al.*, 2013). Con base en lo anterior, se puede deducir que los bajos valores obtenidos de PZ, en las MPV, indican un alto grado de entrecruzamiento del quitosano con el ion sulfato y, la incorporación de carbofurano (a pH 4 el nitrógeno de la amida del plaguicida se encuentra protonado) aumentaría la carga superficial, aumentando ligeramente el PZ para las MPC (figura 2.12). Teniendo esto en cuenta, en un polielectrolito altamente entrecruzado, con un valor de PZ bajo, no hay suficientes cargas superficiales para que haya repulsión, lo cual facilita la aglomeración de las partículas, y en consecuencia, el aumento del tamaño, conllevando a sistemas polidispersos; mientras que si existieran cargas superficiales, habría repulsión de las partículas disminuyendo la probabilidad de aglomeración de partículas, obteniéndose partículas con un menor tamaño, tal como sucedió con las MPC (Kumar *et al.* 2014; Yang *et al.* 2018).

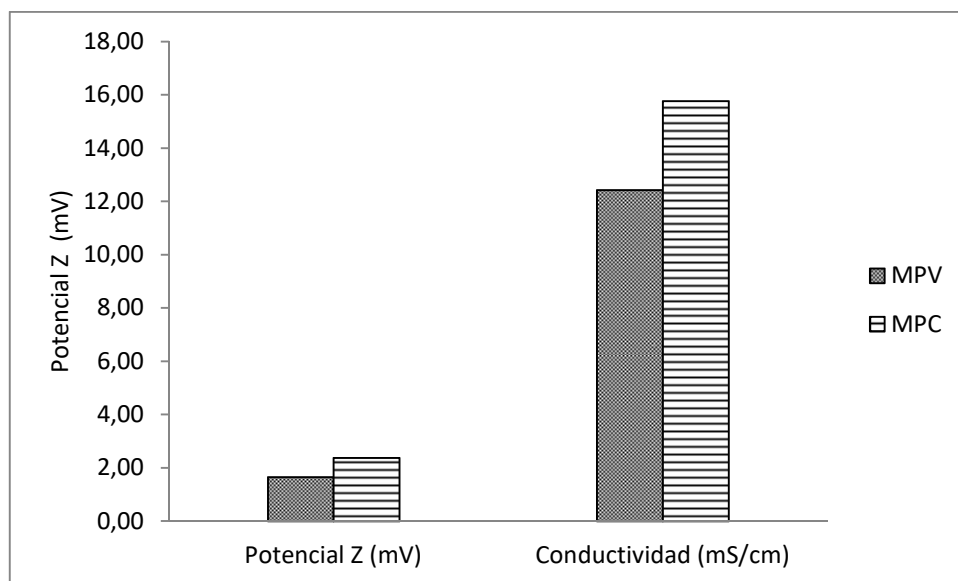


Figura 2.12. Potencial Z y conductividad para MPV y MPC

De acuerdo a la literatura, el PZ es el mejor indicativo de la estabilidad de las partículas en suspensión, entre menor sea el PZ menos probable es que la suspensión sea estable (Naskar *et al.*, 2019), lo que de alguna manera es conveniente en el caso de FLC con nematocidas encapsulados debido al ciclo de vida de los nemátodos, el cual es de 21 días, por lo que partículas muy estables no liberan el plaguicida en los tiempos requeridos para el control de la plaga.

La polidispersidad de las micropartículas se puede apreciar en las micrografías SEM que se observan en la figura 2.13. Es de anotar que las micrografías fueron tomadas en la muestra secada por liofilización. En términos generales se observa que la polidispersidad medida por DLSL se corrobora en las imágenes del SEM (ver figuras 2.13a y 2.13b). Cabe destacar que el tamaño de partícula medido por DLS es hidrodinámico, el cual puede dar tamaños más pequeños, que cuando se mide por SEM ya que el secado de las partículas puede generar agregación, como se puede observar en estas dos figura 2.14a, donde las partículas tienen tamaños desde aproximadamente 5 μm hasta por debajo de 1 μm ; además, también se observa que las partículas no tienen una geometría definida, sin embargo, parece que las MPC tienden a tener una geometría un poco más esférica que las MPV (figuras 2.13c y 2.13d).

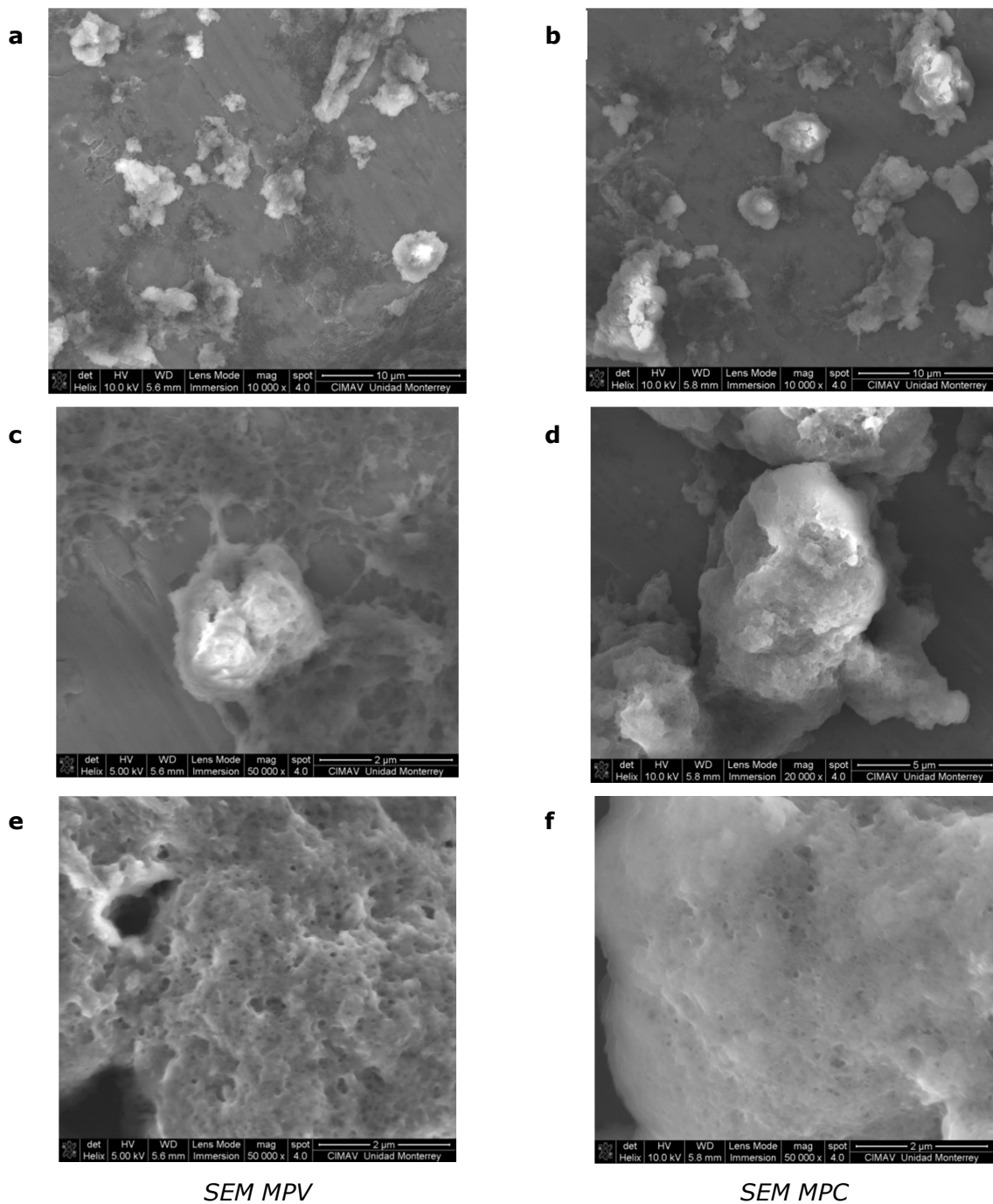


Figura 2.13. Micrografías de las micropátículas vacías y micropartículas con carbofurano

Las figuras 2.13e y 2.13f muestran las micropartículas con un poco más de detalle, donde se hace una interesante observación: la superficie de las MPV luce mucho más porosa que las MPC que son un poco más compactas y con una superficie un poco más suave. La porosidad de la superficie de las MPV puede permitir el paso de moléculas

hacia adentro y hacia afuera de la red por difusión, que es la base de las FLC (Lin y Metters, 2006; Neri y Chakraborty, 2019). El cambio en la estructura superficial de las MPC por efecto del carbofurano sugiere la existencia de interacciones del carbofurano con la estructura de las micropartículas generando partículas con una superficie más lisa y con menor tamaño de poro, lo cual representa una ventaja en el sistema de FLC por el efecto que puede tener en la liberación del plaguicida que será discutido en el siguiente capítulo.

El atrapamiento de carbofurano también se puede evidenciar por los estudios termogravimétricos realizados a las MPV y MPC, como se muestra en la figura 2.14 para

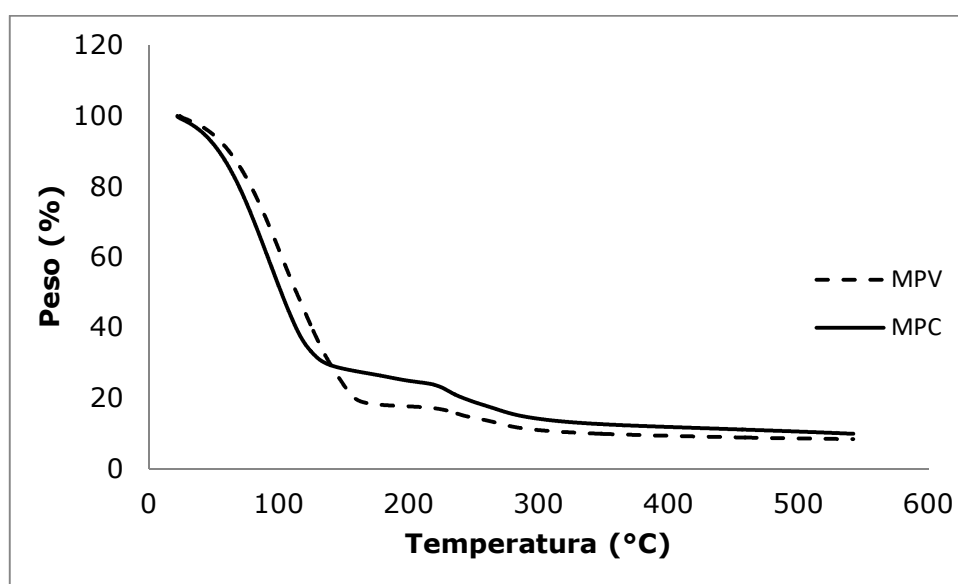


Figura 2.14. TGA de las MPV y MPC

micropartículas de quitosano vacías (MPV) y cargadas con carbofurano (MPC). Se puede observar en los termogramas que la pérdida de peso se da en dos y tres pasos, respectivamente, para los dos tipos de micropartículas. La curva para las MPV muestra una pérdida de masa del 82% en el rango de 27 y 190 ° C (con punto de inflexión en 140 °C), la cual se puede atribuir a la pérdida de la fracción volátil debida a la deshidratación y desaminación por los grupos -OH y -NH₂ del quitosano (Hosseini *et al.*, 2013). En segundo lugar, la pérdida de masa en el rango de temperatura de 210 a 300 °C corresponde a la escisión de los enlaces glicosídicos del quitosano (Bibi *et al.*, 2016). El termograma de TGA de las MPC muestra un comportamiento térmico con pérdida de masa del 79 %, a más baja temperatura (entre 27 °C y 150 °C) que puede

deberse a la presencia del plaguicida, ya que la temperatura de descomposición del carbofurano se inicia alrededor de 130 °C (Sikora, 1991). En ambos casos el residuo inorgánico de la descomposición térmica de las micropartículas es del 10% a 540 °C la cual corresponde a los residuos del sulfato del entrecruzante.

Los termogramas DSC (figura 2.15) muestran, para las MPV, un cambio energético importante en el rango de temperatura a la que ocurrió la deshidratación y desaminación del quitosano (entre 27 °C y 140 °C) con señal endotérmica a 104 °C, mientras que el DSC de las MPC muestran dos señales, una con un pico endotérmico a 104 °C y otro a 108 °C (Nair *et al.*, 2019), los cuales corresponden a la deshidratación del quitosano y a la descomposición del carbofurano que presenta su máxima señal a 130 °C, temperatura del cambio endotérmico del carbofurano y que corresponde a su punto de descomposición (Sikora, 1991).

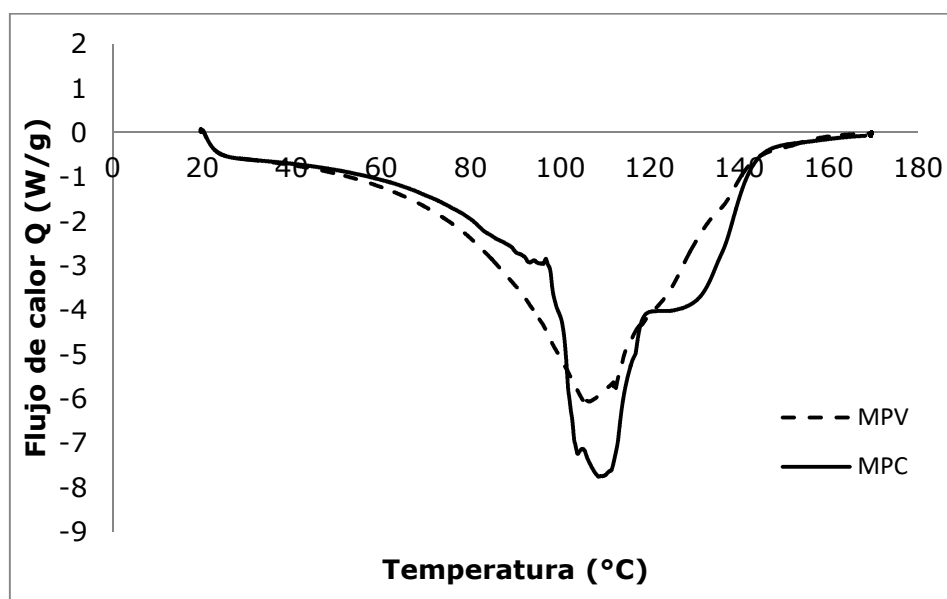


Figura 2.15. DSC de las MPV y MPC

2.2.6 Determinación de la EE y la CC del quitosano en función de la masa de carbofurano

Una vez caracterizadas las MPC y encontrando las evidencias necesarias del encapsulamiento de carbofurano en la matriz de quitosano, es necesario saber cuál es la capacidad que tiene una masa de quitosano para encapsular una cierta cantidad del plaguicida. Los resultados de este experimento se discutirá a continuación.

En aras de extrapolar los resultados obtenidos hasta ahora en el diseño de formulaciones, basadas en diferentes cantidades de carbofurano encapsulado, se evaluó la EE y la CC de una masa constante de quitosano (5 g) para encapsular el plaguicida en función de la masa de carbofurano. La figura 2.16 muestra la EE del quitosano en función del carbofurano adicionado en el momento de encapsular.

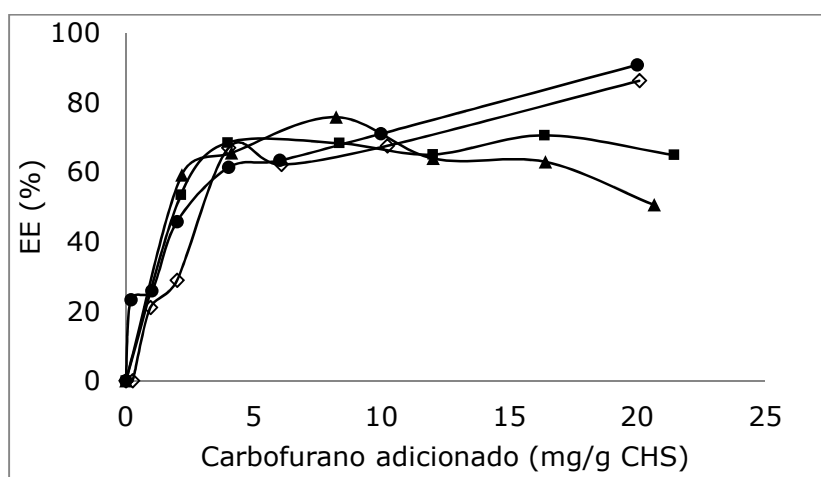


Figura 2.16. Capacidad de encapsulamiento del quitosano para encapsular carbofurano (mg CAB/g CHS), en términos de la EE. Cada línea corresponde a una réplica

Se observa que la EE de carbofurano aumenta, con una tendencia más o menos lineal, hasta la adición de 20 mg de carbofurano; a partir de este punto, la adición de más plaguicida no genera un aumento significativo de la EE y tiende a estabilizarse, obteniéndose una EE máxima promedio de 67%. Se esperaba que las cantidades más bajas de carbofurano se encapsularan completamente de carbofurano, dando valores de EE alrededor del 100 %, pues la masa de quitosano es alta comparada con la masa del plaguicida, 85 mg vs. 5 mg respectivamente, sin embargo, los resultados mostraron un efecto contrario, tal como se puede observar en los valores de la tabla 2.7. Esta baja EE del carbofurano podría deberse a la estructura porosa de las MPV observada por SEM (figura 2.13e), pues como se mencionó anteriormente, entre más porosa sea la estructura, más probable es la difusión de los compuestos atrapados en la red polimérica; así que parece que a estas cantidades bajas, el carbofurano sale fácilmente de la estructura del polímero. Dado que no se encontraron reportes de este tipo de curvas de encapsulamiento de carbofurano, no se tiene referencia de comparación de los resultados obtenidos. A concentraciones altas de carbofurano adicionado, las cantidades

de carbofurano encapsulado son altas, inclusive se obtuvieron cantidades de carbofurano cercanas al peso de quitosano, lo cual sugiere que el carbofurano quedó mezclado con el polímero, sin quedar necesariamente encapsulado, lo cual generó EE y CC altas. Probablemente a estas cantidades altas de carbofurano, la estructura se hace menos porosa (como la de la figura 2.13f) y, por lo tanto, con menor posibilidad de que el plaguicida salga de la red.

Tabla 2.7. Valores consolidados de EE y CC en función de la masa de carbofurano

Carbofurano adicionado, en mg	Carbofurano encapsulado, en mg	EE (%)	CC (%)
0,0	0,0	0,0	0,0
1,2	0,1	11,7	0,1
5,0	1,2	23,5	0,8
10,4	4,9	46,8	3,4
20,2	13,2	65,6	9,1
30,3	19,0	62,8	13,1
41,4	29,8	72,1	20,6
50,5	35,0	69,3	24,1
60,0	38,7	64,5	26,7
82,0	54,8	66,8	37,8
102,7	74,9	73,2	51,7

Los valores obtenidos de EE están en el mismo orden de magnitud de los que se encuentran publicados en los diferentes trabajos de encapsulamiento de carbofurano en diferentes matrices (diferentes al quitosano); se encuentran reportes de EE del 95% en FLC a base de alginato de sodio y bentonita (Fernández *et al.*, 2005), 94.2 % y 99.5 % en FLC a base de polímeros de polietilen glicol (Shakil *et al.*, 2010), 95.5 % en FLC a base de polietilenglicol y ácido poliláctico (Adaka *et al.*, 2015), todos ellos partiendo de una masa inicial entre 0.1 g a 0.3 g de carbofurano adicionado, la cual es considerablemente alta. En la figura 2.17 se pueden ver los espectros de infrarrojo para cada una de las formulaciones a diferentes cantidades de carbofurano adicionado; por debajo de 4 mg/g mg del plaguicida, las bandas propias del carbofurano no se observan fácilmente, posiblemente porque se encuentra dentro de la red del quitosano entrecruzado donde no es posible que lo alcance la radiación infrarroja y, en consecuencia, no hay absorción de radiación; por encima de 4 mg/g quitosano aparecen las señales características del carbofurano a 3340 cm^{-1} y 1740 cm^{-1} ; esta observación coincide con el valor de la inflexión de las curvas en la figura 2.14, donde a partir de 20

mg la EE se vuelve casi constante, de lo cual se podría concluir que el encapsulamiento se da por debajo de 4 mg/g quitosano.

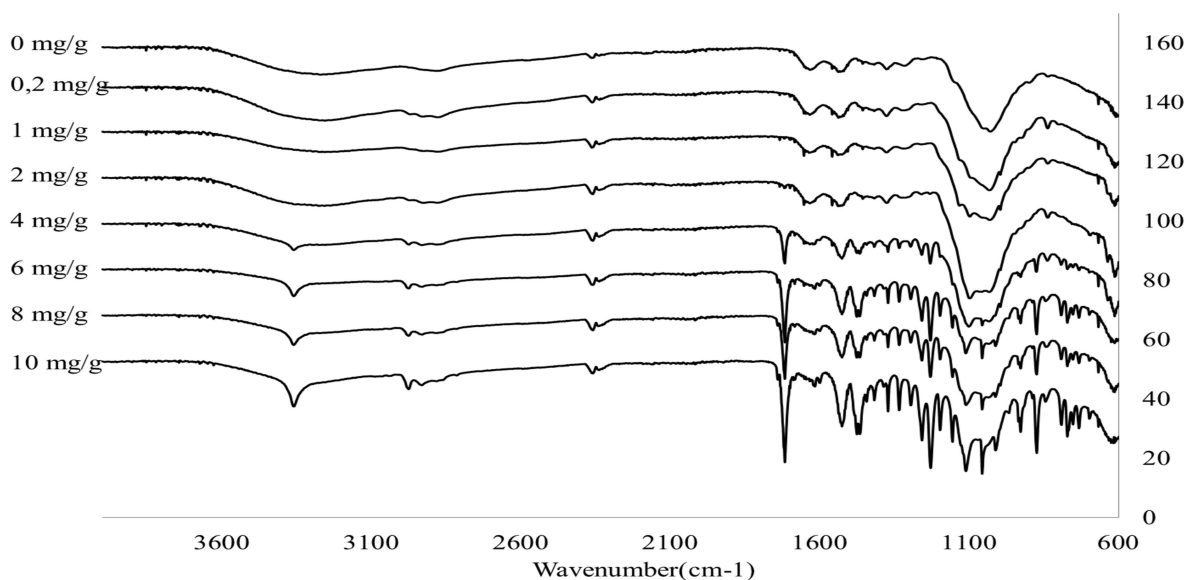


Figura 2.17. Espectros de infrarrojo de las diferentes FLC en relación con la masa de carbofurano en relación con la masa de quitosano

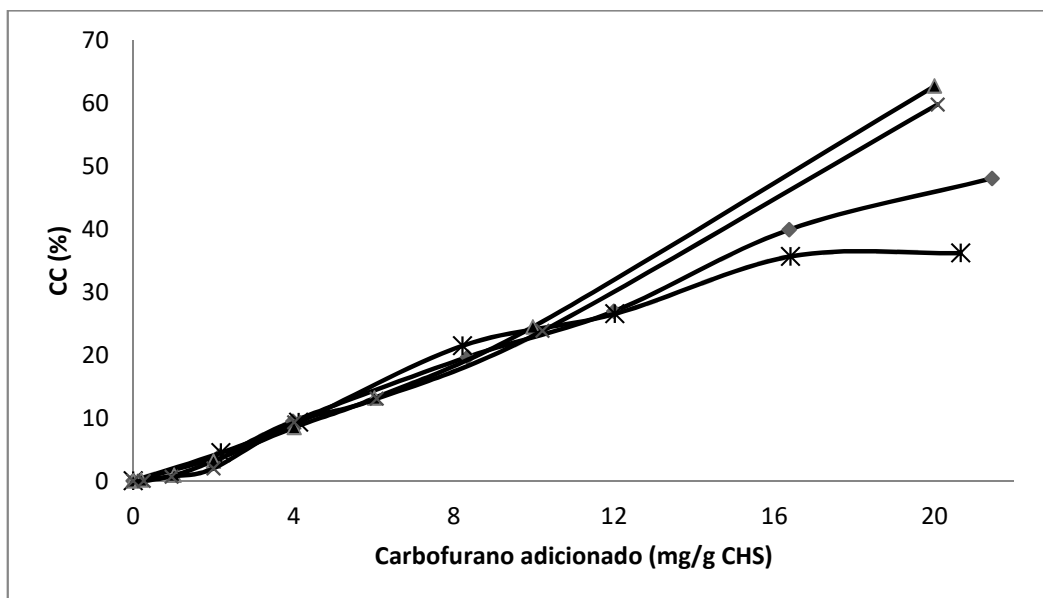


Figura 2.18. Capacidad de encapsulamiento del quitosano para encapsular carbofurano (mg CAB/g CHS), en términos de la EE. Cada línea corresponde a una réplica

La gráfica de la figura 2.18 ilustra el comportamiento de la capacidad de carga, CC en función de concentración de carbofurano en el quitosano (mg/g quitosano). Desde 0.2 mg/g se observa una tendencia lineal hasta 10 mg/g con buena reproducibilidad del experimento, sin embargo, a altas concentraciones, la gráfica muestra una alta desviación.

Con la porción de la gráfica de mayor precisión se pudo establecer una relación matemática empírica de regresión lineal (ecuación 2.3) que relaciona la masa de carbofurano adicionado vs. la masa de carbofurano encapsulado. Una relación de esta naturaleza brinda la posibilidad de calcular la cantidad de carbofurano que se requiere adicionar para que la FLC tenga una concentración deseada, siempre y cuando se encuentre dentro de los límites de precisión encontrados (hasta 10 mg/g de quitosano).

$$CE = 2.4862CA - 0.9708 \quad (\text{Ecuación 2.3})$$

Donde CE es la masa de carbofurano encapsulado (o esperado) y CA es la masa de carbofurano adicionado.

Evidentemente, dicha relación matemática se deberá validar en investigaciones posteriores donde se pueda determinar si ocurrió en este caso fortuito o es una relación que se pueda generalizar en este tipo de MPC. Con esta ecuación se pudo diseñar las formulaciones con las que se evaluó el efecto nematocida y que se discutirá en el capítulo IV.

2.3 CONCLUSIONES

El entrecruzamiento iónico de quitosano con sulfato permitió obtener micropartículas con capacidad máxima de 60% para encapsular carbofurano en su estructura, como una nueva formulación de liberación controlada del plaguicida.

En este proceso se evaluaron algunos factores y condiciones que afectan la reacción, permitiendo evidenciar el atrapamiento del plaguicida dentro de la red polimérica del quitosano bajo las siguientes condiciones: pH 4.0, Relación molar Sul/quitosano 2.5, velocidad de agitación 1100 rpm y tiempo de agitación 30 min, manteniendo constantes la masa de etanol y propilenglicol.

El potencial Z permitió evidenciar un alto nivel de entrecruzamiento, lo que garantiza la estabilidad de las micropartículas en sistemas coloidales.

Se determinó que la eficiencia de encapsulamiento del quitosano entrecruzado iónicamente con sulfato tiene como límite máximo un 68 % y una capacidad de carga del 37 %, lo cual permite encapsular cantidades pequeñas menores a 50 mg del plaguicida para ser usado como formulación de liberación controlada.

CAPÍTULO III Estudios de cinética de liberación y movilidad de carbofurano encapsulado en suelos

	Página
3.1	METODOLOGÍA 46
3.1.1	Recolección, secado y almacenamiento de los suelos 46
3.1.2	Caracterización físicoquímica de los suelos 46
3.1.3	Determinación de la cinética e isothermas de adsorción de carbofurano en los suelos 47
3.1.3.1	Determinación de la cinética de adsorción de carbofurano. 47
3.1.3.2	Determinación de las isothermas de adsorción de carbofurano 48
3.1.4	Método para la cuantificación de carbofurano en suelos 49
3.1.5	Preparación de la formulación de liberación controlada (FLC) 50
	Liberación de carbofurano desde la FLC en agua y a diferentes
3.1.6	pHs 50
3.1.7	Liberación de carbofurano desde la FLC en los suelos 51
3.1.8	Estudio de movilidad de carbofurano en suelos 52
3.1.8.1	Preparación de la columna de suelo 52
3.1.8.2	Experimentos en la columna 53
3.2	RESULTADOS Y DISCUSIÓN 54
3.2.1	Caracterización de los suelos 54
3.2.2	Adsorción de carbofurano en los suelos 56
3.2.3	Liberación de carbofurano de la FLC en agua y a diferentes pHs 58
3.2.4	Liberación de carbofurano de la FLC en los suelos 63
3.2.5	Movilidad de carbofurano en suelos: perfil de lixiviación 65
3.3	CONCLUSIONES 71

3.1 METODOLOGÍA

3.1.1 Recolección, secado y almacenamiento de los suelos

Se seleccionaron dos tipos de suelos de uso agrícola, uno proveniente de Santander de Quilichao, denominado ST, región del norte del Departamento del Cauca (3°6'39.24"N, 76°31'21.43"O) y otro procedente de Palmira, denotado como PAL, parte media del Departamento del Valle del Cauca (3°30'9.32"N, 76°21'18.17"O), ambas zonas con temperatura media de 23 grados centígrados y altura promedio 1001 m.s.n.m.

Se tomaron diferentes muestras de suelo disturbado para formar una muestra compuesta, mediante un muestreo aleatorio simple, dividiendo el terreno en grillas y tomando las muestras en zig-zag. De cada parte se tomó 1.0 Kg de suelo hasta completar 100 Kg, tomando los primeros 20 cm de la capa de arado, siguiendo el procedimiento descrito en la Norma Técnica Colombiana NTC 3656 [ICONTEC, 2004]

Las muestras recolectadas se trasladaron en bolsas de polipropileno para su preparación. El suelo de ST se disgregó manualmente y se dejó secar a temperatura ambiente, hasta alcanzar la humedad de equilibrio (una semana). El suelo PAL se dejó secar a temperatura ambiente, hasta alcanzar la humedad de equilibrio (una semana) y se redujo su tamaño de muestra y, posteriormente, ambos suelos, se tamizaron a través de un tamiz N°10 con apertura de 2 mm A.S.T.M.E.-11, y fueron almacenadas en toneles plásticos, para evitar su humificación, y poder ser usados en experimentos posteriores.

3.1.2 Caracterización fisicoquímica de los suelos

Todos los parámetros de caracterización del suelo se realizaron en laboratorios externos, excepto la humedad. La caracterización fisicoquímica se desarrolló en el Laboratorio de Servicios Analíticos del Centro Internacional de Agricultura Tropical, CIAT, la clasificación textural en el Centro de Investigación de la Caña de Azúcar, Cenicaña, y la humedad se realizó en nuestro Laboratorio.

La determinación de la humedad se realizó por el método de secado en horno siguiendo el procedimiento de la norma NTC 1495 [ICONTEC, 2013].

En la determinación de los parámetros más relevantes realizados por el CIAT se siguieron los siguientes métodos: el pH se determinó por potenciometría: se toma una masa suficiente de muestra para preparar una dispersión suelo:agua 1:1, se deja en reposo

por dos horas, al cabo del cual se toma las medidas de pH usando un pH-metro. El contenido de carbono orgánico se determinó por el método de Walkley Black, para ello se toma una masa de muestra de 0,03 g, se adiciona 20 mL de ácido sulfúrico concentrado y 15 mL de una solución de dicromato de potasio 1,0 N, se deja en reposo por espacio de dos horas, para después valorarse el exceso de dicromato con una solución de sulfato ferroso amoniacal 1,0 N. La materia orgánica se determinó por el método de la combustión, para lo cual $2,0 \text{ g} \pm 0,0001 \text{ g}$ se someten a calcinación en una mufla a 650°C por espacio de dos horas y hasta peso constante [NTC 5167].

3.1.3 Determinación de la cinética e isothermas de adsorción de carbofurano en los suelos

3.1.3.1 Determinación de la cinética de adsorción de carbofurano

La adsorción de carbofurano en los dos tipos de suelos preparados en el numeral 3.2.2, se llevó a cabo mediante el procedimiento descrito por Bermúdez *et al.*, con ligeras modificaciones [Bermúdez *et al.*, 2011]. A porciones de $2,0000 \text{ g} \pm 0,0001 \text{ g}$ de suelo se adicionaron 10,00 mL de solución de carbofurano a 5 ppm, preparada en CaCl_2 0,01 M, se sellaron con papel parafilm™ y se colocaron diferentes tiempos (2, 4, 6, 8, 10, 24, 48, 54, 62 y 72 h) en un agitador horizontal (Mazine Agitator TA-09E) a 180 rpm. Finalizado el tiempo de incubación, las suspensiones se centrifugaron a 3500 rpm durante 10 min (Centrifuga Dinámica Indulab C-04), y el sobrenadante se filtró ($0,45 \mu\text{m}$) para su posterior análisis por HPLC-UV siguiendo las condiciones cromatográficas descritas en el numeral 2.2.2 del capítulo II.

La cantidad de plaguicida adsorbida por masa de suelo, denotada por q , en ppm ($\mu\text{g/g}$), se calculó mediante la ecuación 3.1, con la cual se construyó una gráfica de q vs. t para los dos sistemas en estudio:

$$q = \frac{[C_0 - C_{aq,t}]V_0}{m_{\text{suelo}}} \quad (\text{Ecuación 3.1})$$

Donde, C_0 es la concentración inicial de la solución, en ppm (mg/L), $C_{aq,t}$ es la concentración de carbofurano en la fase acuosa al tiempo t , en ppm (mg/L), V_0 es el volumen de la fase acuosa, en mL, y m_{suelo} es la masa del suelo, en g.

Los resultados de las curvas cinéticas para determinar el tiempo de equilibrio se ajustaron a modelos cinéticos de pseudo primer orden (PPO) y pseudo segundo orden (PSO) reportados en la literatura en estudios de adsorción de contaminantes sobre diferentes sólidos [Liu y Liu, 2008]. Dichas ecuaciones se diferencian de las ecuaciones convencionales de primer y segundo orden en que no están expresadas en función de la concentración de un producto o reactivo, si no que están relacionadas con la capacidad de adsorción del adsorbente, y no incluyen los parámetros establecidos en las ecuaciones cinéticas convencionales, además, el ajuste al modelo de PSO asume que la tasa de carga del adsorbente es debida a los sitios disponibles en la superficie [Tan y Hameed, 2017]. A continuación se muestran las ecuaciones de los modelos de PPO y PSO ecuaciones 3.2 y 3.3, respectivamente:

$$q = q_e[1 - e^{-k_1 t}] \quad (\text{Ecuación 3.2})$$

Donde q_e es la cantidad de plaguicida adsorbida por masa de suelo en el equilibrio ($\mu\text{g/g}$) a un tiempo t , y k_1 es la constante de velocidad. El ajuste se realizó utilizando la función de ajuste no lineal [Tan y Hameed, 2017]

$$\frac{t}{q} = \frac{1}{k_2 q_e^2} + \frac{t}{q_e} \quad (\text{Ecuación 3.3})$$

Donde q es la cantidad de plaguicida adsorbida por masa ($\mu\text{g/g}$) en el tiempo t , q_e es la cantidad de plaguicida adsorbida por masa de suelo en el equilibrio ($\mu\text{g/g}$) a un tiempo t y k_2 es la constante de velocidad de pseudosegundo orden.

3.1.3.2 Determinación de las isotermas de adsorción de carbofurano

La determinación de las isotermas de adsorción de carbofurano en los suelos se llevó a cabo mediante el procedimiento descrito por Singh y Srivastava, con ligeras modificaciones [Singh y Srivastava, 2009]. Porciones de (2 ± 0.0001) g de suelo se mezclaron con soluciones de carbofurano entre 0.5 y 25.0 ppm (mg/L) preparadas en CaCl_2 0.01 M. Una vez las suspensiones han alcanzado el tiempo de equilibrio (determinado en el numeral 3.2.7.1), se centrifugaron a 3500 rpm por 10 min, y el sobrenadante se filtró ($0.45 \mu\text{m}$) para su posterior análisis por HPLC-UV. Estos experimentos fueron realizados por duplicado.

Con base en la literatura, los datos se ajustaron a los modelos de adsorción de Langmuir (ecuación 3.4) y Freundlich (ecuación 3.5) [Bermúdez *et al.*, 2011]. Las ecuaciones 3.6 y 3.7 presentan las formas linealizadas de estas isotermas.

$$q = \frac{Q_0 b C_e}{1 + Q_0 C_e} \quad (\text{Ecuación 3.4})$$

$$q = K_F C^{1/n} \quad (\text{Ecuación 3.5})$$

$$\frac{C_e}{q_e} = \frac{1}{b Q_0} + \frac{C_e}{Q_0} \quad (\text{Ecuación 3.6})$$

$$\log q_e = \log K_F + \frac{1}{n} \log C_e \quad (\text{Ecuación 3.7})$$

$$K_d = \frac{q_e}{C_e} \quad (\text{Ecuación 3.8})$$

$$K_{OM} = \frac{100 K_d}{\% MO} \quad (\text{Ecuación 3.9})$$

$$K_{OC} = 1.724 K_{OM} \quad (\text{Ecuación 3.10})$$

En donde, b , es la constante de Langmuir, Q_0 , es la capacidad máxima de adsorción, K_F (mL/g) es la constante de Freundlich y, n , es un estimativo de la heterogeneidad de los sitios de adsorción. Con estas relaciones matemáticas se obtuvieron los parámetros experimentales asociados al proceso de adsorción, los cuales fueron K_d (mL/g) coeficiente de distribución de la adsorción (ecuación 3.8), K_{OM} (mL/g) es el coeficiente de distribución del plaguicida en el suelo normalizado por contenido de materia orgánica (ecuación 3.9), y K_{OC} (mL/g) es el coeficiente de distribución normalizado por contenido de carbono orgánico (ecuación 3.10)

3.1.4 Método para la cuantificación de carbofurano en suelos.

La extracción del carbofurano en suelos se basó en el procedimiento descrito por Fernández *et al.*, [Fernández *et al.*, 2005], que consiste en una extracción asistida por baño de ultrasonido: se tomaron 5 g de suelo y se adicionaron 5.0 mL de una mezcla metanol-agua (70-30) y se agitaron en vortex por un minuto. Luego, la solución se

sometió por 10 minutos a ultrasonido, seguido de 10 minutos de centrifugación a 3500 rpm. El sobrenadante se filtró (nylon de 0,45 μm) y se llevó a 25 mL de volumen con metanol-agua (70-30) para ser cuantificado por HPLC, siguiendo el método y las condiciones cromatográficas descritas en el numeral 2.2.2 del capítulo II.

3.1.5 Preparación de la formulación de liberación controlada (FLC)

La nueva formulación de carbofurano encapsulado en micropartículas de quitosano se preparó de acuerdo al procedimiento descrito en el numeral 2.2.2 del capítulo II. Se prepararon pastillas de FLC cuyos contenidos de carbofurano promedio para los experimentos de liberación en agua fueron de 10.70 mg (desviación estándar, $s = 0.45$) y para los experimentos de liberación en suelos de 5.90 mg ($s=0.64$). Para los experimentos de lixiviación se prepararon pastillas con un contenido de carbofurano de 20.00 mg ($s=0.85$).

3.1.6 Liberación de carbofurano desde la FLC en agua y a diferentes pH

El perfil de liberación de carbofurano en agua, desde la FLC, se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Shakil *et al.*, con ligeras modificaciones, tomándose el término de liberación como indicador de la cantidad de IA que se registra a ciertos intervalos de tiempo [Shakil *et al.*, 2010]. Se pesó 0,1 g de la FLC (descrita en el numeral 3.2.6, la cual contenía, en promedio, 10,7 mg de carbofurano ($s = 0,45$) y se envolvió en una pequeña bolsa de nylon (de aproximadamente 4 cm^2), la cual se introdujo en matraz cónico, con tapón, en 250 mL de agua desionizada a temperatura ambiente (25 °C aproximadamente). La bolsa con la FLC se suspendió en el agua teniendo cuidado de estar en la mitad del volumen del líquido. En el primer momento que la FLC se introduce en el agua, se extrae una alícuota de 2 ml y se analiza el carbofurano disuelto por HPLC (numeral 2.2.2, capítulo II), a este se le denominó tiempo cero (t_0). Se determinó carbofurano por HPLC en alícuotas de 2 mL de la muestra tomadas a diferentes intervalos de tiempo (4, 8, 12, 18, 24 y 36 h). Se tuvo en cuenta que cada vez que se extraía una alícuota de la muestra, se restituía con el mismo volumen de agua desionizada, con el fin de mantener el volumen constante y las condiciones insaturadas [Xu *et al.*, 2016]. Simultáneamente se montó el mismo experimento, pero en lugar de la FLC se usó materia prima de carbofurano libre (CAB-L).

Se utilizó el modelo semiempírico de Korsmeyer y Peppas para el cálculo de los coeficientes de difusión de la liberación de carbofurano en agua a partir de la FLC,

mediante una relación simple de liberación en función exponencial con el tiempo (ecuación 3.11). Este modelo se aplica para matrices poliméricas porosas que experimentan hinchamiento con agua, basándose en la segunda ley de difusión de Fick [Costa y Sousa, 2001; Korsmeyer *et al.*, 1983].

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \quad (3.11)$$

Donde M_t/M_∞ corresponde a la fracción del carbofurano liberado en el tiempo t , k es una constante que incorpora características estructurales y geométricas de la cápsula y el IA, y n es el exponente de liberación, que indica el mecanismo de liberación del plaguicida.

Dichos coeficientes se obtuvieron mediante la linealización de la ecuación 3.12:

$$\ln\left(\frac{M_t}{M_\infty}\right) = \ln k + n \ln t \quad (3.12)$$

El procedimiento descrito anteriormente se utilizó para determinar los mismos coeficientes a diferentes pHs, para lo cual sólo se modificó la solución de liberación. En lugar de agua se preparó una solución tampón (pH 4 y 8) de fosfato, debido a que los suelos que se evaluaron se encuentran en estos pHs. En todos los casos, el volumen total de la solución se mantuvo constante.

3.1.7 Liberación de carbofurano desde la FLC en los suelos

El perfil de liberación de carbofurano en suelos, desde la FLC, se realizó adaptando el procedimiento descrito por Kumar *et al.*, al plaguicida que se trabajó [Kumar *et al.*, 2010]. Se utilizaron los suelos preparados en el numeral 3.2.2 y caracterizados en el numeral 3.2.3.

Se prepararon 10 tabletas de la FLC (numeral 3.2.6), las cuales contenían 5.9 mg de carbofurano ($s = 0.64$) y se dispusieron en pequeñas bolsas hechas con pedazos de nylon de 4 cm². Paralelamente, se prepararon, en bolsas de nylon, 10 muestras que contenían 6.0 mg de CAB-L. En vasos de 5 mL (10 vasos para la FLC y los otros 10 para CAB-L) se pesaron 5,0 g $\pm$ 0,0001 g de suelo (rotulados aleatoriamente del 1 al 20), y se les adicionó suficiente volumen de agua para garantizar una humedad del 40% en cada uno de ellos. Se colocaron cada una de las bolsas en cada vaso con el suelo, asegurándose que quedara en el centro del volumen de la muestra (aproximadamente

1.5 cm de profundidad). El vaso se pesaba cada tres días y se añadió agua cuando fue necesario para mantener el mismo nivel de humedad; posteriormente, los vasos se cubrieron con papel parafil™ y se perforaron con el fin de asegurar el intercambio de aire a temperatura ambiente, y así, se mantuvo durante todo el experimento. A las 12 h (0,5 días) se tomó el primero de los vasos, se retiró la bolsa con la muestra y se cuantificó el carbofurano en el suelo mediante el método (HPLC) descrito en el numeral 3.2.5. Posteriormente, se fue tomando cada vaso a cada tiempo planeado (0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 12 y 14 días); se determinó el contenido de carbofurano en el suelo por HPLC, como se describió anteriormente. Este procedimiento se realizó por duplicado para los dos tipos de suelos.

Se aplicaron las ecuaciones descritas en el numeral 3.2.7 para el cálculo de los coeficientes de difusión y la descripción de la velocidad de liberación [Kumar *et al.*, 2010]

3.1.8 Estudio de movilidad de carbofurano en suelos

Una vez el carbofurano ha salido de la matriz de la FLC y se encuentra en el suelo, una parte de él actuará sobre la plaga objetivo (*nemátodos* que se discutirá en el siguiente capítulo), el restante quedará en el suelo donde se moverá. En este numeral se discutirá su movilidad en los dos tipos de suelos que fueron seleccionados. La movilidad se determinó mediante el perfil de lixiviación, por el método de columna que se describe a continuación.

3.1.8.1 Preparación de la columna de suelo

El perfil de lixiviación del carbofurano liberado de la FLC se llevó a cabo mediante el método de lixiviación en columna de acuerdo a la metodología de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE). Se utilizaron columnas de PVC (5 cm id, 40 cm de longitud) seccionadas cada 10 cm (figura 1). Se colocó filtro de fibra de vidrio en las partes inferior y superior de la columna (con el fin de evitar la alteración del suelo durante la infiltración, facilitando la distribución de agua en la superficie homogéneamente) y en cada una de las secciones de 10 cm, asegurándose de que no existiera filtración ni pérdida de material cuando el experimento estuviese corriendo. Se llenó la columna con cada uno de los suelos (preparados en el numeral 3.2.2 y caracterizados en el numeral 3.2.3), mediante adiciones sucesivas de capa de suelo con vibración constante para que el empaquetamiento fuera homogéneo y se tuviera una densidad aparente uniforme cada 10 cm de altura. Los experimentos se llevaron a cabo a

temperatura ambiente (en promedio 26 °C) y por triplicado (OECD/OCDE 312, 2004; Peña *et al.*, 2011; Rodríguez-Liébana *et al.*, 2014b)

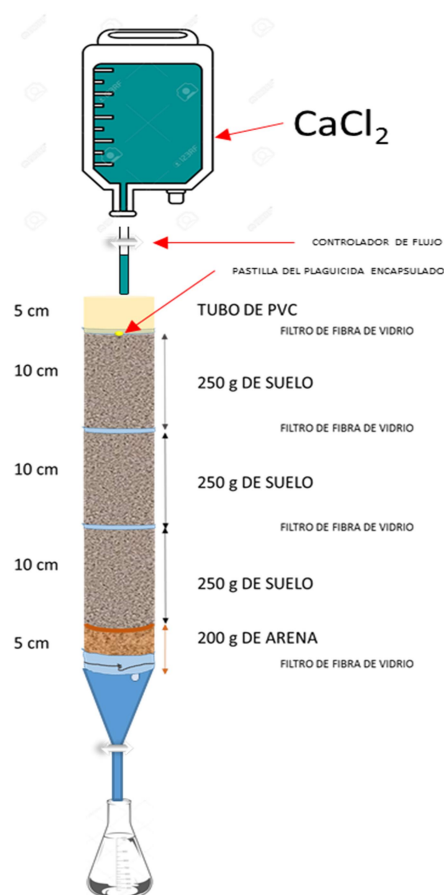


Figura 3.1. Columna de lixiviación usada para el estudio de movilidad de carbofurano a través del suelo

3.1.8.2 Experimentos en la columna

El primer paso fue la hidratación del suelo con solución de CaCl_2 0,01 M (simulando agua de lluvia) con el fin de saturar todos los poros del suelo para que el flujo de la solución lixivianante sea constante durante todo el experimento. Para esto, se dejó la columna con los suelos en un platón con la solución de CaCl_2 subiera lentamente por la columna por capilaridad; de esta forma se garantiza que el aire que se encontraba en los poros del suelo sea desplazada por la solución [OECD/OCDE 312, 2004]. Una vez se alcanzó el equilibrio, el exceso de agua se drenó por gravedad durante la noche, con el propósito de que la humedad final del suelo en la columna estuviera cerca de la del suelo en el campo. El volumen de poros (PV) de las columnas empaquetadas se estimó por la diferencia de peso entre las columnas saturadas de agua y las columnas secadas al horno.

La pastilla de la FLC fue colocada en la parte superior de la columna para dar inicio al drenaje de 400 mL de solución de CaCl_2 de manera continua por goteo. La lixiviación se realizó a un caudal entre 0.1-0.2 mL/min. Las fracciones de lixiviados (54 mL diarios) fueron colectadas, filtradas (0.45 μm) y analizadas por HPLC-UV (numeral 2.2.2 Cap II). A las muestras de suelo que fueron tomadas en cada segmento (1 g) se les determinó el carbofurano mediante el procedimiento descrito en el numeral 3.2.5.

Cada experimento se llevó a cabo por triplicado, incluyendo un control con CAB-L y un control sin plaguicida (sólo solución de CaCl_2).

3.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.2.1 Caracterización de los suelos

En general, los suelos del Valle Geográfico del río Cauca son de tipo latósiles y Monisoles, sometidos a quemas y requemas por lo que han perdido parte de su contenido de materia orgánica. En particular, los suelos provenientes de Santander de Quilichao son ácidos, con toxicidad en aluminio y baja disponibilidad de fósforo y se clasifican dentro del orden de los inceptisoles o sea suelos jóvenes [Malagón, 2003], un poco menos jóvenes que los entisoles y con un desarrollo incipiente de horizontes (capas de suelo). No presentan acumulación de materia orgánica, hierro o arcilla. Los inceptisoles son uno de los tipos de suelo más abundantes en las zonas de aluviones. Los suelos procedentes de Palmira son del orden de los vertisoles, estos son suelos donde hay un alto contenido de minerales de arcilla expansiva, entre ellos muchas montmorillonitas, que forman profundas grietas en las estaciones secas. Las expansiones y contracciones debido a las arcillas generan que el suelo se mezcle consistentemente entre sí, causando muchos vertisoles con un horizonte A (capa orgánica del suelo) extremadamente profundo [Sposito, 2008].

El comportamiento de plaguicidas en este tipo de suelos depende de dos factores principales: 1) Los fenómenos físicos, químicos y biológicos que ocurren en ellos y 2) las características físico-químicas de los plaguicidas; ambas propiedades fijan procesos como adsorción-desorción, volatilización, degradación, lixiviación y escorrentía, los cuales influyen directa o indirectamente en su movilidad y transporte [Arias *et al.*, 2008].

Tabla 3.1 Características físico-químicas y texturales de los suelos de estudio

Parámetro	Suelo PAL	Suelo ST
pH	7.67	4.30
Materia Orgánica (%)	2.41	4.17
Carbono orgánico (%)	1.40	2.42
Humedad (%)	4.51	4.74
Aluminio intercambiable (cmol/Kg)	N.D.	4.58
CIC (cmol/Kg)	27.7	14.2
Arcilla (%)	50.8	64.8
Arena (%)	12.6	22.6
Limo (%)	36.6	12.6
Textura	Arcilloso	Arcilloso
Porosidad (%)	38	43

CIC = Capacidad de Intercambio Catiónico, N.D.=No detectable, PAL=Palmira, ST=Santander de Quilichao

La tabla 3.1 muestra los resultados de la caracterización físico-química de los suelos usados en la investigación. Una primera observación es la composición de la textura de los dos tipos de suelos; a pesar que ambos materiales son de tipo arcilloso, las diferencias en los contenidos de arena y limo hace que el comportamiento del drenaje de agua sea diferente, drenando con mayor facilidad el suelo de ST; lo cual es predecible ya que la suma de arcilla y limo en el suelo de ST (77.4 %) es menor, con mayor contenido de arena, que el suelo de PAL (87.4 %), pues su límite de plasticidad es menor, y en consecuencia la porosidad se hace un poco mayor y esto hace que el agua fluya mejor [Rucks *et al.*, 2004], afectando la movilidad del carbofurano en el suelo.

Ambos suelos presentan una diferencia importante del valor de pH. Como se discutió en el numeral 2.3.2 del capítulo II, el pH afecta la estructura de carbofurano, así como su hidrólisis a pHs por encima de 6.5 [Eisler, 1985; Evert, 2002], por lo tanto, se podría predecir que el comportamiento del plaguicida sea un poco diferente en ambos suelos; su estructura se ve más afectada en el suelo de PAL que en el de ST y, en consecuencia, los procesos de adsorción, movilidad y su efectividad también se ven afectados [Singh y Srivastava, 2009].

A pesar de que el suelo de ST presenta mayor concentración de arcilla y materia orgánica su valor de la CIC es más bajo; el menor valor del pH de este suelo hace que las cargas negativas inducidas superficiales disminuyan, por efecto de protonación de los hidroxilos

de la arcilla, y en consecuencia la CIC sea menor, mientras que en el suelo de PAL el mayor valor de pH estimula la carga negativa inducida por desprotonación de los grupos HO^- , favoreciendo la estabilidad del anión $(\text{Si}_2\text{O}_5)^{n-}$ de este tipo de silicatos y por ende la carga negativa de las partículas, así la CIC se vuelve mayor [Gillman, 1981; Castaing, 1998]. En consecuencia, se podría decir que parte de las diferencias encontradas en la liberación de carbofurano desde la FLC y en la lixiviación de los dos suelos, se deben a estas características.

3.2.2 Adsorción de carbofurano en los suelos

La retención es un proceso físico, sin cambio en la naturaleza química de la molécula, en el que se produce una acumulación del plaguicida en la superficie o en el interior de las partículas del suelo. Este proceso se denomina sorción, e incluye a los procesos de absorción, entrada del plaguicida a la matriz del suelo, y adsorción, unión del plaguicida a las partículas de suelo. La descripción del proceso de transferencia de una sustancia desde la fase líquida (agua) a la fase sólida (suelo) se realiza mediante isothermas de retención, mientras que los estudios cinéticos para procesos de adsorción permiten dilucidar el comportamiento del sistema y su forma de alcanzar el estado de equilibrio [Sposito, 2008].

Inicialmente se ajustaron los datos experimentales a dos modelos cinéticos regularmente empleados en procesos de adsorción: modelo de pseudoprimer orden (PPO) y pseudosegundo orden (PSO); la linealización planteada para el modelo PPO (regresión no lineal) proporcionó estimaciones precisas, y puede usarse con mayor grado de precisión que otros ajustes lineales reportados en la literatura para este modelo (El-Khaiary *et al.*, 2010). La Tabla 3.2 resume los parámetros obtenidos tras el ajuste de los datos a los modelos de PPO y PSO para la cinética de adsorción en los suelos.

Tabla 3.2. Parámetros cinéticos para la adsorción de carbofurano en los suelos

Modelo	Parámetro	Suelo	
		PAL	ST
Pseudo primer orden	k_1	0.278	0.060
	$q_e (\mu\text{g g}^{-1})$	5.045	3.052
	R^2	0.714	0.476
Pseudo segundo orden	k_2	0.036	0.009
	$q_e (\mu\text{g g}^{-1})$	5.798	3.933
	R^2	0.988	0.439

Como se puede ver en la tabla 3.2, ninguno de los suelos de estudio presentó buenos coeficientes de correlación para el modelo cinético de PPO. En el caso del suelo de PAL se obtuvo buena correlación para el modelo de PSO, lo cual determina el modelo de adsorción del carbofurano en un suelo con esas características, y eso explica por qué el valor predicho por el modelo para la capacidad de adsorción q_e fue muy cercano al valor experimental obtenido. Con el ajuste al modelo del PSO se deduce que existen numerosos sitios activos para la adsorción en la superficie del suelo y, que la ocupación de los mismos se da por reacciones superficiales relacionadas a procesos de quimisorción [Vithanage *et al.*, 2016]. El suelo de ST es más heterogéneo que el suelo de PAL, con partículas más gruesas, que pueden deberse a su mayor contenido de arena, pudiendo ser una causa para la poca correlación en el ajuste de los modelos cinéticos, pues la heterogeneidad en los sitios de adsorción constituye una limitante que afecta la velocidad de los procesos de adsorción [Kumar *et al.*, 2006]. Estos resultados corroboran la premisa de que la textura y las propiedades físicas de los suelos juegan un papel importante en la adsorción de compuestos orgánicos, pues dichos procesos están determinados en gran medida por las interacciones superficiales existentes entre el adsorbato y el adsorbente [Tan y Hameed, 2017].

La capacidad de retención del carbofurano en los suelos puede ser descrita por medio de isotermas de adsorción y es el parámetro del cual depende el fenómeno de lixiviación [Liu y Liu, 2008]. Los modelos que tienen mayor aceptación para la determinación del equilibrio de adsorción en sólidos son el de Langmuir y el de Freundlich [Chamorro y Sánchez, 2012], el ajuste de la linealización de las isotermas nos da información sobre el tipo de adsorción que se presentó en el suelo en contacto con el carbofurano. La Tabla 3.3 resume los parámetros obtenidos a través de las isotermas de Langmuir y Freundlich y sus respectivos coeficientes de distribución.

Los coeficientes de regresión r^2 para la linealización de las isotermas del modelo de Langmuir indican que la adsorción, en ambos suelos, no se ajusta a éste modelo de Langmuir, en caso contrario, los coeficientes de regresión para los suelos de PAL y ST de 0.996 y 0.849 respectivamente, indican que la adsorción sigue el modelo de Freundlich.

Tabla 3.3. Resultados del ajuste de los modelos de Langmuir y Freundlich en la adsorción de carbofurano en los suelos

Suelo	Modelo de Freundlich			Modelo de Langmuir			K_d	K_{OM}	K_{OC}	Log K_{OC}
	K_F	n_F	R^2	Q_o	b	r^2	(ml g ⁻¹)	(ml g ⁻¹)	(ml g ⁻¹)	
PAL	1.179	1.057	0.996	329.805	0.003	0.048	1.083	44.933	77.645	1.889
ST	2.775	1.240	0.849	21.970	0.316	0.663	2.658	63.733	109.875	2.041

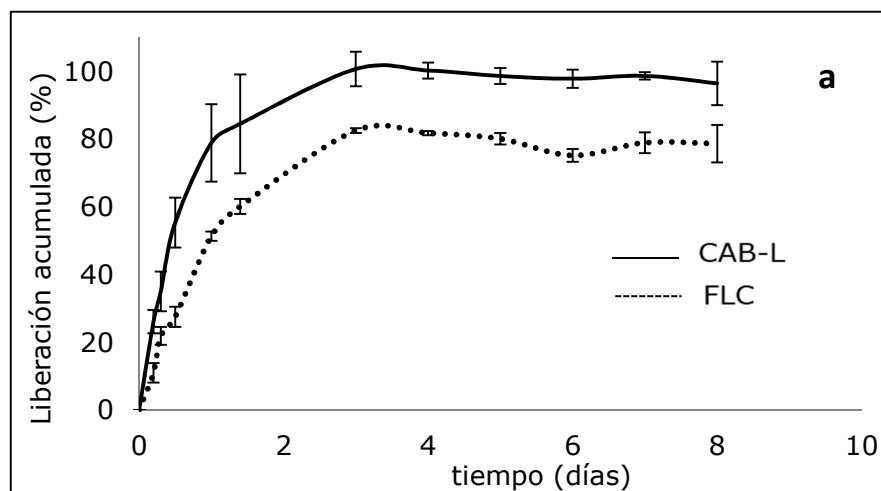
El modelo empírico de Freundlich representa el proceso de adsorción en multicapas sobre superficies heterogéneas, donde los sitios de adsorción tienen diferentes afinidades, en primer lugar, se ocupan las posiciones de mayor afinidad y posteriormente la fuerza del enlace decrece logarítmicamente, al incrementar la ocupación de sitios de adsorción. Los resultados en la tabla 3.3 muestra que la capacidad de adsorción (K_F) para el suelo de ST es mayor que para el suelo de PAL (2.775 y 1.179 respectivamente), así como también, la intensidad de adsorción (n_F) de 1.240 para el suelo de ST y 1.057 para el suelo de PAL. Este modelo asume que una intensidad de adsorción (n) mayor a uno describe una adsorción favorable en multicapas y, si por el contrario n es menor a uno, la adsorción de Freundlich es desfavorable [Liu y Liu, 2008], lo cual confirma la favorabilidad de la adsorción del carbofurano en multicapas. Este resultado es coherente con el valor de K_d (coeficiente de adsorción) y el $LogK_{OC}$ (coeficiente de partición carbono orgánico-agua), los cuales describen la tendencia del suelo de ST por la adsorción de carbofurano. Valores similares se habían encontrado para la adsorción de carbofurano en suelos colombianos con valores de $LogK_{OC}$ entre 1.73 y 2.05 con valores de OC (%) entre 1.20 y 3.79 [Valencia *et al.*, 2008].

Con base en lo anterior resulta evidente que el proceso de adsorción afecta el proceso de movilidad del carbofurano en los suelos, así como también afecta la liberación del plaguicida de la FLC en los suelos, el cual se discutirá a continuación.

3.2.3 Liberación de carbofurano de la FLC en agua y a diferentes pHs

El perfil de liberación de carbofurano desde la FLC fue contrastado con el del carbofurano libre (carbofurano proveniente de una materia prima y que se encuentra sin ningún aditivo, denominado CAB-L); estos perfiles se muestran en la figura 3.2. En la gráfica 3.2A se observa que el CAB-L se libera con mayor velocidad que el carbofurano de la FLC. A las primeras 12 horas se ha liberado el 23.5 % del contenido de carbofurano de la

FLC, mientras que el CAB-L ha migrado el 40 % en el mismo tiempo, y se estabilizó en los primeros 3 días con una liberación máxima del 65 %, mientras el CAB-L se transfirió el 100 % al cuerpo del agua. Una observación interesante es que los perfiles de liberación de las FLC muestran una concentración máxima de carbofurano del 70 %, quedando el 30 % restante, presumiblemente, en la red polimérica. Este comportamiento lo han conseguido varios investigadores en el esfuerzo por encapsular carbofurano en diferentes matrices, por ejemplo, Fernández *et al.* obtuvo liberaciones del plaguicida entre 5% al 90% aproximadamente, para diferentes tipos de formulaciones en el mismo tiempo [Fernandez *et al.*, 2005]. Otra diferencia, en cuanto a la liberación de carbofurano en agua, respecto a los trabajos publicados, es el tiempo de estabilización de la liberación, en nuestro trabajo se consiguió un tiempo en el que la liberación se hace constante a los 3 días, mientras que en el trabajo publicado por Fernández *et al.*, este tiempo se encuentra alrededor de las 24 horas (2 días) y Paradelo *et al.* consigue la estabilización a 2 horas aproximadamente [Fernandez *et al.*, 2005; Paradelo *et al.*, 2012].



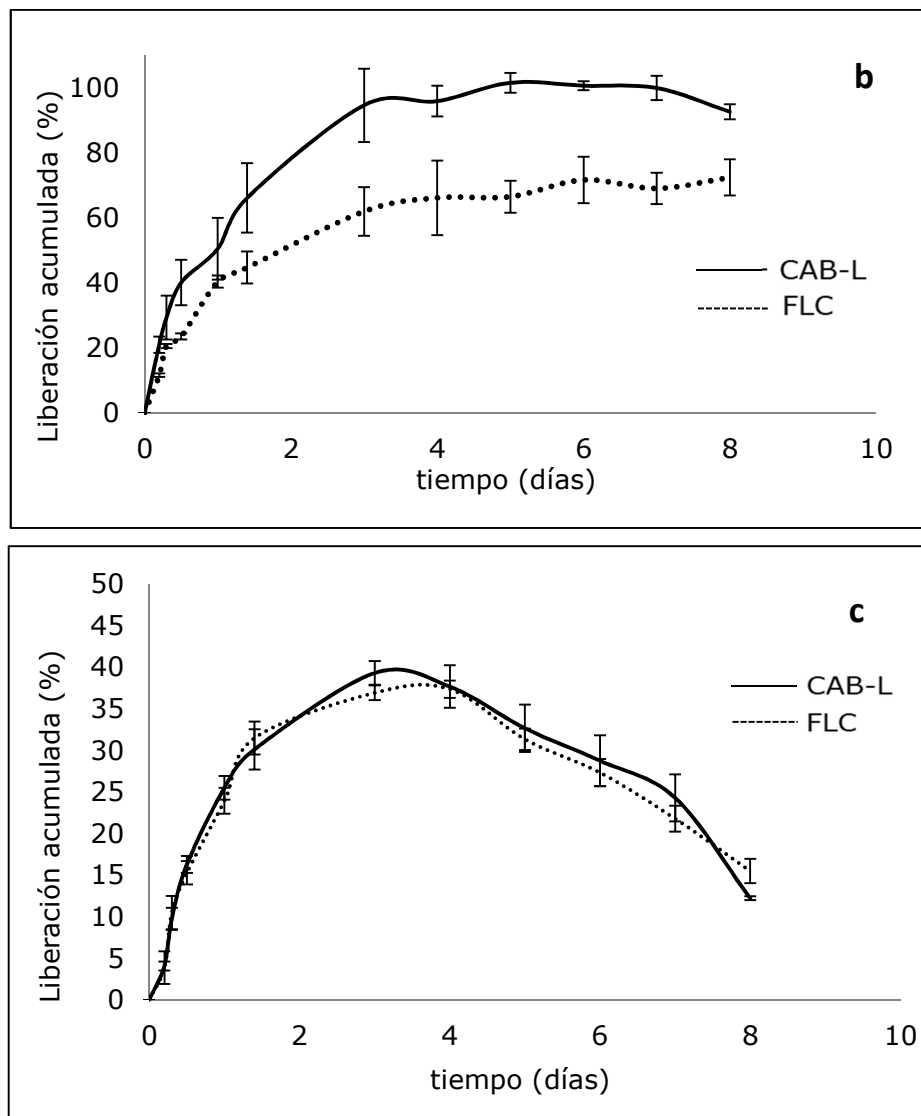


Figura 3.2 Perfiles de liberación en agua a pH 4 (a), 7 (b) y 8 (c) de la FLC y CAB-L

Los perfiles de liberación a pH 7 muestran un aspecto un poco diferente (Figura 3.2). La liberación del carbofurano se consigue a menor tiempo: a las 12 horas se ha liberado el 27.5 % de la FLC mientras que en el CAB se ha liberado el 55 %; el tiempo de estabilización en la liberación de la FLC se consigue a los 3 días con un porcentaje de liberación del 80 %, mientras que en el CAB el tiempo de estabilización de la liberación se consigue al mismo tiempo, pero con una liberación del 100%. A pH 8 el perfil de liberación muestra en ambos casos un patrón muy similar y, además se presenta una liberación muy baja, con un porcentaje máximo de liberación del 37 % para ambas

muestras. Una observación importante es que la curva de liberación sufre una caída en las concentraciones del plaguicida a partir del 4 día.

Una primera conclusión que sale de estos resultados es el efecto que tiene el pH sobre la estabilidad de la molécula de carbofurano, aspecto que ya se había tratado anteriormente, pero que aquí se muestra con resultados experimentales. A pH ácidos (en un rango de 4 a 6) la molécula se mantiene estable en el tiempo logrando mantenerse las concentraciones en el tiempo de estudio: 8 días (figura 3.2), a medida que el pH aumenta el carbofurano sufre degradación, probablemente por hidrólisis (Morales *et al.*, 2012), a partir del 8 día para el CAB-L; en el caso de la FLC se observa que el decaimiento de la concentración de carbofurano es del 28.5 %, mientras que para el CAB-L es del 45.7, lo cual podría sugerir un efecto protector del carbofurano que se encuentra encapsulado. En el caso de la liberación a pH 8, el efecto de la hidrólisis es mucho más evidente, las concentraciones de carbofurano caen, en ambos casos, por debajo del 1% al vigésimo día (figura 3.2). Esta observación sugiere que las micropartículas de quitosano entrecruzadas iónicamente podrían ser inestables bajo condiciones de basicidad; una posible hipótesis es que la alcalinidad desprotona los grupos aminos del quitosano perdiendo carga y destruyendo la atracción electrostática entre el quitosano y el sulfato, liberando de forma inmediata el carbofurano que se encuentra en la red polimérica, sin embargo, esta premisa debe tener más estudios que sustenten la afirmación.

El modelamiento matemático de la liberación de principios activos tiene una gran utilidad en la predicción de los tiempos de liberación de una cierta masa del compuesto con el objetivo de diseñar la FLC que se requiera. Estos modelos han sido ampliamente usados en la formulación de medicamentos, y hoy en día toma más fuerza su aplicabilidad para la liberación de agroquímicos desde matrices poliméricas [Lee, 1980; Siepmann y Siepmann, 2008].

Los coeficientes calculados con la ecuación 3.13 se muestran en la tabla 3.4, para la liberación a pH 4 y 7, donde se observa una buena linealidad con coeficiente de regresión de 0.960 para la FLC a pH 4 y 0.958 para la FLC a pH 7.

Tabla 3.4 Coeficientes de difusión para la liberación en agua de la FLC a pH 4, 7 y 8

	n	K	r ²
FLC pH4	0,82	-3,12	0,960
FLC pH7	0,60	-3,40	0,958
FLC pH8	No hay linealidad		

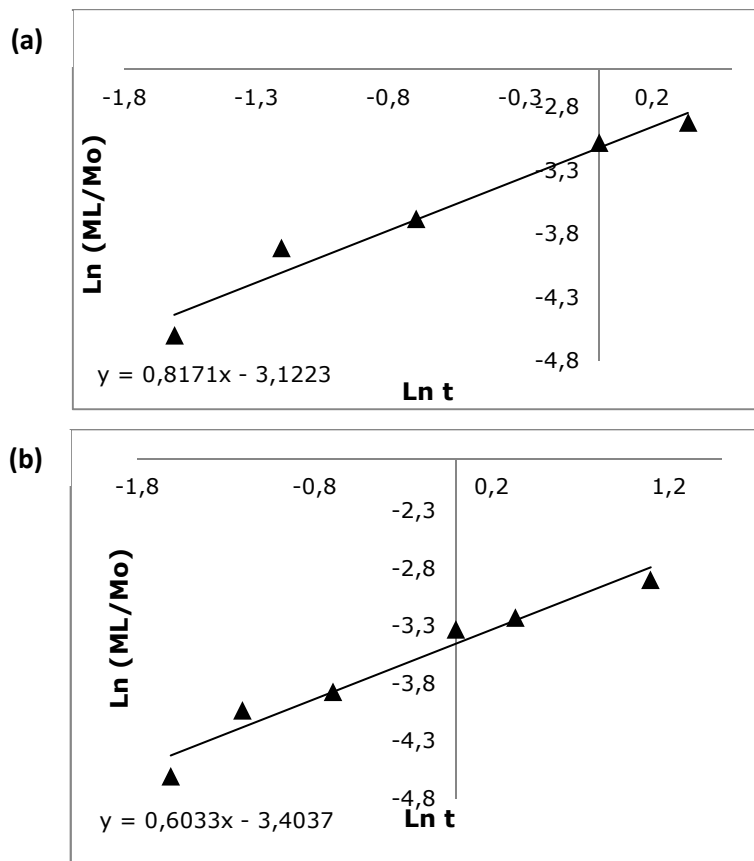


Figura 3.3 Linealización de la ecuación de Korsmeyer y Peppas para los perfiles de liberación en agua
(a) pH 4 y (b) 7 de la FLC

Como puede verse en la figura 3.3, la linealidad de las gráficas permite deducir que el modelo de Korsmeyer y Peppas se ajusta bien a la liberación del carbofurano desde las micropartículas de quitosano. Los exponentes de difusión, n , encontrados permite deducir que el mecanismo de transporte del plaguicida hacia el agua sigue un transporte anómalo ($0.5 < n < 1.0$) y la velocidad depende de t^{n-1} ; en el caso de la liberación a pH 8, coeficiente de regresión dio muy bajo ($r^2=0.1018$), lo cual no se ajusta al modelo de

Korsmeyer y Peppas, lo cual puede tomarse como una confirmación de que la cápsula se destruye, y por lo tanto, no hay liberación lenta [Costa y Sousa, 2001].

3.2.4 Liberación de carbofurano de la FLC en los suelos

La gráfica 3.4 muestra los perfiles de liberación de carbofurano en los dos suelos objeto de estudio, ST y PAL.

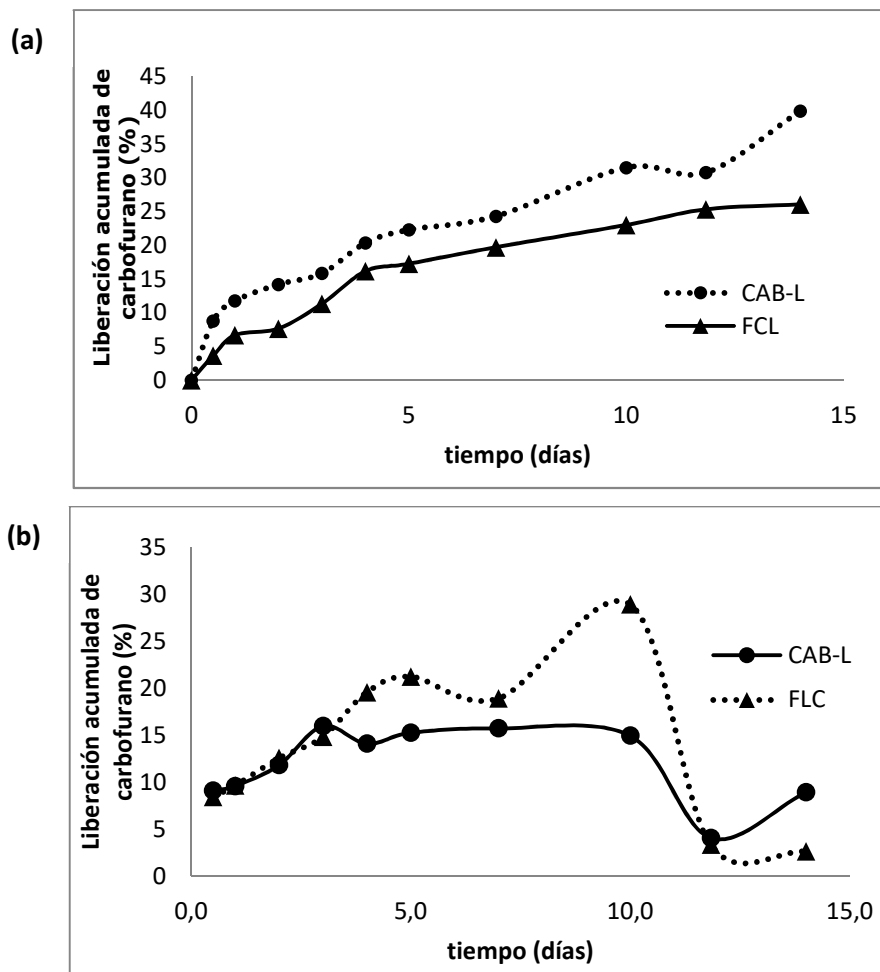


Figura 3.4 perfiles de liberación de carbofurano en suelos a) suelo ST, b) suelo PAL

Se observa que el perfil del suelo de ST (figura 3.4a) tiene un comportamiento de liberación ascendente en el tiempo, lo cual sugiere una liberación lenta para el caso del carbofurano en la FLC. Para el CAB-L la velocidad de liberación es un poco menor, con un perfil de disolución irregular durante el tiempo del experimento. La mayor concentración

de carbofurano liberado se logró con el CAB-L (aproximadamente 40%), mientras que en la FLC se obtuvo 26% en el mismo tiempo.

El perfil de la liberación de carbofurano en el suelo de PAL tuvo un comportamiento anómalo, como puede observarse en la figura 3.4b. La liberación de la FLC y el CAB sigue el mismo comportamiento hasta el día 3 en el que la concentración de carbofurano del CAB bajó (15% aproximadamente en ambos casos), la FLC siguió liberando, pero la concentración del CAB bajó y no liberó más de este valor. El comportamiento anómalo de la liberación podría explicarse teniendo en cuenta el pH del suelo de PAL, que es cercano a 8.0, el cual puede hacer que el carbofurano se degrade, como se vio en la liberación en agua. Sin embargo, una observación interesante es que la FLC libera más que el CAB solo; una posible explicación para este fenómeno es que la cápsula esté sirviendo de agente protector del plaguicida, el cual hace que la concentración se mantenga más tiempo en el suelo. Esta afirmación debe evaluarse en futuras investigaciones para corroborar esta hipótesis.

A pesar de que el perfil de liberación de carbofurano en el suelo de ST guarda una cierta similitud con el de la liberación en agua, la cantidad liberada en suelos sí difiere, debido a los procesos fisicoquímicos que se dan en el suelo y que hacen que el plaguicida no difunda en la misma magnitud, pero sí bajo el mismo modelo, como se puede observar en los coeficientes de regresión en la figura 3.5, y por esta razón se pueden aplicar las ecuaciones desarrollada por Korsmeyer y Peppas para determinar la cinética de difusión.

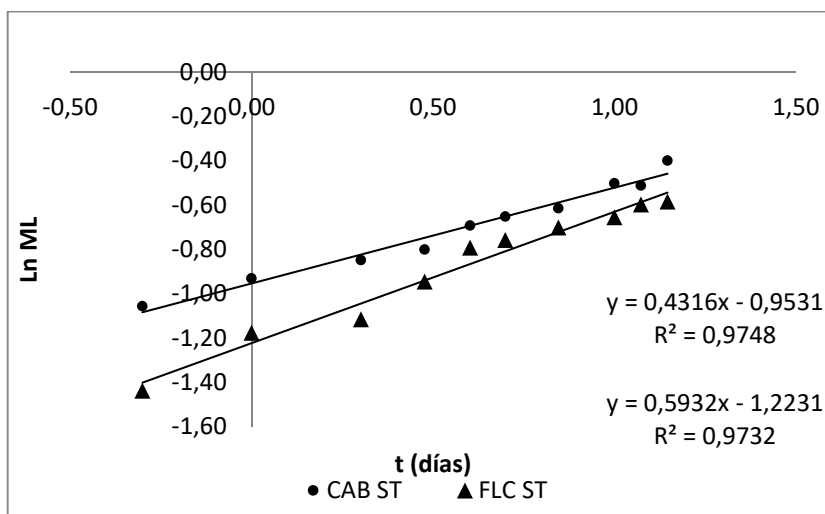


Figura 3.5 Linealización de las ecuación de Korsmeyer y Peppas para los perfiles de liberación en suelo de ST de la FLC y CAB

En la tabla 3.5 se muestran los coeficientes de difusión de las ecuaciones de Korsmeyer y Peppas, donde el r^2 muestra una buena regresión indicando un buen ajuste al modelo y el parámetro de difusión, n , establece que el mecanismo de transporte de carbofurano en este suelo es de tipo anómalo [Costa y Sousa, 2001].

Tabla 3.5 Coeficientes de la linealización de las ecuaciones de Korsmeyer y Peppas

	n	K	r^2
FLC ST	0,59	-1,22	0,973
CAB ST	0,43	-0,95	0,975

Estas características son muy importantes porque miden la delimitación de la cantidad de carbofurano que sale de la cápsula permitiendo predecir las cantidades del plaguicida en un momento determinado.

3.2.5 Movilidad de carbofurano en suelos: perfil de lixiviación

La determinación de las concentraciones de carbofurano en las columnas evaluadas mostró, en general, una buena concordancia entre las repeticiones, por lo que se decidió trabajar con la media aritmética ($n=3$) de los resultados de las columnas de los suelos de ST y PAL.

El comportamiento de la molécula del carbofurano en su proceso de movilidad en los dos tipos de suelos estudiados se debe principalmente a sus características fisicoquímicas, su capacidad de adsorción a partículas del suelo, su solubilidad en agua, además a la lipofilicidad, la volatilización, la presión de vapor, la persistencia o tiempo de vida media, y su constante de disociación (pK_a). Estas características son las mismas para carbofurano encapsulado y no encapsulado y, por lo tanto, las diferencias en la liberación del plaguicida van a depender de la condición de encapsulamiento.

Los parámetros del suelo que intervienen en los procesos de movilidad de los plaguicidas son el contenido de materia orgánica, el tipo y proporción de minerales del suelo (arena, limo, arcilla), la capacidad de intercambio catiónico, el pH, el espacio poroso y la distribución del tamaño de poros, que aquí se determinó como volumen de poro de agua (VP) y se calculó con la diferencia de masa entre la columna seca y húmeda.

El proceso de transporte del plaguicida en el suelo se realiza a través de un material poroso compuesto por partículas sólidas de tamaños variable. La textura y la estructura

del suelo determinan la distribución del tamaño de poros (macroporos, mesoporos y microporos), los cuales son importantes para el movimiento de agua, de solutos y del aire.

El mecanismo más simple de movimiento de solutos en el suelo es el transporte convectivo, en el cual las moléculas de soluto siguen al movimiento del flujo del agua (Zhen *et al.* 2019). Sin embargo, los mecanismos de difusión y dispersión, también poseen un rol importante en el transporte de solutos. Por su parte, la difusión, descrita por la primera Ley de Fick, puede ocurrir cuando existen gradientes de concentración de solutos en el suelo. Mientras que la dispersión, ocurre en la dirección del movimiento del agua debido a las diferentes velocidades de flujo dentro de los poros. La capacidad del agua para transportar las moléculas de plaguicidas depende del tamaño y continuidad de los poros presentes en el perfil del suelo. En los macroporos se da el flujo preferencialmente por dispersión hidrodinámica de forma longitudinal y las moléculas de soluto (plaguicidas). Por los mesoporos el movimiento se realiza en forma longitudinal y lateral en igual medida. Este movimiento puede ser longitudinal y/o lateral, generando direcciones de flujo convergente y divergente (INTA, 2015). La distribución de solutos en el perfil de suelo se modifica por los gradientes de concentración lateral y longitudinal y por la velocidad alcanzada en los poros.

Para sintetizar y comparar la información generada en el proceso de lixiviación o transporte vertical, se presentaran los resultados como porcentaje de recuperación, que mide el porcentaje del plaguicida que se recupera en la solución lixiviada, respecto al total aplicado en la superficie del suelo, una vez que ha concluido el período de lixiviación considerado. El factor de retardo (RF) (ecuación 3.13) significa que el plaguicida no se mueve junto con el flujo de agua, sino que sufre procesos de sorción-desorción, que condicionan y retardan el movimiento vertical del plaguicida y que se mide con la siguiente relación (Mercado *et al.* 2018) :

$$RF = 1 + \frac{Densidad\ aparente}{Porosidad} K_d \quad (3.13)$$

En la figura 3.6 se representa el porcentaje de carbofurano recuperado y retenido en los dos tipos de suelos, los cuales mostraron que, para el carbofurano sin encapsular en el suelo de ST, se recuperó el 24% y se retuvo el 76% durante el periodo de

experimentación y en el encapsulado se recuperó el 7.2% y se retuvo el 92.3%, confirmándose que en suelos la liberación del carbofurano es más lenta a partir de un sólido pastilla y mucho menor cuando se aplica en forma de ingrediente encapsulado.

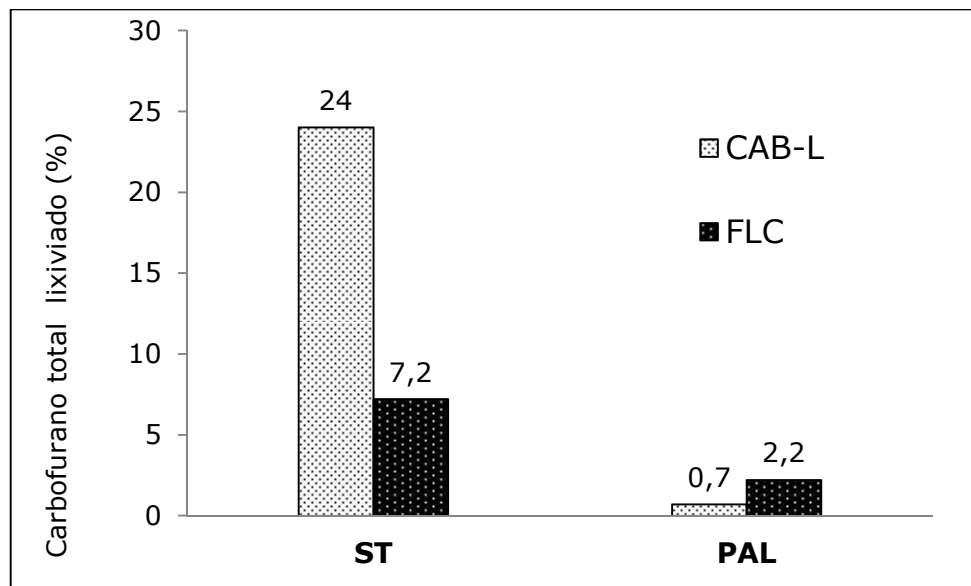


Figura 3.6. Porcentajes de carbofurano recuperados por lixiviación en columna de los suelos de ST y PAL

En el suelo de PAL, se observa un comportamiento muy diferente, pues el porcentaje recuperado en la columna en el que eluye el CAB-L se recupera el 0,7% y por diferencia, se retiene el 99,3% y en la columna de la FLC se recupera el 2.2% y se retiene el 97.8%. Esta diferencia permite deducir que el pH del suelo degrada la molécula de carbofurano (3-hidroxicarbofurano, 3-cetocarbofurano y fenol-carbofurano) de tal manera que el carbofurano puro no es que esté retenido dentro de la columna, sino que se ha degradado durante su exposición al suelo y que el tiempo de vida media en estas condiciones es muy bajo, mostrando coherencia con los resultados encontrados en la liberación en este mismo suelo y discutido en el numeral 3.3.4. Esto nos permite concluir que el uso de la FLC permitiría una mayor estabilidad a la molécula encapsulada permitiendo que el carbofurano pueda actuar durante más tiempo; en condiciones de cultivo regular, con la degradación del carbofurano encontrada para este tipo de suelos se requeriría de aplicaciones más frecuentes o de mayores cantidades del plaguicida.

El factor de retardo RF calculado para la molécula de carbofurano en los dos tipos de suelo nos indica que se encuentra dentro del mismo orden, 1.09 para el suelo ST y 1.06 para el suelo PAL, simplemente indicándonos que es > 1 y < 2 considerado como móvil.

El comportamiento de lixiviación del carbofurano libre en los dos tipos de suelos se muestra en la figura 3.7, se puede observar que la cantidad de soluto recuperado en la solución lixiviada para el suelo ST fue mayor y su comportamiento de distribución es más coherente que el suelo PAL, respecto al total aplicado en la superficie del suelo. Esto se debe probablemente a la influencia de la textura de los dos tipos de suelos y el pH.

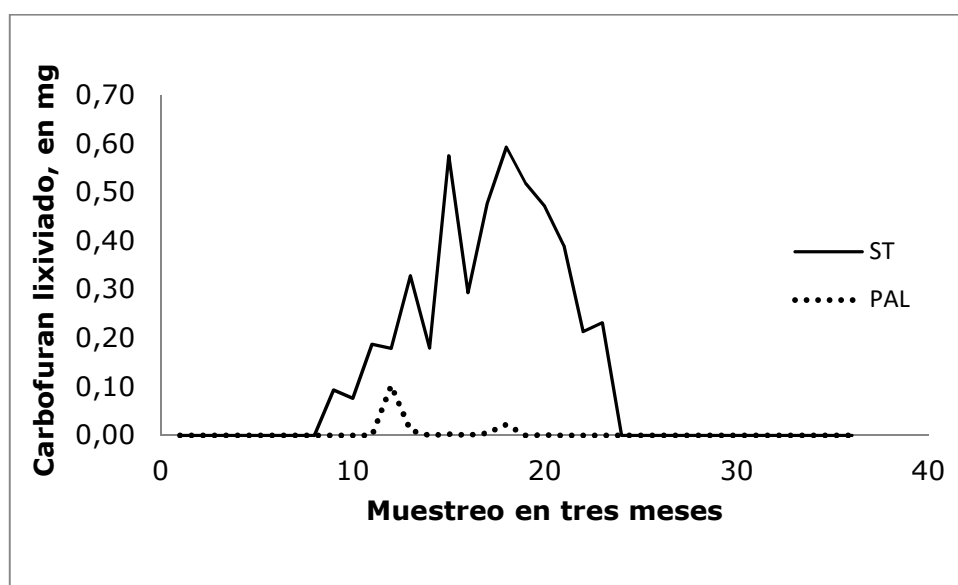


Figura 3.7. Lixiviación de Carbofurano libre en los suelos de ST y PAL

De acuerdo a la textura de ambos suelos, los dos son considerados arcillosos; sin embargo, el de PAL, con un 50,8 % de arcilla favorece los procesos de adsorción del carbofurano, mientras que el suelo de ST el contenido de arcilla es mucho mayor dejando el plaguicida un poco más libre; adicionalmente, el contenido de arena y de limo del suelo de PAL lo hacen fácilmente apelmazable, dificultando la circulación de aire y agua a través de él (Ibáñez, 2006). También se debe considerar que su volumen de poro está en un rango menor que el de ST. La otra variable significativa es el pH, puesto que el suelo de PAL (pH=7.67) facilita el proceso de degradación del carbofurano, lo cual se podría evidenciar por la señal que Salió en los cromatogramas durante la cuantificación por HPLC, asumiendo que se trata de fenolcarbofurano ((2,3-dihidro-2,2-dimetil-7-beozofuranoil) (Mora, A., 1992). En condiciones de ensayo similares, cuando el plaguicida presenta un menor porcentaje de recuperación, priman los procesos de sorción y degradación (INTA, 2015). El carbofurano es considerado como una molécula de

movilidad tipo V, es decir móvil, con un factor de movilidad relativa en el rango de 2.5 a 5.0, según la OECD, (OECD/OCDE 312, 2004).

Al comparar el comportamiento de lixiviación de la FLC y el CAB-L en el suelo de ST (figura 3.8), la liberación del plaguicida es lenta en la FLC, tal como se esperaba, con una buena distribución en el tiempo de lixiviación y cantidades lixiviadas menores a las mostradas por el CAB-L. En este caso no se considera que esté en degradación pues esta ocurriría en ambas moléculas liberadas. Así que se determina que este comportamiento es a la liberación controlada y la sorción que pueda estar ocurriendo

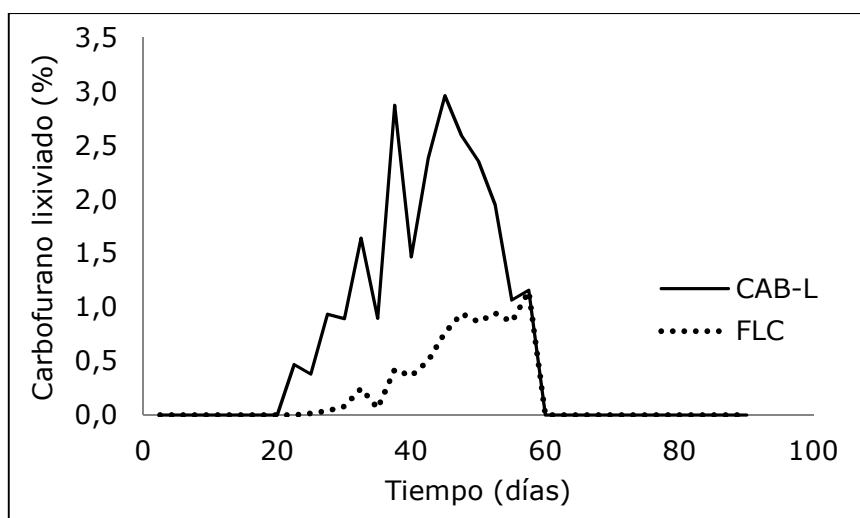


Figura 3.8. Lixiviación de Carbofurano libre y encapsulado en los suelos de ST

El comportamiento del carbofurano encapsulado en los dos suelos (figura 3.9) reconfirma lo expuesto anteriormente; es decir, que el compuesto encapsulado tiene mayor estabilidad y que, aunque seguramente una vez liberada la molécula del encapsulado en el suelo PAL sufre degradación, el tiempo de acción se prolonga aunque su concentración baje.



Figura 3.9. Lixiviación de carbofurano encapsulado en los suelos de ST y PAL

La figura 3.9 ilustra con mayor claridad el efecto del suelo PAL en el proceso y la estabilidad del compuesto encapsulado. Podemos ver como el producto que proviene del encapsulado tiene mayor tiempo de vida y su concentración aunque baja, se mantiene durante más tiempo (figura 3.10).

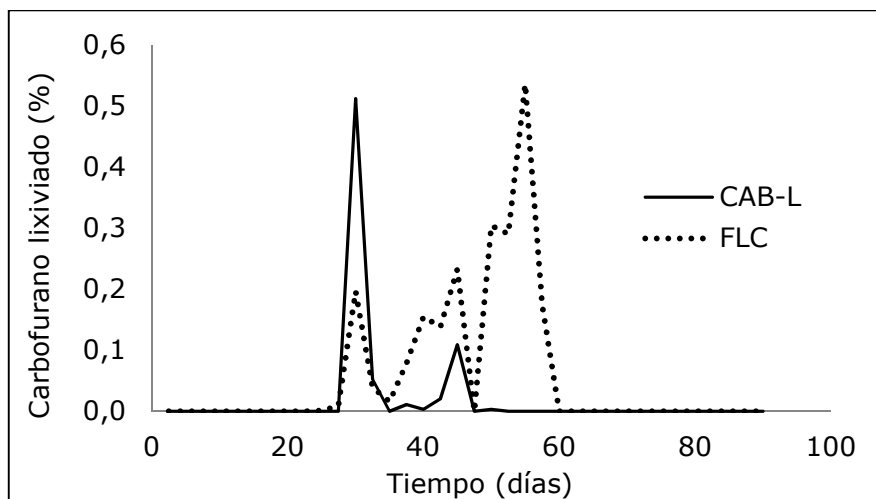


Figura 3.10. Lixiviación de carbofurano libre y encapsulado en los suelos de PAL

3.3 CONCLUSIONES

- El encapsulamiento de la molécula de carbofurano produjo una menor velocidad de liberación desde las micropartículas de quitosano en agua a pHs 4 y 7, mientras que a pH 8 mostró un perfil de degradación.
- Los resultados encontrados de la liberación en el suelo de ST (pH 4) mostraron concordancia con los de agua al mismo pH. En el suelo de PAL se evidenció la degradación de carbofurano mostrada en agua a pH 8.
- El perfil de liberación del carbofurano encapsulado mostró una liberación lenta disminuyendo el proceso de lixiviado y su posibilidad de contaminar más fácilmente las aguas subterráneas.
- Los perfiles de lixiviación del carbofurano encapsulado mostró una mayor lixiviación en el suelo de ST con pH 4 (7,2), mientras que la lixiviación en el suelo de PAL con pH 8 fue menor (2,2)
- Se observa que al aplicar el plaguicida en suelos con pH por encima de 7 y cercanos a 8 (muy comunes en algunas zonas del Valle del Cauca, Llanos Orientales y zonas del bajo Cauca), generan procesos de degradación, los cuales se verían disminuidos al usar el compuesto encapsulado, dando mayor tiempo de acción al ingrediente activo, disminuyendo el número de aplicaciones pues se mantendría más tiempo en el suelo y reduciendo el riesgo de contaminación por lixiviación.

CAPÍTULO IV Evaluación del efecto nematicida de carbofurano encapsulado en micropartículas de quitosano

	Página
4.1	METODOLOGÍA
4.1.1	Fuente de inóculo de <i>Meloidogyne spp</i>
4.1.2	Determinación de la toxicidad o concentración efectiva de carbofurano para <i>Meloidogyne spp</i> (CE ₅₀)
4.1.3	Recolección de las muestras de suelo y caracterización.
4.1.4	Preparación de las plántulas de tomate para la infestación.
4.1.5	Preparación y caracterización de la FLC
4.1.6	Evaluación del efecto nematicida del carbofuran encapsulado sobre <i>Meloidogyne spp</i> .
4.1.7	Carbofurano residual en el suelo.
4.2	RESULTADOS
4.2.1	Conteo de nemátodos en el inóculo de <i>Meloidogyne spp</i> .
4.2.2	Determinación del CE ₅₀ del carbofurano
4.2.3	Evaluación del efecto nematicida del carbofuran encapsulado sobre <i>Meloidogyne spp</i>
4.2.4	Carbofurano persistente en suelo
4.3	CONCLUSIONES
4.4	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

4.1 METODOLOGÍA

4.1.1 Fuente de inóculo de *Meloidogyne spp.*

Los nemátodos del género *Meloidogyne spp* fueron adquiridos de un suelo (tipo aluvial) infestado por *Meloidogyne spp.*, donado por el Laboratorio de Investigación en Ingeniería Agrícola de la Universidad Nacional sede Palmira. Para su extracción se utilizó el método de las bandejas de Whitehead (Bybd *et al.* 1983), el cual consiste en el paso por difusión de los nemátodos a través de una membrana porosa depositada entre el suelo y un depósito de agua, (Figura 4.1), concentrándose la cantidad de nemátodos a 45 mL.



Figura 4.1. Bandejas de Whitehead utilizadas para la extracción de nemátodos.

Como fuente de inóculo de masas de huevos se utilizaron raíces de tomate recolectadas de un suelo infestado. La extracción de las masas de huevos se realizó utilizando el método de lavado con hipoclorito de sodio al 1% y tamizaje en malla de 400 mesh (38 μ m) de la solución resultante como se observa en la Figura 4.2 (Coyne *et al.* 2007).

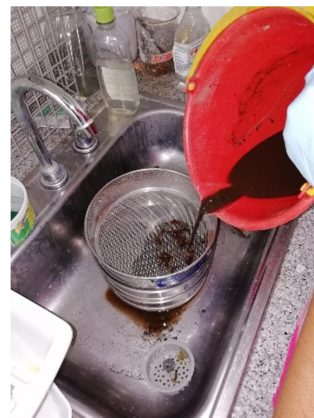


Figura 4.2. Extracción de huevos de *Meloidogyne spp.*, lavando con NaClO al 1 %.

4.1.2 Determinación de la toxicidad o concentración efectiva de carbofurano para *Meloidogyne spp* (CE₅₀)

Para la determinación de la toxicidad del carbofurano utilizado, se prepararon soluciones de 0, 56, 84, 168, 204 y 240 ppm de carbofurano, de las cuales se tomaron 25 mL de cada una y se mezclaron con 2 mL de la solución de nemátodos preparados según el numeral 4.2.1, cuya concentración promedio fue de 10 individuos por mL, por triplicado. Cada recipiente (tubos falcon) se incubó a 27 °C, aproximadamente. La evaluación de la movilidad de los nemátodos se realizó a las 24 horas de exposición. Para ello, antes de cada evaluación, los tubos falcon fueron agitados de manera manual para dispersar los nemátodos. Posteriormente, se hicieron observaciones en un microscopio óptico con aumento entre 4x y 10x, colocando 3 mL de la solución sobre un segmento rectangular acrílico con divisiones en sectores cuadrados de 2 x 2 mm. En cada sector se observó el número de nemátodos que exhibían movimiento propio; los movimientos no activos se tocan suavemente con un filamento y, si reaccionaban, se contaban como nemátodos activos; aquellos que no mostraban movilidad se reportaron como nemátodos muertos. Para precisar la toxicidad del carbofurano, se calculó la CE₅₀, o concentración efectiva media que consiste en la concentración calculada estadísticamente, de una sustancia en el medio, que se espera que produzca un determinado efecto en el 50% de los organismos de experimentación de una población dada, bajo un conjunto de condiciones definidas, siguiendo el procedimiento sugerido por Choudhary *et al.*, (2006), donde se grafica el porcentaje de mortalidad de los nemátodos frente a la concentración aplicada tanto del carbofurano libre como el encapsulado.

4.1.3 Recolección de las muestras de suelo y caracterización.

Las muestras de suelo utilizadas para la siembra de las plántulas de tomate y la determinación del efecto del plaguicida encapsulado fueron los mismos que se describieron en el capítulo III y que fueron usados en la determinación de la liberación y movilidad de carbofurano en suelos, denominados Santander de Quilichao (ST) y Palmira (PAL), y cuya caracterización está descrita en el numeral 3.2.3 del capítulo anterior.

4.1.4 Preparación de las plántulas de tomate para la infestación.

Las plántulas de tomate utilizadas fueron cultivadas en vasos de poliestireno expandido (icopor) con una altura de 20 cm y 12 cm de diámetro, en invernadero, a la

temperatura promedio de la ciudad de Cali durante los meses de enero-marzo de 2019 19-29 °C. Durante este periodo se mantuvo una humedad constante en el suelo aplicando 50 mL de agua diariamente, ver Figura 4.3.



Figura 4.3. Cultivo experimental de plántulas de tomate.

4.1.5 Preparación y caracterización de la FLC.

Se utilizó la FLC, a base de carbofurano encapsulado, preparada y evaluada en el capítulo II. La preparación de las microcápsulas se describe en el numeral 2.2.2, la cual se hizo mediante la técnica de entrecruzamiento iónico del quitosano con sulfato de sodio, la caracterización y la determinación de la eficiencia de encapsulamiento (EE), así como la capacidad de carga (CC) se encuentran descritas en los numerales 2.2.8 y 2.2.3 respectivamente y la preparación de las pastilla a usar.

4.1.6 Evaluación del efecto nematicida de la FLC en plántulas de tomate para el control de *Meloidogyne spp.*

Las pastillas preparadas para este experimento tuvieron un peso promedio de 64,76 mg $\pm$ 13,02 mg y contenían de 3,83 a 29,79 mg de carbofurano encapsulado para ser usadas en el suelo de ST y 5,73 mg a 20,55 mg para el suelo de PAL, preparadas de forma aleatoria.

Para la evaluación del efecto de los tratamientos, se empleó un diseño experimental completamente aleatorio en arreglo por bloques con cinco tratamientos (utilizando como concentración mínima encapsulada el dato de CE₅₀) y tres plántulas de tomate por tratamiento, como testigo negativo se tuvieron plántulas sin nemátodos y sin FLC, y como testigo positivo una plántula con nemátodos y sin carbofurano; además, se

dispuso de dos plántulas infestadas por nemátodos con una cantidad de carbofurano sin encapsular igual al CE_{50} para cada experimento.

Para la inoculación de las plántulas se utilizaron 0,6 mL de la solución de huevos para cada tratamiento con una concentración de 420 huevos por mL. Una vez inoculadas las plantas se esperó dos días y se administró la FLC y el CAB-L a cada plántula. A los 30 días de haber empezado el tratamiento, a una temperatura promedio de 25 °C, se evaluó el efecto mediante el conteo de agallas en las raíces de las plantas. El muestreo permitió determinar el número de agallas por plántula y el índice de nudosidad (IN). Este muestreo fue destructivo, es decir, se eliminaron las plántulas al final de cada observación. Para el IN, se utilizó la escala de evaluación de infección de raíces con nudosidad causadas por *Meloidogyne spp* propuesta por (Taylor y Sasser, 1978) (Figura 4.4), atribuyendo el rango de porcentaje de daño a cada planta tomando como base los nódulos contados y la cantidad de raíces afectadas. Las medias de los tratamientos fueron comparadas mediante una prueba de rangos múltiples (prueba de Fisher $\alpha < 0.05$), posterior al análisis de varianzas (ANOVA), con un nivel de confianza del 5%.

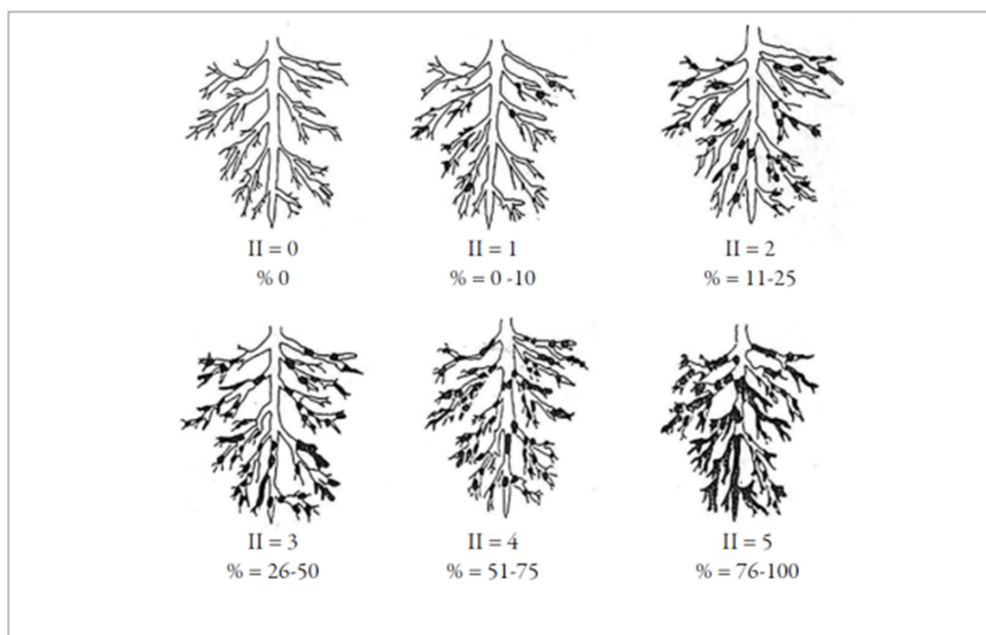


Figura 4.4. Ilustración de la clasificación del índice de nudosidad en raíces por daño de *Meloidogyne spp*. Las partes de color negro se representan como agallas en la raíz.

4.1.7 Carbofurano residual en el suelo.

Para la extracción del carbofurano del suelo se utilizó la extracción asistida por ultrasonido, agregando 5 g de suelo en 5 mL de metanol, posteriormente, 1 minuto de agitación en vortéx, 10 minutos en baño ultrasonido y 10 minutos de centrifugación a 3500 rpm. El sobrenadante se filtró a través de membrana de nylon de 0,45 μm . Las muestras de suelos se analizaron a los 10 y 30 días posteriores a la adición de las FLC. La cuantificación se realizó por HPLC siguiendo el método descrito en el numeral 3.2.6 del capítulo anterior.

4.2 RESULTADOS

4.2.1 Cuento de nemátodos en el inóculo de *Meloidogyne spp.*

El recuento de nemátodos vivos del género *Meloidogyne spp* en estado juvenil (J2) en el inóculo fue, en promedio, 10 nemátodos por mL de solución, después de llevar la solución a aproximadamente 45 mL. Por otra parte, el conteo de huevos a partir de raíces de tomate infestadas (claros síntomas de afectaciones por el género *Meloidogyne spp.*) fue de 420 huevos por mL de solución, ver figura 4.5.

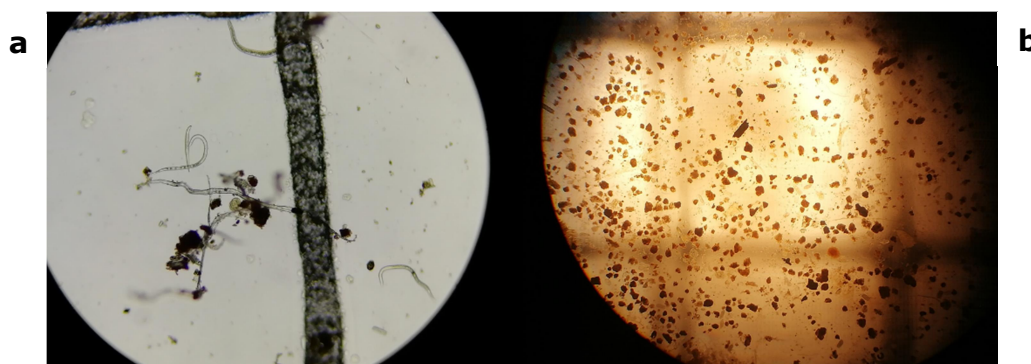


Figura 4.5. Cuento al microscopio de nemátodos (a) y huevos de nemátodos (b).

4.2.2 Determinación del CE_{50} del carbofurano

Fue importante establecer el CE_{50} ya que permite encontrar un rango de efectividad del ingrediente activo para controlar el nemátodo y así saber que concentraciones se debería aplicar. En la figura 4.6, la gráfica muestra la relación entre la concentración del carbofurano libre evaluado y los nemátodos muertos a estas concentraciones con el fin de determinar el EC_{50} . Como se puede observar existe una correlación lineal entre las dos variables.

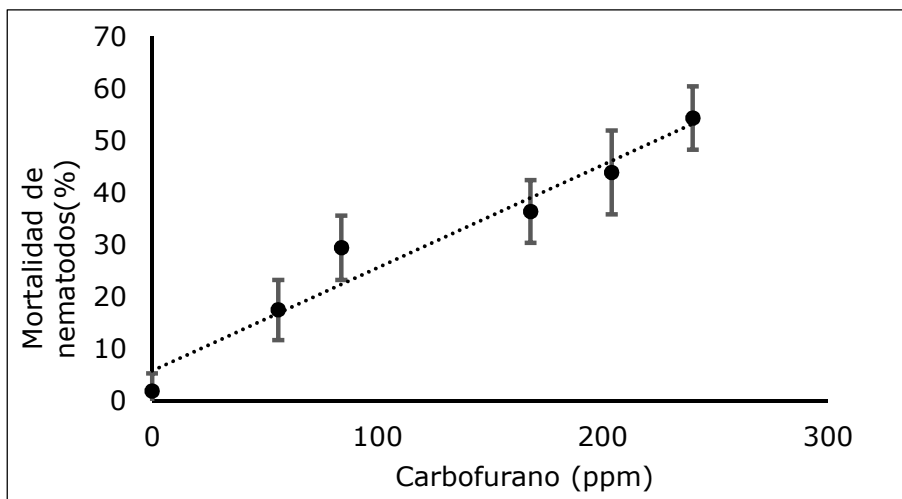


Figura 4.6 Gráfica de toxicidad del carbofurano.

Mediante la regresión de la CE_{50} se determinó que la CE_{50} fue de 229 ppm, que teniendo la alícuota tomada (25 mL), corresponde a una masa 5,74 mg de carbofurano en los 25 mL o 0,229 por mL. La concentración de la CE_{50} encontrada se encuentra en el mismo orden de magnitud que la encontrada por Gonzáles, en el que en su estudio halló 711 ppm en 10 mL (7,11 mg del plaguicida por 10 mL o 0,711 mg por mL) (Gonzales *et al.*, 2014). A pesar que los resultados son comparables, se debe resaltar que formulaciones con menores cantidades de plaguicidas son preferibles dado el alto daño que hacen estos compuestos a concentraciones tan bajas.

4.2.3 Evaluación del efecto nematicida del carbofuran encapsulado sobre *Meloidogyne spp.*

En la figura 4.7 se puede observar un caso típico de las raíces infestadas, en las tablas 4.1 y 4.2 se encuentran los resultados del índice de agallamiento y el número de agallas observadas para los diferentes tratamientos en los suelos de ST y PAL, respectivamente. En estas tablas se puede verificar que el número de agallas formadas en el suelo de ST fueron ligeramente mayores que en el suelo de PAL, posiblemente porque el suelo de ST es un suelo ligeramente más aireado por tener un porcentaje de arena mayor, lo cual permite que las raíces puedan extenderse con más facilidad y los nutrientes y el agua puedan llegar a ellas fácilmente, siendo favorables para el desarrollo de la plaga.



Figura 4.7 Raíces infestadas (a) y raíces no infestadas (b)

Tabla 4.1. Resultados del daño a la raíz causado por *Meloidogyne spp.* en el suelo de ST

Carbofurano en la FLC (%)	Promedio del número de agallas	Índice de agallamiento (%)
10,3	32	26-50
11,1	34	26-50
16,6	42	26-50
34,7	37	26-50
36,2	30	26-50
Control negativo	85	76-100
Control positivo	19	11-25

Tabla 4.2. Resultados del daño a la raíz causado por *Meloidogyne spp.* en el suelo de PAL.

Carbofurano en la FLC (%)	Promedio del número de agallas	Índice de agallamiento (%)
4,6	23	11-25
6,7	21	11-25
9,4	21	11-25
16,9	23	11-25
19,5	30	11-25
Control negativo	44	26-50
Control positivo	8	1-10

Se evalúa el daño a la raíz y se realizan comparaciones entre los diferentes tratamientos usando el número de agallas como variable de respuesta, con lo cual se busca que exista diferencia, pero con valores menores a los controles. Los resultados para el suelo de PAL y de ST se encuentran consignados en las tablas 4.3 y 4.4, respectivamente.

Tabla 4.3. Resultados del análisis de varianza utilizando el control positivo.

Factor	Suelo ST		Suelo PAL	
	GL	Valor p	GL	Valor p
Concentraciones de CAB encapsulado	5	0,012	5	0,381

Tabla 4.4. Resultados del análisis de varianza utilizando como control el CAB libre.

Factor	Suelo ST		Suelo PAL	
	GL	Valor p	GL	Valor p
Concentraciones de CAB encapsulado	5	0,482	5	0,640

En los resultados se observa que el suelo de ST presenta diferencia significativa de las concentraciones de los diferentes tratamientos y el control positivo debido a que el p valor es menor de 0,05. La prueba postanova (aplicada cuando existe diferencia estadística entre los tratamientos), utilizada fue la prueba de rangos múltiples de Fisher (Tabla 4.5), muestran que en el suelo de ST las formulaciones de carbofuran tuvieron una media de número de agallas menor que la del control, mientras en el suelo de PAL sucedió lo contrario; se determinó que las medias halladas no difieren significativamente del control. De esta forma se comprueba el supuesto de que las formulaciones de estudio disminuyen significativamente el daño a las raíces producido por *Meloidogyne spp* en cultivos piloto de tomate, teniendo en cuenta que el tipo de suelo afecta los resultados.

Tabla 4.5. Prueba de rangos múltiples de Fisher de los tratamientos respecto al control para suelo de ST y PAL

CONCENTRACIONES	n	Suelo ST		Suelo PAL	
		Media	Agrupación	Media	Agrupación
6 (Control)	1	88,2667	A	44,8333	A
3	3	42,3333		30,0000	A
4	3	36,6667		23,3333	A
2	3	34,0000		22,6667	A
1	3	32,0000		21,3333	A
5	3	30,3333		21,3333	A

Las medias no etiquetadas con la letra A son significativamente diferentes de la media del nivel de control.

En cuanto a la comparación con el uso del CAB-L se comprobó que no había diferencia significativa en las medias del índice de agallamiento de las formulaciones y el control para ambos tipos de suelos (Tabla 4.6). Esto demuestra que el uso de las formulaciones propuestas puede usarse para reemplazar formulaciones comerciales que utilicen el ingrediente activo de forma libre con el fin de disminuir el daño a las raíces de plantas piloto causado por *Meloigodyne spp.*

Tabla 4.6. Prueba de rangos múltiples de Fisher de los tratamientos respecto al control para suelo de Santander y Palmira.

CONCENTRACIONES	N	Suelo ST		Suelo PAL	
		Media	Agrupación	Media	Agrupación
6 (Control)	2	22,2667	A	8,8333	A
3	3	42,3333	A	30,0000	A
4	3	36,6667	A	23,3333	A
2	3	34,0000	A	22,6667	A
1	3	32,0000	A	21,3333	A
5	3	30,3333	A	21,3333	A

Las medias no etiquetadas con la letra A son significativamente diferentes de la media del nivel de control.

Se calculó la diferencia (en porcentaje) de la disminución del agallamiento de los controles y los controles negativos (sin plaguicida). Como las líneas de tendencia sugieren en la Figura 4.8, no hubo una mejora frente al blanco en el suelo de ST conforme se aumentaban la concentración de carbofurano encapsulado, de igual forma, el suelo de PAL tuvo un aumento en el índice de agallamiento conforme se aumentaban la concentración de carbofurano encapsulado.

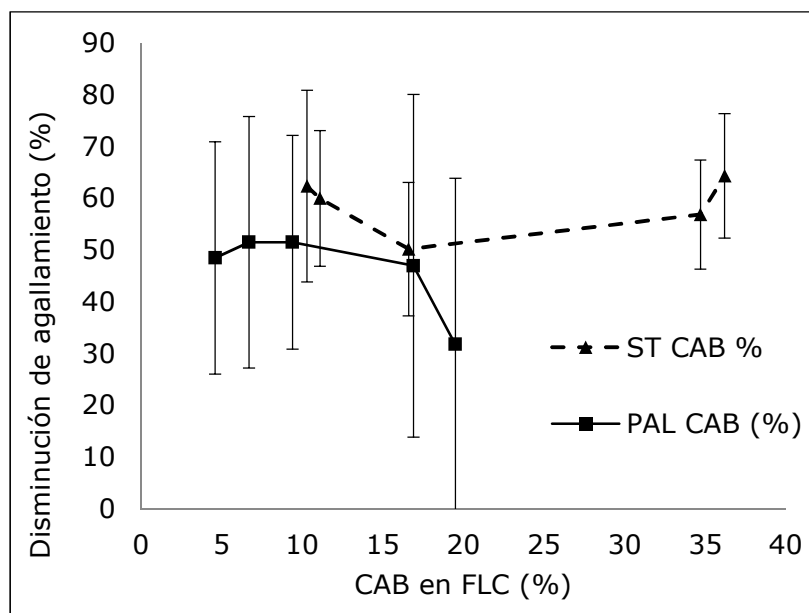


Figura 4.8. Mejor control nematocida de la FLC en el suelo de ST con menor desviación

Este fenómeno pudo ocurrir por varios factores, tanto de cinética de liberación como de movilidad. Sin embargo, esta tendencia se entiende como constante debido a que el rango en que oscila es muy estrecho. Por otra parte, se observa que en promedio para el suelo de ST la mejoría fue cercana al 60% y para Palmira al 50%, esto indica que, pese a los resultados del ANOVA, existe una mejora representativa de las formulaciones al ser comparadas con el control negativo.

Como se puede ver se encontró que las formulaciones de liberación controlada basadas en carbofurano quitosano son eficaces contra esta variedad de nemátodo que infecta los cultivos de tomate, pues se alcanza un control de un 50% en el índice de agallamiento, porcentaje considerado válido en el uso de formulaciones (Pankaj *et al.*, 2012), aún con el uso de las concentraciones más bajas usadas. Todas las plantas tratadas mostraron un mejor crecimiento que las plantas de control. Este nivel de crecimiento vegetativo implicaba que la tasa de fotosíntesis y la acumulación de materia seca eran más altas para las plantas tratadas que para las plantas de control.

4.2.4 Carbofurano residual en suelo.

Se realizó la cuantificación de carbofurano presente en los suelos a los 10 y 30 días del experimento con la finalidad de comprobar el supuesto de liberación. En las gráficas 4.9a y 4.9b se observa que las tendencias son crecientes en ambos tiempos, es decir,

que a mayor cantidad de carbofurano encapsulado se libera mayor cantidad de esta sustancia al medio

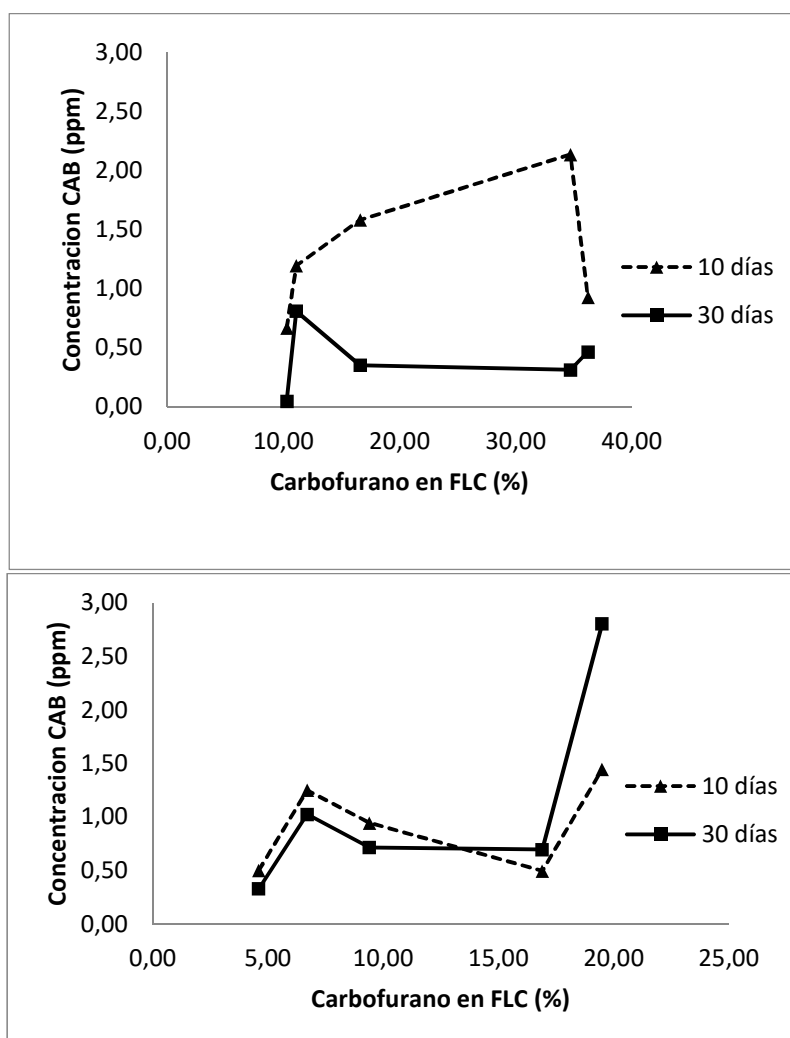


Figura 4.9. Concentración de carbofurano liberado respecto a la cantidad de carbofurano encapsulado en las diferentes formulaciones a los 30 días 10 días para el suelo de ST (a) y PAL (b).

Este hecho indica que se debe optar por trabajar con menores cantidades del ingrediente activo encapsulado para disminuir los daños en el medio ambiente con iguales resultados. Para el caso de ST se puede destacar que la concentración de carbofurano se queda en la parte superior del suelo, ya que a los 30 días se observó un aumento significativo en la pendiente, esto puede garantizarse debido a que las muestras fueron tomadas a la misma altura de las medidas de los 10 días. Esta observación podría suponer que existe una menor movilidad del carbofurano para este suelo en comparación con el suelo de PAL, vemos que sin embargo esto no ocurre y

que la pérdida se da por la degradación generada por el pH del suelo, pues se observa un fenómeno completamente inverso, en donde las concentraciones de carbofurano disminuyeron en el tiempo para las diferentes formulaciones evaluadas.

Los suelos de Santander y Palmira poseen un pH de 4.11 y 7.78, respectivamente, por esta razón lo que sugieren los resultados encontrados de tendencia creciente en el suelo de ST son congruentes con lo que se esperaba, ya que la liberación del carbofuran se da más efectivamente, es decir, se comprueba la hipótesis que plantea las cápsulas preparadas entregan el ingrediente activo sin la consecuente degradación por efecto de pH como sí ocurre con el suelo de PAL. Además, entre más cantidad de carbofurano se encuentra encapsulado, mayor será la cantidad liberada al medio para su uso.

4.3 CONCLUSIONES

La toxicidad encontrada para los nemátodos en forma de EC_{50} se halla dentro del rango de las concentraciones utilizadas y este valor sirve como un indicativo de no utilizar concentraciones indiscriminadas de carbofurano en el momento de preparar las capsulas para ser usadas en la nueva formulación.

El efecto nematicida encontrado en ambos tipos de suelos tratados (PAL y ST) con el carbofuran encapsulado se considera que fue efectivo pues se pudo comprobar su eficiencia al controlar el 50% de las afecciones causadas por la plaga en el tratamiento aplicado en plántulas piloto de tomate.

Los resultados encontrados sugieren que se descarte el uso de altas concentraciones de carbofurano encapsulado para el tratamiento de plántulas de tomate contra los nemátodos de estudio, debido a que el efecto nematicida no mejora al aumentarla, y si se aumentaría el remanente del ingrediente activo en el suelo.

4.4 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL H. *et al.*, A. Towards better modeling of chitosan nanoparticles production: screening different factors and comparing two experimental designs. *International journal of biological macromolecules*, **2014**, vol. 64, p. 334-340.

ADAKA, P., *et al.*, Evaluation of Controlled release formulations of Carbofuran against YMV in Soybean and their residues. *Ann. Pl. Protec. Sci*, **2015**, vol. 23, no 1, p. 127-130.

AGRAWAL, S. y Rathore, P., Nanotechnology pros and cons to agriculture: a review. *Int J Curr Microbiol App Sci*, **2014**, vol. 3, no 3, p. 43-55.

AKELAH, Ahmed. Novel utilizations of conventional agrochemicals by controlled release formulations. *Materials Science and Engineering: C*, **1996**, vol. 4, no 2, p. 83-98.

AKTAR, Wasim *et al*, Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdisciplinary toxicology*, **2009**, vol. 2, no 1, p. 1-12.

ALTIERI, M. A. y Nicholls, C. I., Biodiversidad y manejo de plagas en agroecosistemas. Icaria editorial, **2007**.

ANDRES M. F., Estrategias en el control y manejo de nemátodos fitoparasitos, *Ciencia y Medio Ambiente*, **2002**, 221-227

ANTONIOU, J., *et al.*, Physicochemical and morphological properties of size-controlled chitosan-tripolyphosphate nanoparticles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **2015**, vol. 465, p. 137-146.

ARIAS E., *et al.*, The mobility and degradation of pesticides in soils and the pollution of groundwater resources. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, **2008**, vol. 123, no 4, p. 247-260.

ARMENDÁRIZ B. B., *et al.*, Plant extracts: from encapsulation to application. *Expert opinion on drug delivery*, **2016**, vol. 13, no 8, p. 1165-1175.

ATIFI, A., *et al.*, In situ study of the photodegradation of carbofuran deposited on TiO₂ film under UV light, using ATR-FTIR coupled to HS-MCR-ALS. *Environmental science & technology*, **2013**, vol. 47, no 15, p. 8650-8657.

BALÁZS, N. y Sipos, P., Limitations of pH-potentiometric titration for the determination of the degree of deacetylation of chitosan. *Carbohydrate research*, **2007**, vol. 342, no 1, p. 124-130.

BAUTISTA B., *et al.*, Chitosan in the Preservation of Agricultural Commodities, **2016**.

BEN S. *et al.*, Controlling Gray Mould Caused by Botrytis Cinerea in Cucumber Plants by Means of Chitosan. *Crop Prot.*, **2003**, 22 (2): 285-290.

BERGER, J., *et al.*, Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics*, **2004**, vol. 57, no 1, p. 19-34.

BERMÚDEZ C. A., *et al.*, , Adsorption and desorption kinetics of carbofuran in acid soils, *Journal of Hazardous Materials*, **2011**, 190, 159-167

BERTH, G., *et al.*, Polyelectrolyte complexes and layer-by-layer capsules from chitosan/chitosan sulfate. *Biomacromolecules*, **2002**, vol. 3, no 3, p. 579-590.

BIBI, S., *et al.*, M. Chitosan/CNTs nanocomposite as green carrier material for pesticides controlled release. *Journal of Polymer Research*, **2016**, 23(8),

BRECHELT, A. El manejo ecológico de plagas y enfermedades. *Red de Acción en Plaguicidas y sus Alternativas para América Latina (RAP-AL)*. Fundación Agricultura y Medio Ambiente (FAMA). RD, **2004**.

BRUGNEROTTO, J., *et al.*, An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. *Polymer*, **2001**, vol. 42, no 8, p. 3569-3580.

BYBD D.W., *et al.*, An Improved Technique for Clearing and Staining Plant Tissues for Detection of Nematodes, *Journal of Nematology*, **1983**, 15(1):142-143.

CAI, Y. y Lapitsky, Y., Formation and dissolution of chitosan/pyrophosphate nanoparticles: is the ionic crosslinking of chitosan reversible?. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **2014**, vol. 115, p. 100-108.

CARVALHO, F. P. Agriculture, pesticides, food security and food safety. *Environmental science & policy*, **2006**, vol. 9, no 7-8, p. 685-692.

CASTAING, J., Uso de las arcillas en alimentación animal. A: *XIV Curso de especialización FEDNA. Avances en nutrición y alimentación animal. Expoaviga, Barcelona*, **1998**, p. 143-157.

CHAMORRO, A. F., y Sánchez A. R. A., Estudio De La Adsorción De Plomo En Suelos De La Región Minera En El Distrito De Buenos Aires En El Departamento Del Cauca, Colombia. *Revista de Ciencias*, **2012**, vol. 16, p. 145-160.

CHAN, E. S., *et al.*, Encapsulation of herbal aqueous extract through absorption with ca-alginate hydrogel beads. *Food and Bioproducts Processing*, **2010**, vol. 88, no 2-3, p. 195-201.

CHEMICALIZE Online Database en <https://chemicalize.com/>, última visita 05 junio de 2019.

CHEN C., *et al.*, The synergistic toxicity of the multiple chemical mixtures: implications for risk assessment in the terrestrial environment, *Environ. Int.* 77 (**2015**) 95-105.

CHEN, P. y Tsay, T. T. Effect of crop rotation on *Meloidogyne* spp. and *Pratylenchus* spp. populations in strawberry fields in Taiwan. *Journal of nematology*, **2006**, vol. 38, no 3, p. 339.

CHITWOOD, D. J., Nematicides. *Encyclopedia of agrochemicals*, **2003**.

CHOUDHARY, G. *et al.*, Development of controlled release formulations of carbofuran and evaluation of their efficacy against *Meloidogyne incognita*. *Journal of agricultural and food chemistry*, **2006**, vol. 54, no 13, p. 4727-4733.

CHOUDHARY, G., *et al.*, Controlled Release of Carbofuran in Water from some Polymeric Matrices. *Pesticide Research Journal*, **2006**, vol. 18, no 1, p. 65.

COSTA, P., *et al.*, Modeling and comparison of dissolution profiles. *European journal of pharmaceutical sciences*, **2001**, vol. 13, no 2, p. 123-133.

COYNE, D.L., *et al.*, Practical plant nematology: a field and laboratory guide. SP-IPM Secretariat, International Institute of Tropical Agriculture (IITA), **2007**, Cotonou, Benin.

DIMZON, I. K. D., Degree of deacetylation of chitosan by infrared spectroscopy and partial least squares. *International journal of biological macromolecules*, **2015**, vol. 72, p. 939-945.

DONG, Y., *et al.*, Scalable ionic gelation synthesis of chitosan nanoparticles for drug delivery in static mixers. *Carbohydrate polymers*, **2013**, vol. 94, no 2, p. 940-945.

DONOVAN, S., *et al.*, An overview of the chemistry, manufacture, environmental fate and detection of carbofuran. *Carbofuran and Wildlife Poisoning: Global Perspectives and Forensic Approaches*. UK: John Wiley & Sons, Inc, **2012**, p. 1-18.

DUBEY, S., *et al.*, Controlled release agrochemicals formulations: a review. **2011**.

EISLER, R., *Carbofuran hazards to fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic review*. Fish and Wildlife Service, US Department of the Interior, **1985**.

EL-KHAIRY, M. I., *et al.*, On the Use of Linearized Pseudo-Second-Order Kinetic Equations for Modeling Adsorption Systems. *Desalination* **2010**, 257 (1-3), 93-101.

EREL, G., *et al.*, Nanoencapsulated chitosan nanoparticles in emulsion-based oral delivery system: In vitro and in vivo evaluation of insulin loaded formulation. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, **2006**, 36:161-167.

ESPINOSA A., *et al.*, Interrelationship between the zeta potential and viscoelastic properties in coacervates complexes. *Carbohydrate polymers*, **2013**, vol. 95, no 1, p. 161-166.

EPA (Environmental Protection Agency), Carbofuran cancellation process, **2011**, disponible en: https://archive.epa.gov/pesticides/reregistration/web/html/carbofuran_noic.html, fecha de consulta: 20 de junio de 2019

EVERT, S., Environmental fate of Carbofuran. *California Environmental Protection Agency, Department of Pesticide Regulation, Sacramento*, **2002**.

FABREGAS, A., *et al.*, Impact of physical parameters on particle size and reaction yield when using the ionic gelation method to obtain cationic polymeric chitosan-tripolyphosphate nanoparticles. *Int.J. Pharm.* **2013**, 446:199-204.

FAN, W., *et al.*, Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **2012**, vol. 90, p. 21-27.

FERNANDEZ U., *et al.*, Development of controlled release formulations of alachlor in

ethylcellulose. *Journal of microencapsulation*, **2000**, vol. 17, no 3, p. 331-342.

FERNÁNDEZ P., *et al.*, Use of bentonite and activated carbon in controlled release formulations of carbofuran. *Journal of agricultural and food chemistry*, **2005**, vol. 53, no 17, p. 6697-6703.

GAN, Z., *et al.*, Cloning of the gene *Lecanicillium psalliotae* chitinase Lpch1 and identification of its potential role in the biocontrol of root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **2007**, vol. 76, no 6, p. 1309-1317.

GHORMADE, V. *et al.*, Perspectives for nano-biotechnology enabled protection and nutrition of plants. *Biotechnology advances*, **2011**, vol. 29, no 6, p. 792-803.

GILLMAN, G. P., Effects of pH and ionic strength on the cation exchange capacity of soils with variable charge. *Soil Research*, **1981**, vol. 19, no 1, p. 93-96.

GOGOS, A. *et al.*, Nanomaterials in plant protection and fertilization: current state, foreseen applications, and research priorities. *Journal of agricultural and food chemistry*, **2012**, vol. 60, no 39, p. 9781-9792.

GONZÁLEZ X., El ICA canceló el registro de plaguicidas químicos para uso agrícola (en línea), 27 de febrero de **2018**, disponible en: <https://www.agronegocios.co/agricultura/cancelan-registro-de-plaguicidas-quimicos-para-uso-agricola-2623263>, fecha de consulta: 25 de junio 2019.

GONZÁLEZ C. C.; *et al.*, Evaluación de un producto nematocida sobre nemátodos fitoparásitos del plátano Dominico Hartón (Musa AAB). *Acta agronómica*, **2014**, vol. 63, no 1, p. 1-12

GRENHA, A.. Chitosan Nanoparticles: A Survey of Preparation Methods. *J. Drug Target*, **2012**, 20 (4): 291-300.

GUPTA, R., Carbofuran toxicity. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A Current Issues*, **1994**, vol. 43, no 4, p. 383-418.

GUZMÁN P., Importancia de los nemátodos espiral, *Helicotylenchus multicinctus* (Cobb) Golden y *H. dihystra* (Cobb) Sher, en banano y plátano. *Agronomía*, **2011**, vol. 19, no 2, p. 19-32.

GUZMÁN, P. E. y Villegas B., Principales nemátodos fitoparásitos y síntomas ocasionados en cultivos de importancia económica, **2012**, *Agron.* 20 (1): 38 – 50.

HACK, Beate, *et al.*, Advanced agrochemical formulations through encapsulation strategies?. *Chemie Ingenieur Technik*, **2012**, vol. 84, no 3, p. 223-234.

HAGUE, N.G.M. y Gowen, S.R.. Chemical control of nematodes, In R.H. Brown & B.R. Kerry, eds. Principles and practice of nematode control in crops. **1987**, Academic Press., p.131-178.

HASENBEIN S., *et al.*, Environmentally relevant concentrations of herbicides impact non-target species at multiple sublethal endpoints, *Sci. Total Environ.* 607-608 (**2017**) 733-743.

HILDEBRANDT, A., *et al.*, Impact of pesticides used in agriculture and vineyards to surface and groundwater quality (North Spain). *Water Res.*, **2008**, 42, 3315–3326.

HOSSEINI, S. F., *et al.*, Two-step method for encapsulation of oregano essential oil in chitosan nanoparticles: preparation, characterization and in vitro release study. *Carbohydrate polymers*, **2013**, vol. 95, no 1, p. 50-56.

HOWELER, R. H.. Los suelos de Centro Internacional de Agricultura Tropical en Palmira, Colombia. Centro Internacional de Agricultura tropical, **1986**.

HUANG, Y. y Lapitsky, Y., Determining the colloidal behavior of ionically cross-linked polyelectrolytes with isothermal titration calorimetry. *The Journal of Physical Chemistry B*, **2013**, vol. 117, no 32, p. 9548-9557

IBÁÑEZ, J. J., **2006**, El Agua en el Suelo 4: Textura del Suelo y Propiedades Hídricas | Un Universo invisible bajo nuestros pies, <https://www.madrimasd.org/blogs/universo/2006/07/05/33887>, 3/7/2019

IBRAHIM, H. M., *et al.*, Effective approaches to study the plant-root knot nematode interaction. *Plant Physiology and Biochemistry*, **2019**.

INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACIÓN, NTC 3656, Gestión ambiental suelo. Toma de muestras de suelo para determinar contaminación, **2004**, Bogotá, Colombia.

INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACIÓN, NTC 1495, Suelos. Método de ensayo para determinar en el laboratorio el contenido de agua (humedad) de suelos y rocas, con base en la masa, **2013**, Bogotá, Colombia.

INTA, **2015**, Los plaguicidas agregados al suelo y su destino en el ambiente, ISBN 978-987-521-665-5.

JADA, M. Y.; *et al.*, I. Efficacy of carbofuran in controlling root-knot nematode (*Meloidogyne javanica* Whitehead, 1949) on cultivars of bambara groundnut (*Vigna subterranea* (L.) Verdc.) in Yola, Nigeria. *International Journal of Agronomy*, **2011**, vol. 2011.

JHA, Z., *et al.*, Nanotechnology: prospects of agricultural advancement. *Nano Vision*, **2011**, vol. 1, no 2, p. 88-100.

JYOTHI, N. *et al.*, Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency. *Journal of microencapsulation*, **2010**, vol. 27, no 3, p. 187-197.

JURADO, A., *et al.*, Emerging organic contaminants in groundwater in Spain: a review of sources, recent occurrence and fate in a European context. *Sci. Total Environ.*, **2012**, 440, 82–94.

KAMBLE, V., *et al.*, Microencapsulation of Cypermethrin Via Interfacial Polymerization for Controlled Release Application. *Materials Today: Proceedings*, **2018**, vol. 5, no 10, p. 22621-22629.

KASHYAP, P. L., *et al.*, Chitosan nanoparticle based delivery systems for sustainable agriculture. *International journal of biological macromolecules*, **2015**, vol. 77, p. 36-51.

- KIM, K., *et al.*, Exposure to pesticides and the associated human health effects. *Science of the Total Environment*, **2017**, vol. 575, p. 525-535.
- KORSMEYER, R. W., *et al.*, Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. *International journal of pharmaceutics*, **1983**, vol. 15, no 1, p. 25-35.
- KUMAR, S., *et al.*, Synthesis, characterization and on field evaluation of pesticide loaded sodium alginate nanoparticles. *Carbohydrate polymers*, **2014**, vol. 101, p. 1061-1067.
- KUMAR, M. y Philip, L. Adsorption and Desorption Characteristics of Hydrophobic Pesticide Endosulfan in Four Indian Soils. *Chemosphere* **2006**, 62 (7), 1064-1077
- KUMAR, J., *et al.*, Controlled release formulations of metribuzin: Release kinetics in water and soil. *Journal of Environmental Science and Health Part B*, **2010**, vol. 45, no 4, p. 330-335.
- KUMAR, S., *et al.*, Nano-based smart pesticide formulations: Emerging opportunities for agriculture. *Journal of Controlled Release*, **2019**, 294, 131-153.
- KUROZAWA, L. E., *et al.*, Hydrophilic food compounds encapsulation by ionic gelation. *Current Opinion in Food Science*, **2017**, vol. 15, p. 50-55.
- LABITE, H., *et al.*, **2013**. Comparison of pesticide leaching potential to groundwater under EU FOCUS and site specific conditions. *Sci. Total Environ.* 432-441
- LALAH, J. O.y Wandiga, S. O. Adsorption/desorption and mobility of carbofuran in soil samples from Kenya. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, **1996**, vol. 56, no 4, p. 575-583.
- LAPITSKY, Y. Ionically crosslinked polyelectrolyte nanocarriers: Recent advances and open problems. *Current opinion in colloid & interface science*, **2014**, vol. 19, no 2, p. 122-130.
- LEE, P. I. Diffusional release of a solute from a polymeric matrix—approximate analytical solutions. *Journal of membrane science*, **1980**, vol. 7, no 3, p. 255-275.
- LEWIS, D. H., y Cowsar, D. R. Principles of Controlled Release Pesticides. *Controlled Release Pesticides*, **1977**, 1-16.
- LI, Y., *et al.*, Preparation and characterization of citrus essential oils loaded in chitosan microcapsules by using different emulsifiers. *Journal of food engineering*, **2018**, vol. 217, p. 108-114.
- LIN, C., *et al.*, Hydrogels in controlled release formulations: network design and mathematical modeling. *Advanced drug delivery reviews*, **2006**, vol. 58, no 12-13, p. 1379-1408.
- LIU, Y. y Liu, Y. J., Biosorption isotherms, kinetics and thermodynamics. *Separation and Purification Technology*, **2008**, vol. 61, no 3, p. 229-242.
- MALAGON, D., **2003**, Ensayo Sobre Tipología De Suelos Colombianos - Énfasis En Génesis Y Aspectos Ambientales, Rev. Acad. Colomb. Cienc.: Volumen XXVII, número 104-SEPTIEMBRE

MALERBA, M., y Cerana, R., Chitosan effects on plant systems. *International Journal of Molecular Sciences*, **2016**, vol. 17, no 7, p. 996.

MARTÍNEZ, R.; *et al.*, Descripción de las características y propiedades de las unidades cartográficas de suelos. In Estudio general de suelos y zonificación de tierras. Departamento Del Cauca; Instituto Geográfico Agustín Codazzi, **2009**, Bogotá. p 255

MAYYAS y Remawi, Properties of chitosan nanoparticles formed using sulfate anions as crosslinking bridges. *American Journal of Applied Sciences*, **2012**, vol. 9, no 7, p. 1091.

MAZANCOVÁ, P., *et al.*, Dissociation of chitosan/tripolyphosphate complexes into separate components upon pH elevation. *Carbohydrate polymers*, **2018**, vol. 192, p. 104-110.

MERCADO G., S., *et al.*, Estudio de la adsorción de carbofurano en dos suelos colombianos de uso agrícola. Tesis de Pregrado, **2018**, Departamento de Química, Universidad del Valle

MCEWEN, F. L. y Davis, A. C. Tests with insecticides for seed-corn maggot control in lima beans. *Journal of Economic Entomology*, **1965**, vol. 58, no 2, p. 369-370.

MOGUL, M. G., *et al.*, Controlled Release of Biologically Active Agents for Purposes of Agricultural Crop Management. In Resources, Conservation and Recycling. **1996**, 16: 289-320.

MORA O. A., Evolución del carbofurano en suelos, memorias curso internacional de edafología, Sevilla, **1992**, p.26.

MORALES, J., *et al.*, Degradation of carbofuran and carbofuran-derivatives in presence of humic substances under basic conditions. *Chemosphere*, **2012**, vol. 89, no 11, p. 1267-1271.

MOTIEI, M., y Kashanian, S., Novel amphiphilic chitosan nanocarriers for sustained oral delivery of hydrophobic drugs. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **2017**, vol. 99, p. 285-291.

MWANGI, W. W., *et al.*, Facile method for forming ionically cross-linked chitosan microcapsules from Pickering emulsion templates. *Food Hydrocolloids*, **2016**, vol. 55, p. 26-33.

NAGA J. V. N., *et al.*, Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency. *Journal of microencapsulation*, **2010**, vol. 27, no 3, p. 187-197.

NAIR, R. S., *et al.*, An Evaluation of Curcumin-Encapsulated Chitosan Nanoparticles for Transdermal Delivery. *AAPS PharmSciTech*, **2019**, vol. 20, no 2, p. 69.

NASKAR, S., *et al.*, Chitosan-based nanoparticles as drug delivery systems: a review on two decades of research. *Journal of drug targeting*, **2019**, vol. 27, no 4, p. 379-393.

NAVAS, J.D., *et al.*, *Meloidogyne incognita* (Kofoid and White, 1919) Chitwood 1949 y *Meloidogyne arenaria* (Neal 1889) Chitwood 1949: Nemátodos de las nudosidades radiculares en Guayaba (*Psidium guajava* L.) cv manzana en Montería, Córdoba. *Temas Agrarios*, 2003, vol. 8, no 2, p. 15-21.

NERI B., M. C. y Chakraborty, S., Carbohydrate polymers as controlled release devices for pesticides. *Journal of Carbohydrate Chemistry*, **2019**, vol. 38, no 1, p. 67-85.

NIBLACK T., Nematodes, *Illinois agronomy handbook: 24th edition*, University of Illinois at Urbana-Champaign, College of Agriculture, Cooperative Extension Service, **2009**, Capitulo 15, 209-218.

NURUZZAMAN, M. D., et al., Nanoencapsulation, nano-guard for pesticides: a new window for safe application. *Journal of agricultural and food chemistry*, **2016**, vol. 64, no 7, p. 1447-1483.

OERKE, E.C., Crop losses to pests, *Journal of Agricultural Science*, **2006**, 144, 1, 31

OKENIYI, M. O., et al., Effect of botanical extracts on root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) infection and growth of cashew (*Anacardium occidentale*) seedlings. Academia Journal of Biotechnology, 2013, vol. 1, no 6, p. 081-086.

ORTIZ-H., et al., Pesticide biodegradation: mechanisms, genetics and strategies to enhance the process. En *Biodegradation-life of science*. IntechOpen, **2013**.

SÃO PEDRO, A., et al., The use of nanotechnology as an approach for essential oil-based formulations with antimicrobial activity. *Microbial Pathogens and Strategies for Combating Them (Méndez-Vilas, A., ed.) Formatex Research Center Publisher*, **2013**, vol. 2, p. 1364-1374.

PANKAJ, et al., Bioefficacy evaluation of controlled release formulations based on amphiphilic nano-polymer of carbofuran against *Meloidogyne incognita* infecting tomato. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, **2012**, vol. 47, no 6, p. 520-528.

PARADELO, M., et al., Influence of pore water velocity on the release of carbofuran and fenamiphos from commercial granulates embedded in a porous matrix. *Journal of contaminant hydrology*, **2012**, vol. 142, p. 75-81.

PATEL, B. K., et al., Development of oral sustained release rifampicin loaded chitosan nanoparticles by design of experiment. *Journal of drug delivery*, **2013**, vol. 2013.

PENICHE, C., et al., Chitosan: an attractive biocompatible polymer for microencapsulation. *Macromolecular Bioscience*, **2003**, vol. 3, no 10, p. 511-520.

PEÑA, A., et al., **2011**. Transport of dimethoate through a Mediterranean soil under flowing surfactant solutions and treated wastewater, *Colloid. Surface. A* 384, 507-512.

PERLATTI, B., et al., Polymeric Nanoparticle-Based Insecticides: A Controlled Release Purpose for Agrochemicals. *Insectic. - Dev. Safer More Eff. Technol.* No. September **2016**: 523-550.

PETEU, S. F., et al., Responsive polymers for crop protection. *Polymers*, **2010**, vol. 2, no 3, p. 229-251.

PPDB – Pesticides properties Database
<https://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/Reports/>

REDDY, M. V. B., *et al.*, **1999**. Chitosan Treatment of Wheat Seeds Induces Resistance to *Fusarium Graminearum* and Improves Seed Quality. *J. Agric. Food Chem.* 47 (3): 1208–1216.

RIGBY, D., *et al.*, Organic farming and the sustainability of agricultural systems. *Agricultural systems*, **2001**, vol. 68, no 1, p. 21-40.

RITGER, P. L. y Peppas,. A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs. *Journal of controlled release*, **1987**, vol. 5, no 1, p. 23-36.

RIZZATI V., *et al.*, Effects of pesticide mixtures in human and animal models: an update of the recent literature, *Chem. Biol. Interact.* 254, **2016**, 231–246.

RODRÍGUEZ L., *et al.*, Pesticide mobility and leachate toxicity in two abandoned mine soils. Effect of organic amendments, *Science of the Total Environment*, **2014**, 497–498, 561–569

ROY, A., *et al.*, Controlled pesticide release from biodegradable polymers. *Central European Journal of Chemistry*, **2014**, vol. 12, no 4, p. 453-469.

RUCKS, L., *et al.*, Propiedades físicas del suelo. *Universidad de la República: Facultad de agronomía. Montevideo, Uruguay*, **2004**.

SACCO, P., *et al.*, Insight into the ionotropic gelation of chitosan using tripolyphosphate and pyrophosphate as cross-linkers. *International journal of biological macromolecules*, **2016**, vol. 92, p. 476-483.

SAHOO, S., *et al.*, Kinetics of metribuzin release from bentonite-polymer composites in water. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, **2014**, vol. 49, no 8, p. 591-600.

SHAKIL, N. A., *et al.*, Development of poly (ethylene glycol) based amphiphilic copolymers for controlled release delivery of carbofuran. *Journal of Macromolecular Science®, Part A: Pure and Applied Chemistry*, **2010**, vol. 47, no 3, p. 241-247.

SHISHIR, M. R., *et al.*, Advances in micro and nano-encapsulation of bioactive compounds using biopolymer and lipid-based transporters. *Trends in food science & technology*, **2018**, vol. 78, p. 34-60.

SHU, X.Z. y ZHU, K.J., Controlled drug release properties of ionically cross-linked chitosan beads: the influence of anion structure. *International Journal of pharmaceutics*, **2002**, vol. 233, no 1-2, p. 217-225.

SHU, X. Z. y ZHU, K. J., The influence of multivalent phosphate structure on the properties of ionically cross-linked chitosan films for controlled drug release. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **2002**, vol. 54, no 2, p. 235-243.

SHUKLA, P. G., *et al.*, Crosslinked starch-urea formaldehyde (St-UF) as a hydrophilic matrix for encapsulation: studies in swelling and release of carbofuran. *Journal of Controlled Release*, **1991**, vol. 15, no 2, p. 153-165.

SHUKLA, P. G., *et al.*, Structure of carbofuran in crosslinked starch matrix by ^{13}C nmr: correlation of release and swelling kinetics with the dynamic behaviour of polymer chains. *Polymer*, **1992**, vol. 33, no 17, p. 3611-3615.

SIEPMANN, J., y Siepmann, F. Mathematical modeling of drug delivery. *International journal of pharmaceutics*, **2008**, vol. 364, no 2, p. 328-343.

SIEPMANN, J., Siepmann, F., Modeling of diffusion controlled drug delivery. *Journal of controlled release*, **2012**, vol. 161, no 2, p. 351-362.

SIKORA, R. A., *et al.*, Mode-of-action of the carbamate nematocides cloethocarb, aldicarb and carbofuran on *Heterodera schachtii*. 2. Systemic activity. **1991**.

SINGH, R. P. y Srivastava, G., Adsorption and movement of carbofuran in four different soils varying in physical and chemical properties. *Adsorption Science & Technology*, **2009**, vol. 27, no 2, p. 193-203.

SPOSITO, G. , The Chemistry of Soils, Oxford University Press, second edition, **2008**, pg 195

TAN, K. L., y Hameed, B. H., Insight into the Adsorption Kinetics Models for the Removal of Contaminants from Aqueous Solutions. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* **2017**, 74, 25-48.

TAYLOR, A.L. y Sasser, J.N. Biology, identification and control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* species). Universidad del Estado de Carolina del Norte (ed.), **1978**, Carolina del Norte, U.S.A

TRDAN, S., *Insecticides-Development of Safer and More Effective Technologies*. **2013**.

TSUJI, K. Microencapsulation of pesticides and their improved handling safety. *Journal of microencapsulation*, **2001**, vol. 18, no 2, p. 137-147.

USEPA, United States Environmental Protection Agency, Estimation programs interface suiteTM for Microsoft[®] Windows v4.11. Washington DC, USA, **2012**.

VALENCIA, E., *et al.*, Evaluación de La Adsorción-Desorción de ^{14}C -Carbofuran Y Furadan 3SC En Tres Suelos de Cundinamarca (Colombia). *Rev. Colomb. Química* **2008**, 37 (1), 79-92.

VINCEKOVIĆ, M., *et al.*, Innovative technologies for encapsulation of Mediterranean plants extracts. *Trends in food science & technology*, **2017**, vol. 69, p. 1-12.

VISHNUDASAN, D., *et al.*, Assessment of nematode resistance in wheat transgenic plants expressing potato proteinase inhibitor (PIN2) gene. *Transgenic research*, **2005**, vol. 14, no 5, p. 665-675.

VITHANAGE, M., *et al.*, Thermodynamics and Mechanistic Studies of Carbofuran Removal Using Biochars from Tea Waste and Rice Husks. *Chemosphere* **2016**, 150, 781-789.

WADHWA, B.K., *et al.*, Analysis of pesticide residues in soils. In: Nollet, L.M.L., Rathore, H.S. (Eds.), *Handbook of Pesticides: Methods of Pesticide Residues Analysis*.

CRC Press, Taylor and Francis Group, **2010**, Boca Raton London New York, pp. 583–585.

XU Y., *et al.*, Study on the preparation, characterization, and release behavior of carbosulfan/polyurethane microcapsules, *J. Appl. Polym. Sci.*, 133, **2016**, pp. 1-9.

YADAV, I. S., *et al.*, Pesticides Classification and Its Impact on Human and Environment. *Environment Science and Engineering*, **2017**, vol. 6.

YANG, Y., *et al.*, Preparation of an environmentally friendly formulation of the insecticide nicotine hydrochloride through encapsulation in chitosan/tripolyphosphate nanoparticles. *Journal of agricultural and food chemistry*, **2018**, vol. 66, no 5, p. 1067-1074.

ZHEN, Q., *et al.*, **2019**, Changes of solute transport characteristics in soil profile after mining at an opencast coal mine site on the Loess Plateau, China. *Science of the Total Environment* 665, 142–152

ZOU, X., *et al.*, Preparation and drug release behavior of pH-responsive bovine serum albumin-loaded chitosan microspheres. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, **2015**, vol. 21, p. 1389-1397.