



UNIVERSIDAD DE ALMERÍA

**Facultad de Ciencias Experimentales
Departamento de Química Física, Bioquímica y
Química Inorgánica**

**PREPARACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y
EVALUACIÓN DE FORMULACIONES DE
LIBERACIÓN CONTROLADA DE
CIROMAZINA**

**Ana Belén Siles Castellano
Almería, 2011**

PREPARACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE FORMULACIONES DE LIBERACIÓN CONTROLADA DE CIROMAZINA

Memoria presentada por Ana Belén Siles Castellano para la
evaluación del Trabajo Fin de Máster perteneciente al “Máster
en Residuos de Plaguicidas y Contaminantes. Control

Alimentario y Ambiental”

Almería, 11 de Julio de 2011

Tutores del alumno:

Fdo.: Prof. Dr. D. Manuel Fernández
Pérez, Profesor Titular de Universidad
del Departamento de Química Física,
Bioquímica y Química Inorgánica.
Facultad de Ciencias Experimentales.
Universidad de Almería.

Fdo.: Prof. Dr. D. Francisco Flores
Céspedes, Profesor Titular de
Universidad del Departamento de
Química Física, Bioquímica y Química
Inorgánica. Facultad de Ciencias
Experimentales. Universidad de
Almería.

El alumno:

Fdo.: Ana Belén Siles Castellano

ÍNDICE

ÍNDICE

PARTE I. PRESENTACIÓN	1
PARTE II. MEMORIA CIENTÍFICA	5
1.- INTRODUCCIÓN	6
1.1.-SISTEMÁTICA DE LA APLICACIÓN DE PLAGUICIDAS	6
1.2.-TÉCNICAS DE PREPARACIÓN DE LOS SISTEMAS DE LIBERACIÓN CONTROLADA	8
1.3.-PLAGUICIDA SELECCIONADO:CIROMAZINA	11
1.4.-FORMULACIONES ENSAYADAS	13
1.4.1.- Sistemas basados en matriz polimérica de alginato	13
1.4.2.- Sistemas basados en matrices monolíticas de lignina	17
1.5.- OBJETO Y ALCANCE	21
2.- MATERIALES Y MÉTODOS	22
2.1.- DESCRIPCIÓN DE LOS MATERIALES	22
2.1.1.- Plaguicida	22
2.1.2.- Materiales usados en la preparación de formulaciones de liberación controlada	22
2.1.2.1.- Ácido Algínico	22
2.1.2.2.- Antracita	22
2.1.2.3.- Carbón activado	23
2.1.2.4.- Ácido húmico	23
2.1.2.5.- Lignina	23

	<i>Índice</i>
2.1.2.6.- Polietilenglicol	23
2.2.- CARACTERIZACIÓN DE LOS MATERIALES	23
2.2.1.- Espectroscopía de absorción FT-IR	24
2.2.2.- Espectroscopía de absorción UV	24
2.2.3.- Análisis termogravimétrico (TGA)	24
2.2.4.- Calorimetría a diferencial de barrido (DSC)	24
2.2.5. Composición química	24
2.2.6. Superficie específica	26
2.3.- MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DEL PLAGUICIDA	27
2.4.- PREPARACIÓN , CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE LOS SISTEMAS DE LIBERACIÓN CONTROLADA BASADAS MATRIZ POLIMÉRICA DE ALGINATO	30
2.4.1.- Preparación de las formulaciones de liberación controlada	30
2.4.2.- Determinación del tamaño de gránulo	32
2.4.3. Determinación del contenido de ingrediente activo	32
2.4.4.- Determinación de las características cinéticas del proceso de liberación	33
2.5.-PREPARACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE LOS SISTEMAS DE LIBERACIÓN CONTROLADA BASADAS EN MATRICES MONOLÍTICAS DE LIGNINA	33
2.5.1.- Preparación de las formulaciones de liberación controlada	34
2.5.2.- Determinación del tamaño de gránulo	34
2.5.3.- Determinación del contenido de ingrediente activo	34
2.5.4.- Espectroscopía de absorción FT-IR	35

	<i>Índice</i>
2.5.5.- Análisis termogravimétrico (TGA)	35
2.5.6.- Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	35
2.5.7.- Determinación de las características cinéticas del proceso de liberación	35
3.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
3.1.- CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LA CIROMAZINA	36
3.1.1.- Espectroscopía de absorción FT-IR	36
3.1.2.- Espectroscopía de absorción UV	37
3.1.3.- Análisis termogravimétrico (TGA)	37
3.1.4.- Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	38
3.2.- CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LOS MATERIALES EMPLEADOS EN LA PREPARACIÓN DE FLCs	39
3.2.1.- Espectroscopía de absorción FT-IR	39
3.2.2.- Análisis termogravimétrico (TGA)	44
3.2.3.- Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	47
3.2.4.- Composición química	49
3.2.5.- Superficie específica	51
3.3.- PREPARACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN EN AGUA DE LAS FORMULACIONES DE LIBERACIÓN CONTROLADA BASADAS EN MATRIZ POLIMÉRICA DE ALGINATO	52
3.3.1.- Características y composición de las FLCs	52
3.3.2.- Determinación del tamaño de gránulo	53
3.3.3.- Estudio cinético de liberación de ciromazina en agua	55

3.3.4.- Ajuste de los datos experimentales de liberación de ingrediente activo al modelo de Ritger y Peppas	58
3.4.- PREPARACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN EN AGUA DE LAS FORMULACIONES DE LIBERACIÓN CONTROLADA BASADAS EN MATRICES MONOLÍTICAS DE LIGNINA	62
3.4.1.- Características y composición de las FLCs	62
3.4.2.- Determinación del tamaño de gránulo	63
3.4.3.-Espectros de absorción IR	65
3.4.4.- Análisis termogravimétrico (TGA)	66
3.4.5.- Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	67
3.4.6.- Estudio cinético de liberación de ciromazina en agua	69
3.4.7.- Ajuste de los datos experimentales de liberación de ingrediente activo al modelo de Ritger y Peppas	70
4.- PROPUESTAS SOBRE LA CONTINUACIÓN DEL TRABAJO	73
PARTE III: CONCLUSIONES	74
BIBLIOGRAFÍA	77

PARTE I. PRESENTACIÓN

Los contenidos del Máster “Residuos de Plaguicidas y Contaminantes. Control Alimentario y Ambiental”, se dividen en cuatro módulos:

Módulo I: Plaguicidas

Este módulo se centra en el estudio de los plaguicidas desde distintos puntos de vista, para ello se imparten las siguientes asignaturas:

- **Plaguicidas. Aplicaciones y tendencias;** en la cual se conocen los distintos tipos de plaguicidas en función de los grupos funcionales presentes en su estructura y se relaciona la estructura de un plaguicida con su actividad biológica.

También se adquiere la capacidad para decidir los aspectos funcionales y operacionales que permiten realizar un tratamiento fitosanitario óptimo desde un punto de vista técnico y la influencia que tiene su regulación sobre aspectos medioambientales y sobre la salud de las personas.

- **Políticas de seguridad alimentaria:** en la que se da a conocer el marco normativo regulador para el control de residuos de plaguicidas y contaminantes en el ámbito internacional, nacional y autonómico, como para conocer las medidas reguladoras de control de residuos de plaguicidas y contaminantes en alimentos.

- **Registro de plaguicidas:** se da a conocer el marco normativo y administrativo europeo, así como las herramientas necesarias para buscar e interpretar dicha normativa.

- **Formulaciones de plaguicidas. Liberación controlada,** en la que se adquieren conocimientos para el diseño, preparación, caracterización y evaluación de las formulaciones de liberación controlada de plaguicidas así como para el conocimiento de las aplicaciones agronómicas de las formulaciones de liberación controlada y su utilidad en la prevención de la contaminación por plaguicidas

Modulo II: Contaminantes

Las asignaturas comprendidas en éste módulo, tienen por objeto el estudio de los contaminantes alimentarios y ambientales, para ello se cursan las siguientes asignaturas:

- **Calidad y trazabilidad alimentaria;** en la que se desarrollan los criterios necesarios para establecer las características que determinan la calidad de un producto alimenticio y conocer los diferentes organismos, nacionales o internacionales, con competencias en la calidad alimentaria.
- **Contaminantes: Significación alimentaria y ambiental,** se basa en adquirir conocimientos sobre toxicología básica, y la evaluación de la toxicidad, toxicología alimentaria, considerando a los alimentos como vehículo de agentes potenciales con posibles acciones nocivas al organismo, de origen intrínseco al alimento o como consecuencia de la producción, procesado o manipulación de los alimentos y finalmente sobre Toxicología ambiental, considerando el ambiente como destino, fuente y reservorio de ciertos principios tóxicos.
- **Contaminación y remediación de suelos,** en la que se conocen los procesos relacionados con la contaminación y remediación de suelos, y los factores que afectan a la interacción entre un potencial contaminante y la fracción sólida del suelo, así como la mayor o menor situación de riesgo en el sistema suelo-agua para la protección de un ecosistema.

Modulo III: Gestión de laboratorios

Éste módulo se centra en el estudio de cómo se lleva a cabo la gestión de los laboratorios de ensayo; para ello se imparten las siguientes asignaturas.

- **Muestreo. Preparación de muestras,** en esta asignatura se conocen tanto los procedimientos de toma de muestra, su problemática y su importancia dentro del problema analítico como un paso fundamental, así como las principales técnicas para la separación y/o preconcentración de trazas, destacando distintos aspectos relacionados con la reducción de tiempo y coste.
- **Tratamiento de datos analíticos. Control de calidad,** en este caso la asignatura se centra en la importancia del tratamiento de datos en la calidad de los resultados; así como la trazabilidad y los materiales de referencia en la medida química para proceder a validar un método analítico.
- **Gestión de la calidad en laboratorios de ensayo,** aquí se conocen las normas y documentos que establecen los requisitos para implementar sistemas de gestión de la calidad en los laboratorios de ensayo y la diferencia entre las entidades

de certificación y acreditación de laboratorios, sus ámbitos de aplicación y características.

Modulo IV: Experimentación en técnicas cromatografías

Este módulo tiene por objeto el estudio de las distintas técnicas cromatografías, para ello comprende las siguientes asignaturas:

- **Espectrometría de masas**, en la que se estudian las distintas técnicas de ionización y tipos de analizadores de masas aplicables para el desarrollo de métodos de análisis de contaminantes
- **Exposición a plaguicidas**, en esta asignatura se conocen las distintas estrategias para la evaluación riesgos derivados del uso de los plaguicidas, tanto desde el punto de vista laboral como no-ocupacional.
- **Experimentación en técnicas cromatográficas**, en la que se aprende a optimizar, mantener y utilizar distintos equipos, como el cromatógrafo de gases, líquidos con diferentes configuraciones instrumentales, en el campo del control de residuos de plaguicidas.

PARTE II. MEMORIA CIENTÍFICA

1.-INTRODUCCIÓN

1.1.- SISTEMÁTICA DE LA APLICACIÓN DE PLAGUICIDAS

El uso excesivo de los plaguicidas para el control de plagas en los cultivos ocasiona problemas de contaminación ambiental. Esto ha motivado la búsqueda de nuevas metodologías y técnicas de aplicación más eficientes, con el fin de mejorar la eficacia en la utilización de los plaguicidas y disminuir el impacto sobre los ecosistemas.

Una de estas técnicas es la aplicación de formulaciones de liberación controlada (FLCs) del plaguicida directamente en las zonas de cultivo. En estos sistemas, el agente activo se encuentra contenido dentro de una estructura polimérica, la cual evita la dispersión descontrolada del plaguicida y mantiene la concentración del mismo dentro de los niveles de efectividad. Así mismo, se minimizan las pérdidas del ingrediente activo durante su aplicación, se emplean cantidades menores del plaguicida y se reduce el número de aplicaciones.

Los sistemas de liberación controlada es una tecnología reciente y ha venido a revolucionar las aplicaciones en el control de plagas. Algunos polímeros como la lignina y el alginato, han sido ampliamente utilizados para dosificar de forma controlada principios activos (Sáez, 2004).

Esta tecnología puede resolver una variedad de problemas relacionados con la aplicación de un principio activo de forma convencional, puesto que el tratamiento con estos agentes causa graves daños, ya que puede migrar fácilmente a través del agua y el aire. Además, cuando un principio activo se aplica como formulación de liberación controlada estos productos son más seguros para las personas que los manejan cuando están en contacto con los cultivos tratados durante la cosecha o postcosecha (Abd El-Mohdy, 2010)

Cuando se aplican por métodos convencionales, los plaguicidas están sujetos invariablemente a pérdidas tales como lixiviación, evaporación, escapes y degradación (biológica y química). Todas estas pérdidas hacen que el plaguicida tenga más difícil alcanzar su objetivo y produzca riesgos medioambientales, además de afectar a organismos que en principio no son su objetivo (Barbash, 2001; Knowles, 2007).

Para compensar estas pérdidas, la cantidad de plaguicida aplicada es superior a la requerida (Jiménez Gómez, 1992; M. Fernández Pérez 2007), ya que en la aplicación de los plaguicidas por medio de sistemas convencionales, el 60-90% del ingrediente activo nunca alcanza su objetivo (Mogul, 1996).

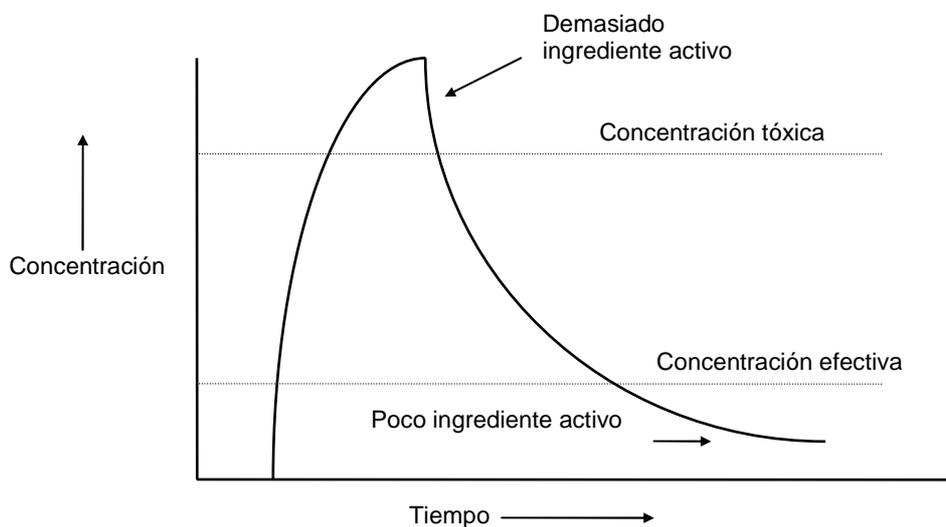


FIGURA 1.1.- Variación de la concentración de plaguicidas cuando se aplican por métodos convencionales

Tal como se muestra en la figura 1.1, cuando los plaguicidas son aplicados por métodos convencionales, se alcanzan concentraciones iniciales muy altas, superiores incluso al nivel de concentración tóxica, para inmediatamente disminuir su concentración por debajo del nivel mínimo de efectividad. Estas sobredosis, a menudo, causan problemas de toxicidad y efectos medioambientales adversos.

Toda la problemática anterior relativa a la eficacia y contaminación por plaguicidas cuando se aplican por métodos convencionales, puede ser mitigada, en gran medida, mediante el uso de sistemas de liberación controlada (figura 1.2). Estos sistemas regulan la aportación del plaguicida, permitiendo una concentración más baja y continuada de los mismos en el suelo. Por tanto, se consigue reducir las pérdidas por lixiviación y evaporación (Wilkins, 1990), manteniéndose siempre su concentración entre los límites correspondientes a la toxicidad y efectividad.

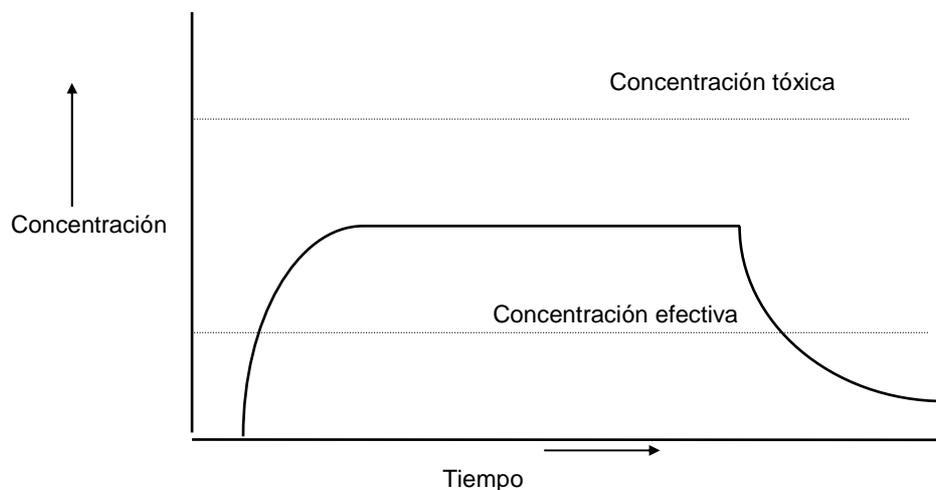


FIGURA 1.2.- Variación de la concentración de plaguicidas cuando se aplican por medio de sistemas de liberación controlada

En los sistemas de liberación controlada, los plaguicidas se encapsulan, es decir, se integran en una matriz polimérica, natural o sintética, o en sólidos inorgánicos de características adecuadas, ya sean disueltos, o bien unidos a ella física o químicamente. De esta forma, el ingrediente activo es liberado a través de procesos controlados por difusión, permitiendo que las pérdidas sean mínimas.

En agricultura, los objetivos primarios de la tecnología de liberación controlada son la mejora de la actuación sobre el blanco deseado y la eficacia de los agentes que protegen al cultivo, permitiendo una reducción de los problemas ambientales asociados a su aplicación.

1.2.- TÉCNICAS DE PREPARACIÓN DE SISTEMAS DE LIBERACIÓN CONTROLADA

Para preparar un sistema de liberación controlada, se deben tener en cuenta varios factores entre los que destacan:

- La tecnología de liberación controlada que encaja mejor con la aplicación, la forma física básica del sistema y la matriz polimérica.
- El agente activo que se va a utilizar.

La tabla 1.1 refleja las diferentes tecnologías de liberación controlada, incluyendo tanto sistemas físicos como químicos.

TABLA 1.1.- Clasificación de los Sistemas Poliméricos de Liberación Controlada

1.- SISTEMAS FÍSICOS	
A.-Sistemas de reserva con membrana controladora de velocidad	1.- Microencapsulación 2.- Macroencapsulación 3.- Sistemas membrana
B.-Sistemas de reserva sin membrana controladora de velocidad	1.- Fibras huecas 2.- Sustratos y espumas poliméricosporosos
C.- Sistemas monolíticos	1.- Físicamente disueltos en matriz noporosa, polimérica o elastómera. a.- No erosionables b.- Erosionables c.- Degradables 2.-Físicamente dispersos en matriz no porosa, polimérica o elastómera. a.- No erosionables b.- Erosionables c.- Degradables
D.- Estructuras laminadas	
E.- Otros métodos físicos	1.- Bombas osmóticas 2.- Adsorción sobre resinas de intercambio iónico
2.- SISTEMAS QUÍMICOS	
A.- Erosión química de la matriz polimérica	
B.- Adsorción sobre resinas de intercambio iónico	

De las diferentes tecnologías enumeradas en la tabla 1.1, la liberación de todos los sistemas está controlada, de una u otra manera, por la difusión del agente activo a través de la barrera que representa el agente polimérico, por difusión interna de un fluido medioambiental en el caso de mecanismos de “incorporación de un agente medioambiental” o por algún mecanismo homogéneo de “reacción química reversible” en los sistemas químicos.

En la siguiente tabla se muestran los posibles mecanismos de liberación a través de membranas y matrices poliméricas (Wilkins, 1990):

TABLA 1.2.- Mecanismos de liberación a través de membranas y matrices poliméricas

<i>Difusión</i>
<i>Hinchamiento y difusión</i>
<i>Degradación/erosión (hidrólisis, actividad biológica, fotólisis)</i>
<i>Fractura</i>
<i>Disolución</i>

La mayoría de formulaciones, independientemente del mecanismo de liberación de la tabla 1.2, implican liberaciones de primer orden controladas por la difusión, donde la velocidad de liberación es proporcional al tiempo, al menos hasta que sea liberado el 60% de ingrediente activo. Después, la velocidad disminuye exponencialmente con el tiempo, lo que produce una rápida liberación inicial. En los casos en los que la membrana o matriz es susceptible de sufrir hinchamiento, erosión o degradación, la velocidad de liberación puede ser más constante con el tiempo. Muchos sistemas erosionables y degradables han mostrado una velocidad de liberación proporcional al área superficial de la matriz y relativamente independiente de la concentración de ingrediente activo (Wilkins, 1990).

La mayoría de sistemas de liberación controlada se basan en la difusión del ingrediente activo a través de la membrana controladora de velocidad o matriz polimérica. El transporte a través de la membrana polimérica o matriz transcurre por un proceso de disolución-difusión, donde el ingrediente activo primero se disuelve y, posteriormente, difunde a través del polímero a la superficie externa, donde la concentración es más baja (Scher, 1999).

1.3.- PLAGUICIDA SELECCIONADO: CIROMAZINA

La ciromazina es un insecticida que pertenece al grupo químico de las triazinas. Su nombre químico (IUPAC) es *N-ciclopropil-1,3,5-triazina-2,4,6-triamina*, su fórmula empírica es $C_6H_{10}N_6$ y su fórmula estructural puede observarse en la figura 1.3.

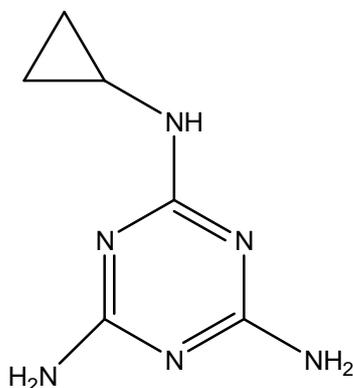


FIGURA 1.3.- Fórmula estructural de la ciromazina

PROPIEDADES FISICO-QUÍMICAS	
Estado físico	Sólido
Forma	Polvo
Color	Blanco tostado
pH	6-10 a 1%w/v
Solubilidad en agua	1300mg/L
Inflamabilidad (sólido, gas)	No altamente inflamable
Clase de explosión del polvo	Forma las nubes de polvo inflamable.
Energía mínima de ignición	< 0,5 kJ
Temperatura de ignición espontanea	250 °C
Propiedades comburentes	No oxidante
Propiedades explosivas	No explosivo
Densidad aparente	0,30 – 0,40 g/cm ³
Miscibilidad	Miscible
Punto de fusión	224,9°C

(Ficha de datos de seguridad de acuerdo el Reglamento (CE) No. 1907/2006)

La ciromazina es un insecticida sistémico, regulador del crecimiento de los insectos que interfiere los procesos de muda de las larvas de los insectos e impide la formación de pupas y adultos.

Es eficaz sobre las larvas de dípteros que han adquirido resistencia a los insecticidas convencionales. Posee acción por contacto e ingestión. Penetra en los tejidos de las hojas y es absorbido también por las raíces, translocándose por toda la planta. Sobre las larvas que atacan las hojas, su actividad es inmediata; sus efectos sobre las minas o galerías se observarán en su totalidad pasados unos días.

Aplicaciones autorizadas:

- Hortalizas (alcachofa, acelga, apio, berenjena, calabacín, lechuga, melón, pepinillo, pepino, sandía y tomate): minadoras de hojas (*Liriomyza spp.*).
- Champiñón: mosquitos del champiñón (*Sciáridos* y *Fóridos*).
- Patata: minadoras de hojas (*Liriomyza spp.*).
- Ornamentales y florales: minadoras de hojas (*Liriomyza spp.*)

INFORMACIONES SOBRE ELIMINACIÓN (PERSISTENCIA Y DEGRADABILIDAD)	
Estabilidad en el agua	Ciromazina es persistente en agua
Estabilidad en el suelo	Ciromazina no es persistente en el suelo
Movilidad	Ciromazina tiene una movilidad que varía entre baja y alta, en suelo
Bioacumulación	Ciromazina no se bioacumula

(Ficha de datos de seguridad de acuerdo el Reglamento (CE) No. 1907/2006)

1.4.- FORMULACIONES ENSAYADAS

Atendiendo a las propiedades físico-químicas que presenta el ingrediente activo seleccionado para nuestro estudio, emplearemos matrices poliméricas como medios encapsulantes, e investigaremos los agentes coadyuvantes de características más apropiadas para conseguir la encapsulación más efectiva.

Se pretende, por tanto, avanzar en el camino de la prevención de la contaminación agroambiental derivada de la utilización de plaguicidas (sin reducir la productividad agrícola). Con tal motivo se llevará a cabo el diseño, preparación y ensayo del sistema de liberación controlada del plaguicida ciromazina; lo que supone una alternativa a las formulaciones convencionales ya existentes.

De este modo se ha utilizado dos técnicas o dos tipos de sistemas de liberación controlada basados en polímeros biodegradables, que se describen a continuación:

- a) Sistemas basados en matriz polimérica de alginato
- b) Sistemas basados en matrices monolíticas de lignina

1.4.1.- Sistemas basados en matriz polimérica de alginato

El ácido algínico es un polisacárido natural que se encuentra en la pared celular de las algas pardas (*Phaeophyceae*). Está formado por residuos de ácido α -L-gulurónico y ácido β -D-manurónico unidos por enlaces 1,4-glicosídicos y ordenados en secuencias compuestas de unidades de ácido gulurónico, ácido manurónico o aquellas en las que se alternan el ácido gulurónico y el ácido manurónico. (Figura 1.4)

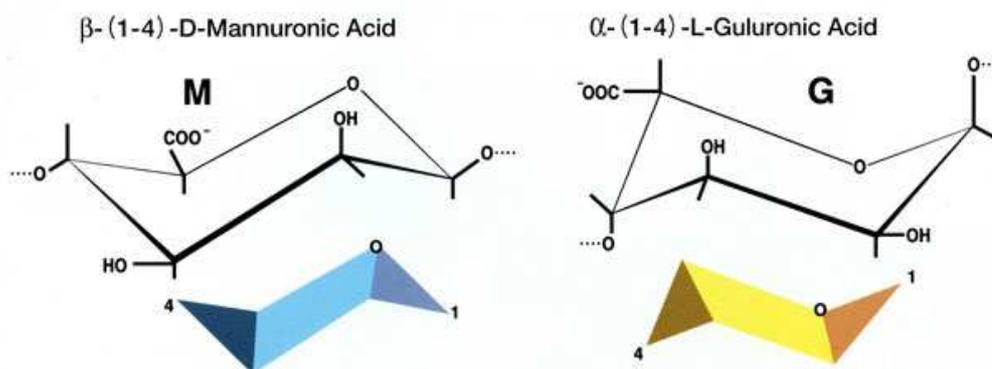


Figura 1.4. Estructura de las unidades monoméricas del alginato

La proporción de estos bloques varía entre las diferentes especies de algas (Baird, 1994). La principal fuente comercial de ácido algínico se basa en su obtención desde diferentes especies de algas de los géneros *Laminaria*, *Ascophyllum* *Macrocystis* (McHugh, 1991).

Para la obtención de ácido algínico, se sigue el siguiente procedimiento:

- Se realiza un tratamiento alcalino con el fin de extraer las sales algínicas (potásicas, sódicas, cálcicas y magnésicas) presentes en las algas.
- Estas sales se precipitan como sales cálcicas para finalmente obtener el ácido algínico y alginato sódico por tratamiento con un ácido y carbonato sódico.
- Las sales algínicas formadas con metales alcalinos son solubles en agua a pH neutro y moderadamente básico, donde el polímero adopta una configuración al azar con sólo débiles interacciones intra e intercatenarias. La forma ácida es insoluble a pH inferior a 3. Los enlaces glicosídicos entre los residuos de ácido gulurónico son di-axiales, resultando segmentos con una conformación de doble pliegue con cavidades hidrofílicas formadas entre los residuos del ácido gulurónico, como se muestra en la figura 1.5.

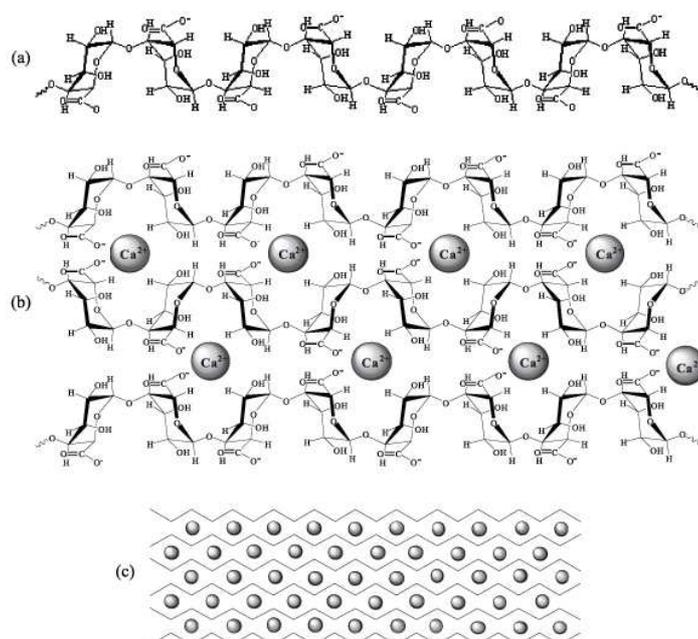


Figura 1.5.- Formación de los geles de alginato, homopolímeros del ácido gulurónico en disolución (a), unión de cadenas de homopolímero mediante iones Ca^{2+} (b) y formación del gel (c).

Sin embargo, los enlaces glicosídicos entre los restos manurónicos son di-ecuatoriales y dan lugar a la aparición de cadenas de ácido poli-manurónico en forma de cintas planas. En presencia de calcio, las cadenas de alginato se asocian preferentemente por dimerización de los segmentos de ácido gulurónico. Dicha dimerización se lleva a cabo a través de la coordinación del calcio con los grupos carboxílicos en el interior de la cavidad formada entre los ácidos gulurónicos, aunque también tiene lugar la agregación de dímeros y calcio enlazado en secuencias alternativas (Morris, 1978).

La gelificación del alginato también tiene lugar con otros cationes di- y polivalentes, tales como bario, cobre, aluminio y cromo, aunque el mecanismo de enlace del catión al alginato puede ser diferente con respecto al del calcio (Oracesca, 1992). La implicación predominante de bloques de poli-gulurónico en el proceso de gelificación da lugar a que los alginatos obtenidos de diferentes especies de algas marinas produzcan geles de características variadas dependiendo de la composición de los bloques del alginato. Una alta proporción de residuos de gulurónico, como ocurre en los alginatos procedentes de la especie *Laminaria*, produce geles más fuertes que aquellos formados con alginatos compuestos preferentemente de segmentos de ácido manurónico, tales como aquellos procedentes de *Macrocystis* (Martinsen, 1987).

Los alginatos han sido usados en la preparación de sistema de liberación controlada de varios plaguicidas, incluyendo insecticidas y herbicidas, dirigidos al control de plagas tanto a nivel acuático como terrestre (Garrido-Herrera, 2006; Flores-Céspedes, 2007; Singh, 2010).

Cuando una dispersión de alginato-plaguicida se pone en contacto con una disolución conteniendo metales di- o polivalentes, se forman gránulos esféricos de gel alginato que encapsulan al plaguicida. No obstante, estos geles hidratados no muestran propiedades adecuadas para controlar la emisión del plaguicida y éste se libera rápidamente hacia el medio acuoso (Connick, 1982). El gel que se ha formado tiene una estructura macroporosa, donde las moléculas con una masa molecular inferior o igual a $2 \cdot 10^4$ se difunden libremente hacia dentro y hacia fuera del mismo. Sin embargo, cuando el gel se seca sufre una contracción formándose enlaces adicionales entre cadenas poliméricas, dando lugar a la formación de una densa red que no se hincha hasta su tamaño original cuando de nuevo se coloca en agua. La

liberación del ingrediente activo desde estas estructuras altamente entrelazadas se ralentiza (Connick, 1982).

Los gránulos secos son sistemas monolíticos en los que el ingrediente activo está disperso en una matriz de alginato. En contacto con el medio de liberación, normalmente agua, el ingrediente activo se disuelve y sufre una difusión a través de la matriz hasta la superficie del gránulo, desde donde es liberado. Igualmente se ha comprobado que existe una correlación entre las velocidades de liberación y la solubilidad del ingrediente activo, tanto cuando el estudio se realiza con gránulos hidratados o cuando éste se realiza con gránulos secos (Pfister, 1986). En particular, la liberación de diferentes herbicidas desde los gránulos en los que el alginato es el único componente de la matriz es bastante rápida para moléculas tales como desmetryn (580 mg/L a 20°C) y monolinurón (735 mg/L a 25°C) (Bahadir, 1987). Es por ello que se han investigado distintas metodologías para ralentizar la liberación del plaguicida desde las matrices, entre los que destacan la incorporación de rellenos inertes y adsorbentes. Así, la incorporación de kaolinita en sistemas de liberación controlada, reduce en éstos el contenido de alginato, más caro, y retarda la liberación de ingrediente activo, llegándose a obtener distintos perfiles de liberación variando la cantidad de kaolinita en el gránulo. Además de la kaolinita se han usado ciertos agentes modificantes, entre los que se encuentran los sólidos adsorbentes clásicos como: bentonita, montmorillonita, carbón activado, gel de sílice o alúmina, entre otros (Garrido-Herrera, 2006; Flores-Céspedes, 2007; Singh, 2010). En los últimos años se han preparado, asimismo, formulados con adsorbentes cuyas propiedades han sido modificadas. Así, encontramos formulados de plaguicidas con bentonita sometida a distintos tratamientos ácidos, consiguiendo menores velocidades de liberación conforme más intenso es el tratamiento (Fernández-Pérez, 2004).

La incorporación de estos agentes modificantes confiere una gran versatilidad a estos sistemas, adaptando la velocidad de liberación del ingrediente activo a las necesidades de prevención de la plaga, en unas condiciones climatológicas y de cultivo determinadas.

Junto a los beneficios de ralentizar la liberación de plaguicida, los sistemas de liberación controlada basados en alginato no se desintegran como les ocurre a otros sistemas utilizados en otros trabajos experimentales, tales como los de carboximetilcelulosa (Connick, 1984) y almidón entrelazado (Wienhold, 1992). Esto

significa que no tienen lugar liberaciones inesperadas por rotura de gránulos y así se pueden hacer predicciones más fiables sobre la liberación del ingrediente activo.

1.4.2.- Sistemas basados en matrices monolíticas de lignina

El término general de lignina se refiere a un material polifenólico formado en la pared celular de la mayoría de las plantas, donde está fuertemente asociada a los carbohidratos. Durante el crecimiento y diferenciación de las células de las plantas, la lignina se sitúa entre las capas de celulosa y se enlaza covalentemente en el interior de la estructura de la pared celular. Este proceso ocurre una vez que ha finalizado la expansión y la diferenciación es completa. Por lo tanto, la lignina es, después de la celulosa, el segundo polímero natural más abundante (Glasser, 1990).

Como ya se ha comentado, se encuentra en todas las plantas y además constituye, aproximadamente, una cuarta parte del peso de la madera seca. Las ligninas son desechos o subproductos de la mayoría de las industrias forestales y agrícolas de todo el mundo. Se obtienen como un subproducto del proceso de extracción de la celulosa o producción de papel. Tiene fácil disponibilidad, es económica, versátil y no presenta toxicidad, por lo que es ideal como agente formulador de sistemas de liberación controlada de plaguicidas, teniendo además la ventaja de ser biodegradable y protectora de la radiación UV (Dellicolli, 1977).

La lignina es un biopolímero formado por unidades de fenilpropano (C₉) unidas al azar mediante enlaces éter o enlaces carbono-carbono. Es un polímero altamente aromático y rico en contenido de oxígeno debido al elevado número de grupos funcionales hidroxilos, metoxilos y grupos carbonilos (Davin, 2005).

La estructura de la lignina aislada por algunos métodos no suele presentar una repetición regular del monómero, por lo que es un material amorfo. Por lo tanto, no puede representarse una estructura exacta, pero sí una estructura representativa basada en la frecuencia de las distintas partes. En la figura 1.10 se muestra una pequeña sección del polímero en la que se observan los típicos enlaces químicos de la lignina.

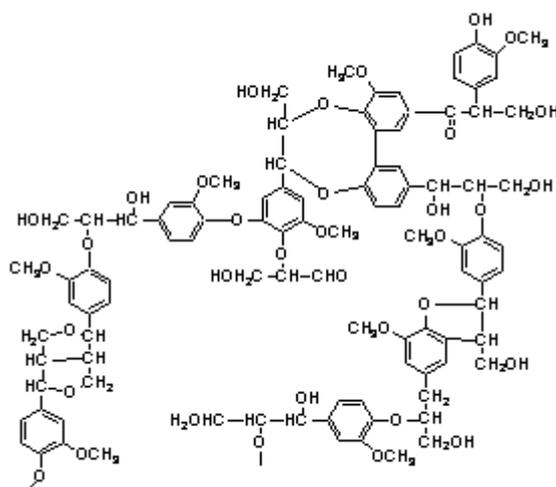


FIGURA 1.10.- Estructura representativa de una sección de la lignina

Usualmente la lignina se divide en dos clases: ligninas guaiacyl y ligninas guaiacyl-syringyl, de acuerdo con la proporción de unidades C₉ guaiacyl (G), syringyl (S) y p-hidroxilfenilpropano que forman el polímero (Glasser, 1990). La estructura de las unidades C₉ se muestran en la figura 1.11. Las diferencias en la relación (unidades syringyl/unidades guaiacyl) entre ligninas de variadas fuentes han sido atribuidas a diferencias en la genética y en las condiciones del estrés del crecimiento de la planta (Kärkönen, 2010). Las ligninas de madera blanda, por ejemplo la lignina kraft, son del tipo guaiacyl, mientras que las ligninas de madera dura son del tipo guaiacyl-syringyl.

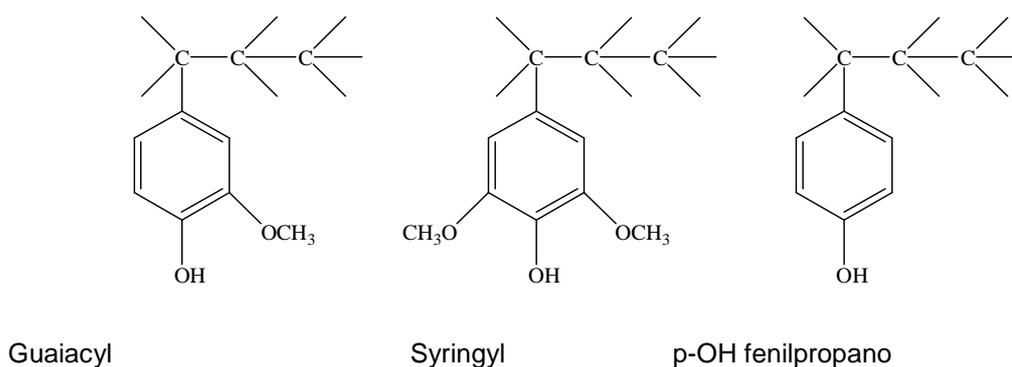


FIGURA 1.11.- Estructura de las unidades guaiacyl, syringyl y p-hidroxilfenilpropano

En lo que respecta a la extracción de la lignina de la madera, se pueden distinguir tanto procesos físicos como químicos. La estructura química de la lignina en el interior de las plantas (lignina nativa) no es conocida debido a los cambios que sufre

durante la separación de los tejidos de las plantas en los procesos de obtención. Entre los diversos métodos químicos de extracción de la lignina que existen, el proceso original usa álcalis acuosos (soda) y se ha desarrollado en los métodos comerciales *kraft* y *sulfito*. Las propiedades físicas y químicas de las ligninas dependen de la fuente genética y del método de extracción (Glasser, 1983). Particularmente, con el método *sulfito*, se obtiene como producto la lignina sulfonada, y en el proceso *kraft* se obtiene la lignina *kraft*. Cada tipo de lignina ha sufrido un proceso de extracción distinto, originando distintas propiedades en las mismas; mientras el método *sulfito* origina lignina hidrofílica, que se disuelve en agua, la lignina resultante del método *kraft* es hidrofóbica.

La lignina estudiada en el presente trabajo es una lignina *kraft* denominada *Indulin AT* y es el subproducto del proceso *kraft*, el cual es el más importante de entre todos los métodos de obtención de celulosa en el mundo. En este proceso *kraft* la lignina es separada de los carbohidratos en un medio básico conteniendo iones sulfito en la relación 3:1 (hidróxido sódico/sulfuro de sodio) (Minor, 1982).

Las ligninas *kraft* son aisladas como un polvo marrón, con densidades comprendidas entre 1,3 y 1,4 g cm⁻³, son insolubles en agua y medios ácidos, pero solubles en disoluciones alcalinas, en algunos disolventes orgánicos oxigenados y en aminas. Las ligninas no funden, pero si se ablandan o se suavizan con calentamiento (Goheen, 1982). Del estudio comparativo de varias ligninas con la lignina *kraft* se concluye que esta última es de las más reactivas debido a su mayor contenido en OH fenólicos y más bajo contenido en OCH₃ (Nada, 1998).

La primera formulación de liberación controlada de plaguicidas basada en matriz de lignina fue desarrollada en la Universidad de Washington, Seattle, USA. La matriz fue formada disolviendo la lignina *kraft* y el plaguicida en dioxano, seguido de la evaporación del disolvente. El proceso fue patentado por Allan (1971). Un método alternativo de formación de matrices lignínicas es simplemente por calentamiento del plaguicida y la lignina bajo condiciones de fusión. Cuando se calienta con ciertos plaguicidas a temperaturas por encima de sus puntos de fusión, la lignina es solvatada o plastificada por el plaguicida, y al enfriarse dicha mezcla fundida, ésta se transforma en un matriz sólida que posteriormente puede granularse en un molino (Wilkins, 1990). Este método de fusión para la formación de matrices de lignina es muy simple y tiene la ventaja de no requerir disolventes en su formación.

Usando el método de fusión para formar la matriz de lignina se han formulado un gran número de pesticidas. Entre ellos se encuentran el insecticidas imidacloprid y ciromazina, los herbicidas cloridazona y metribuzina (Garrido-Herrera, 2009; Fernández-Pérez, 2010). El proceso es posible para plaguicidas sólidos que sean compatibles con la lignina (Dellicolli, 1977). En cuanto a la compatibilidad de lignina y plaguicida, ésta será alta, en principio, si los parámetros de solubilidad de ambos componentes son similares (Dellicolli, 1980).

Se han estudiado formulaciones de liberación controlada en las que los plaguicidas implicados se enlazan covalentemente a la lignina o materiales lignocelulósicos (Jagtap, 1983). Así, herbicidas de ácidos carboxílicos, tales como el 2,4-D, forman un enlace covalente entre los grupos hidroxilo de la lignina y los grupos ácidos de este tipo de plaguicidas. El ingrediente activo se libera por la hidrólisis de dicho enlace controlando, de esta forma, la liberación (Allan, 1980).

La capacidad de las ligninas *kraft* para interaccionar con los plaguicidas conduce al desarrollo de composiciones de formulados que reducen el lixiviado de cloridazona y metribuzina (Fernández-Pérez, 2010). La lignina *kraft* contiene grupos hidroxilo, carboxilo, metoxilo y carbonilo, pudiendo adsorber potencialmente a los plaguicidas por enlaces de hidrógeno, enlace iónico o fuerzas de Van der Waals (Riggle, 1992).

1.5.- OBJETO Y ALCANCE

El objetivo fundamental del trabajo que se da cuenta en la presente memoria es investigar la potencial aplicabilidad de materiales carbonosos tales como carbón activado, ácido húmico y carbón antracita, así como materiales poliméricos biodegradables tales como lignina, polietilenglicol y el alginato sódico para ser utilizados en la preparación de nuevas formulaciones de liberación controlada de plaguicidas con una elevada solubilidad en agua tal y como sucede con el insecticida ciromazina.

Para llegar a conseguir el objetivo planteado, el trabajo se ha dividido en tres fases bien diferenciadas:

En la primera de ellas se da cuenta de la preparación de sistemas de liberación controlada de ciromazina, utilizando como agentes encapsulantes materiales biodegradables, tales como el alginato sódico, la lignina, y el polietilenglicol a los cuales se les han añadido diferentes modificantes tales como carbón activado, antracita y ácido húmico mediante técnicas tales como la encapsulación en hidrogeles y la fusión con lignina.

En la segunda fase se procedió a la caracterización de las formulaciones de liberación controlada preparadas, a través de estudios de espectroscopía de absorción infrarroja, análisis termogravimétrico, calorimetría diferencial de barrido y microscopía óptica de las formulaciones preparadas. Esto ha permitido la familiarización con diferentes técnicas de caracterización de materiales.

Por último, en la tercera fase se lleva a cabo la evaluación de la eficacia de las formulaciones, en medio acuoso, a través del estudio de los procesos cinéticos de liberación del ingrediente activo y la aplicación de modelos que permitan establecer el mecanismo de liberación.

En cuanto a los objetivos formativos perseguidos, se encaminan a la realización del trabajo proyectado en cada una de las fases anteriormente comentadas.

Finalmente, la búsqueda de información bibliográfica para cubrir los aspectos relativos a los estudios llevados a cabo en cada fase, ha permitido el acceso y conocimiento de las fuentes bibliográficas, tanto de publicaciones periódicas como de monografías especializadas.

2.- MATERIALES Y MÉTODOS

2.1.- DESCRIPCIÓN DE LOS MATERIALES

2.1.1.- Plaguicida

Para la realización del trabajo presentado en esta memoria, se han utilizado las muestras de plaguicida, que se detallan:

- *Plaguicida de grado analítico:*
 - Ciromazina, patrón analítico de pureza mínima igual al 99,9% y masa molecular 166,18 g mol⁻¹, suministrado por la casa Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Germany).

Dicho patrón se considera de pureza adecuada para este estudio.

- *Plaguicida de grado técnico:*
 - Ciromazina, de grado técnico de pureza mínima igual a 99%, suministrado por Industrias Afrasa S.A. (Valencia, España).

2.1.2.- Materiales usados en la preparación de formulaciones de liberación controlada

2.1.2.1.- Ácido algínico

Como matriz polimérica para la preparación de sistemas de liberación controlada se ha utilizado el ácido algínico, como sal sódica, obtenido a partir de *Macrocystis Pyrifera*, que nos fue suministrado por Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Germany).

2.1.2.2.- Antracita

Se ha utilizado como modificador un carbón mineral tipo antracita en polvo, 100% puro, procedente de Peñarroya-Puebl Blanco (Córdoba), que nos ha sido suministrado por la Central Térmica de Puente Nuevo. En lo sucesivo la denominaremos como An.

Dicha antracita en polvo fue sometida a un proceso de calentamiento a 110 °C, hasta pesada constante, sin necesidad de molturación. Se continuó con un tamizado

de la misma, recogiendo la fracción de tamaño de partícula menor a 100 μm y, posteriormente, se volvió a secar a 110 $^{\circ}\text{C}$.

2.1.2.3.- Carbón activado

El carbón activado en polvo, químicamente puro, nos fue suministrado por la casa Panreac. En lo sucesivo lo denominaremos como C.

Dicho carbón activado en polvo tan sólo fue sometido a un proceso de calentamiento a 110 $^{\circ}\text{C}$, hasta pesada constante, sin necesidad de molturación ni tamizado.

2.1.2.4- Ácido húmico

El ácido húmico utilizado nos ha sido suministrado por la casa Fluka. Su contenido en cenizas es del 20 % y posee una masa molecular relativa (Mr) comprendida entre 600-1000. En lo sucesivo lo denominaremos como AH.

Dicho ácido húmico fue sometido a un proceso de molturación y tamización hasta un tamaño de partícula de diámetro menor o igual a 150 μm .

2.1.2.5.- Lignina

Para la preparación de los sistemas de liberación controlada se ha utilizado lignina kraft (Indulin AT) (L), que nos fue suministrada por Westvaco Corporation (Charleston, SC, USA).

2.1.2.6.- Polietilenglicol

Se utilizó polietilenglicol (PE), de peso molecular 1000 g mol^{-1} suministrado por la casa Fluka Chemie AG (Buchs, Switzerland).

2.2.- CARACTERIZACIÓN DE LOS MATERIALES

2.2.1.- Espectroscopía de absorción FT-IR

Los espectros de absorción FT-IR de los materiales utilizados en la preparación de las formulaciones de liberación controlada se obtuvieron utilizando un equipo de la casa *Bruker*, modelo FT-IR Raman VERTEX 70, a partir de un comprimido de bromuro potásico sólido en el que se había dispersado la sustancia objeto de estudio en cada

caso. El intervalo de número de onda explorado fue el comprendido entre 4000 cm^{-1} y 400 cm^{-1} .

2.2.2.- Espectroscopía de absorción UV

Los espectros de absorción en la zona ultravioleta de la ciromazina utilizada en la preparación de las formulaciones de liberación controlada se obtuvo utilizando un espectrofotómetro de la casa *Shimadzu*, modelo UV-1700, a partir de una disolución acuosa de concentración perfectamente conocida, explorándose la zona comprendida entre 200 y 350 nm.

2.2.3. Análisis termogravimétrico (TGA)

Se procedió a la obtención de los termogramas en aire usando un analizador termogravimétrico de la casa *TA Instruments*, modelo *TGA Q50*, aplicando una rampa de temperatura de 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ y explorando la región comprendida entre 20 $^{\circ}\text{C}$ y 900 $^{\circ}\text{C}$.

2.2.4. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Para la obtención de los curvas DSC de los productos utilizados para la preparación de las formulaciones de liberación controlada se ha utilizado un equipo de la casa *TA Instruments*, modelo *DSC Q20*, en atmósfera de nitrógeno y cápsula sellada, explorando la región entre 20 y 300 $^{\circ}\text{C}$ a una velocidad de 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

2.2.5.- Composición química

La proporción de volátiles de la antracita viene dada por la pérdida de peso de una muestra seca por calentamiento a temperaturas entre 875 $^{\circ}\text{C}$ y 1050 $^{\circ}\text{C}$, fuera del contacto con el aire, siendo equivalente este contenido de materia volátil, generalmente, con la fracción orgánica (Cloutis, 2003). El contenido en cenizas se determina por combustión en aire; el residuo, expresado como tanto por ciento con respecto del peso original de la muestra, constituye la expresión de este parámetro.

Al ácido húmico, lignina y carbón antracita utilizados en nuestro estudio se le ha determinado el contenido en C, H, N, y S en los Servicios centrales de Investigación de la Universidad de Almería, utilizando para ello un equipo de análisis elemental de la casa Elementar, modelo Vario Micro: Analizador Elemental CHNS-O. Esta determinación requiere la combustión de la muestra en un horno en torno a los

1200 °C. Los gases generados son impulsados con un gas portador (helio) a través de unos reactivos que reducen el número de especies gaseosas presentes en la mezcla resultante de la combustión. A continuación, pasan a un cromatógrafo de gases con detector de conductividad térmica (TCD) que permite medir N₂, CO₂, H₂O y SO₂.

Para obtener la acidez total del ácido húmico hemos utilizado el método propuesto por Schnitzer y Gupta (Schnitzer, 1965, 1982), basado en la neutralización de los hidrógenos ionizables -presentes en grupos -COOH aromáticos y alifáticos y en grupos -OH fenólicos de las sustancias húmicas- con hidróxido de bario y posterior valoración del hidróxido añadido con ácido clorhídrico. Para ello se pesaron 100 mg de muestra en cada caso y se le adicionó 20 mL de una disolución de Ba(OH)₂ 0,1 M, desplazando el aire presente en el matraz con una corriente de nitrógeno. Las muestras se agitaron durante 24 horas a temperatura ambiente, y el líquido sobrenadante obtenido tras la centrifugación se valoró por retroceso con ácido clorhídrico 0,5 M.

Los grupos -COOH presentes en el ácido húmico se determinaron utilizando el método propuesto por Schnitzer y Wright (Schnitzer, 1965, 1982), basado en la valoración del ácido acético liberado al tratar los materiales húmicos con una solución de acetato cálcico. Para ello, se pusieron en contacto 100 mg de material húmico con 10 mL de acetato cálcico 0,5 M y 40 mL de agua destilada libre de CO₂. Las muestras se agitaron durante 24 horas a temperatura ambiente, y el líquido sobrenadante obtenido tras la centrifugación se valoró por retroceso con hidróxido sódico 0,1 M. Para el proceso de centrifugado se utilizó una centrifuga de la casa BGH Hermle, modelo ZK 401.

Se dispuso del correspondiente blanco, expresándose finalmente los resultados de acidez total y grupos -COOH, como miliequivalentes por gramos de material húmico. La cantidad de grupos -OH fenólicos se puede calcular de la siguiente forma según Schnitzer (Schnitzer , 1982):

$$(\text{Acidez total}) - (\text{grupos -COOH}) = \text{grupos -OH fenólicos (meq/g)}$$

En cuanto a la composición química del carbón activado, ésta nos ha sido suministrada por la casa Panreac, indicando que dicho carbón sólo presenta las siguientes impurezas: 0,2% Cl⁻; 0,005% Cu; 0,05% Fe; 0,005% Ni y 0,005% Pb.

Para la valoración de los grupos de naturaleza básica presentes en la superficie de dicho carbón activado se siguió el método descrito por Boehm (Boehm, 1994). Para ello, 0,25 g de muestra se pusieron en contacto con 25 mL de una solución de HCl (0,1 M), y se mantuvo la suspensión durante 48 horas con agitación continua a 25 °C. Transcurrido este tiempo, se filtró y la disolución sobrenadante se valoró por retroceso con hidróxido sódico, determinándose la cantidad de grupos básicos del carbón.

La determinación de la concentración de grupos ácidos se llevó a cabo con bases de distinta fortaleza siguiendo el método descrito por Boehm (Boehm, 1994). Para ello se pesaron diferentes porciones de muestra (0,15 g) y se pusieron en suspensión en 25 mL de disoluciones de NaHCO₃ (0,1 M), Na₂CO₃ (0,05 M) y NaOH (0,1 M), manteniéndose al igual que en el caso anterior con agitación continua a 25 °C durante 48 horas. Pasado este tiempo, las disoluciones sobrenadantes se valoraron con ácido clorhídrico, determinándose las cantidades consumidas de las diferentes bases por retroceso.

Teniendo en cuenta que el NaHCO₃ valora sólo grupos carboxílicos, que el Na₂CO₃ valora los grupos carboxílicos y lactónicos y que el NaOH valora los grupos carboxílicos, lactónicos y fenólicos, se calcularon los grupos ácidos de diferente naturaleza mediante las siguientes expresiones:

$$\text{meq Grupos Carboxílicos} = \text{meq NaHCO}_3$$

$$\text{meq Grupos Lactónicos} = \text{meq Na}_2\text{CO}_3 - \text{meq NaHCO}_3$$

$$\text{meq Grupos Fenólicos} = \text{meq NaOH} - \text{meq Na}_2\text{CO}_3$$

2.2.6.- Superficie específica

Para la determinación de la superficie específica de cada uno de los adsorbentes utilizados en este trabajo, previamente desecados a 110 °C, se ha empleado un analizador de superficies de gases de la casa Micromeritics modelo Gemini II- 2370.

La temperatura de trabajo se consiguió utilizando un baño de nitrógeno líquido (77,4 K) y como adsorbato se utilizó en todos los casos nitrógeno, con una pureza del 99,98 %.

Las muestras estudiadas se desgasificaron a 110 °C durante el tiempo necesario para eliminar las especies fisisorbidas en la superficie del adsorbente.

Operando de esta manera se puede determinar el área superficial, volumen de la monocapa y volumen de microporos del adsorbente.

2.3.- MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DEL PLAGUICIDA

Para la realización del trabajo era necesario disponer de un método analítico que permitiera la determinación de la concentración de las distintas disoluciones de ctiromazina, lo suficientemente preciso y fiable teniendo en cuenta la distinta naturaleza de las matrices, que pudieran interferir en las medidas.

Tras una amplia revisión bibliográfica, se llegó a la conclusión que el método más útil, de acuerdo con los equipos disponibles y con la naturaleza de nuestro trabajo, era la determinación por cromatografía líquida de alta resolución.

Para ello se utilizó un equipo cromatográfico de la casa *Beckman Coulter Inc.* System Gold HPLC (Fullerton, CA, USA) con bomba de gradiente, modelo 126, detector diodo array, modelo 168, inyector automático, modelo 508 y software 32 Karat.

Después de un estudio de los métodos de cromatografía líquida descritos en bibliografía para este plaguicida (Yokley, 2000), se fijaron las condiciones de operación y variables del sistema cromatográfico que se detallan a continuación:

- **Fase móvil:** Para la determinación de la concentración del plaguicida se ha utilizado como eluyente una mezcla binaria de 25% acetonitrilo (grado "HPLC" suministrado por la casa Sigma-Aldrich) y agua (desionizada, de pureza adecuada para HPLC)
- **Flujo del eluyente:** 2,0 mL/min
- **Cantidad de muestra inyectada:** 50µL
- **Columna:** Supelcosil™ LC-SCX (250 x 4,6 mm), suministrada por Supelco Co.
- **Longitud de onda:** Como longitud de onda de trabajo se utilizó la correspondiente al máximo de absorción ($\lambda = 214$ nm).

En las condiciones operatorias descritas anteriormente para el plaguicida estudiado, se comprobó que el método utilizado, proporcionaba una separación adecuada de la señal correspondiente al plaguicida y a la matriz.

En la figura 2.1, a modo de ejemplo, se muestra el cromatograma obtenido para el insecticida en extracto acuoso

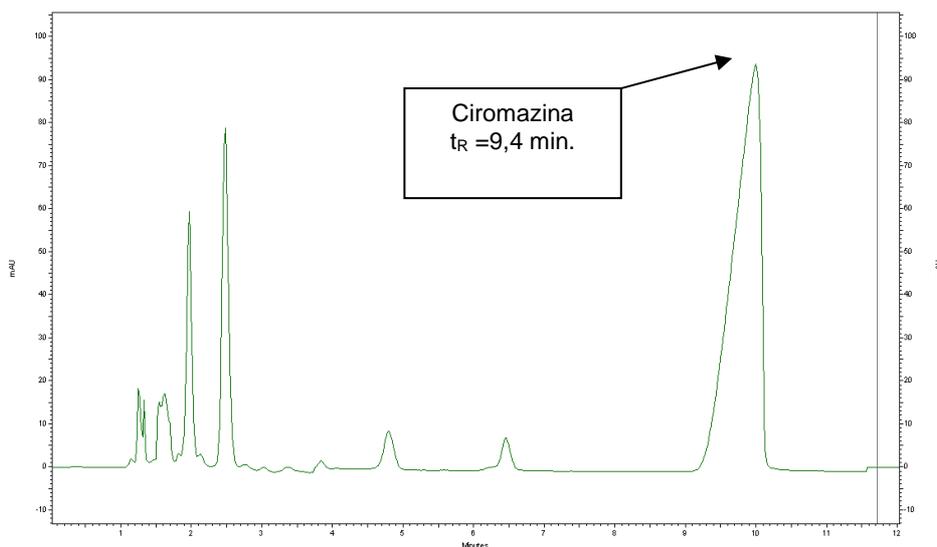


FIGURA 2.1.- Cromatograma de ciromazina en extracto acuoso

A la vista de la figura, se puede observar que la separación entre picos es suficiente para llevar a cabo la determinación de ciromazina según las condiciones analíticas propuestas anteriormente.

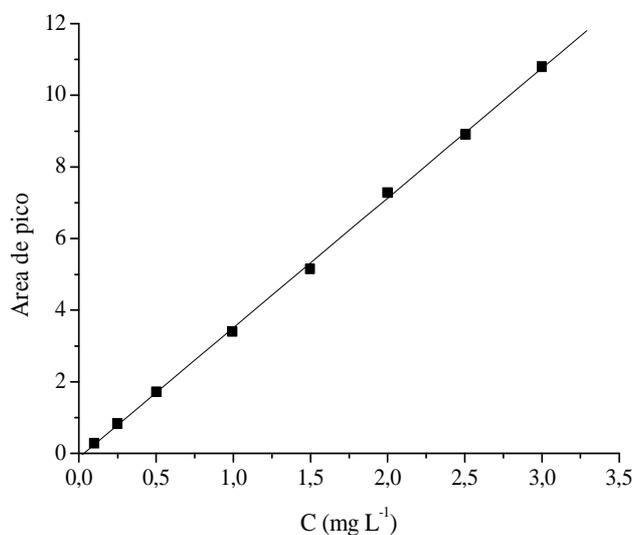
Para la obtención de la recta de calibrado, se prepararon una serie de disoluciones en fase móvil para ciromazina, de concentración perfectamente conocida, al nivel de concentración, desde $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ a $3,0 \text{ mg L}^{-1}$.

Estas disoluciones, una vez filtradas a través de filtros de nylon de tamaño de poro de $0,45 \mu\text{m}$, se inyectaron por duplicado en el cromatógrafo en las condiciones anteriormente indicadas. Los resultados así obtenidos aparecen indicados en la tabla 2.1

TABLA 2.1.- Datos cromatográficos correspondientes a las disoluciones de ciromazina

C (mg L ⁻¹)	área de pico
0,099	0,283
0,249	0,833
0,501	1,722
0,993	3,403
1,497	5,154
2,000	7,282
2,505	8,909
2,999	10,793

En la figura 2.2 se representan los valores de área de pico obtenidos en función de la concentración (mg plaguicida L⁻¹) para la ciromazina. El coeficiente de correlación obtenido resultó ser de 0,999 para dicha recta.

**FIGURA 2.2.- Recta de calibrado correspondiente a las disoluciones acuosas de ciromazina en el intervalo de concentraciones estudiado**

2.4.-PREPARACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN EN AGUA DE LOS SISTEMAS DE LIBERACIÓN CONTROLADA BASADAS EN MATRIZ POLIMÉRICA DE ALGINATO

Para la preparación y caracterización de los sistemas de liberación controlada, se han utilizado los materiales que se describen a continuación.

- **Matriz polimérica**

Como matriz polimérica para la preparación de sistemas de liberación controlada se ha utilizado el ácido algínico, como sal sódica, obtenido a partir de *Macrocystis Pyrifera*, descrito en el apartado 2.1.2.1.

- **Ingrediente activo**

Como ingredientes activos de los sistemas de liberación controlada preparados se han utilizado las muestras de plaguicida de grado técnico indicada en el apartado 2.1.1.

- **Modificadores**

Como modificadores se han empleado un ácido húmico (AH), una antracita (An) y un carbón activado (C), cuyas características fueron comentadas anteriormente en los apartados 2.1.2. y 2.1.2.3.

- **Tripolifostato**

Para la disgregación de gránulos de sistemas de liberación controlada de alginato se ha usado tripolifostato, como sal pentasódica anhidra, de pureza entre 90-95%, suministrado por Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Germany).

- **Cloruro cálcico**

Cloruro cálcico anhidro, de pureza igual al 95%, suministrado por Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Germany).

2.4.1.- Preparación de las formulaciones de liberación controlada

A partir del método desarrollado por Connick (Connick, 1982) se han obtenido diferentes sistemas de liberación controlada basados en alginato sódico

(A) que contienen ciromazina (Ci) como ingrediente activo. Como modificadores se han utilizado un ácido húmico (AH), una antracita (An) y un carbón activado comercial (C). Para ello, en primer lugar, se prepararon diferentes dispersiones en agua mezclando los componentes anteriormente citados en las proporciones que aparecen en las tablas 2.9. y 2.10.

TABLA 2.9.- Composición de las dispersiones de ciromazina

Muestra	Ciromazina (Ci) (g)	Alginato sódico (A) (g)	Carbón activo (C) (g)	Antracita (An) (g)	Ácido húmico (AH) (g)
CiAC	1,30	1,50	5,40	-	-
CiAAn	1,30	1,50	-	5,40	-
CiAAH	1,31	1,51	-	-	5,40

CiAC: Ciromazina-alginato-carbón activado

CiAAn: Ciromazina-alginato-antracita

CiAAH: Ciromazina-alginato-ácido húmico

Estas dispersiones fueron sometidas a continuación a una agitación mecánica, con un agitador de aspas de la casa *Heidolph*, modelo 50111, durante una hora. Este tiempo se considera suficiente para que las diferentes dispersiones se homogenicen totalmente (Connick, 1982). Tras la homogenización, se midió el pH de cada dispersión, impulsándose a continuación la misma con la ayuda de una bomba peristáltica, marca *Watson Marlow* modelo 505S, hacia un montaje formado por 4 pipetas Pasteur de tal manera que la dispersión goteara uniformemente sobre una disolución de CaCl_2 0,25 M. La disolución de CaCl_2 se mantuvo en constante agitación, con la ayuda de un agitador magnético, para evitar el aglutinamiento de los gránulos formados. El goteo se mantuvo durante un tiempo comprendido entre 20 y 25 minutos, y tras su finalización los gránulos permanecieron unos 5 minutos más en la disolución para que las últimas gotas caídas de dispersión dispusieran de tiempo suficiente para formarse adecuadamente como gránulos. Finalmente, para separar los gránulos formados por gelificación de la disolución de CaCl_2 , se utilizó un embudo Büchner. Una vez separados los gránulos se lavaron sobre el mismo Büchner con 50 mL de agua destilada para eliminar el exceso de Ca^{2+} y se dejaron al aire durante otras 24 horas. Transcurrido este tiempo se depositaron los gránulos en unas placas

Petriy se introdujeron en una estufa, marca *Selecta* tipo aire forzado, a una temperatura de 45 °C hasta pesada constante.

2.4.2.- Determinación del tamaño de gránulo

Para la determinación y estudio del tamaño de los gránulos se ha utilizado un microscopio con zoom estereoscópico de la casa *Nikon*, modelo SMZ1000, provisto de una cámara *PixelLINK (Megapixel FireWire Camera)* modelo PL-A662.

Para ello se hicieron fotografías de poblaciones de aproximadamente 10 gránulos para cada uno de los sistemas preparados. Una vez capturadas las imágenes, con la ayuda del programa informático *Image-Pro Plus 4.5.1 (Media Cybernetics, Inc., Silver Spring, MD, USA)*, se midieron los diámetros medios de las superficies proyectadas de los gránulos y se calculó el valor promedio de los valores obtenidos para cada uno de los sistemas preparados.

2.4.3.- Determinación del contenido de ingrediente activo

Las determinaciones del contenido en ingrediente activo (Ciromazina) de los diferentes sistemas de liberación controlada fueron realizadas como se describe a continuación:

Se colocaron muestras de 5 gránulos secos, correspondientes a cada uno de los sistemas de liberación controlada preparados, en matraces erlenmeyer de 100 mL de capacidad con tapón de rosca, y una vez allí les fueron adicionados 5 mL de una disolución 0,03 M de tripolifosfato sódico. A continuación, se colocaron dichos matraces en un baño termostático a la temperatura de 25 °C y una agitación de 200 rpm durante 2 horas, con el fin de desintegrar los gránulos y que el alginato se disolviera completamente. Tras esta operación, se le añadieron 80 mL de una mezcla metanol-agua (80:20) a cada uno de los matraces y fueron introducidos en un baño de ultrasonidos marca *Selecta*, modelo Ultrasons-P, durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo, las muestras se depositaron de nuevo en el baño termostático, permaneciendo en éste durante 24 horas. Finalmente, el extracto resultante, tras ser enrasado a 100 mL, se filtró a través de un filtro de nylon de 0,45 µm de tamaño de poro y se determinó la concentración de plaguicida por cromatografía líquida de alta resolución, usando el método descrito en el apartado 2.3. Todos los contenidos de

ingrediente activo en los diferentes sistemas de liberación controlada se determinaron por triplicado para comprobar la homogeneidad de los gránulos.

2.4.4.- Determinación de las características cinéticas del proceso de liberación

Para el estudio cinético del proceso de liberación de ciromazina en medio acuoso, se tomaron los gránulos necesarios para disponer aproximadamente de 8 mg de ingrediente activo total y se colocaron en matraces erlenmeyer de 500 mL de capacidad provistos de tapón de rosca, y se les añadieron 500 mL de agua destilada. Colocados los diferentes matraces en un baño termostático, se mantuvieron a la temperatura de 25 °C y con una agitación constante de 200 rpm. A intervalos determinados de tiempo se retiró una alícuota de 1000µL de muestra. Posteriormente, se midió la concentración de ingrediente activo liberado en agua de la propia alícuota, según el método propuesto en el apartado 2.3

2.5.- PREPARACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN EN AGUA DE LOS SISTEMAS DE LIBERACIÓN CONTROLADA BASADAS EN MATRICES MONOLÍTICAS DE LIGNINA

Para la preparación de los sistemas de liberación controlada, se han utilizado los materiales que se describen a continuación.

- **Matriz polimérica**

Como matriz polimérica para la preparación de los sistemas de liberación controlada se ha utilizado la lignina kraft descrita en el apartado 2.1.2.5.

- **Ingrediente activo**

Como ingrediente activo del sistema de liberación controlada preparado se ha utilizado ciromazina de grado técnico.

- **Agentes modificantes**

Como agente antiagregante, para mejorar las propiedades de homogeneidad del formulado, se usó polietilenglicol y como modificador el ácido húmico, descritos en el apartado 2.1.2.6.

2.5.1.- Preparación de las formulaciones de liberación controlada

A partir del método desarrollado por Chanse (Chanse, 1987), se ha preparado una formulación de liberación controlada basada en lignina kraft (L) que contienen Ciromazina (Ci) como ingrediente activo y polietilenglicol (PEG) y ácido húmico (AH) como agentes modificantes.

Para preparar el sistema de liberación controlada basado en matriz polimérica de lignina (*CiPELAH*), en primer lugar, se obtiene una dispersión sólida mezclando lignina (9g), ciromazina (4g), ácido húmico(9g) y polietilenglicol (6g); a continuación se calienta en un baño *Selecta*, modelo Tectron-L, provista de un termosensor, a una temperatura ligeramente superior al punto de fusión del ingrediente activo (224,9°C) durante 20 minutos y con agitación continua hasta conseguir una mezcla homogénea. Una vez fría, la matriz sólida obtenida se molturó y utilizando tamices de luz de malla comprendidos entre 0,2 y 3mm se obtuvieron las siguientes fracciones:3mm<d<4mm; 2mm<d<3mm; 1mm<d<2mm; 0,5mm<d<1mm; 0,2 mm<d<0,5mm; d< 0.2mm.

2.5.2.- Determinación del tamaño de gránulo

Para la determinación y estudio del tamaño de los gránulos se ha seguido el procedimiento descrito en el apartado 2.4.2

2.5.3.- Determinación del contenido de ingrediente activo

La determinación del contenido en ingrediente activo (ciromazina) en las formulaciones de lignina se realizó como se describe a continuación:

Se colocan muestras de 20 mg de gránulos, correspondientes a las fracciones en matraces erlenmeyer de 100 mL de capacidad provistos de tapón de rosca, y les fueron adicionados 50 mL de metanol. A continuación, se colocaron dichos matraces en un baño de ultrasonidos marca *SELECTA*, modelo Ultrasons-P, durante 15 minutos con el fin de desintegrar los gránulos. Una vez transcurrido este tiempo, se añaden 50 ml de agua y se introducen en un baño termostático a la temperatura de 25 °C y con una agitación de 200 rpm durante 24 horas, con el fin de completar la extracción de ingrediente activo. Finalmente, el extracto resultante, tras ser enrasado a 100 mL con agua destilada, se filtró a través de un filtro de nylon de 0,45 µm de tamaño de poro y

se determinó la concentración de plaguicida usando el método analítico descrito en el apartado 2.3

Todos los contenidos de ingrediente activo en los diferentes sistemas de liberación controlada se determinaron por triplicado.

2.5.4.- Espectroscopía de absorción FT-IR

Los espectros de absorción IR las formulaciones de liberación controlada se obtuvieron utilizando el procedimiento descrito en el apartado 2.2.1.

2.5.5- Análisis termogravimétrico (TGA)

Los termogramas de las formulaciones de liberación controlada, se obtuvieron utilizando el procedimiento descrito en el apartado 2.2.3.

2.5.6.- Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Las curvas DSC de las formulaciones de liberación controlada de plaguicidas, se obtuvieron utilizando el procedimiento descrito en el apartado 2.2.4.

2.5.7.- Determinación de las características cinéticas del proceso de liberación

Para el estudio cinético del proceso de liberación de ciromazina en medio acuoso, se tomaron los gránulos necesarios para disponer aproximadamente de 8 mg de ingrediente activo total y se colocaron en matraces erlenmeyer de 500 mL de capacidad provistos de tapón de rosca, y se les añadieron 500 mL de agua destilada. Colocados los diferentes matraces en un baño termostático, se mantuvieron a la temperatura de 25 °C y con una agitación constante de 200 rpm. A intervalos determinados de tiempo se retiró una alícuota de 1000µL de muestra. Posteriormente, se midió la concentración de ingrediente activo liberado en agua de la propia alícuota, según el método propuesto en el apartado 2.3.

3.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1.- CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LA CIROMAZINA

3.1.1.- Espectroscopía de absorción FT-IR

A partir del método descrito en el apartado 2.2.1 se ha obtenido el espectro de absorción FT-IR correspondiente a la ciromazina técnica utilizada en la presente memoria para la preparación de las formulaciones de liberación controlada. Dichos espectro se muestra en la figuras 3.1.

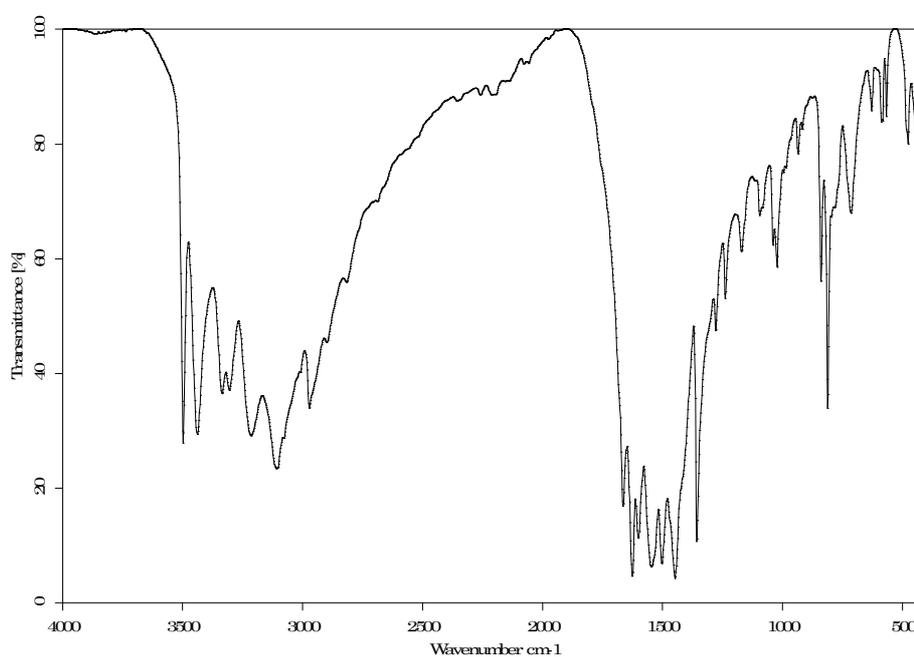


FIGURA 3.1.- Espectro FT-IR de la ciromazina

En el caso de la ciromazina (Figura 3.1), el espectro IR es similar al que aparece en bibliografía para este compuesto (Armenta, 2004), observándose las siguientes bandas características:

- Banda situada en la región de los 3400 cm^{-1} debido a la vibración de tensión del grupo N-H.
- Una banda en la región de 3050 cm^{-1} correspondiente a la vibración de tensión del enlace C-H en el grupo ciclopropilo.

c) Bandas intensas en la región de 1450 cm^{-1} ~ 1650 cm^{-1} correspondientes a las bandas de tensión de los enlaces C=N conjugados del anillo triazínico; además se destacan tres bandas de absorción características a 1626 , 1601 y 1547 cm^{-1} correspondientes a curvatura del plano N-H, vibración de tensión del grupo triazina y vibración de tensión del enlace C-N, respectivamente.

3.1.2.- Espectroscopía de absorción UV

El espectro de absorción UV obtenido para el insecticida ciromazina, operando de la forma descrita en el apartado 2.2.2 se muestra en la figura 3.2.

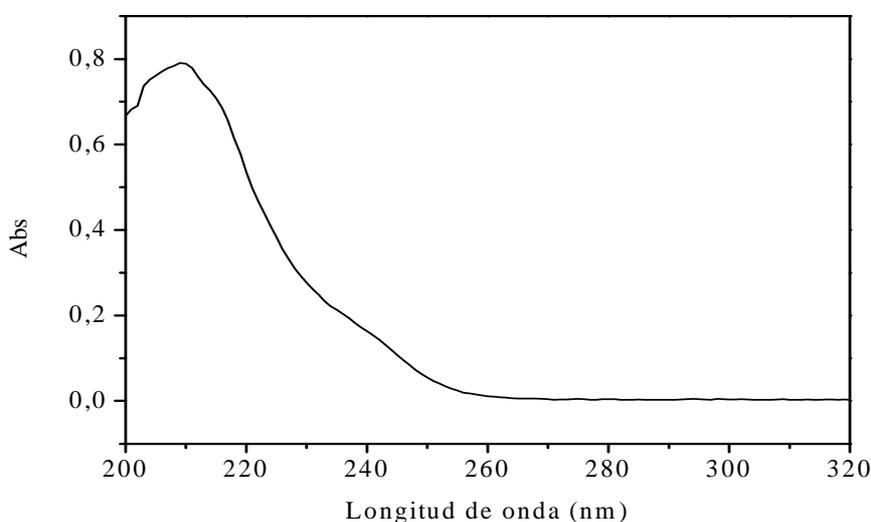


FIGURA 3.2.- Espectro UV de la ciromazina

Este espectro de absorción UV es similar al que aparece en la bibliografía para este compuesto (Robert, 2000). En él podemos observar la existencia de un máximo de absorción a 214 nm , siendo este valor de longitud de onda el que se ha seleccionado para llevar a cabo las medidas cuantitativas.

3.1.3.- Análisis termogravimétrico (TGA)

El termograma obtenido para ciromazina, operando de la forma descrita en el apartado 2.2.3 se muestra en la figura 3.3.

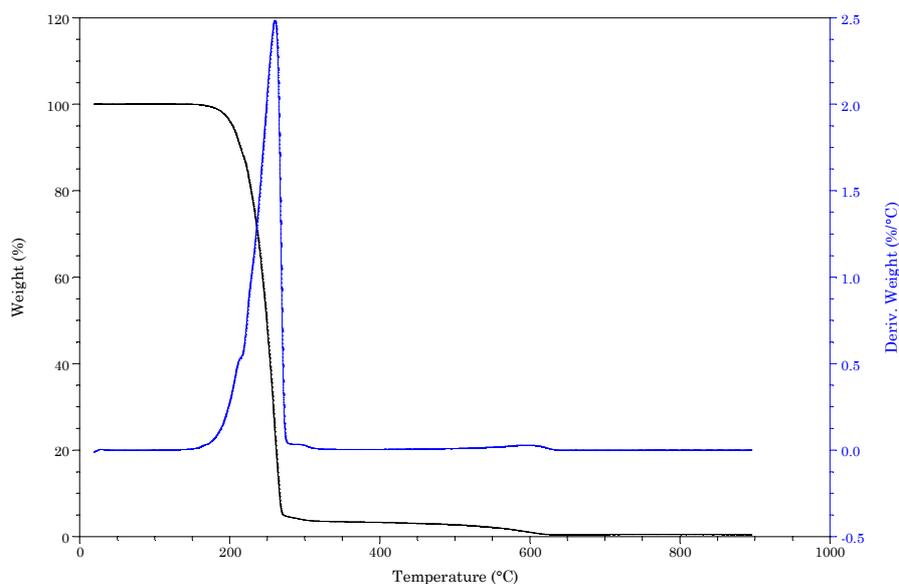


FIGURA 3.3.- Curvas TGA-DTG de la ciromazina

El termograma de la ciromazina (figura 3.3), es similar al que aparece en la bibliografía para plaguicidas con una estructura química análoga (Senneca, 2007). En él podemos observar que la descomposición térmica del plaguicida tiene lugar en un único paso. Dicha descomposición comienza a los 175 °C completándose al alcanzar la temperatura de 400 °C con una pérdida total de masa del 96%, alcanzándose la máxima velocidad de volatilización a 260 °C como muestra la curva DTG. También se pone de manifiesto la no existencia de residuo alguno una vez que superamos la temperatura de 600 °C.

3.1.4.- Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

La curva DSC obtenida operando de la forma descrita en el apartado 2.2.4 para ciromazina se muestra en las figura 3.4.

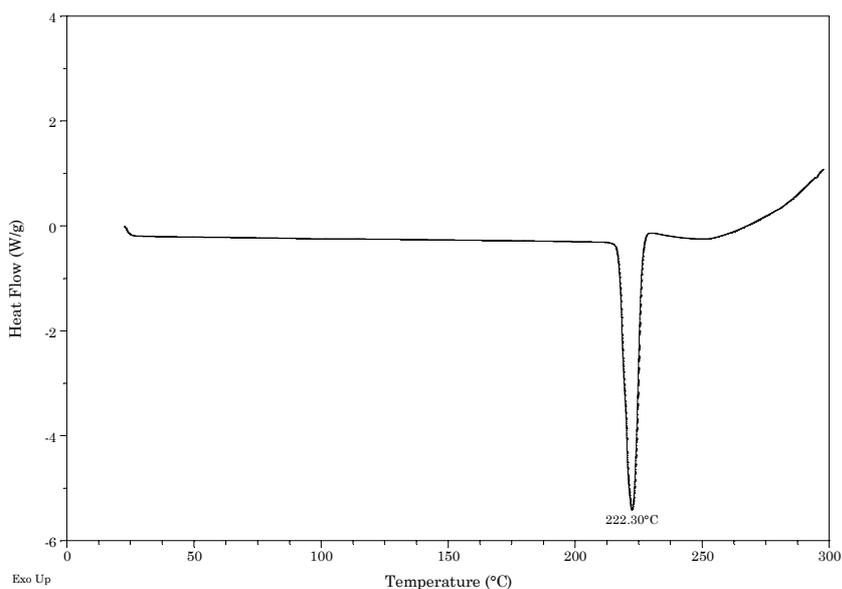


FIGURA 3.4.- Curva DSC de la ciromazina

A la vista de la figura anterior se observa la presencia de un pico endotérmico a 222,30 °C, que se corresponden con el punto de fusión del producto técnico del plaguicida ciromazina (Tomlin, 2009).

3.2.-CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LOS MATERIALES EMPLEADOS EN LA PREPARACIÓN DE FLCs

3.2.1.- Espectroscopía de absorción FT-IR

A partir del método descrito en el apartado 2.2.1 se han obtenido los espectros de absorción FT-IR correspondientes a los materiales utilizados en la preparación de los sistemas de liberación controlada. Dichos espectros se muestran en las figuras 3.5 a 3.7.

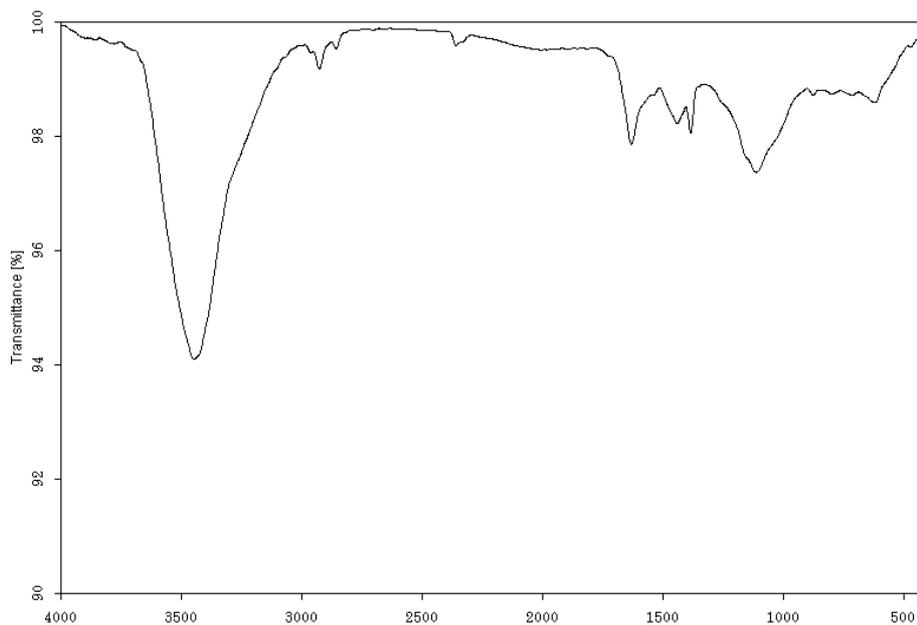


FIGURA 3.5.- Espectro FT-IR de la muestra de carbón activado

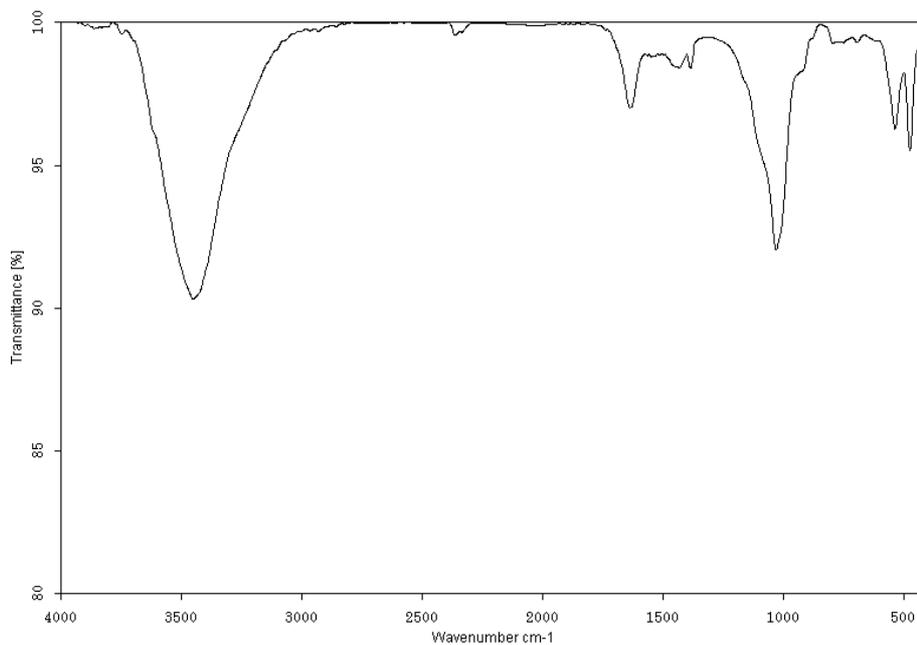


FIGURA 3.6.- Espectro FT-IR de la muestra de antracita

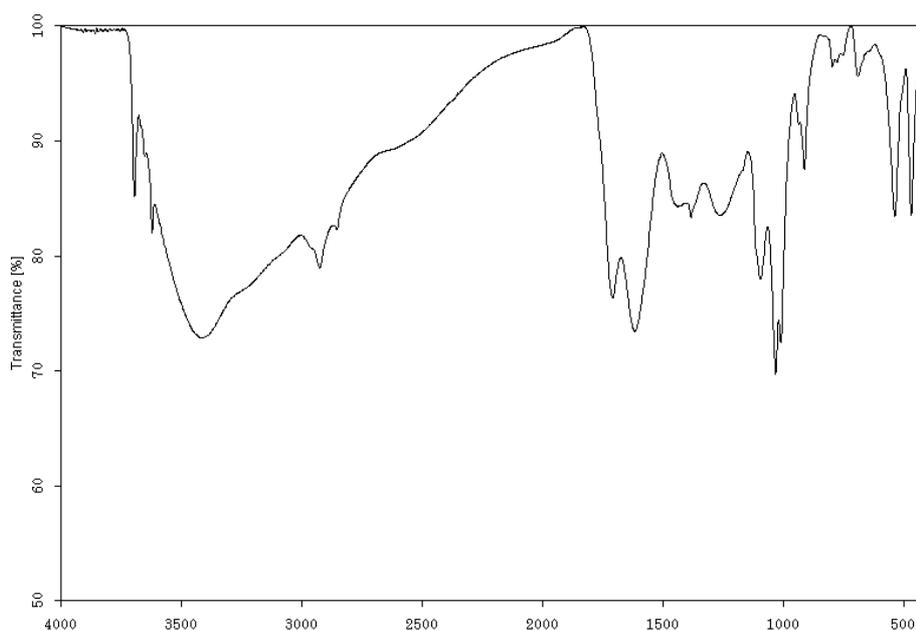


FIGURA 3.7.- Espectro FT-IR de la muestra de ácido húmico

El espectro de absorción IR del carbón activado (figura 3.5) es similar a los mostrados por otros autores (Olivares-Marín, 2006; Liu, 2010). Aparece una banda a 1650 cm^{-1} que puede ser asignada a la vibración de tensión del enlace C=O de cetonas, aldehídos y grupos carboxílicos. En el rango $1600\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$ se observan una serie de bandas que pueden asignarse a la vibración de tensión del doble enlace C=C aromático. Por último, en el rango $1480\text{--}1300\text{ cm}^{-1}$, se observa otra serie de bandas que puede ser debida a la presencia de varias formas de oxígeno en grupos superficiales como: el -OH en fenoles y estructuras que contienen grupos carboxílicos o enlaces como el C-O-C en éteres.

En referencia al espectro de absorción IR de la antracita (figura 3.6), éste puede considerarse similar al obtenido por otros autores (Gómez Serrano, 2003). Se puede observar una banda a 3400 cm^{-1} , correspondiente a la vibración del enlace O-H de los grupos hidroxilo asociados a las moléculas de agua adsorbidas. La banda a 1440 cm^{-1} se corresponde con la vibración del enlace C-O de carbonatos minerales (Herzberg, 1945). La presencia de varias bandas espectrales a: 3600 , 1030 , 530 y 475 cm^{-1} es asignable a la presencia de silicatos de estructura laminar como la kaolinita (White, 1971; Dixon, 1979).

El espectro de absorción IR del ácido húmico (figura 3.7) presenta numerosas bandas debido a su complejidad química y al gran número de grupos funcionales que

presenta coincidentes con la descritas en bibliografía (D'Orazio, 2009; Liang, 2011). Se puede observar una banda bastante ancha a 3407 cm^{-1} que se asigna a la vibración de tensión de los grupos -OH , dos bandas a 2924 y 2853 cm^{-1} que se corresponden con las vibraciones de tensión de los enlaces C-H alifáticos, una banda centrada a 1709 cm^{-1} correspondiente a la vibración de tensión de C=O de los grupos carboxílicos, aldehídos o cetonas, la vibración de tensión correspondiente a los enlaces C=O de grupos amida o quinona se observa a 1618 cm^{-1} , a números de onda más bajos se obtienen las bandas correspondientes a la vibración de tensión de los OH fenólicos (1439 cm^{-1}) y de los enlaces C-O de estructuras carboxílicas y fenólicas (1262 cm^{-1}).

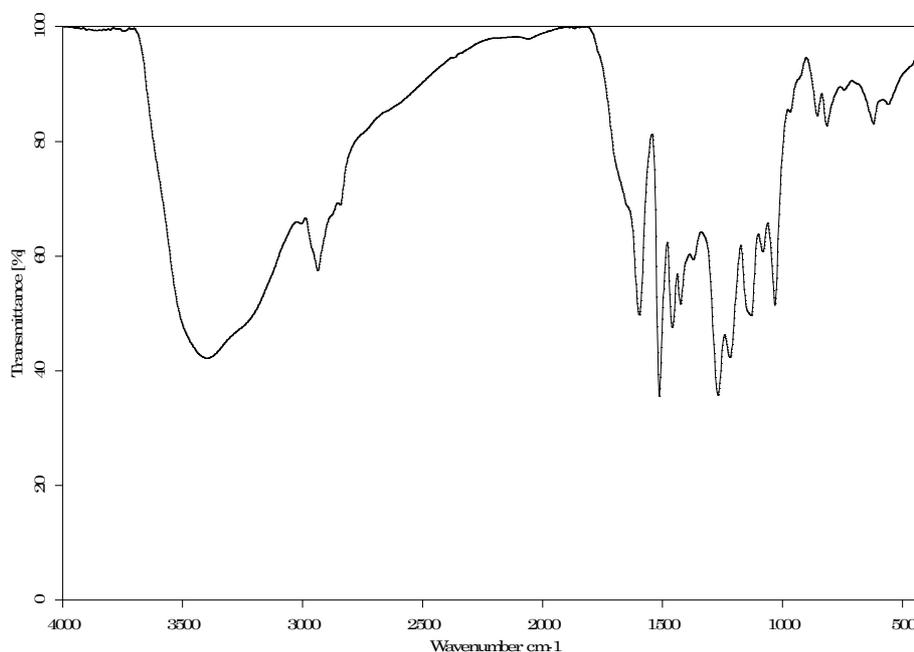


FIGURA 3.8- Espectro FT-IR de la lignina

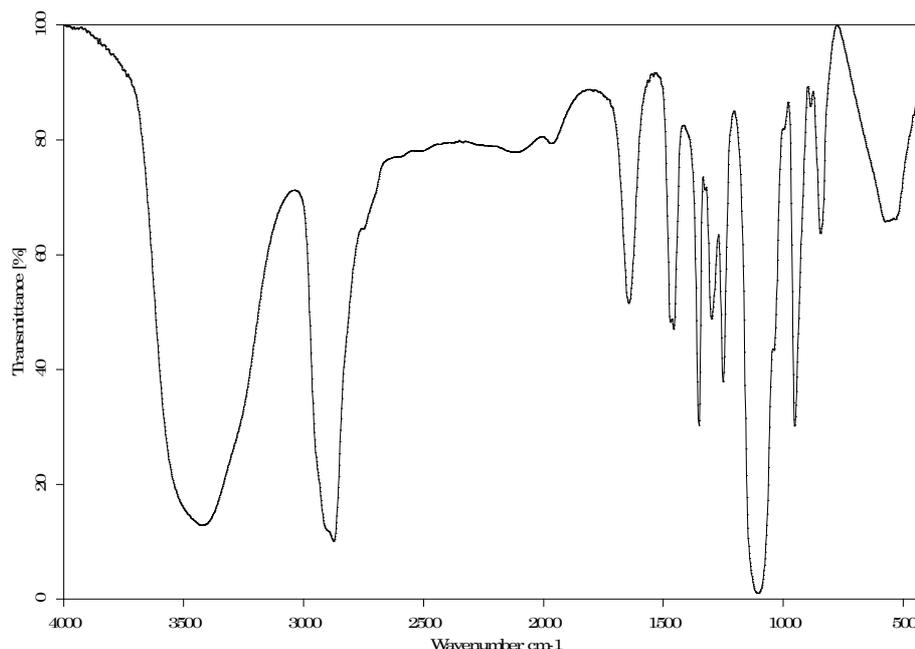


FIGURA 3.9.- Espectro FT-IR del polietilenglicol

A la vista de la figura 3.8, en la que se muestra el espectro FT-IR de la lignina, podemos indicar que este espectro de absorción IR es similar al que aparece en la bibliografía para este compuesto (Boeriu, 2004; Tejado, 2007). En él podemos observar la existencia de una banda muy amplia centrada a 3398 cm^{-1} atribuida a la vibración de los grupos hidroxilo en estructuras fenólicas y alifáticas. Otra centrada alrededor de 2936 cm^{-1} , debida a la vibración carbono-hidrógeno en grupos metoxilo aromáticos y en grupos metilo, así como en el grupo metileno de las cadenas laterales.

Las bandas centradas a 1596 , 1513 y 1425 cm^{-1} se corresponden a las vibraciones del anillo aromático del esqueleto de fenilpropano y la banda centrada 1459 cm^{-1} a la deformación C-H combinada con la vibración del anillo aromático.

Todas estas bandas son comunes para cualquier tipo de lignina, dependiendo la intensidad de las mismas del tipo concreto de lignina estudiada (Boeriu, 2004).

La región espectral por debajo de 1400 cm^{-1} es más difícil de analizar, las bandas son más complejas, ya que pueden ser debidas a la contribución de varios modos de vibración. Sin embargo, esta región contiene vibraciones que son específicas de las diferentes unidades de monolignol y que diferencian a unas ligninas de otras.

En el caso de las ligninas procedentes de madera blanda como es el caso del Indulin AT, la figura 3.8 muestra las vibraciones características de la unidad guaiacil; una banda centrada a 1269 cm^{-1} correspondiente al anillo G y a la vibración C=O; otra a 1131 cm^{-1} correspondiente a la deformación planar C-H y las bandas a 855 y 816 cm^{-1} asignadas a vibraciones no coplanarias C-H (Boeriu, 2004; Tejado, 2007).

La figura 3.9, correspondiente al espectro FT-IR del polietilenglicol, muestra una banda situada en la región de los 3425 cm^{-1} debida a la vibración de la tensión del grupo -OH, dos picos centrados a 2874 cm^{-1} y 951 cm^{-1} correspondientes a la vibración de tensión del enlace C-H alquílico, una serie de picos centrados a 1457 , 1352 , 1298 y 1250 cm^{-1} correspondientes a la deformación de los enlaces C-H de grupos alquilo, y por último una banda muy intensa a $\approx 1106\text{ cm}^{-1}$ debida a la vibración de tensión del grupo -C-O-C. Este espectro de absorción es similar al que aparece en la bibliografía para este compuesto (Wang, 2009)

3.2.2.-Análisis termogravimétrico (TGA)

A partir del método descrito en el apartado 2.2.3 se han obtenido las curvas TGA-DTG correspondientes a los materiales poliméricos, lignina, polietilenglicol y ácido húmico, usados para la preparación de las formulaciones de liberación controlada. Dichas curvas se muestran en las figuras 3.10 a 3.12.

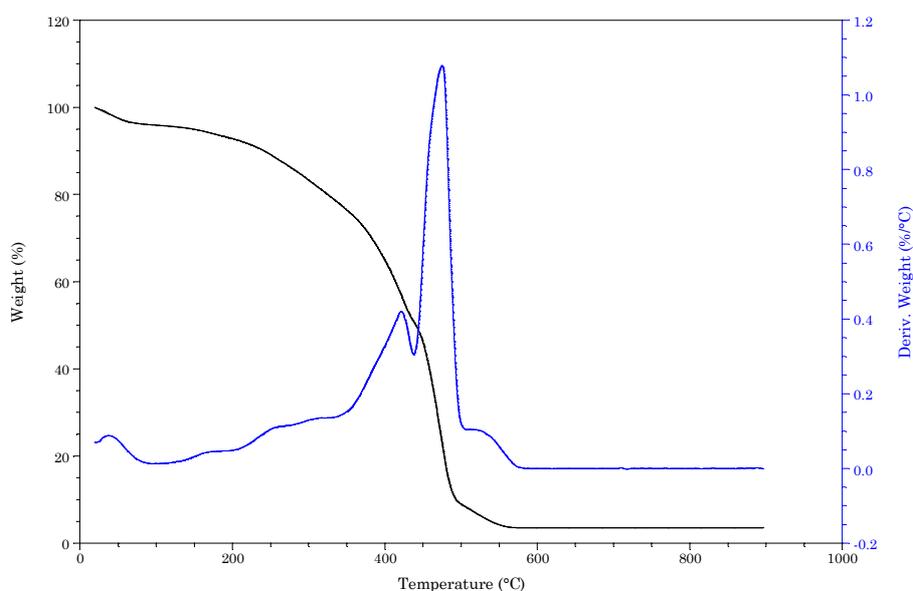


FIGURA 3.10.- Curvas TGA-DTG de la lignina

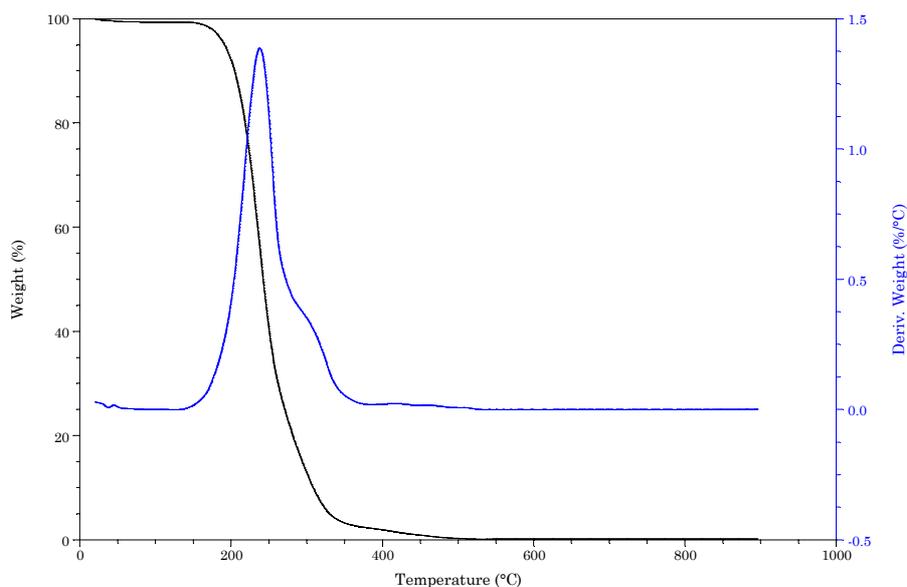


FIGURA 3.11.- Curvas TGA-DTG del polietilenglicol

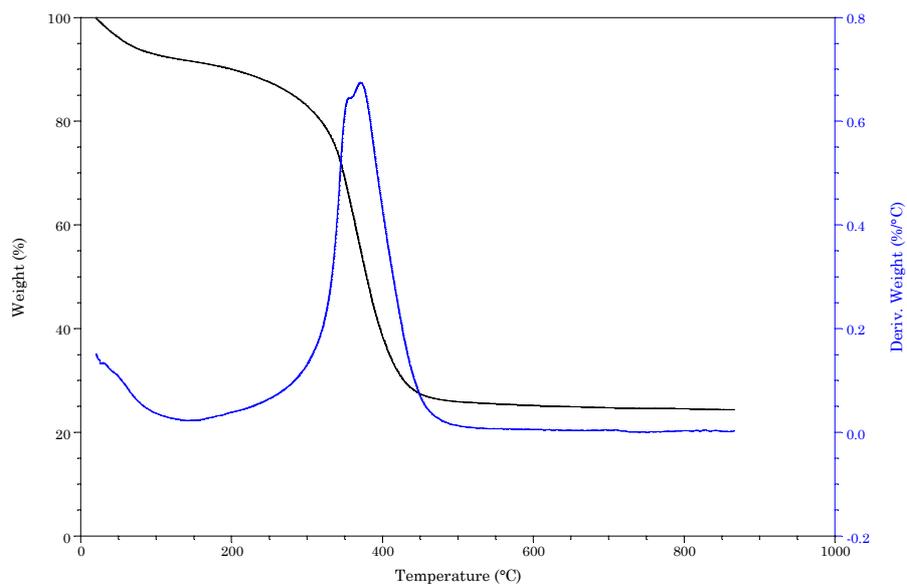


FIGURA 3.12.- Curvas TGA-DTG del ácido húmico

El termograma de la lignina (figura 3.10) es similar al que aparece en la bibliografía para este compuesto (Domínguez, 2008; Wang, 2009; Wang, 2008). En él podemos observar que la descomposición térmica del polímero tiene lugar en un amplio intervalo de temperaturas, entre 100 y 600 °C, lo cual puede explicarse debido al hecho de que la lignina contiene numerosos anillos aromáticos con diversas ramificaciones y por ello la actividad de los enlaces químicos y los grupos funcionales

en la lignina cubre un amplio rango de temperaturas (Wang, 2008). El perfil de pérdida de peso de la lignina exhibe tres etapas durante el proceso de degradación. Inicialmente, la pérdida de peso es debida a la humedad presente en la muestra. Además, estas pérdidas de peso son atribuibles a la eliminación de dióxido de carbono, monóxido de carbono y la evaporación de otros productos de pirólisis (1ª etapa), con un porcentaje de pérdida de masa del 4%. A temperaturas próximas a 200 °C comienza la segunda etapa. En esta etapa, la degradación de la lignina se produce de forma lenta en un amplio intervalo de temperaturas (200–450 °C), que puede ser explicado por el hecho de que la lignina presenta una estructura complicada formada por grupos hidroxifenólicos, carbonilo e hidroxilbenzílicos, que están conectados por enlaces fuertes (Sjöstrom, 1984). Durante esta etapa se produce una pérdida de masa del 45%. A temperaturas superiores a 400 °C, las reacciones de descomposición y las reacciones de condensación de anillos aromáticos son posibles durante el proceso de pirólisis de la lignina constituyendo la tercera etapa del proceso, con una pérdida de masa del 44%. Es precisamente en esta etapa cuando se alcanza la mayor velocidad de pérdida de masa, tal y como muestra la curva DTG (T= 475 °C).

La lignina es utilizada en una amplia variedad aplicaciones, algunas de cuales implica una breve exposición a temperaturas moderadamente altas. En tales aplicaciones la estabilidad térmica es importante, tal y como sucede en el caso de la preparación de formulaciones de plaguicidas mediante métodos de fusión. Los datos obtenidos en este estudio ponen de manifiesto la estabilidad de la lignina a la temperatura de trabajo usadas en el proceso de formulación de los plaguicidas.

La curva TGA-DTG del polietilenglicol (figura 3.11) es similar al que aparece en la bibliografía para este compuesto (Lamin, 2006; Kim, 2004). En ella podemos observar que la descomposición térmica del polímero tiene lugar en un único paso; dicha descomposición comienza a los 180 °C, completándose al alcanzar la temperatura de 350 °C y alcanzándose la máxima velocidad de volatilización a 237 °C. También se observa igualmente la no existencia de residuo alguno una vez que superamos la temperatura de 500 °C.

A la vista de la figura 3.12, donde se muestra la curva TGA-DTG del ácido húmico podemos comprobar que inicialmente tiene lugar una pérdida de masa del 8% atribuida a la pérdida del agua absorbida (Zhang, 2011), posteriormente comienza la descomposición térmica del ácido húmico, la cual tiene lugar en un solo paso entre 150 y 500 °C, con una pérdida de masa del 65%. La máxima pérdida de masa de esta

etapa se registra a 372 °C como muestra la curva DTG. Durante esta etapa se produce la degradación de los carbohidratos, de los grupos carboxílicos, fenólicos, carbonilo y alcohólicos, además de deshidratación de los compuestos alifáticos (Zhang, 2011). También se pone de manifiesto la existencia de una gran cantidad de residuo una vez que superamos la temperatura de 600 °C.

3.2.3.- Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

A partir del método descrito en el apartado 2.2.4 se han obtenido las curvas DSC correspondientes a los materiales poliméricos usados para la preparación de las formulaciones de liberación controlada. Dichas curvas se muestran en las figuras 3.13 a 3.15.

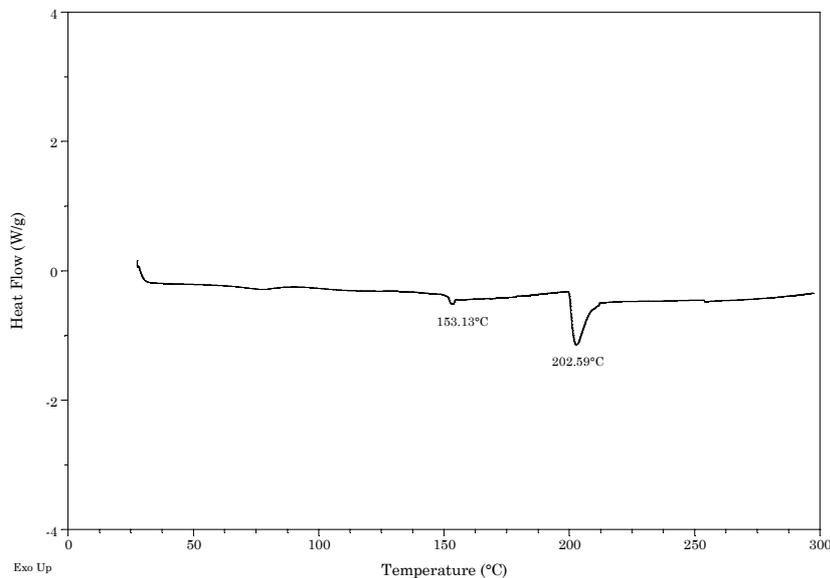


FIGURA 3.13.- Curva DSC de la lignina

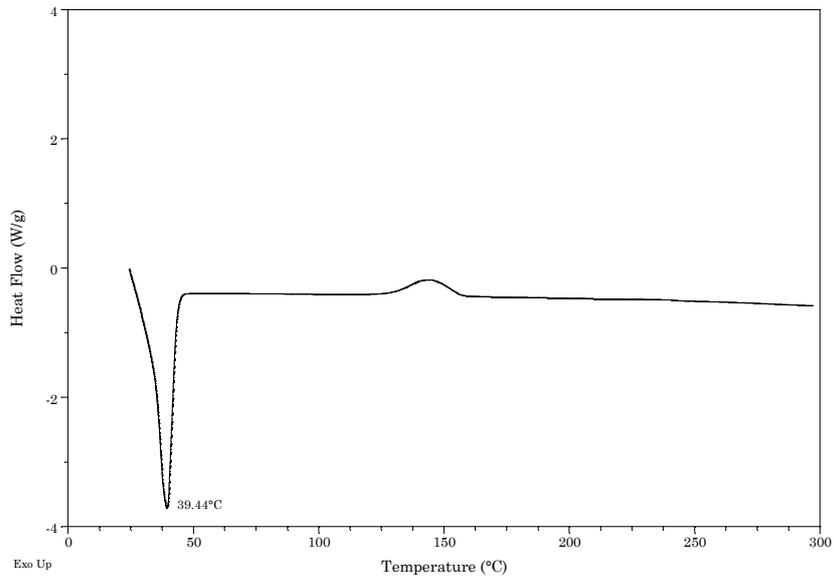


FIGURA 3.14.- Curva DSC del polietilenglicol

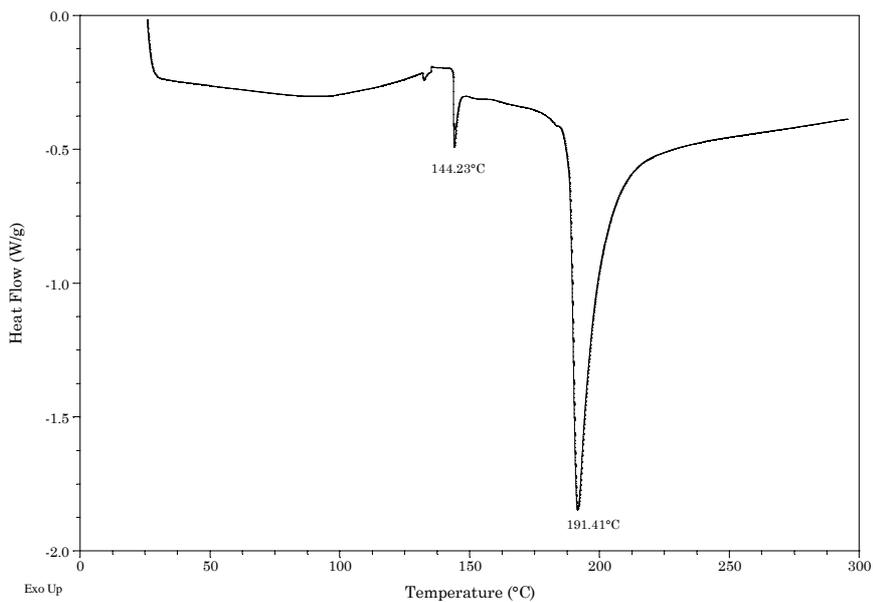


FIGURA 3.15.- Curva DSC del ácido húmico

La curva DSC presentada en la figura 3.13, correspondiente a la lignina es similar al que aparece en la bibliografía para este compuesto (Corradini, 1999). En ella se puede observar un pico a una temperatura 153,13 °C correspondiente a una transición vítrea. A 202,59 °C se aprecia un pico endotérmico correspondiente a la fusión de la fase cristalina, lo cual es indicativo de que la lignina es un material parcialmente cristalino.

En el caso del polietilenglicol (figura 3.14) se observa la presencia de un pico endotermico a 39,44 °C correspondiente al proceso de fusión. Este termograma es similar al que aparece en la bibliografía para este compuesto (Lamin, 2006).

La curva presentada en la figura 3.15 corresponde al estudio de calorimetría diferencial de barrido del ácido húmico; dicha curva es similar a la que aparece en la bibliografía para este compuesto (Provenzano, 1998). En ella podemos observar la existencia de un pico endotérmico alrededor de los 145 °C resultado de la deshidratación de la muestra. Se muestra un segundo pico endotermico a la temperatura de 191 °C que se corresponde con la perdida de las cadenas periféricas de las moléculas de polisacarido (Provenzano, 1998).

3.2.4.- Composición química

En el caso del ácido húmico y del carbón antracita, operando de la forma descrita en el apartado 2.2.5 se han obtenido los contenidos en C, H, N y O, que se especifican en la tabla 3.1.

TABLA 3.1.- Análisis químico elemental de la antracita y ácido húmico

	Carbono	Azufre	Hidrógeno	Nitrógeno	Oxígeno
	(%)				
Antracita	47,78	0,20	0,80	0,48	4,99
Ácido Húmico	42,18	<0,1	3,69	0,80	53,33

Los resultados del análisis químico inmediato de la antracita utilizada en la presente memoria, aparecen recogidos en la tabla 3.2.

TABLA 3.2.- Análisis químico inmediato de la antracita

	Materias Volátiles (%)	Cenizas(%)
Antracita	7,38	45,75

Por otra parte, siguiendo igualmente el método propuesto en el apartado 2.2.5, para la determinación de la acidez total, grupos -COOH y grupos -OH fenólicos del ácido húmico, se han obtenido los valores que se expresan en la tabla 3.3.

Tabla 3.3.- Acidez total, grupos carboxilo y fenólicos del ácido húmico

ACIDEZ TOTAL (meq/g)	G.-COOH (meq/g)	G.-OH FENOL. (meq/g)
5,36	1,07	4,29

En cuanto a la concentración de los grupos de naturaleza ácida y básica presentes en la superficie del carbón activado y siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 2.2.5, se han obtenido los resultados que se muestran en la tabla 3.4.

TABLA 3.4.- Grupos funcionales superficiales del carbón activado

	Grupos carboxílicos	Grupos lactónicos	Grupos fenólicos	Grupos básicos
	(meq g⁻¹)			
Carbón activado	2,25	0,17	0,50	3,44

Los modificadores que se estudian en la presente memoria tienen características muy diversas, tanto por su origen, como por algunas de sus propiedades fisicoquímicas. El carbón activado, constituido en su mayor parte por carbono, aparece como un material pulvulento altamente poroso y con un gran desarrollo de su superficie interna.

Por otra parte, la antracita, carbón mineral 100%, es un material también pulvulento, de consistencia terrosa, constituido por carbono amorfo acompañado de hidrocarburos, compuestos orgánicos complejos y materiales inorgánicos. De entre todos los carbones minerales la antracita es el carbón que posee el mayor contenido en carbono ($\approx 90\%$) y el menor contenido en materia volátil. El contenido en cenizas nos proporciona idea de qué cantidad de minerales formaban parte del carbón, incluyendo: silicatos, aluminosilicatos (arcillas minerales), carbonatos, sulfatos, sulfuros, sílice (cuarzo), etc. Aunque en los carbones se han encontrado una gran diversidad de minerales (Speight, 1990), predominan las arcillas (Gómez Serrano, 2003). El contenido en cenizas en los carbones españoles es muy alto (Gómez Serrano, 2003). Una de las principales características de estos carbones, por tanto, es

que poseen un muy alto contenido de materia mineral, que varía entre un 35% y 45% en peso y que, raramente, es inferior al 30% (Ministerio de Industria y Energía, 1979). Por estos motivos podemos afirmar que nuestra muestra de antracita es representativa de los carbones nacionales, presentando un contenido en cenizas del 45,75%.

En cuanto al análisis químico elemental de la antracita, cabe resaltar que los resultados mostrados se han dado en base seca y teniendo en cuenta la cantidad de cenizas en la muestra. Teniendo en cuenta el mismo análisis, en base seca y libre de cenizas, los resultados serían: 88,07%, 0,37%, 1,47%, 0,88% y 9,20% de carbono, azufre, hidrógeno, nitrógeno y oxígeno, respectivamente. Con estos datos podemos confirmar la catalogación de antracita de nuestra muestra, puesto que posee un contenido de carbono próximo al 90%. Además, los datos de análisis químico anteriormente mostrado, son similares a los encontrados para otras muestras de antracitas nacionales (Suárez-Ruiz, 2006; Marques, 2009).

Los valores de los diferentes parámetros físico-químicos estudiados (tablas 3.1 a3.4) son análogos a los que aparecen en bibliografía para estos tres materiales (Suárez-Ruiz, 2006; Sachs, 2011).

3.2.5.- Superficie específica

A partir de los datos correspondientes a las isotermas de fisisorción se han calculado los valores correspondientes al volumen de la monocapa adsorbido (V_m) y la superficie accesible al N_2 a 77,4 K (S) para los modificadores utilizados en la preparación de formulaciones de liberación controlada de alginato. Dichos datos aparecen en la tabla 3.5 junto con los correspondientes coeficientes de correlación (r).

TABLA 3.5.- Volumen de monocapa, superficie accesible al N_2 a 77,4 K y coeficiente de correlación, obtenidos mediante la aplicación de la ecuación de BET

Muestra	V_m ($mL\ g^{-1}$)	S ($m^2\ g^{-1}$)	r
Carbón activado	197,11	858,07	0,999
Antracita	5,37	23,40	0,999
Ácido Húmico	3,17	13,79	0,999

Los datos obtenidos son del mismo orden de magnitud que los que aparecen en bibliografía para muestras similares (Biniak, 1999; Sun Kou, 2004). En la tabla 3.5 se observa que el valor de *S* es 37 veces mayor para el carbón activado que para la antracita, y unas 2 veces mayor para esta última que para el ácido húmico. El valor tan elevado de área superficial que presenta el carbón activado se justifica por la contribución esencial de los microporos de dicho adsorbente, mientras que la antracita y el ácido húmico son fundamentalmente materiales no porosos o macroporosos.

3.3.- PREPARACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN EN AGUA DE LAS FORMULACIONES DE LIBERACIÓN CONTROLADA BASADAS EN MATRIZ POLIMÉRICA DE ALGINATO

3.3.1. Características y composición de las FLCs

En la tabla 3.6 aparecen las características y composición de los diferentes sistemas de liberación controlada preparados con el ingrediente activo (i.a.) ciromazina, según se describe en el apartado 2.4.1

TABLA 3.6.- Características y composición de los sistemas de liberación controlada de ciromazina

<i>Formulación</i>	<i>i.a (%)</i>	<i>Eficiencia Encapsulación* (%)</i>
CiAAn	4,52	32,30
CiAAH	8,66	60,20
CiAC	10,89	92,57

*Eficiencia de encapsulación: (cantidad de plaguicida en la matriz sólida / cantidad de plaguicida en la dispersión) x 100

A la vista de la tabla 3.6 en la que aparecen reflejadas las características y composición de los sistemas de liberación controlada preparados con ciromazina, se puede observar que se han alcanzado valores de eficiencia de encapsulación que oscilan entre 32,30% para el sistema CiAAn y 92,57% para el sistema CiAC, observándose que los valores de eficiencia de encapsulación para las formulaciones preparadas con antracita y ácido húmico son considerablemente menores a los obtenidos en presencia de carbón activado. Los valores de eficiencia de encapsulación

de las formulaciones CiAAAn y CiAAH son indicativos la existencia de pérdida de materia activa durante el proceso de obtención de los gránulos, probablemente debido a la elevada solubilidad de la ciromazina (Garrido–Herrera, 2006) y a la baja capacidad de adsorción de estos modificadores, especialmente en el caso de la antracita, frente al carbón activado (Flores-Céspedes, 2007).

Los porcentajes de ingrediente activo de las formulaciones preparadas oscilan entre 4,52% para el sistema CiAAAn y 10,89% para el sistema CiAC. Los gránulos preparados en ausencia de carbón activado presentan porcentajes de ingrediente activo menores que estos, justificado por la menor eficiencia de encapsulación del ingrediente activo debido a la menor adsorción del carbón antracita y del ácido húmico en comparación con el carbón activado. No obstante, todos los contenidos de ingrediente activo son adecuados para la utilización a nivel agronómico de las formulaciones preparadas, tal y como se pone de manifiesto en la composición de otros sistemas (Garrido–Herrera, 2006; Fernández-Pérez, 2007) similares o convencionales.

3.3.2- Determinación del tamaño de gránulo

Para la determinación del tamaño de gránulo, se han obtenido las fotografías de microscopía óptica para todas las formulaciones de liberación controlada preparadas siguiendo la metodología descrita en el apartado 2.4.2. A modo de ejemplo se exponen algunas de las fotografías usadas para realizar dichas determinaciones (figuras 3.16 a 3.18).

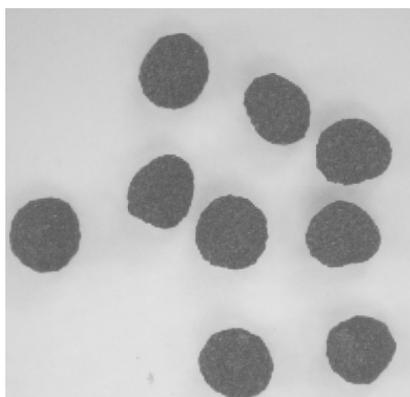


Figura 3.16.- Fotografía de microscopía óptica de la formulación de liberación controlada CiAC

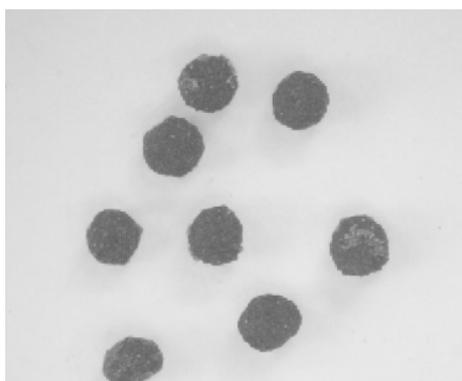


Figura 3.17.- Fotografía de microscopía óptica de la formulación de liberación controlada CiAAn

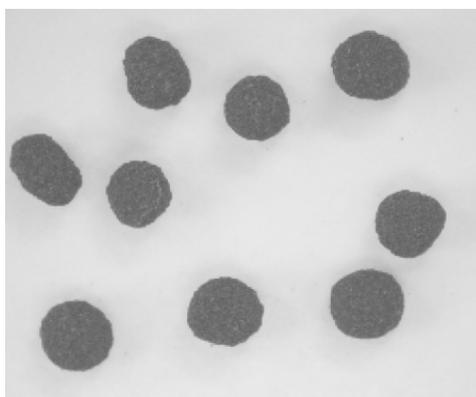


Figura 3.18.- Fotografía de microscopía óptica de la formulación de liberación controlada CiAAH

A partir de estas fotografías se ha realizado el correspondiente análisis de las imágenes, siguiendo la metodología descrita en el apartado 2.4.2, que ha permitido obtener los valores de diámetro medio, como se muestra en la siguiente tabla:

TABLA 3.7.- Valores de diámetro medio (mm) para las diferentes formulados de liberación controlada basadas en matriz polimérica de alginato

<i>Formulación</i>	<i>Diámetro medio(mm)</i>
CiAAn	1,56 (0,06) ^a
CiAAH	1,88 (0,07) ^a
CiAC	2,22 (0,09) ^a

^aValores entre paréntesis representan la desviación estándar

A la vista de los datos de la tabla anterior se observa que el tamaño medio de los gránulos es mayor en presencia de carbón activado, disminuyendo conforme aumenta la densidad del agente modificador.

3.3.3.- Estudio cinético de liberación de ciromazina en agua

Operando según el método experimental descrito en el apartado 2.4.4, se han obtenido los datos los correspondientes a la de liberación de ciromazina para los diferentes sistemas de liberación preparados como se indican en el apartado 2.4.1.

TABLA 3.8.- Datos correspondientes al proceso de solubilización en agua del producto técnico de ciromazina

<i>T (horas)</i>	<i>Ciromazina técnica solubilizada (%)</i>
0,08	76,3
0,17	84,66
0,25	92,79
0,33	97,1
0,42	97,96
0,5	99,6
1	99,99
2	100
3	100
6	100

TABLA 3.9.-Datos correspondientes al estudio cinético de liberación de ciromazina desde las distintas FLCs basadas en matriz polimérica de alginato

<i>CiAAn</i>		<i>CiAAH</i>		<i>CiAC</i>	
<i>Tiempo</i>	<i>Ciromazina liberada</i>	<i>Tiempo</i>	<i>Ciromazina liberada</i>	<i>Tiempo</i>	<i>Ciromazina liberada</i>
	(%)		(%)		(%)
0	0,00	0	0,00	0	0,00
1	63,26	0,5	25,21	1	9,53
2	73,40	1	32,42	2	14,25
4	78,15	2	40,88	4	16,16
7	80,86	4	48,36	7	18,79
9	81,12	6	54,67	9	20,54
24	82,30	20	64,00	24	26,29
32	81,69	44	67,89	32	28,09
48	81,92	76	71,35	48	30,56
72	82,46	92	72,11	72	33,22
96	83,41	116	73,32	96	34,55
144	83,49	140	74,83	144	35,15
168	83,13	171	76,99	168	34,91

Con objeto de proceder a la obtención de la curva de liberación de ingrediente activo, tales datos se han representado en la forma de porcentaje acumulado de ingrediente activo liberado frente al tiempo. En la figura 3.19 se representa la curva de liberación para los diferentes sistemas preparados

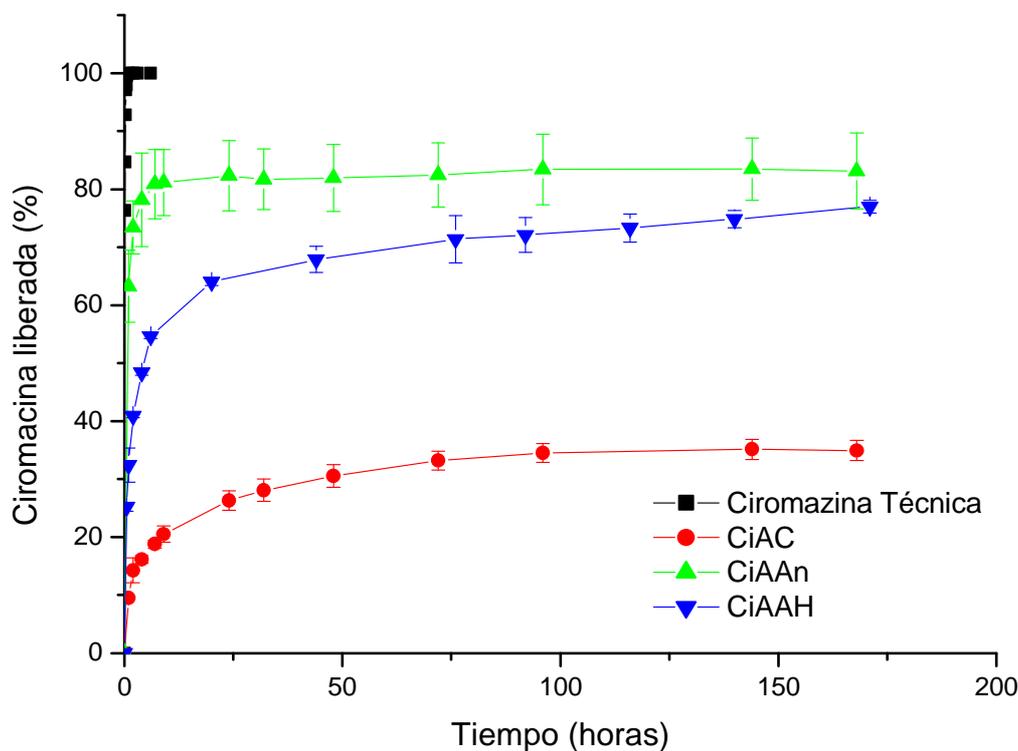


Figura 3.19.-Curva de liberación de ciromazina en agua desde los sistemas de liberación controlada preparados

De forma general se observa, a la vista de la figura anterior y en las condiciones experimentales en que se llevaron a cabo nuestras experiencias, que el producto técnico se solubilizó rápidamente, siendo necesarios apenas 15 minutos para que se alcanzase el 90 % de producto solubilizado, mientras que para los sistemas de liberación controlada preparados la liberación de ingrediente activo desde el gránulo a través de la solubilización del mismo transcurre más lentamente.

Los gránulos preparados (CiAC, CiAAn, CiAAH) producen una ralentización del proceso de disolución de ciromazina, en relación con la ciromazina técnica. Así, se necesitan 50 horas para que se libere el 80% de ciromazina contenida en el sistema CiAAn, liberándose el 70% en el caso del formulado CiAAH y sólo aproximadamente el 30% para la formulación CiAC en ese mismo tiempo.

Es de destacar que para todos los sistemas preparados se observa una disminución de la velocidad de liberación de plaguicida con el tiempo, probablemente debido al incremento de la distancia que las moléculas de plaguicida disueltas han de

recorrer por difusión conforme la zona de agotamiento avanza hacia el centro del gránulo.

En relación a la preparación de estos sistemas, se puede explicar que el entramado de la disolución de alginato sódico que contenía al ingrediente activo y al modificador, dio lugar a un gel en el que los sólidos quedaron suspendidos cuando se prepararon estos sistemas. Al secarse, se formó una matriz de polisacárido envolviendo a las partículas de antracita, ácido húmico, carbón activado y a los cristales de plaguicida. Cuando los gránulos se sumergieron en agua, los poros se rellenaron rápidamente de la misma produciéndose una hidratación del alginato junto con el modificador, lo cual conllevó que el plaguicida se disolviera en el fluido y difundiera a través de los poros hacia la superficie del gránulo, siguiendo un gradiente de concentración (Baker, 1987). En este sistema, conforme se fue liberando el ingrediente activo en la superficie, se disolvió una segunda capa y comenzó a difundir a través de la matriz, la cual fue haciéndose cada vez más porosa conforme se fue liberando más ingrediente activo (Higuchi, 1963). De esta manera, se desarrolló un frente entre las áreas con ingrediente disuelto y aquellas con ingrediente disperso en la matriz, que fue avanzando hacia el interior del gránulo.

De todo lo expuesto se puede deducir, en una primera aproximación, que el factor más relevante que controla la liberación de los plaguicidas desde los sistemas preparados, es la interacción de los ingredientes activos con el tipo de modificador introducido en el sistema, que a su vez incide en el fenómeno de absorción de agua de los gránulos o difusión del ingrediente activo a través de la matriz.

3.3.4.- Ajuste de los datos experimentales de liberación de ingrediente activo al modelo de Ritger y Peppas

El estudio de la cinética de liberación tiene dos objetivos fundamentales:

-En primer lugar comprobar que las velocidades de liberación son las adecuadas para suministrar la concentración necesaria de ingrediente activo.

-En segundo lugar, los perfiles de liberación suministran información sobre el mecanismo que controla la liberación de ingrediente activo.

Los sistemas de liberación controlada son diseñados para que la velocidad de liberación sea constante e independiente del tiempo, es decir, sigan una ley cinética de

orden cero (figura 3.20). Sin embargo, en sistemas monolíticos simples y recubiertos como los estudiados en la presente memoria, es habitual que se produzca una disminución de la velocidad de liberación de plaguicida desde la matriz que lo contiene en función del tiempo. Este hecho puede ser debido, probablemente, a un incremento de la distancia a través que las moléculas disueltas tienen que difundir conforme la zona agotada de plaguicida avanza hacia el centro de la matriz. Dicha disminución de la velocidad provoca, normalmente, que la liberación obtenida sea proporcional a la raíz cuadrada del tiempo (Fig.3.20) (Fan, 1989).

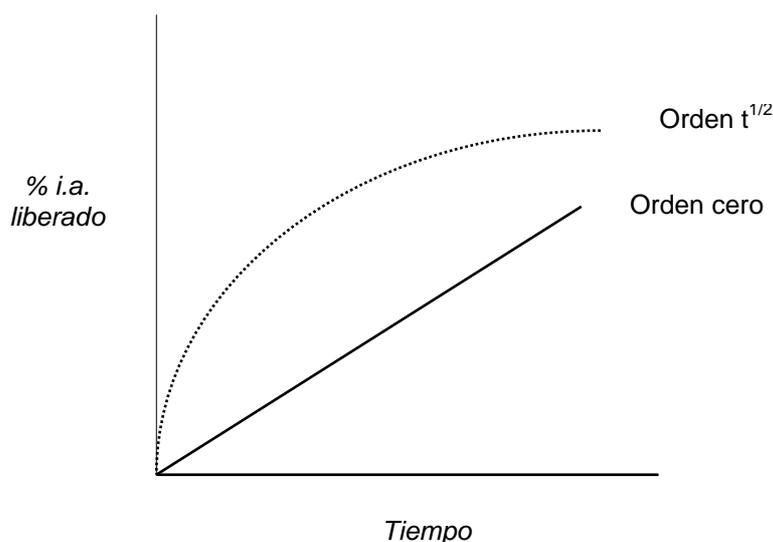


FIGURA 3.20.- Cinéticas de liberación de ingrediente activo

En el caso de sistemas monolíticos con forma de lámina, donde el área de la zona que contiene ingrediente activo no cambia significativamente con la liberación, la relación con la raíz cuadrada del tiempo se mantiene durante la mayor parte de la liberación. Sin embargo, para sistemas con forma irregular, similares a los preparados en este trabajo, hay una reducción del área superficial cuando nos desplazamos hacia el centro de la matriz que contiene el ingrediente activo disperso, hecho éste que limita la relación entre la raíz cuadrada del tiempo y el porcentaje liberado, siendo esta relación aplicable solo al tramo inicial de la curva (Ritger, 1987). Las formulaciones aquí estudiadas pueden ser descritas como sistemas que contienen partículas de soluto finamente divididas, las cuales están uniformemente dispersadas dentro de la fase matriz y en algunos casos además recubiertos por una membrana polimérica.

Para obtener un parámetro comparativo para los distintos sistemas de liberación controlada se ha utilizado la siguiente ecuación empírica propuesta por Ritger y Peppas (Ritger, 1987):

$$\frac{M_t}{M_o} = Kt^n \quad (\text{Ec. 3.1})$$

donde M_t / M_o representa la fracción de ingrediente activo liberado en función del tiempo (t), K es una constante que incorpora características del sistema reticular macromolecular y del plaguicida, y n es un exponente de difusión, indicativo del mecanismo de transporte característico de ella.

Si los datos experimentales se ajustan a la ecuación de Ritger y Peppas se pueden calcular los parámetros n y K , característicos del modelo de Ritger y Peppas, los cuales aparecen, junto con los correspondientes coeficientes de correlación (r) en la tabla 3.10, observándose, en general, un buen ajuste de los datos experimentales al modelo aplicado.

Por otra parte, a partir de los parámetros individuales (K y n), obtenidos de la aplicación de la ecuación de Ritger y Peppas para cada sistema de liberación controlada preparado, se ha obtenido el valor del parámetro T_{50} , que representa el tiempo necesario para que se libere el 50% de ingrediente activo inicialmente presente en las formulaciones. Los valores de este parámetro, calculado para los diferentes sistemas, se recogen igualmente en la tabla 3.10.

TABLA 3.10.- Valores de los parámetros de la ecuación de Ritger y Peppas y T_{50} correspondientes al estudio de liberación en agua de los formulados de ciromazina basados en matriz polimérica de alginato

Formulación liberación	K (horas⁻ⁿ)	n	r	T_{50} (horas)
CiAAn	0,655	0,109	0,952	$8,40 \times 10^{-2}$
CiAAH	0,348	0,159	0,974	9,77
CiAC	0,109	0,266	0,989	306,98

Desde un punto de vista teórico, la difusión tipo Fick -aquella en la que el transporte de ingrediente activo se rige por la primera ley de Fick- se corresponde con

un valor de n igual a 0,5 para cualquier geometría del sistema de liberación controlada. Sin embargo, experimentalmente se ha puesto de manifiesto que este valor debe ser corregido tomando como base la geometría particular del sistema (Ritger, 1987). Así, para matrices monolíticas esféricas, como es nuestro caso, la difusión tipo Fick tiene lugar cuando n está comprendido aproximadamente entre 0,4 y 0,5 (Ritger, 1987).

Los valores obtenidos del exponente difusional (n) varían entre 0,109 para la formulación CiAAN y 0,226 para la formulación CiAC. El hecho de que se obtengan valores de n inferiores a 0,4 podría estar relacionado con la complejidad de los sistemas, en los que el ingrediente activo interacciona con los modificadores, haciendo que en estos casos la difusión no sea el único factor a considerar en el proceso de liberación.

Los valores del parámetro K del modelo de Ritger y Peppas parecen estar relacionados con las variaciones que se introducen en la red macromolecular específica de cada sistema de liberación controlada preparado. Considerando las FLCs preparadas, se observa que los valores de K oscilan entre 0,109 horas⁻ⁿ para el sistema CiAC y 0,665 horas⁻ⁿ para el sistema CiAAn.

Los sistemas monolíticos preparados en nuestro estudio, consistentes en una red hidrofílica de alginato y calcio con cristales de ingrediente activo dispersos en ella-modificada en ciertos casos por la incorporación de componentes de relleno- absorben rápidamente el agua del medio. Dicha absorción de agua da lugar a la formación de un hidrogel de alginato con una membrana continua que rodea al plaguicida junto con los componentes de relleno. En esta situación el ingrediente activo, una vez disuelto desde la superficie de los cristales, se difunde a través de la red macromolecular y se libera hacia el medio.

Si consideramos la masa molecular del plaguicida utilizado en nuestro estudio (166,18 uma), no es de esperar, en principio, que se produzcan impedimentos estéricos que afectan a la difusión del plaguicida a través de los poros rellenos de agua en las regiones del hidrogel. No obstante, las zonas de entrecruzamiento de alginato constituyen una barrera para el movimiento de soluto en el gel (Oracesca, 1992).

Obviamente, la presencia de modificadores en el hidrogel, tales como la antracita, ácido húmico o el carbón activado, representan un aumento considerable de

centros de interacción, derivado de la porosidad de estos componentes, que conlleva una disminución de la difusión de ingrediente activo. La presencia de grupos funcionales tales como hidroxilos en la superficie del ácido húmico, en el carbón activado y en la antracita, puede contribuir a la formación de enlaces de hidrógeno con los grupos carboxilos presentes en las cadenas de alginato, dando lugar a la aparición de sistemas con un mayor entrecruzamiento y consecuentemente con menor permeabilidad.

Paralelamente, de la evaluación de los datos correspondientes al parámetro T_{50} que, tal y como se describió con anterioridad, representa el tiempo necesario para que se libere el 50% de ingrediente activo presente en cada sistema se obtiene el orden de variación $CiAAn < CiAAH \lll CiAC$, siendo el valor de T_{50} para la formulación preparada con carbón activado unas 30 veces superior al obtenido para el formulado que contiene ácido húmico y ≈ 3800 veces superior al obtenido para la formulación $CiAAn$.

Estos valores de T_{50} parecen estar de acuerdo con la distinta superficie específica y contenido de grupos superficiales accesibles de los modificadores que condicionaría la extensión y tipos de interacción entre la ciromazina y los modificadores. De esta forma, el carbón activado con una mayor superficie específica presenta el valor más alto del parámetro T_{50} y por tanto la mayor ralentización en la velocidad de liberación de ciromazina. Por otra parte, el ácido húmico presenta un alto número de grupos carboxílicos y fenólicos superficiales que pueden interaccionar con los grupos amino de la ciromazina, esta interacción daría lugar a una menor velocidad de liberación de esta formulación en relación a la formulación preparada con antracita.

3.4.- PREPARACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN EN AGUA DE LAS FORMULACIONES DE LIBERACIÓN CONTROLADA BASADAS EN MATRICES MONOLÍTICAS DE LIGNINA

3.4.1. Características y composición de las FLCs

En la tabla 3.11 aparecen las características y composición de la FLC, preparado con el ingrediente activo ciromazina, como se ha descrito en el apartado 2.5.1.

En este caso se ha tomado la fracción de matrices sólidas comprendida entre $d < 0,2\text{mm}$ y $0,2\text{mm} < d < 0,5\text{mm}$ como referencia para determinar las características y

composición de dichos sistemas de liberación controlada, siendo estas características idénticas en el resto de fracciones a excepción de la masa y diámetro medio.

TABLA 3.11.-Características y composición de los sistemas de liberación controlada de ciromazina

<i>Formulado</i>	<i>i.a</i> (%)	<i>Eficiencia de Encapsulación*</i> (%)
d<0,2mm	8,10	56,70
0,2mm<d-0,5mm	8,05	55,64

Eficiencia de encapsulación: (cantidad de plaguicida en la matriz sólida / cantidad de plaguicida en la mezcla de fusión) x 100

El porcentaje de ingrediente activo de las formulaciones preparadas (\cong 8%) es adecuado para la utilización a nivel agronómico de las formulaciones preparadas, tal y como se pone de manifiesto en la composición de otras formulaciones similares o convencionales.

3.4.2- Determinación del tamaño de gránulo

Para la determinación del tamaño de gránulo, se han obtenido las fotografías de microscopía óptica para todas las formulaciones de liberación controlada preparadas siguiendo la metodología descrita en el apartado 2.5.2. A modo de ejemplo se exponen algunas de las fotografías usadas para realizar dichas determinaciones (figura 3.21).

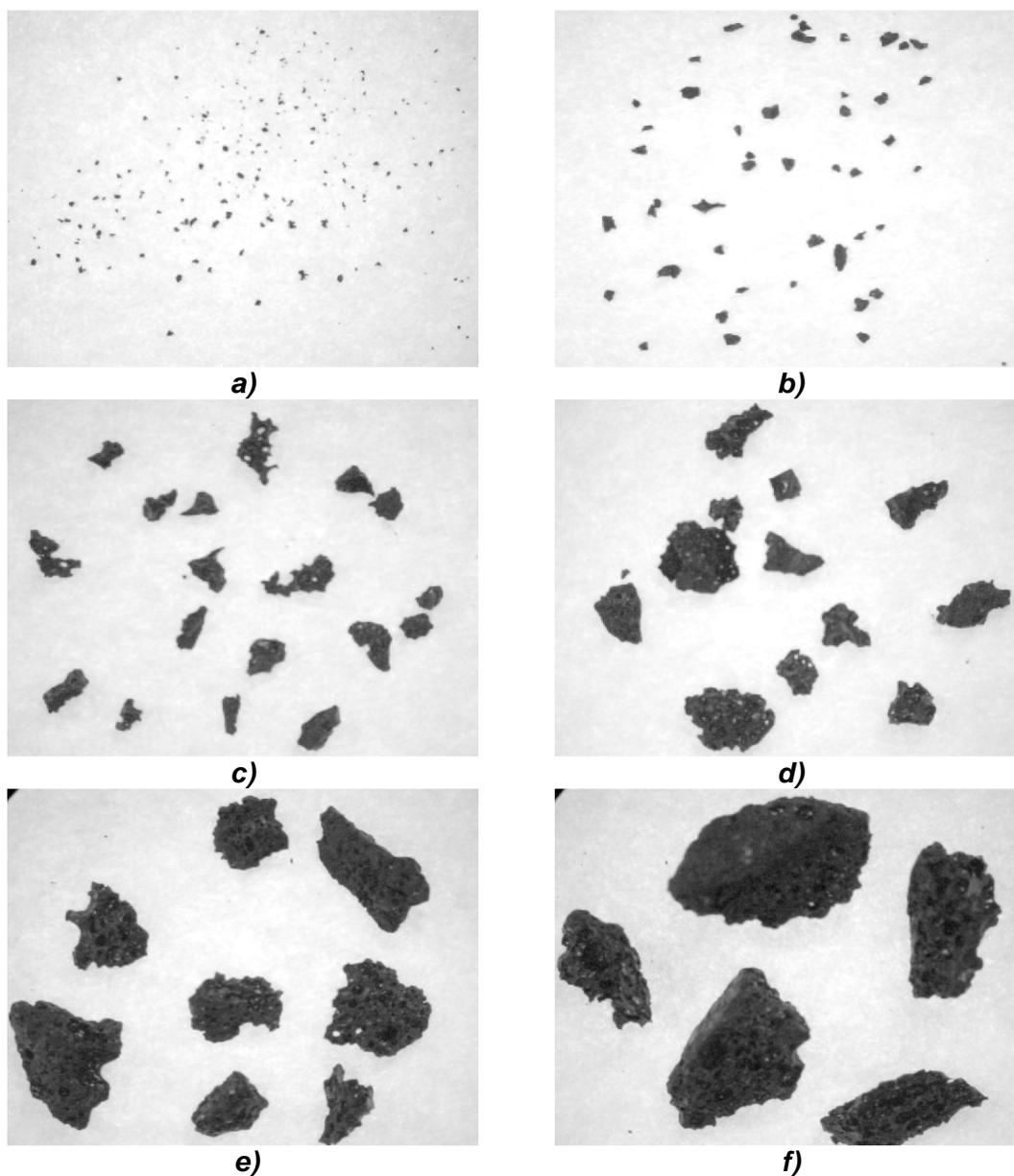


Figura 3.21.- Fotografía de microscopía óptica de las formulaciones de liberación controlada de cymazina; CiPELAH $d < 0,2\text{ mm}$ (a), CiPELAH $0,2\text{ mm} < d < 0,5\text{ mm}$ (b), CiPELAH $0,5\text{ mm} < d < 1,0\text{ mm}$ (c), CiPELAH $1,0\text{ mm} < d < 2,0\text{ mm}$ (d), CiPELAH $2,0\text{ mm} < d < 3,0\text{ mm}$ (e) y CiPELAH $3,0\text{ mm} < d < 4,0\text{ mm}$ (f)

TABLA 3.12.- Valores de diámetro mínimo (mm) para las diferentes fracciones de las matrices monolíticas basadas en lignina, para los plaguicidas ciromazina.

Formulación	Tamaño de la fracción	Diámetro mínimo (mm)
CiPELAH	d<0,2mm	0,15 (0,03) ^a
	0,2mm<d<0,5mm	0,41 (0,10) ^a
	0,5mm<d<1mm	0,82 (0,17) ^a
	1mm<d<2mm	1,69 (0,40) ^a
	2mm<d<3mm	2,89 (0,39) ^a
	3mm<d<4mm	3,56 (0,54) ^a

^aValores entre paréntesis representan la desviación estándar

A la vista de los valores reflejados en la tabla anterior, se observa que los valores de diámetro medio obtenidos para todas las formulaciones están dentro del intervalo ensayado, situándose en todos los casos en la parte superior del mismo.

3.4.3.-Espectro de absorción FT-IR

A partir del método descrito en el apartado 2.2.1 se ha obtenido el espectro de absorción IR correspondiente a la formulación CiPELAH. Dicho espectro se representa en la figura 3.22.

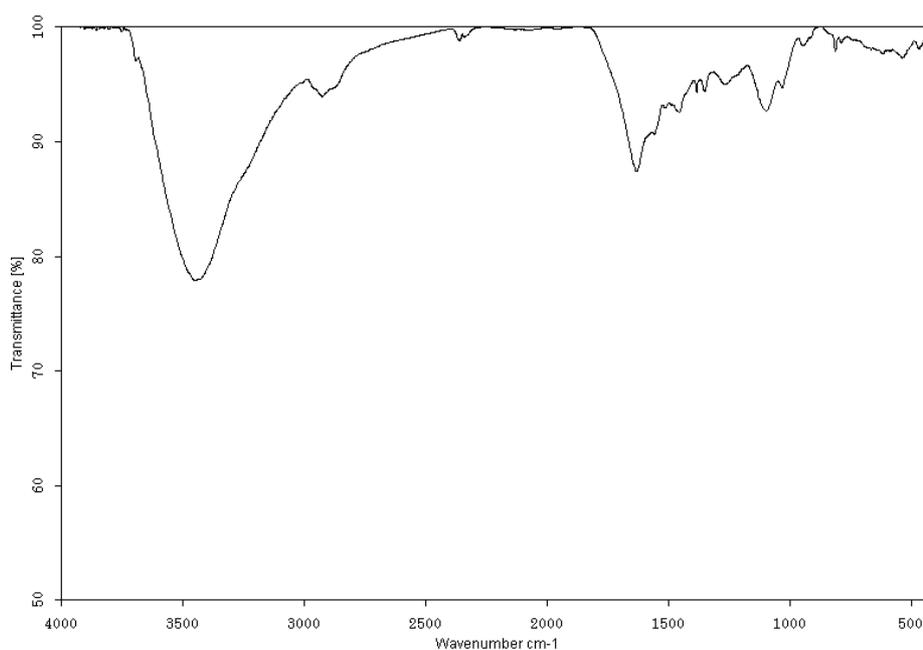


Figura 3.22.- Espectro FT-IR de la formulación CiPELAH

Este espectro de absorción es similar al que obtenido para la lignina, si bien en algunos casos las bandas aparecen desplazadas ligeramente y la intensidad de las señales es menor en la mayoría de los casos. En él podemos observar la existencia de una banda muy amplia centrada a 3446 cm^{-1} atribuida a la tensión de vibración de los grupos hidroxilo. Otra centrada alrededor de 2925 cm^{-1} , debida a la tensión de vibración carbono-hidrógeno en grupos metoxilo aromáticos y en grupos metilo y metileno de las cadenas laterales. Tanto el desplazamiento observado como la disminución de la intensidad de estas bandas es indicativo de la formación de enlaces de hidrogeno intermoleculares entre los grupos hidroxilo de la lignina y los grupos éter del polietilenglicol (Kubo, 2005).

Los cambios observados en las frecuencias de vibración de estos grupos funcionales ponen de manifiesto la existencia de interacciones específicas entre los componentes de la mezcla. La magnitud del desplazamiento en el número de onda dependerá de la intensidad de las interacciones intermoleculares que se producen.

También se observa una banda intensa a 1632 cm^{-1} correspondiente a la vibración de tensión del doble enlace C=N de la molécula de ciromazina. Y por último una banda muy intensa a $\approx 1099\text{ cm}^{-1}$ debida a la vibración de tensión del grupo -C-O-C- del polietilenglicol.

Se observa también la desaparición de algunas bandas características de la lignina probablemente debido al solapamiento con bandas de la ciromazina y del polietilenglicol a regiones por debajo de los 1500 cm^{-1} .

3.4.4.- Análisis termogravimétrico (TGA)

La mezcla de polímeros es un método apropiado para el desarrollo de formulaciones de liberación controlada de plaguicidas. El resultado final del producto obtenido dependerá de las propiedades físico-químicas de las moléculas involucradas. La mayoría de los materiales poliméricos son inmiscibles debido a su baja entropía de mezcla y solamente a través de interacciones intermoleculares específicas, la mezcla de compuestos orgánicos se produce de forma adecuada para obtener un producto final con las propiedades deseadas.

Siguiendo el método descrito en el apartado 2.2.3 se han obtenido la curva termogravimétrica de la formulación de liberación controlada preparada (Fig.3.23).

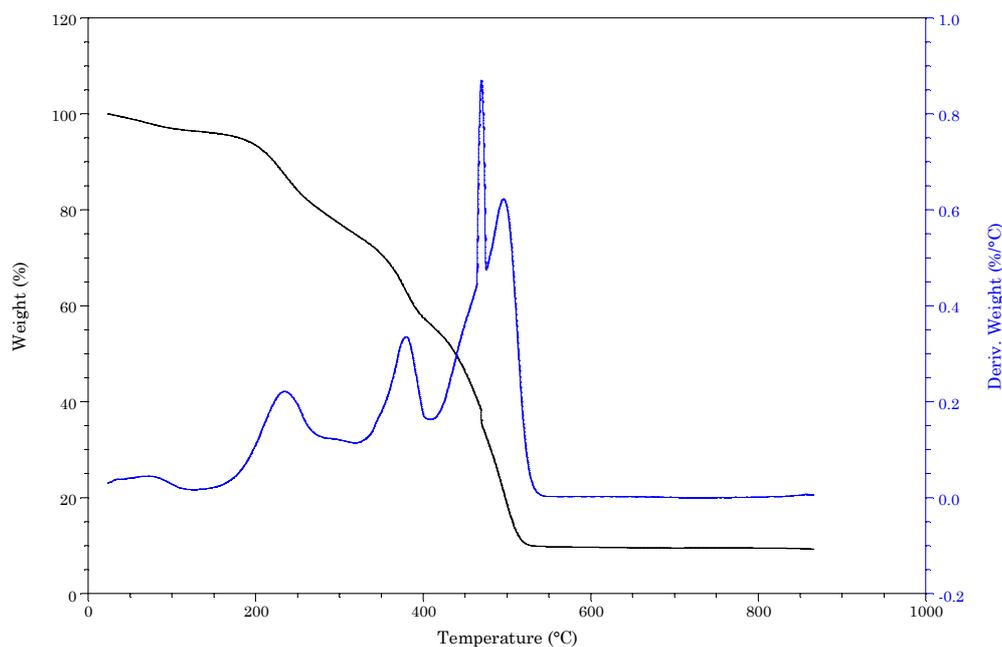


Figura 3.23.- Curva TGA-DTG de la formulación CiPELAH

La figura 3.23 representa el perfil de degradación térmica de la formulación CiPELAH, podemos observar que el proceso de descomposición térmica de la muestra tiene lugar en cuatro etapas, a diferencia de la degradación térmica de los componentes individuales de la formulación en los que ésta sucedía en una única etapa (ciromazina (Fig. 3.3) y polietilenglicol (Fig. 3.11)) o en tres en el caso de la lignina (Fig. 3.10).

3.4.5.- Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Siguiendo el método descrito en el apartado 2.2.4 se han obtenido la curva DSC de la formulación de liberación controlada preparada (Fig.3.24).

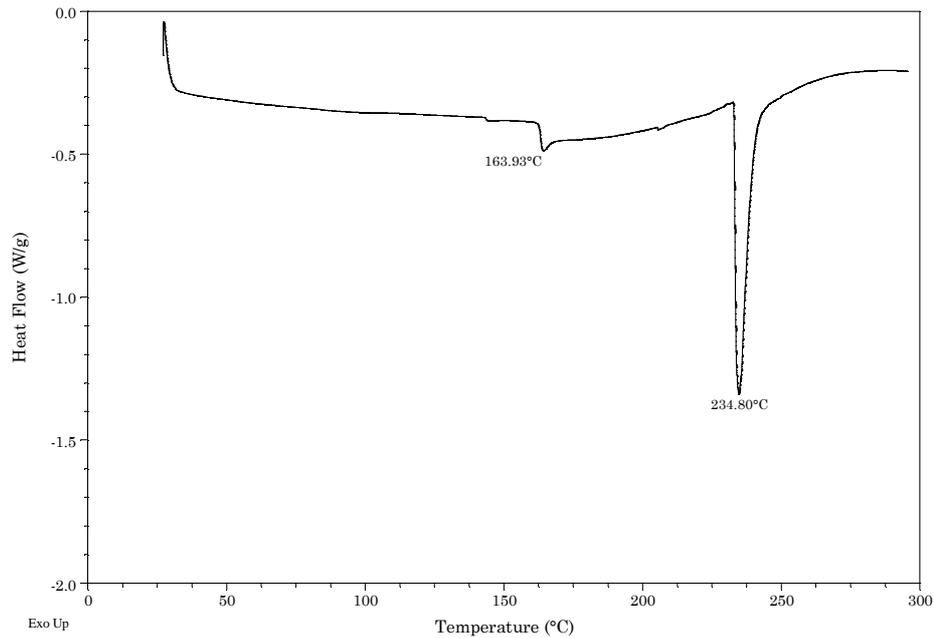


Figura 3.24.- Curva DSC correspondiente a la formulación CiPELAH

La figura 3.24 muestra la curva DSC para la formulación CiPELAH. En dicha figura se observa un pico endotérmico a 164 °C, correspondiente a la transición vítrea de la muestra. Al alcanzar la temperatura de 200 °C comenzaría el proceso de degradación de muestra, lo que estaría de acuerdo con lo observado en las curvas TGA. A la temperatura de 235 °C se observa un pico endotérmico debido a un proceso de fusión, que puede estar relacionado con la interacción química entre la ciromazina, AH, PE y lignina. Esta interacción da lugar a la posible formación de una nueva fase cristalina debido a los cambios estructurales y morfológicos que conlleva el proceso de obtención de los gránulos mediante el proceso de fusión.

3.4.6.- Estudio cinético de liberación de ciromazina en agua

Operando según el método experimental descrito en el apartado 2.5.7, se han obtenido los datos los correspondientes a la de liberación de ciromazina para las diferentes FLCs basadas en matrices monolíticas de lignina de liberación preparados como se indican en el apartado 2.5.1.

TABLA 3.13.-Datos correspondientes al estudio cinético de liberación de ciromazina desde las distintas FLCs basadas en matrices monolíticas de lignina

Tiempo	<i>CiPELAH</i> _{d<0, 2 mm}	<i>CiPELAH</i> _{0, 2 mm<d< 0,5mm}	<i>CiPELAH</i> _{0, 5 mm<d< 1,0mm}	<i>CiPELAH</i> _{1, 0 mm<d< 2,0 mm}	<i>CiPELAH</i> _{2, 0 mm<d< 3,0 mm}	<i>CiPELAH</i> _{3, 0 mm<d< 4,0 mm}
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1	77,32	73,01	67,87	54,63	49,78	38,99
2	80,78	75,98	70,99	61,39	57,61	49,07
3	81,58	77,84	76,43	67,34	59,87	52,95
4	84,32	80,46	79,52	69,42	66,72	62,77
7	88,69	81,66	82,55	76,04	68,73	73,85
24	92,83	84,55	85,58	77,84	73,45	75,55
33	95,26	84,94	87,91	79,11	80,55	78,47
48	94,94	87,89	88,70	82,15	81,91	80,48
74	96,54	92,30	91,41	83,94	85,89	84,00
96	100,82	95,06	93,89	86,62	86,48	89,80
144	98,54	96,32	95,96	90,65	87,62	91,95
168	98,98	97,69	97,01	89,52	89,15	92,74
240	100,41	97,94	97,91	90,04	94,00	95,50

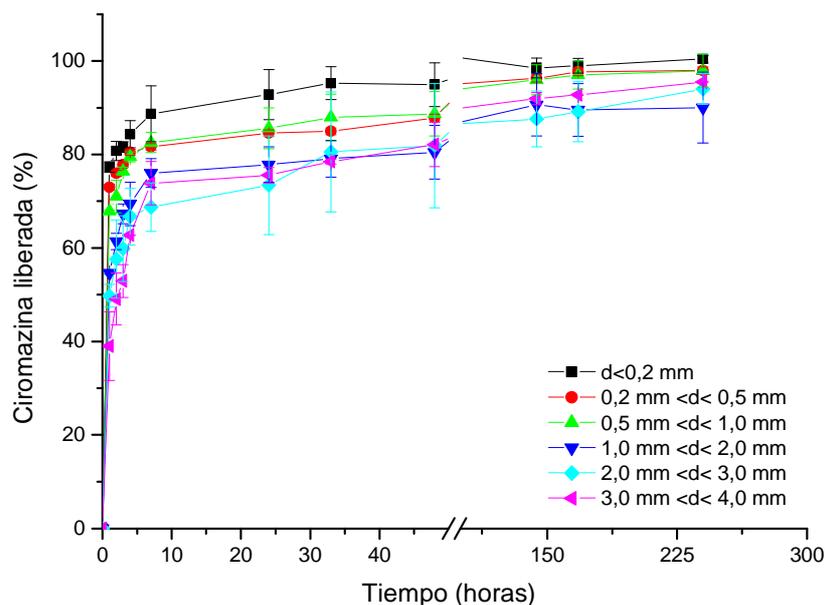


Figura 3.25.-Curva de liberación de cioramazina en agua desde los sistemas de liberación controlada preparados

En cuanto a la figura 3.25, se observa que el tamaño sobre la liberación de ingrediente activo, así, el aumento del tamaño va a incidir en el comportamiento de los sistemas preparados, observándose una ralentización de la liberación para el sistema de mayor tamaño (CiPELAH 3,0mm<d<4,0mm). A medida que disminuye el tamaño del gránulo se produce una liberación más rápida de la cioramazina debido al incremento del área superficial de la matriz en contacto con el agua, disminuyendo asimismo la distancia que el ingrediente activo debe recorrer a lo largo del gránulo para difundir hasta la superficie del mismo; así para la fracción de tamaño $d < 0,2\text{ mm}$ el tanto por ciento liberado de cioramazina es de un 95% transcurridas 48 horas y conforme aumenta el tamaño de la fracción disminuye este porcentaje, siendo de un 80% para la fracción $3,0\text{ mm} < d < 4,0\text{ mm}$ en el mismo tiempo.

3.4.7.- Ajuste de los datos experimentales de liberación de ingrediente activo al modelo de Ritger y Peppas

Para el caso de los sistemas de liberación controlada basados en matriz monolítica de lignina, los datos experimentales de liberación de ingrediente activo han sido ajustados al modelo de Ritger y Peppas, tal y como se llevó a cabo con los datos correspondientes a las formulaciones de alginato.

TABLA 3.14.- Valores de los parámetros de la ecuación de Ritger y Peppas y T_{50} correspondientes al estudio de liberación de ingrediente activo en para las diferentes fracciones de CiPELAH

Formulación	K (horas ⁻ⁿ)	n	r	T_{50} (horas)
CiPELAH $d < 0,2mm$	0,777	0,056	0,987	$3,74 \times 10^{-4}$
CiPELAH $0,2mm < d < 0,5mm$	0,741	0,043	0,978	$1,07 \times 10^{-4}$
CiPELAH $0,5mm < d < 1mm$	0,698	0,067	0,961	$6,93 \times 10^{-3}$
CiPELAH $1mm < d < 2mm$	0,588	0,091	0,933	0,169
CiPELAH $2mm < d < 3mm$	0,528	0,118	0,970	0,633
CiPELAH $3mm < d < 4mm$	0,441	0,176	0,934	2,028

Los valores obtenidos del exponente difusional (n) estarían fuera del intervalo establecido para ser descritos por la primera ley de Fick, al igual que sucedía con las formulaciones de alginato, lo que pone nuevamente de manifiesto la complejidad de los sistemas, en los que el ingrediente activo interacciona con los modificadores, haciendo que en estos casos la difusión no sea el único factor a considerar en el proceso de liberación.

Al evaluar los valores del parámetro T_{50} correspondientes a las diferentes fracciones estudiadas del formulado CiPELAH se observa que el valor más bajo de T_{50} corresponde a la fracción con el menor tamaño de gránulo (CiPELAH $d < 0,2$ mm) siendo el orden de variación de este parámetro

$$\text{CiPELAH}(d < 0,2mm) < \text{CiPELAH}(0,2mm < d < 0,5mm) <$$

$$\text{CiPELAH}(0,5mm < d < 1,0mm) < \text{CiPELAH}(1,0mm < d < 2,0mm) <$$

$$\text{CiPELAH}(2,0mm < d < 3,0mm) < \text{CiPELAH}(3,0mm < d < 4,0mm)$$

Este orden de variación pone de manifiesto la ralentización del proceso de liberación del plaguicida a medida que aumenta el tamaño de los gránulos, hecho totalmente lógico si tenemos en cuenta que el incremento de la distancia que las moléculas de plaguicida han de recorrer por difusión, es mayor a medida que aumenta el tamaño de gránulo.

De este modo, el tamaño de los gránulos es el factor que mayor influencia tiene sobre el proceso cinético de liberación de los plaguicidas, en estos sistemas de

liberación controlada. Debido a este comportamiento, se ha realizado el análisis de regresión simple entre el parámetro T_{50} y el diámetro medio (D) de los gránulos, determinado siguiendo el procedimiento experimental descrito en el apartado 3.4.2, para cada una de las fracciones de la matriz monolítica de lignina que contienen ciromazina.

La representación de T_{50} frente al diámetro medio de los gránulos, aparece en la figura 3.26.

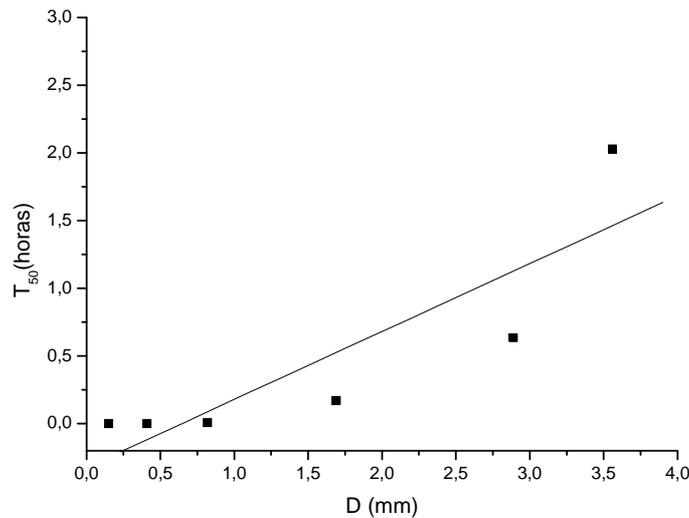


FIGURA 3.26.- Correlación entre el parámetro T_{50} y el diámetro medio (D) de las fracciones de la matriz monolíticas CiPELAH.

Tras el ajuste analítico correspondiente, hemos obtenido la siguiente ecuación empírica (Ec. 3.2).

$$T_{50} = 0,50 \cdot D - 0,32 \quad r = 0,871 \quad (p = 0,024) \quad (\text{Ec. 3.2})$$

Es fácil comprobar que la liberación de ingrediente activo desde los sistemas basados en matriz polimérica de lignina se ralentiza, notablemente, a medida que aumenta el diámetro medio del gránulo (D). Vemos pues, que es posible predecir en una primera aproximación, y con un grado de fiabilidad aceptable, los valores de T_{50} a partir del diámetro medio de gránulo. Tal y como se ha indicado, estos valores de T_{50} se utilizarán para predecir el comportamiento cinético del sistema preparado y, por tanto, diseñar un perfil adecuado de liberación del ingrediente activo desde el formulado en cada situación cultivo-plaguicida particular.

4. PROPUESTAS SOBRE LA CONTINUACIÓN DEL TRABAJO

Continuando con el estudio realizado, las investigaciones futuras estarían orientadas por una parte al desarrollo de nuevas formulaciones de liberación controlada donde se alcance una mayor eficiencia de encapsulación y por otra al conocimiento de las interacciones de las formulaciones de liberación controlada preparadas con el suelo, a través de estudios de liberación, lixiviación y degradación. Estos estudios junto con los ensayos de actividad in vitro permitirán analizar las ventajas que presentan los sistemas aquí preparados frente a sistemas convencionales. De esta forma podremos evaluar la optimización en la aplicación de plaguicidas en condiciones reales de campo utilizando estos sistemas de liberación controlada.

PARTE III. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Como consecuencia del estudio realizado sobre la preparación, caracterización y evaluación de los sistemas de liberación controlada de la ciromazina basados en materiales poliméricos, así como del examen de los antecedentes bibliográficos encontrados, se ha llegado, entre otras, a las siguientes conclusiones:

Los polímeros alginato, lignina, y el polietilenglicol pueden ser utilizados de forma satisfactoria para la preparación de formulaciones de liberación controlada de la ciromazina mediante técnicas de encapsulación en hidrogel o a través de procesos de fusión.

El método seguido para la preparación de los sistemas de liberación controlada basados en matriz polimérica de alginato, permite obtener una distribución uniforme de la ciromazina en los gránulos, una aceptable esfericidad de los mismos, así como una aceptable eficacia de encapsulación, incrementándose ésta a medida que aumenta la capacidad de interacción del modificador con el plaguicida.

La comparación entre las curvas de solubilidad del producto técnico de ciromazina y las curvas de liberación de este plaguicida desde los distintos sistemas ensayados, demuestra la ralentización de la liberación del ingrediente activo con el uso de estas FLCs basadas en matriz polimérica de alginato.

En relación a la eficacia en la ralentización del proceso de liberación del ingrediente activo, se observa que se obtiene una velocidad de liberación más lenta para aquella formulación que contiene carbón activado.

La metodología seguida en la preparación de los sistemas de liberación controlada basados en matrices monolíticas de lignina permite obtener una distribución homogénea de ingrediente activo en las matrices preparadas con ciromazina, además los estudios de espectroscopía IR y de análisis térmico ponen de manifiesto la existencia de interacciones que dan lugar a una buena compatibilidad entre los materiales poliméricos utilizados y la ciromazina

En relación a la eficacia en la ralentización del proceso de liberación del ingrediente activo y su posible aplicación a nivel de campo, se pone de manifiesto que dicha ralentización se acentúa a medida que aumenta el tamaño de los gránulos, siendo este efecto más acusado para la fracción de mayor tamaño, $3\text{mm} < d < 4\text{mm}$.

Se observa una buena correlación entre los valores de T_{50} en agua y el diámetro mínimo de los gránulos preparados, lo cual nos permitirá predecir, de forma general y aproximada, el comportamiento cinético del sistema preparado, una vez determinado dicho diámetro.

Competencias adquiridas y grado de adquisición

Por último, destacar que las competencias adquiridas a través del trabajo fin de máster, así como en la realización del propio máster, me han permitido desarrollar la capacidad de concebir, diseñar y realizar una investigación científica original. Una vez planteadas las etapas y metodología necesarias para la consecución del fin propuesto, se ha concluido con el tratamiento de la información obtenida a lo largo de la investigación y la redacción de la correspondiente memoria.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- ABD EL-MOHDY H. L.; Hegazy E. A.; El-Nesre. M.; El-Wahab, M. A. "Control Release of Some Pesticides From Starch/(Ethylene Glycol-co-Methacrylic Acid) Copolymers Prepared by γ -Irradiation". *Journal of Applied Polymer Science* DOI 10.1002/app
- ALLAN, G.G.; Neogl, A.N.; Wilkins, R.M. "Design and synthesis of controlled release pesticides-polymer combinations". *Nature* 234, 349-351 (1971).
- ARMENTA, S., Quintás, G.; Garrigues S.; De la Guardia, M. "Determination of cyromazine in pesticide comercial formulations by vibrational spectrometric procedures". *AnalyticaChimicaActa* 524, 257-264 (2004).
- BAHADIR, M. "Safe formulation of agrochemicals" *Chemosphere* 16, 615-621 (1987).
- BAIRD, J.K. "Gums". *Concise Encyclopedia of Polymer Science and Technology*; Kroschwitz, J.I., Wiley Interscience, N.Y. (1994).
- BARBASH, J.E.; Thelin G.P.; Kolpin, D.W.; Gilliom R.J. "Major herbicides in ground water: result from the National Water-Quality Assessment". *J. Env. Quality* 30 (3), 183-845 (2001).
- BINIÁK, S.; Pakula, M.; Szymanski, G.S.; Swiatkowski, A. "Effect of activated carbon surface oxygen- and/or nitrogen-containing groups on adsorption of copper (II) ions from aqueous solution". *Langmuir* 15, 6117-6122 (1999).
- BOEHM, H.P. "Some aspects of the surface chemistry of carbon blacks and other carbons". *Carbon* 32 (5), 759-769 (1994).
- BOERIU, C.G.; Gosselink, R.J.A.; Van Dam J.E.G. "Characterization of structure-dependent functional properties of lignin with infrared spectroscopy". *Ind. Crops Prod.* 20, 205-218 (2004).
- CLOUTIS, E.A. "Quantitative characterization of coal properties using bidirectional diffuse reflectance spectroscopy". *Fuel* 82, 2239-2254 (2003).
- CONNICK, W.J. Jr. "Controlled release of the herbicides 2,4-D and dichlobenil from alginate gels". *Journal of Applied Polymer Science* 27, 3341-3348 (1982).

- CONNICK, W.J. Jr.; Bradow, J.H., Wells, W.; Steward, K.K.; Van, T.K. "Preparation and evaluation of controlled release formulations of 2,6-Dichlorobenzonitrile". *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 32, 1199-1205 (1984).
- D'ORAZIO VALERIA, Sensei N. "Spectroscopic properties of humic acids isolated from the rhizosphere and bulk soil compartments and fractionated by size-exclusion chromatography". *Soil Biology and Biochemistry* 41,1775-1781 (2009).
- DAVIN, L.B.; Lewis, N.G. "Lignin primary structures and dirigent sites". *Current Opinion in Biotechnology* 16, 407-415 (2005).
- DELLICOLLI, H.T. "Controlled release of pesticides from kraft lignin carriers". *Controlled Release Pesticides*; Scher, H.B., ACS, Washington, DC, 84-93 (1977).
- DIXON, J.B.; Weed, S.B. "Minerals in soil environments". *Soil Sci. Soc. of America* (1979).
- DOMINGUEZ, J.C.; Oliet, M.; Alonso, M.V.; Gilarranz, M.A.; Rodriguez F. "Thermal stability and pyrolysis kinetics of organosolv lignins obtained from *Eucalyptus globulus*". *Industrial Crops and Products* 27, 150-156 (2008).
- FAN, L.T.; Singh, S.K. "Controlled Release: a Quantitative Treatment". Springer-Verlag, Berlin, (1989).
- FERNÁNDEZ PÉREZ, M.; Flores Céspedes, F.; González Pradas, E; Villafranca Sánchez, M; Pérez García, S.; Garrido Herrera, F.J. "Use of Activated Bentonites in Controlled-Release Formulations of Atrazine". *J. Agric. Food Chem.* 52, 3888-3893 (2004).
- FERNÁNDEZ PÉREZ, M.; Villafranca Sánchez, M.; Flores Céspedes, F. "Controlled-release formulations of cyromazine-lignin matrix coated with ethylcellulose". *Journal of Environmental Science and Health Part B*, 42, 863-868 (2007).
- FERNÁNDEZ PÉREZ, M.; Villafranca Sánchez, M.; Flores Céspedes, F.; Pérez García, S.; Daza Fernández, I. "Prevention of chloridazon and metribuzin pollution using lignin-based formulations". *Environmental Pollution* 158, 1412-1419 (2010).

- FLORES CÉSPEDES F.; Villafranca Sánchez, M.; Pérez García, S.; Fernández Pérez, M. " Modifying sorbents in controlled release formulations to prevent herbicides pollution". *Chemosphere* 69, 785-794 (2007).
- GARRIDO HERRERA, F.J; Daza Fernández, I.; González Pradas, E; Fernández Pérez, M. "Lignin-based formulations to prevent pesticides pollution" . *Journal of Hazardous Materials* 168, 220-225 (2009).
- GARRIDO HERRERA, F.J; González Pradas, E; Fernández Pérez, M. "Controlled Release of Isoproturom, Imidacloprid, and Cyromazine form Alginate-Bentonite-Activated Carbon Formulations". *J. Agric. Food Chem* 54, 10053-10060 (2006).
- GLASSER, W.G.; Kelley, S.S. "Lignin". *Concise Encyclopedia of Polymer Science and Engineering*; Kroschwitz, J.I., Wiley Interscience, New York, 544-547 (1990).
- GLASSER, W.G.; Barnett, C.A; Sano, Y. "Clasification of lignins with different genetic and industrial origins". *J. Applied Polyme. Sci. Appy. Polym. Symp.* 37, 441-460 (1983).
- GOHEEN, D.W.; Hoyt, C.H. "Lignin". *Kira-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, 14; John Wiley and Sons, New York 294-312 (1982).
- GÓMEZ SERRANO, V.; Fernández González, M.C.; Rojas Cervantes, M.L.; Alexandre Franco, M.F.; Macías García, A. "Carbonization and demineralization of coals: A study by means of FT-IR spectroscopy". *Bull. Mater. Sci.* 26 (7), 721-732 (2003).
- HERZBERG, G. *Infrared and Raman spectra of polyatomic molecules* (1945).
- HIGUCHI, T. "Mechanism of sustained-action medication. Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices". *Journal of Pharmaceutical Sciences* 52, 1145-1149 (1963).
- JIMÉNEZ GÓMEZ, S. *Fertilizantes de Liberación Lenta: Tipos, Evaluación y Aplicaciones*. Agrogúías Mundi-Prensa, Madrid (1992).
- KÄRKÖNEN, A.; Koutaniemi, S. "Lignin Biosynthesis Studies in Plant Tissue Cultures". *Journal of Integrative Plant Biology* 52(2), 176-185 (2010).

- KNOWLES, D.A. 2007. "Recent developments of safer formulations of agrochemicals Environmentalist 28:35–44 (2008).
- KUBO, S.; Kadla, J.F. "Kraft lignin/Poly(ethylene oxide) blends: Effect of lignin structure on miscibility and hydrogen bonding". Journal of Applied Polymer Science 98, 1437-1444 (2005).
- LAMIN, R.; Alves, R.;Rudek, E.; Wilhelm, H.; Cavalcanti, O.; Bresolin, T. "Films of chitosan and N-carboxymethyl-chitosan. Part II: Effect of plasticizers on their physiochemical properties". Polymer International 55, 970-977 (2006).
- LIANG, L.; Luo, L.; Zhang, S. "Adsorption and desorption of humic and fulvic on SO₂ particles at nano- and micro-scales". Colloids Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. doi:10.1016/j.colsurfa.2011.03.045) (2011).
- LIU, S.Q.; Zheng, T.; Wang, P.; Guo,L. " Preparation and characterization of activated carbon from bamboo by microwave-induced phosphoric acid activation". Industrial Crops and Products 31,233-238 (2010).
- MAGHSOODLOOA , S.H.; Noroozia B.;. Haghia, A.K.; Sorial, G.A. "Consequence of chitosan treating on the adsorption of humic acid by granularactivated carbón". Journal of Hazardous Materials 191, 380–387 (2011).
- McHUGH, D.J. "Worldwide distribution of commercial resources of seaweeds including *Gelidium*". Hydrobiology 221, 19-29 (1991).
- MINISTERIO DE INDUSTRIA Y ENERGÍA. Inventario de recursos de carbón en España. Centro de Estudios de la Energía, Madrid (1979).
- MINOR, J. Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, 19; John Wiley and Sons, N.Y. 379-419 (1982).
- MOGUL, M.G.; Akin, H.; Hasirci, N.; Trantolo, D.J.; Gresser, J.D.; Wise, D.L. "Controlled release of biologically active agents for purposes of agricultural crop management". Resources, Conservation and Recycling 16, 289-320 (1996).
- MORRIS, E.R.; Rees,D.A.; Thom,D.; Boyd, J. "Chiroptical and stoichiometric evidence of a specific primary dimerisation process in alginate gelation". Carbohydrate Research 66,145-154, (1978).

- NADA, A.M.A.; El-Sakhawy, M.; Kamel, S.M. "Infra-red spectroscopic study of lignins". *Polymer Degradation and Stability* 60, 247-251 (1998).
- OLIVARES MARTÍN, M.; Fernández González, C.; Macías García, A.; Gómez Serrano, V. "Preparación of activated carbons from cherry stones by activation with potassium hydroxide" *Applied Surface Science* 252, 5980-5983 (2006).
- ORACESCA, B.; Nixon, J.R.; Salomon, M.C. "Alginate transdermal delivery systems-A novel approach to the development of the device and its evaluation". *Proceed. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 19, 198-199 (1992).
- PFISTER, G.; Bahadir, M.; Korte, F. "Release characteristics of herbicides from calcium alginate gel formulations". *Journal of Controlled Release* 3, 229-233 (1986).
- PROVENZANO, M.R.; Sensei, N.; Miikki, V. "Characterization of composts and humic acid from pulp and paper mill biosludges by DSC in association with FTIR spectroscopy". *Journal of Thermal Analysis* 52, 1037-1046 (1998).
- RITGER, P.L.; Peppas, N.A. "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* 5, 23-36 (1987).
- RITGGLE, B.D.; Pender, D. "Kraft lignin adsorption of metribuzin as a controlled-release function evaluation". *J. Agric. Food Chem.* 1710-1712 (1992).
- ROBERT, A.Y., Mayer, L.C., Rezaaiyan, R. "Analytical method for the determination of cyromazine and melamine residues in soil using LC-UV and GC-MSD". *J. Agric. Food Chem.* 48, 3352-3358 (2000).
- SACHS, S.; Bernhard, G. "Humic acid model substances with pronounced redox functionality for the study of environmentally relevant interaction processes of metal ion in the presence of humic acid". *Geoderma* 162, 132-140 (2011).
- SÁEZ, V.; Hernáez, E.; Sanz, L. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, (2004).
- SCHER, H. B. *Controlled-Release Delivery Systems for Pesticides*; Marcel Dekker, Inc. N.Y. (1999).

- SCHNITZER, M. y Gupta, U.C.; "Determination of acidity in soil organic matter". Soil Sci. Soc. Am. Proc. 29: 274-277 (1965).
- SCHNITZER, M. "Organic matter characterisation" en "Methods of soil analysis". Part 2. Agron monograph nº 9." Page, A.L. y col. (Ed.). ASA-SSSA, 677 J. Segoe Rd. Madison, Wi 53711, (1982).
- SENNECA, O.; Scherillo, F.; Nunziata A. "Thermal degradation of pesticides under oxidative conditions". J. Anal. Appl. Pyrolysis 80, 61-76 (2007).
- SINGH, B.; Sharma, D.K.; Kumar, R.; Gupta, A. "Controlled release of thiram from neem-alginate-clay based delivery systems to manage environmental and health hazards". Applied Clay Science, 47, 384-391 (2010).
- SJÖSTROM, E. "Wood chemistry-fundamentals and applications". Academic Press, Orlando (1984).
- SPEIGHT, J.G. Fuel Science and Technology Handbook; Marcel Dekker, Inc., N.Y. (1990).
- SUAREZ RUIZ, I.; Marques, M.; Flores, D.; Guedes, A.; Rodrigues, S. "Correlation between optical, chemical and micro-structural parameters of high-rank coals and graphite". International Journal of Geology 77, 377-382 (2009).
- SUN KOU, M.R.; Volzone, C.; Sapag, K. "Las arcillas y sus diferentes aplicaciones en adsorción". Adsorbentes en la solución de algunos problemas ambientales; Ed. Rodríguez Reinoso, F., Red Iberoamericana de Adsorbentes para la protección Ambiental (2004).
- TEJADO, A.; Peña, A.; Labidi, J.; Echeverría, J.M.; Mondragon, I. "Physico-chemical characterization of lignins from different sources for use in phenol-formaldehyde resin synthesis". Biosource Technology, 98, 1655-1663 (2007).
- TOMLIN, C. The Pesticide Manual; British Crop Protection Council, England (2009).
- WANG, G.; Li, W.; Li, B.; Chen, H. "TG study on pyrolysis of biomass and its three components under syngas". Fuel 87, 552-558 (2008).

- WANG, W.; Yang, X.; Fang, Y.; Ding, J.; Yan, J. "Preparation and thermal properties of polyethylene glycol/expanded graphite blends for energy storage". *Applied Energy*. 86, 1479-1483 (2009).
- WHITE, J.L. "Interpretation of infrared spectra of soil minerals". *Soil Sci.*, 112, 22-31 (1971).
- WIENHOLD, B.J.; Gish, T.J. "Effect of water potential, temperature and soil microbial activity on release of starch-encapsulated atrazine and alachlor". *J. Environmental Quality*, 21, 382-386, (1992).
- WILKINS, R.M. *Controlled Delivery of Crop-Protection Agents*; Taylor and Francis, Bristol (1990).
- YOKLEY, R.A.; Mayer, L.C.; Rezaaiyan R.; Myra,E.M.; Cheung, M.W. "Analytical Method for the Determination of Cyromazine and Melanine Residues in Soil Using LC-UV and GC-MSSD" *J. Agric. Food Chem.*48,3352-3358 (2000).
- ZHANG, Y.; Du, J.; Zhang,F.; YU, Y.; Zhang, J. "Chemical characterization of humic substances isolated from mangrove swamp sediments: The Qinglan area of Hainan Island, China". *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 93, 220-227 (2011).