



**UNIVERSIDAD DE ALMERÍA**

**Facultad de Ciencias Experimentales**

**Departamento de Química Física, Bioquímica y**

**Química Inorgánica**

**APLICACIÓN DE BIOADSORBENTES EN LA  
PREPARACIÓN DE FORMULACIONES DE  
LIBERACIÓN CONTROLADA DE IMIDACLOPRID**

**M<sup>a</sup> Ángeles Hernández Barranco**

**Almería, 2011**

# **APLICACIÓN DE BIOADSORBENTES EN LA PREPARACIÓN DE FORMULACIONES DE LIBERACIÓN CONTROLADA DE IMIDACLOPRID**

Memoria presentada por M<sup>a</sup> Ángeles Hernández Barranco 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<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. D<sup>a</sup>. Matilde Villafranca  
Sánchez, Profesora Titular de  
Universidad del Departamento de  
Química Física, Bioquímica y Química  
Inorgánica. Facultad de Ciencias  
Experimentales. Universidad de  
Almería.

El alumno:

Fdo.: M<sup>a</sup> Ángeles Hernández Barranco

## ***ÍNDICE***

**ÍNDICE**

<b>PARTE I: PRESENTACIÓN</b>	<b>1</b>
<b>PARTE II: MEMORIA CIENTÍFICA</b>	<b>6</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>7</b>
<b>1.1. Aplicación de plaguicidas: problemática medioambiental</b>	<b>7</b>
<b>1.2. Imidacloprid</b>	<b>10</b>
<b>1.3. Sistemas basados en matriz polimérica de alginato</b>	<b>12</b>
<b>1.4. Objeto y alcance</b>	<b>19</b>
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>21</b>
<b>2.1. Materiales</b>	<b>21</b>
2.1.1. Imidacloprid	21
2.1.2. Materiales usados en la preparación de formulaciones de liberación controlada	21
2.1.2.1. Ácido algínico	21
2.1.2.2. Lignina	21
2.1.2.3. Orujo	22
2.1.2.4. Ácido húmico	22
2.1.2.5. Cloruro de calcio	22
2.1.2.6. Tripolifosfato	22
<b>2.2. Método analítico para la determinación del plaguicida</b>	<b>22</b>
<b>2.3. Preparación y caracterización de los agentes modificantes</b>	<b>26</b>

2.3.1. Preparación de: Lignina, Orujo, Ácido Húmico	26
2.3.1.1. Molturado y tamizado	26
2.3.1.2. Lavado Orujo	26
2.3.2. Caracterización	26
2.3.2.1. Espectroscopía de absorción IR	26
2.3.2.2. Espectroscopía de absorción UV	27
2.3.2.3. Composición química	27
2.3.2.4. Contenido en carbono y materia orgánica total	28
2.3.3. Estudio del proceso de adsorción de imidacloprid en disolución	29
2.3.3.1. Determinación del tiempo de equilibrio	29
2.3.3.2. Isotermas de adsorción	30
<b>2.4. Preparación de las formulaciones de liberación controlada</b>	<b>31</b>
<b>2.5. Caracterización y evaluación de las formulaciones de liberación controlada</b>	<b>32</b>
2.5.1. Determinación del contenido de ingrediente activo	32
2.5.2. Masa media	33
2.5.3. Determinación del tamaño de gránulo	33
2.5.4. Determinación de las características cinéticas del proceso de liberación	34

---

<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	35
<b>3.1. Caracterización del plaguicida y de los materiales utilizados en la preparación de las formulaciones de liberación controlada</b>	35
3.1.1. Espectro de absorción UV del Imidacloprid	35
3.1.2. Espectros de absorción IR	35
3.1.2.1. Espectro de absorción IR del Imidacloprid	35
3.1.2.2. Espectro de absorción IR de la lignina	36
3.1.2.3. Espectro de absorción IR del ácido húmico	38
3.1.2.4. Espectro de absorción IR del orujo	40
3.1.3. Composición química	41
3.1.4. Contenido en carbono y materia orgánica total	42
<b>3.2. Estudio del proceso de adsorción de Imidacloprid en disolución</b>	43
3.2.1. Determinación del tiempo de equilibrio del proceso de adsorción	43
3.2.2. Isotermas de adsorción	45
3.2.3. Ajuste de las isotermas de adsorción a diferentes modelos aplicables a los procesos de adsorción en disolución	47
<b>3.3. Preparación, caracterización y evaluación en agua de las formulaciones de liberación controlada de imidacloprid</b>	52
3.3.1. Características y composición de las formulaciones de liberación controlada	52
3.3.2. Estudio cinético del proceso de liberación de Imidacloprid	53

3.3.2.1. Ajuste de los datos experimentales de liberación de ingrediente activo al modelo de Ritger y Peppas	59
<b>4. PROPUESTAS SOBRE LA CONTINUACIÓN DEL TRABAJO</b>	<b>65</b>
<b>PARTE III: CONCLUSIONES</b>	<b>66</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>69</b>

## ***PARTE I: PRESENTACIÓN***

El “Máster en Residuos de Plaguicidas y Contaminantes. Control Alimentario y Ambiental” se organiza en cinco módulos entre los que se incluyen tres módulos de carácter teórico, un módulo experimental y el Trabajo fin de máster.

Cada uno de los Módulos se ha estructurado del siguiente modo:

**Módulo I. Plaguicidas**, se orienta en el estudio general de los plaguicidas desde diferentes aspectos, tales como legislación, registro o mejoras en prácticas agrícolas.

En la asignatura **Plaguicidas. Aplicaciones y tendencias** profundiza en la estructura química de los diferentes plaguicidas, clasificándolos en función de ésta, además de relacionar los grupos funcionales presentes con su actividad. También se ocupa de otros contaminantes ambientales y de las técnicas y equipos de aplicación de fitosanitarios, así como de su eficiencia.

En la asignatura **Políticas de seguridad alimentaria** se adquieren conocimientos acerca del marco normativo regulador para el control de residuos de plaguicidas y contaminantes en el ámbito internacional, nacional y autonómico. Algo muy importante es que se adquiere la destreza para localizar e interpretar el marco normativo regulador, así como los programas de control y vigilancia de contaminantes y residuos de plaguicidas en alimentos.

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

La última asignatura del módulo, **Formulaciones de plaguicidas. Liberación controlada**, se adquieren competencias y conocimientos para diseñar, preparar, caracterizar y evaluar diferentes formulaciones de liberación controlada. También se

dan a conocer las aplicaciones agronómicas de las formulaciones y las ventajas que implica su utilización en comparación con las formulaciones tradicionales.

**Módulo II. Contaminantes**, se centra en el estudio de contaminantes alimentarios y ambientales, abordando, entre otros, procesos de remediación de suelos y de tratamientos de aguas contaminadas.

En la asignatura **Calidad y trazabilidad alimentaria** se desarrollan habilidades para establecer sistemas de gestión de la trazabilidad alimentaria y para conocer los diferentes distintivos de calidad, los organismos que las regulan y la importancia del sistema APPCC.

En la asignatura **Contaminantes: significación alimentaria y ambiental**, se adquieren conocimientos y destrezas sobre toxicología básica, alimentaria y ambiental; incluyendo las fases del fenómeno tóxico.

Para finalizar este módulo, la asignatura **Contaminación y remediación de suelos** se dan a conocer 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.

**Módulo III. Gestión de laboratorios** este módulo se centra en estudiar la gestión de laboratorios en varios aspectos:

En la asignatura, **Muestreo. Preparación de muestras**, se dan a conocer los diferentes procedimientos de toma de muestra y de su importancia en el proceso analítico, además de las principales técnicas de extracción de los analitos y de preconcentración de trazas.

En la asignatura, **Tratamiento de datos analíticos. Control de calidad**, se destaca 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.

Para finalizar este módulo, la asignatura **Gestión de la calidad en laboratorios de ensayo**, se conocen las normas y documentos que establecen los requisitos para implementar sistemas de gestión de calidad en laboratorios de ensayo. También se da a conocer la diferencia entre las entidades de certificación y acreditación de laboratorios, sus ámbitos de aplicación y características particulares.

**Módulo IV. Experimentación en técnicas cromatográficas**, tiene un contenido fundamentalmente práctico, en el que se familiarizará con el manejo de técnicas analíticas avanzadas en el control de plaguicidas y contaminantes orgánicos, así como en la caracterización de metabolitos y/o productos de degradación.

En la asignatura **Espectrometría de masas**, se conocen las distintas técnicas de ionización y tipos de analizadores de masas aplicables para el desarrollo de métodos de análisis de compuestos orgánicos, modos de trabajo y posibilidades de acoplamiento con técnicas separativas.

En la asignatura, **Exposición a plaguicidas** conocemos las distintas estrategias para la evaluación de la exposición a plaguicidas desde el ámbito laboral y no ocupacional.

Para terminar este módulo, la asignatura **Experimentación en técnicas cromatográficas** se adquieren habilidades específicas para optimizar, mantener y utilizar adecuadamente instrumentos tanto de GC como de LC con diferentes configuraciones instrumentales (inyectores, columnas y detectores) en el campo del control de residuos de plaguicidas y otros contaminantes.

Por último, en cuanto a la complementariedad de las asignaturas cursadas en el máster con la línea de investigación, *“síntesis y caracterización de sistemas de liberación controlada de plaguicidas y contaminantes”*, puedo destacar que el primer y segundo módulo: plaguicidas y contaminantes, han aportado a mi trabajo conocimientos necesarios para comprender la legislación europea acerca de los niveles máximos permitidos de ciertos tipos de contaminantes, de igual manera se abordaron temas necesarios y muy relacionados con mi trabajo fin de máster; como es el caso de la evaluación, preparación y caracterización de formulaciones e interpretación de procesos de adsorción. Asimismo, destacar el estudio de las implicaciones medioambientales de los contaminantes.

El tercer y cuarto módulos han aportado a mi trabajo las herramientas básicas para desarrollar un trabajo de investigación científico en aspectos como tratamiento de datos, validación de métodos analíticos y manejo de técnicas analíticas avanzadas.

## ***PARTE II: MEMORIA CIENTÍFICA***

## 1. INTRODUCCIÓN

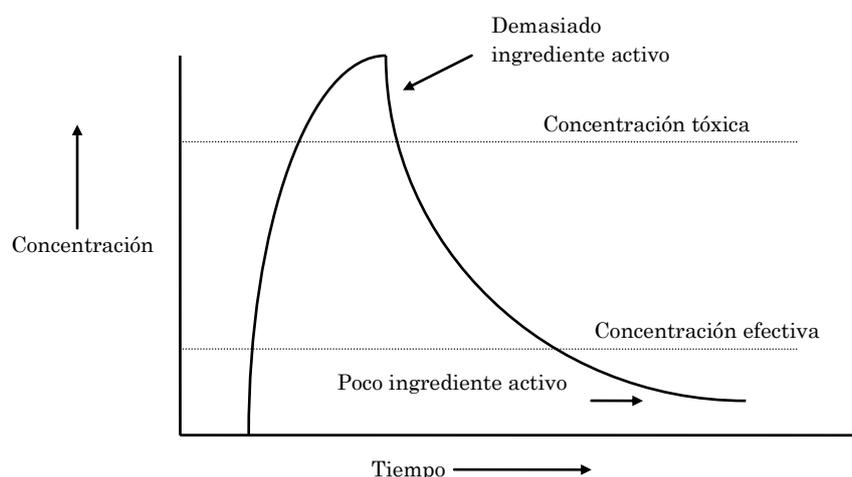
### 1.1. Aplicación de plaguicidas: problemática medioambiental

La contaminación del agua y la degradación de la calidad del suelo, por el uso continuado de plaguicidas en la actividad agrícola, es hoy día uno de los problemas más serios con los que se enfrenta la sociedad en su esfuerzo por la protección del medio ambiente.

El crecimiento de la población ha hecho que se intensifique el uso de la tierra y aumente su productividad en zonas ya preparadas para el cultivo (César-Valdés, 2005). La intensificación de tales prácticas con objeto de producir mayores cantidades de alimento conlleva la aparición de efectos secundarios no deseados. Así, los modelos climáticos de circulación general indican que el incremento del nivel de los gases de efecto invernadero puede hacer subir la temperatura media entre 1,5 y 4,5 °C, durante los próximos 100 años. Paralelamente, el aumento de concentraciones de dióxido de carbono puede incrementar la fotosíntesis de ciertas plantas entre el 30 y el 100%.

Asimismo, la intensificación de la producción agrícola ha conllevado al aumento progresivo en la utilización de plaguicidas para la protección vegetal, experimentando un crecimiento continuado en los últimos años. La ausencia de un control adecuado en aplicación de los plaguicidas al medio, ha dado lugar a la aparición de un mayor número de problemas medioambientales y riesgos sobre la salud humana, asociados a la utilización de estas sustancias poniéndose de manifiesto por la presencia de plaguicidas en suelos no cultivados, atmósfera y en aguas, tanto superficiales como subterráneas, lejos de los lugares de aplicación (Cheng, 1990; Cohen, 1990; Barbash, 2001; Flores-Céspedes, 2006; Arias-Estévez 2008).

Cuando un plaguicida es aplicado por métodos convencionales, puede sufrir pérdidas tales como lixiviación, evaporación y degradación. Estas pérdidas hacen que el plaguicida tenga mayor dificultad a la hora de alcanzar su objetivo. Para compensar dichas pérdidas, lo que se hace es aumentar la cantidad de plaguicida aplicada, por encima de la cantidad requerida (Mogul, 1996). Por lo que estamos utilizando concentraciones altas de plaguicidas, superiores incluso al nivel de concentración tóxica, que pueden producir riesgos medioambientales, además de afectar a organismos que en principio no son su objetivo. Como se observa en la siguiente figura:

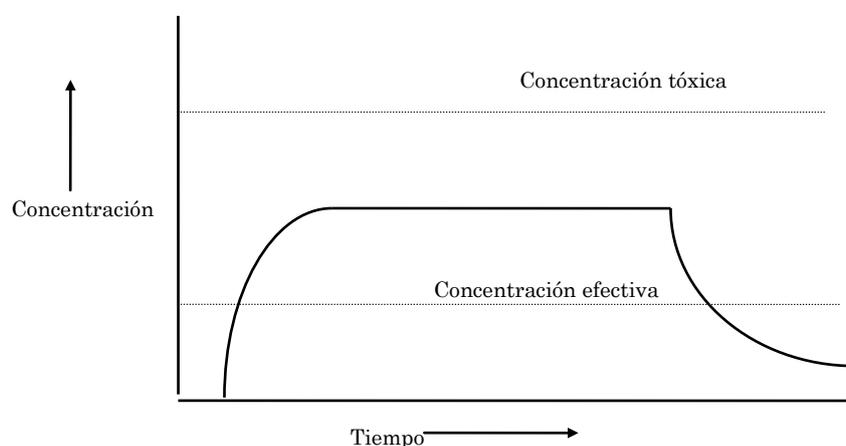


**Figura 1.1. Variación de la concentración de plaguicidas cuando se aplican por métodos convencionales**

La liberación controlada ha sido definida como una “una técnica o método en el que el agente químico activo está disponible para un producto específico a una velocidad y con una duración diseñados para lograr el efecto pretendido” (Scher, 1999).

La principal ventaja de las formulaciones de liberación controlada (FLCs) es que permiten el uso de una menor cantidad de plaguicida para el mismo periodo de

actividad (Mogul, 1996). Por lo que no van a resolver totalmente el problema, pero si pueden paliar en gran medida los efectos medioambientales adversos.



**Figura 1.2. Variación de la concentración de plaguicidas cuando se aplican mediante sistemas de liberación controlada**

Las FLCs están dirigidas para suministrar niveles óptimos de ingrediente activo en el lugar preciso en un período de tiempo deseado. Reducen las pérdidas de plaguicida, disminuyendo así la necesidad de aplicarlos frecuentemente y en mayor cantidad de la realmente requerida.

Los objetivos principales que se pretenden alcanzar con la liberación controlada son:

- Mejorar la efectividad del pesticida en el campo (disponibilidad para la plaga, persistencia).
- Mejorar las características de seguridad del plaguicida (disminuir la peligrosidad para el usuario y el medioambiente).
- Mejorar las cualidades de manejo del plaguicida (equipamiento, almacenaje).

Los sistemas de liberación controlada tienen algunas ventajas sobre los sistemas convencionales, tales como:

- Actividad biológica durante un periodo de tiempo más prolongado.
- Reducción de la toxicidad.
- Control y reducción de las pérdidas de plaguicida.
- Disminuir la fitotoxicidad sobre el cultivo.
- Reducción de la lixiviación hacia aguas subterráneas.
- Menor consumo de disolventes.
- Reducción de la cantidad de plaguicida aplicado.

## 1.2. Imidacloprid

El imidacloprid es un insecticida neonicotinoide. Su nombre químico según la IUPAC es 1-(6-cloro-3-piridilmetil)-N-nitroimidazolidin-2-ilidenoamina; su fórmula empírica es  $C_9H_{10}ClN_5O_2$  y su fórmula estructural la podemos apreciar en la figura 1.3.

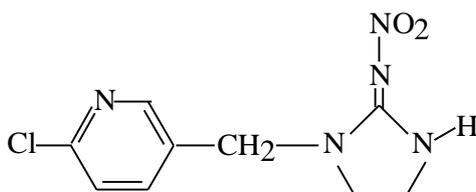


Figura 1.3. Fórmula estructural del imidacloprid.

En estado puro está en forma de cristales incoloros o de polvo beige. Tiene una masa molar de  $255,7 \text{ g mol}^{-1}$  y su punto de fusión es de  $136,4$  (forma cristalina 2) y  $143,8$  °C (forma cristalina 1). Su solubilidad en agua es de  $0,51 \text{ g L}^{-1}$  a  $20$  °C y en otros disolventes orgánicos ( $20$  °C) es la siguiente: en diclorometano de  $55,0 \text{ g L}^{-1}$ ; en

isopropanol de  $1,2 \text{ g L}^{-1}$ ; en tolueno de  $0,68 \text{ g L}^{-1}$  y en n-hexano  $< 0,1 \text{ g L}^{-1}$ . Su presión de vapor es de  $0,2 \text{ }\mu\text{Pa}$  a  $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $1,5 \times 10^9 \text{ mm Hg}$ ). Es estable a la hidrólisis en el intervalo de  $\text{pH} = 5$  y  $\text{pH} = 11$ , se descompone al calentarse y en su combustión forma gases tóxicos (Tomlin, 2002). Coeficiente de partición ( $\text{Log } K_{ow}$ ) es de 0,57.

Tiene aplicaciones tanto agrícolas, industriales y urbanas como pecuarias. Los usos agrícolas más frecuentes se dan en los cultivos hortofrutícolas, así como para cereales, patatas, algodón, etc, para el control de insectos chupadores (trip, mosca blanca), insectos del suelo y algunas especies de insectos masticadores.

Respecto al uso urbano y pecuario se utiliza para el control de pulgas y piojos en perros y gatos, de moscas en instalaciones pecuarias y de cucarachas y termitas subterráneas. En cuanto al uso industrial se utiliza para la formulación de plaguicidas.

Es un insecticida sistémico con acción por contacto así como por ingestión. Actúa sobre el sistema nervioso central, causando un bloqueo irreversible de los receptores postsinápticos de acetilcolina nicotínicos, inhibiendo a la enzima acetilcolinesterasa.

Su persistencia en suelos es moderada, con una vida media de 48 a 190 días, dependiendo de la presencia de cobertura vegetal y materia orgánica. En suelos con una cobertura densa y alto contenido de materia orgánica, la degradación del Imidacloprid se acelera. El proceso de degradación ocurre en dos fases, primero se produce el ácido -6- cloronicotínico y posteriormente dicho metabolito es mineralizado hasta dióxido de carbono. Este compuesto muestra una afinidad moderada por la materia orgánica del suelo.

En agua su vida media es mayor de 31 días a diferentes valores de pH. En las plantas puede penetrar hacia el interior de sus tejidos y ser transportado por el tallo hasta los brotes antes de ser metabolizado. En los tejidos vegetales se metaboliza perdiendo primero el grupo nitro, y posteriormente, por reacciones de hidroxilación en

el anillo imidazolidino e hidrólisis, se forma el ácido 6-cloronicotínico y varios compuestos conjugados. Su potencial de bioconcentración en organismos acuáticos es bajo.

Se comercializa con diferentes formulaciones, como gránulos dispersables, suspensiones concentradas, polvos humectables y dispersables, soluciones tópicas y cebos insecticidas. Lo patentó Bayer Cropscience y tiene diferentes nombres comerciales como Kohinor<sup>®</sup>, Admire<sup>®</sup>, Advantage<sup>®</sup>, Merit<sup>®</sup>, Confidor<sup>®</sup>, etc.

### 1.3. Sistemas basados en matriz polimérica de alginato

Para preparar FLCs, se deben seleccionar una serie de 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, y el agente activo que se va a utilizar. Así, 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**

<p><b>1.- Sistemas físicos</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>A.- Sistemas de reserva con membrana controladora de velocidad<ul style="list-style-type: none"><li>1.- Microencapsulación</li><li>2.- Macroencapsulación</li><li>3.- Sistemas membrana</li></ul></li><li>B.- Sistemas de reserva sin membrana controladora de velocidad<ul style="list-style-type: none"><li>1.- Fibras huecas</li><li>2.- Sustratos y espumas poliméricos porosos</li></ul></li><li>C.- Sistemas monolíticos<ul style="list-style-type: none"><li>1.- Físicamente disueltos en matriz no porosa, polimérica o elastómera<ul style="list-style-type: none"><li>a.- No erosionables</li><li>b.- Erosionables</li><li>c.- Degradables</li></ul></li><li>2.- Físicamente dispersos en matriz no porosa, polimérica o elastómera<ul style="list-style-type: none"><li>a.- No erosionables</li><li>b.- Erosionables</li><li>c.- Degradables</li></ul></li></ul></li><li>D.- Estructuras laminadas</li><li>E.- Otros métodos físicos<ul style="list-style-type: none"><li>1.- Bombas osmóticas</li><li>2.- Adsorción sobre resinas de intercambio iónico</li></ul></li></ul> <p><b>2.- Sistemas químicos</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>A.- Erosión química de la matriz polimérica</li><li>B.- Erosión biológica de la matriz polimérica</li></ul>
--

Probablemente, el sistema más utilizado para controlar la liberación de un elevado número de agentes activos es dispersarlos en una matriz inerte o polimérica. El agente activo se disuelve en la matriz hasta que se alcanza la saturación. El exceso de agente activo permanece disperso dentro de la matriz constituyendo, según la clasificación anterior, un sistema físicamente disperso.

En los últimos años las industrias biomédica y farmacéutica han mostrado gran interés en la preparación de FLCs donde el ingrediente activo está físicamente disperso en una matriz polimérica capaz de formar un hidrogel.

Los hidrogeles son redes tridimensionales de las cadenas de un polímero hidrofílico con propiedades intermedias entre líquidos y sólidos. Los hidrogeles son polímeros física o químicamente reticulados que pueden absorber grandes cantidades de agua sin disolverse y sin perder su forma (Omidian, 2005). Estos materiales se han utilizado en una amplia gama de aplicaciones biológicas, médicas, farmacéuticas y medioambientales debido a sus propiedades características, tales como hinchamiento en agua, biocompatibilidad, su carácter hidrofílico y su no toxicidad (Griffith, 2000; Shin, 2007; Kim, 2006).

De entre todos los materiales poliméricos usados para la preparación de hidrogeles, el alginato es uno de los más comúnmente utilizados. Se trata de un polisacárido lineal aniónico constituido por dos unidades monoméricas, el ácido  $\beta$ -D-manurónico (M) y el ácido  $\alpha$ -L-gulurónico (G) (Fig. 1.4.):

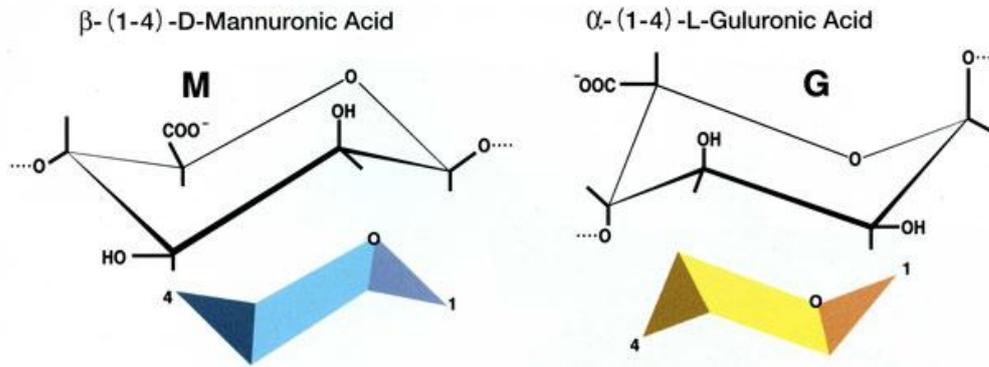


Figura 1.4. Estructura de las unidades monoméricas del alginato

Estos se agrupan en bloques de secuencias MM, MG, unidos por enlaces glucosídicos  $\beta$ -(1-4); y bloques GG, GM, unidos por enlaces glucosídicos  $\alpha$ -(1-4) (Figura 1.5.).

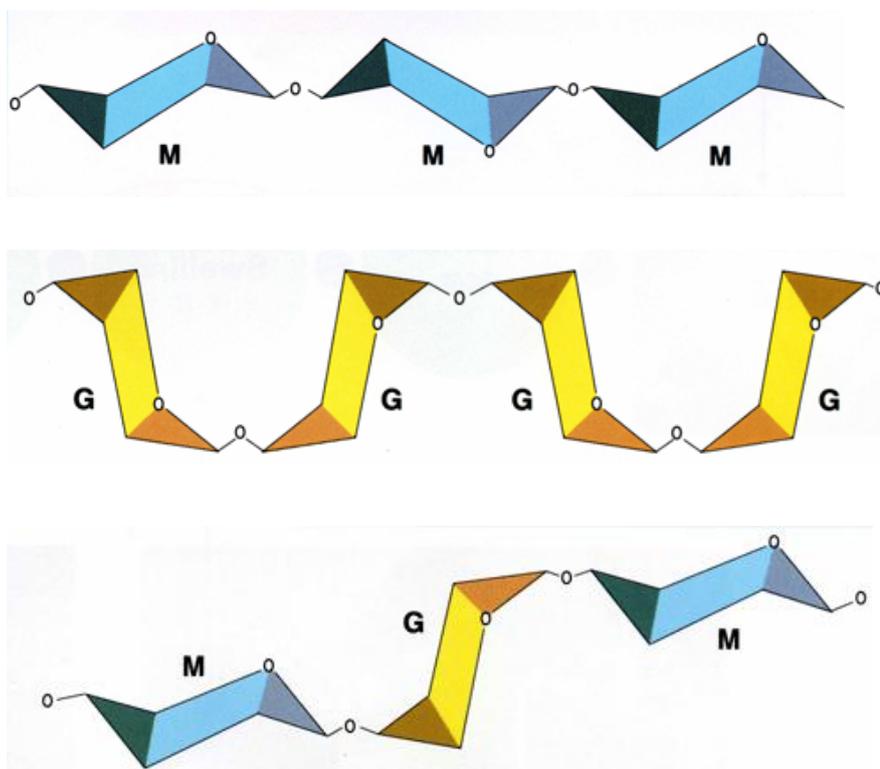
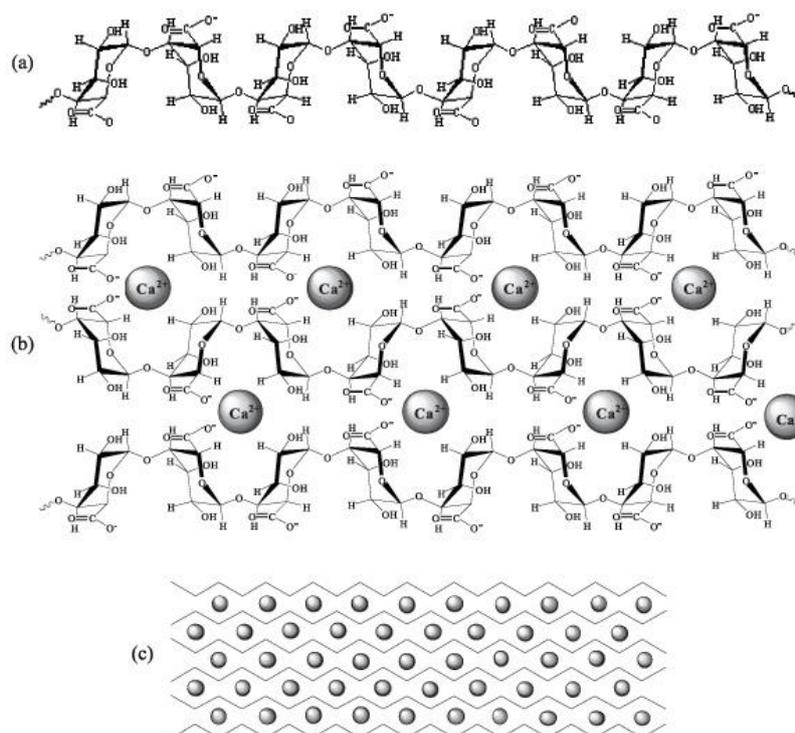


Figura 1.5. Estructura de los bloques MM, GG y MG

Las propiedades gelificantes de sus residuos galurónicos con iones divalentes como el calcio permiten la formación de matrices de alginato en forma de gel, película, granos, y "pellets" (Sarmiento, 2006) (Figura 1.6.).



**Figura 1.6. Formación de los geles de alginato, homopolímeros del ácido galurónico en disolución (a), unión de cadenas de homopolímero mediante iones  $\text{Ca}^{2+}$  (b) y formación del gel (c).**

Aunque muchos polímeros naturales se pueden utilizar para producir hidrogeles, la versatilidad estructural presente en los hidrogeles de alginato junto con la capacidad de poder incorporar materiales adsorbentes, les ha dado propiedades distintivas, que a su vez ha mejorado su utilidad práctica justificando el uso de los mismos.

En los últimos años numerosos investigadores han utilizado diferentes materiales adsorbentes con objeto de modificar los perfiles de liberación de los plaguicidas y adoptarlos a las necesidades del mercado.

Como agentes modificantes, para ralentizar la liberación de los plaguicidas, se han utilizado materiales inorgánicos tales como arcillas, carbones y gel de sílice, así como diversas formas de biomasa procedente de plantas, animales o microorganismos. Estas últimas sustancias denominadas biosorbentes son generalmente los subproductos o residuos procedentes de grandes operaciones a escala industrial y actividades agrícolas (Gadd, 2009). Esta biomasa parece ser una opción viable para obtención de agentes modificantes para la preparación de FLCs, debido a sus cualidades económicas y ecológicas, a su composición química natural, abundante disponibilidad, bajo costo. Entre estos materiales, los subproductos agrícolas han atraído un gran interés debido a su complejidad química, ya que se componen principalmente de lignina y celulosa y son ricos en diferentes tipos de grupos funcionales, tales como alcoholes, aldehídos, cetonas, grupos carboxílicos, fenoles y éteres. Estos grupos tienen la capacidad de interactuar con grupos funcionales presentes en los plaguicidas, lo cual da lugar a la obtención de FLCs con diferentes velocidades de liberación (Demirbas, 2008)

En este estudio se han utilizado materiales poliméricos biodegradables y de bajo coste, como son, el orujo, la lignina y el ácido húmico.

El **orujo** procedente de la extracción del aceite de oliva es uno de los desechos agroindustriales más abundantes en la cuenca del Mediterráneo, especialmente en España. El orujo de oliva es el residuo sólido que se obtiene durante el proceso de producción del aceite de oliva, en cantidades que oscilan entre 30 y 35 kg por cada 100 kg de aceituna tratada. Este residuo consiste en una matriz lignocelulósica con compuestos polifenólicos, ácidos urónicos, y residuos oleosos, tradicionalmente ha sido usado como fertilizante natural, como aditivo en la alimentación animal, como fuente de energía calorífica o estabilizante del suelo, pero en la actualidad está siendo considerado como un prometedor adsorbente de bajo coste debido tanto a la fácil disponibilidad del mismo, así como, a los numerosos sitios, potencialmente activos

para la interacción con los plaguicidas, tales como grupos carboxílicos, hidroxilo, metoxi y fenólicos presentes (Martín-Lara, 2008; Pagnanelli, 2010).

El término general **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).

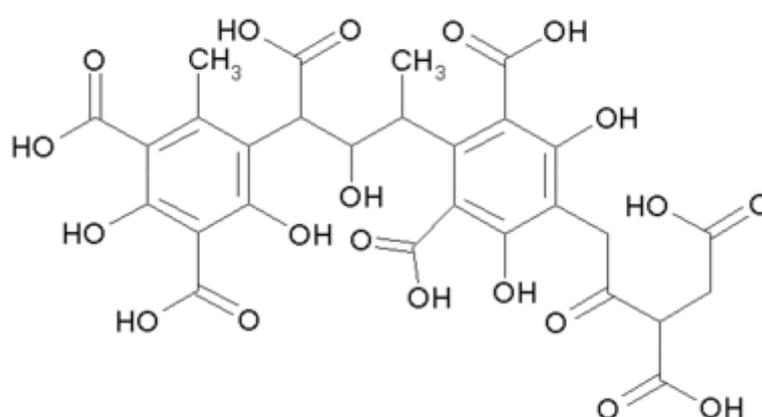
Como ya se ha comentado, se encuentra en todas las plantas y además constituye, aproximadamente, una cuarta parte del peso de la madera seca. Las ligninas son desechos o subproductos de la mayoría de las industrias forestales y agrícolas de todo el mundo. Se obtienen como un subproducto del proceso de 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 modificador de FLCs de plaguicidas, teniendo además la ventaja de ser biodegradable y protectora de la radiación UV (Dellicolli, 1977).

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<sup>-3</sup>, 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 sí 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 -OCH<sub>3</sub> (Nada, 1998).

El **ácido húmico** es un derivado del mineral Leonardita, una forma oxidada de lignito, y son los constituyentes principales de materia orgánica vegetal en un estado avanzado de descomposición.



**Figura 1.7. Estructura del ácido húmico**

En su estructura (figura 1.7), el ácido húmico contiene componentes hidrofóbicos e hidrofílicos, así como muchos grupos funcionales, tales como grupos fenólicos, grupos carbonilo, hidroxilo, conectados con carbonos aromáticos. La existencia de grupos carboxílicos y grupos fenólicos hacen que el ácido húmico se cargue negativamente en disoluciones acuosas; por lo que el ácido húmico puede sufrir diferentes cambios en su estructura (Maghsoodloo, 2011).

#### **1.4. Objeto y alcance**

Teniendo en cuenta todo lo anterior, el objeto fundamental del trabajo que se da cuenta en la presente memoria es evaluar la potencial aplicabilidad de materiales poliméricos biodegradables tales como lignina, el orujo y el ácido húmico en la preparación de nuevas FLCs del insecticida imidacloprid.

El trabajo se ha dividido en cuatro fases diferenciadas, con el fin de llegar a conseguir el objetivo planteado:

En la primera fase, se da cuenta de la preparación y caracterización de los adsorbentes lignina, orujo y ácido húmico, utilizados como modificadores en la preparación de las FLCs.

En una segunda fase, se procede a la obtención y estudio de las isotermas de adsorción del plaguicida imidacloprid, en disolución acuosa por las muestras de adsorbentes. Con ello se ha pretendido determinar la capacidad de retención de los adsorbentes con respecto al imidacloprid.

En la tercera fase se lleva a cabo la preparación y caracterización de las FLCs de imidacloprid, utilizando como agentes modificantes materiales biodegradables, tales como la lignina, el orujo y el ácido húmico.

Por último, en la cuarta fase se lleva a cabo la evaluación 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. Materiales

#### 2.1.1. Imidacloprid

Para la preparación de los patrones de la curva de calibrado utilizadas en el presente trabajo se ha usado una muestra analítica de pureza mínima igual al 99,9% y de masa molar  $255,66 \text{ g mol}^{-1}$ , suministrado por la casa Sigma Aldrich.

Como ingrediente activo para la preparación de las FLCs se ha utilizado Imidacloprid, de grado técnico de pureza mínima igual a 98,6% y de masa molar  $255,66 \text{ g mol}^{-1}$ , suministrado por Laboratorios Alcotán (Sevilla, España).

Dicho producto se considera de pureza adecuada para este estudio.

#### 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 FLCs se ha utilizado el ácido algínico, como sal sódica, obtenido a partir de *Macrocystis Pyrifera*, que nos fue suministrado por Sigma Chemical Co.

##### 2.1.2.2. Lignina

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

### 2.1.2.3. Orujo

En nuestro estudio hemos utilizado un orujo de oliva, procedente de la almazara de Felix S. C. A. Este orujo proviene de un sistema de extracción del aceite de oliva mediante el método tradicional. En lo sucesivo la denominaremos como Or.

### 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.

### 2.1.2.5. Cloruro de calcio

Para la preparación de los encapsulados se empleó una disolución de  $\text{CaCl}_2$  de 0,25 M preparada a partir de reactivo grado técnico con una pureza mínima del 97%, con peso molecular de  $110,99 \text{ g mol}^{-1}$  y suministrado por la casa Riedel- deHaën.

### 2.1.2.6. Tripolifosfato

Para la disgregación de gránulos de FLCs de alginato se empleó tripolifosfato, como sal pentosódica anhidra, de pureza 90% y suministrada por Sigma Chemical Co.

## 2.2. 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 imidacloprid, 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 de que el método más útil, de acuerdo con los equipos disponibles y con la naturaleza de nuestro

trabajo, era la determinación por cromatografía de líquidos de alta resolución. Para ello se utilizó un equipo cromatográfico de la casa *Beckman Coulter*, con bomba de gradiente, modelo 126, detector diodo array, modelo 168, inyector automático, modelo 508 autosampler y software 32 Karat.

Después de un estudio de los métodos de cromatografía de líquidos descritos en bibliografía para este plaguicida 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 35% acetonitrilo (grado "HPLC", > 99,9%) y de 65% agua (desionizada, de pureza adecuada para HPLC), suministrados por la casa J.T.Baker (Deventer, Holanda).
- **Flujo del eluyente:** 1,0 mL/min
- **Cantidad de muestra inyectada:** 20 µL
- **Columna:** NOVA PACK C18 (150 x 3,9 mm) suministrada por Waters Assoc (Milford MA, USA).
- **Longitud de onda:** Como longitud de onda de trabajo se utilizó la correspondiente al máximo de absorción ( $\lambda = 270$  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 la correspondiente a la matriz de lignina o del orujo en el extracto acuoso de los adsorbentes utilizados.

En la figura 2.1 se muestra el cromatograma obtenido para el imidacloprid en los extractos acuosos de los adsorbentes.

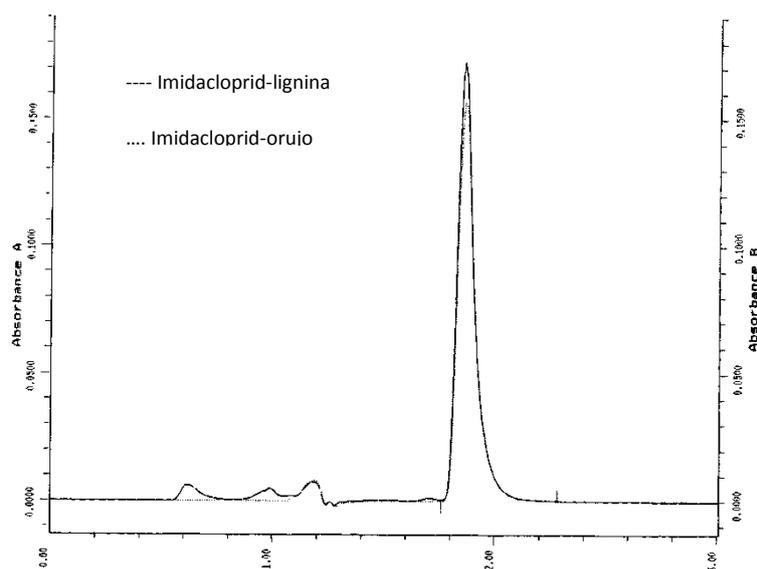


Figura 2.1. Cromatograma Imidacloprid

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

Para la obtención de la recta de calibrado, en cada caso se prepararon una serie de disoluciones acuosas de imidacloprid de concentración perfectamente conocida, entre  $0,026 \text{ mg L}^{-1}$  y  $2,999 \text{ mg L}^{-1}$ . Estas disoluciones, una vez filtradas a través de filtros de nylon de tamaño de poro de  $0,20 \text{ }\mu\text{m}$ , se inyectaron por triplicado 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 imidacloprid

<i>C</i> (mg L <sup>-1</sup> )	área de pico
0,026	0,063
0,100	0,237
0,249	0,580
0,501	1,101
0,999	2,201
1,493	3,101
1,999	4,228
2,493	5,252
2,999	6,224

En la figura 2.2, se representan los valores de área del pico obtenidos en función de la concentración (mg plaguicida L<sup>-1</sup>) para el plaguicida estudiado. El coeficiente de correlación obtenido para esta recta de calibrado resultó ser de 0,999.

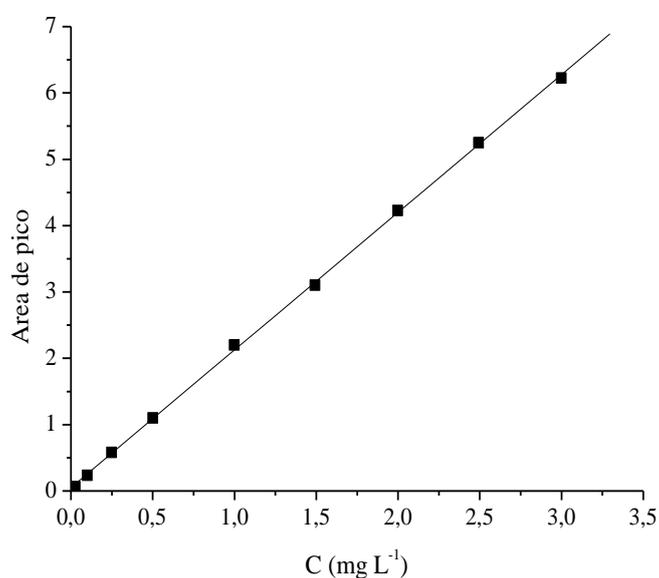


Figura 2.2. Recta de calibrado correspondiente a las disoluciones acuosas de imidacloprid en el intervalo de concentraciones estudiado

## **2.3. Preparación y caracterización de los agentes modificantes**

### **2.3.1. Preparación de Lignina, Orujo, Ácido Húmico**

#### **2.3.1.1. Molturado y tamizado**

El orujo fue molturado mediante un molino de la casa IKA Werke, modelo MF10, provisto de un cabezal de molturación por choque modelo MF10.2. Mientras que la lignina y el ácido húmico fueron molturados con un mortero. A continuación, las muestras fueron tamizadas usando un tamiz con un diámetro de luz de 160  $\mu\text{m}$ , y secadas en una estufa a 110 °C durante 24 horas, tiempo suficiente para el secado de las muestras. Pasadas estas 24 horas, se sacaron las muestras de la estufa y se almacenaron en un desecador.

#### **2.3.1.2. Lavado orujo**

La muestra de orujo fue lavada con agua destilada, para homogeneizarla, eliminando así posibles impurezas. Para ello, se pesaron 25 gramos de la muestra de orujo, se le adicionaron 250 mL de agua destilada y se sometió a agitación durante 1 día. Al día siguiente, se centrifugó la muestra, eliminando el agua, y se volvió a realizar un nuevo lavado con otros 250 mL. Tras este segundo lavado, se secó a 110°C en una estufa durante 24 horas.

### **2.3.2. Caracterización**

#### **2.3.2.1. Espectroscopía de absorción IR**

Los espectros de absorción FT-IR de los materiales utilizados en la preparación de las FLCs 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  $\text{cm}^{-1}$  y 400  $\text{cm}^{-1}$ .

### 2.3.2.2. Espectroscopía de absorción UV

El espectro de absorción en la zona ultravioleta del imidacloprid utilizado en la preparación de las FLCs 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.

### 2.3.2.3. Composición química

A la lignina, ácido húmico y orujo utilizados en nuestro estudio se les han 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 N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O y SO<sub>2</sub>.

Para obtener la acidez total del ácido húmico y del orujo 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)<sub>2</sub> 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 tanto en el ácido húmico como en el orujo 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 CO<sub>2</sub>. 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 Orto-Alresa, modelo digicen 21R.

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):

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

### 2.3.2.4. Contenido en carbono y materia orgánica total

Para la determinación del contenido en carbono y de materia orgánica total, de entre los métodos propuestos en bibliografía se ha utilizado por su comodidad, rapidez y exactitud, el descrito por Walkley y Black (Jackson, 1982).

Este método está basado en la oxidación de la materia orgánica del suelo con dicromato potásico en medio ácido y posterior valoración del dicromato añadido con sal ferrosa. La concentración del dicromato utilizado ha sido 1 N, el medio ácido se consiguió con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado, la sal ferrosa utilizada fue el sulfato ferroso amónico de concentración 0,5 N y como indicador redox se utilizó la difenilamina.

Se pesó 0,1 gramo de cada adsorbente, se introdujeron en un matraz erlenmeyer, donde se añadieron 20 mL de dicromato potásico 1 N. Se agitó y se le

añadió 20 mL de ácido sulfúrico concentrado, agitándolo nuevamente y se dejó reposar durante 30 minutos. También se preparó un blanco.

Transcurrido el tiempo, a cada matraz se le añadió 200 mL de agua destilada y 10 mL de ácido fosfórico del 85%, agitándolo y enfriando con un poco de agua. Se añadió 1 mL de difenilamina a cada matraz, y se valoró cuidadosamente con sulfato ferroso amónico 0,5 N hasta la aparición de un color verde manzana.

Mediante este método se determina el contenido en carbono fácilmente oxidable. El cálculo del contenido en carbono total y materia orgánica total, que es aproximado y empírico, se basa en el supuesto de que por término medio el carbono valorado por este método, o fácilmente oxidable, es el 77% del carbono total y que la materia orgánica del suelo tiene el 58% de carbono.

### **2.3.3. Estudio del proceso de adsorción de imidacloprid en disolución**

#### **2.3.3.1. Determinación del tiempo de equilibrio**

Con objeto de determinar el tiempo de equilibrio correspondiente a los procesos de adsorción de imidacloprid en contacto con los distintos adsorbentes utilizados, se ha seguido el método que se describe a continuación.

Se prepararon una serie de células de adsorción consistentes en matraces erlenmeyer de 100 mL de capacidad, conteniendo cada una de ellas una cantidad fija de adsorbente (0,1 g) y un volumen de 25 mL de una disolución de imidacloprid de una concentración igual a 30,48 mg L<sup>-1</sup>.

Esta serie de células de adsorción fueron introducidas en un baño termostático, de la casa *New Brunswick Scientific Co.*, modelo G25 & R25, a la temperatura de 25 °C y a una agitación de 200 rpm. A diferentes tiempos, se fueron separando la fase sólida y disolución mediante centrifugación (10.000 rpm durante 10 minutos) utilizando una centrífuga de la casa Orto-Alresa, modelo digicen 21R, y se determinó la concentración

de las diferentes disoluciones (expresada en  $\text{mg L}^{-1}$ ) en función del tiempo, utilizando el método analítico descrito en el apartado 2.2, hasta que dicha concentración se mantuviera constante. Una vez que esto sucedía, se consideraba alcanzado el equilibrio de adsorción y, en consecuencia, concluida la experiencia.

### 2.3.3.2. Isotermas de adsorción

Las experiencias de adsorción de imidacloprid sobre los distintos adsorbentes utilizados fueron realizadas como se describe a continuación.

Se prepararon una serie de células de adsorción consistentes en matraces erlenmeyer de 100 mL de capacidad, conteniendo cada una de ellas 0,1 g de adsorbente a las cuales se les añadió 25 mL de una disolución de imidacloprid, en medio  $\text{CaCl}_2$  0,01 M, cuya concentración inicial ( $C_0$ ) estaba comprendida entre 2,01 y 51  $\text{mg L}^{-1}$ .

Dichos matraces se introdujeron en un baño termostático a la temperatura de 25 °C y a una agitación de 200 rpm durante el tiempo suficiente para que se alcance el equilibrio de adsorción. Transcurrido dicho tiempo, se separaron mediante centrifugación la fase sólida y la disolución. La concentración (C) de las distintas disoluciones de imidacloprid en equilibrio con los adsorbentes fue determinada siguiendo el método analítico descrito en el apartado 2.2.

A partir de los valores de C así obtenidos y los correspondientes a las concentraciones iniciales ( $C_0$ ), se ha podido determinar la cantidad de plaguicida adsorbida, expresada como mg de plaguicida por gramo de adsorbente (X), así como establecer las isotermas experimentales de adsorción a partir de la representación  $X = f(C)$ . Las experiencias de adsorción fueron realizadas a la temperatura de 25 °C. En todas las experiencias se dispuso del correspondiente blanco y todos los puntos se pusieron por duplicado.

## 2.4. Preparación de las formulaciones de liberación controlada

Se obtuvieron diferentes FLCs usando alginato sódico como polímero de entrecruzamiento, imidacloprid técnico como ingrediente activo y como agentes modificantes el orujo, la lignina y el ácido húmico.

A partir del método desarrollado por Connick (Connick, 1982), se obtuvieron dichas FLCs. En primer lugar, se prepararon diferentes dispersiones en 100 mL de agua, mezclando los componentes anteriormente citados en las proporciones que aparecen en la tabla siguiente (Tabla 2.4). Las dispersiones se mantuvieron en agitación con un agitador de aspas Heidolph modelo 50111 durante 1 hora, tiempo suficiente para que las diferentes dispersiones se homogenicen totalmente. El pH de dichas dispersiones, se muestra en la Tabla 2.2.

**Tabla 2.2. Características y composición de las dispersiones de Imidacloprid**

MUESTRA	IMIDACLOPRID (Im) (%)	ALGINATO (A) (%)	LIGNINA (L) (%)	ORUJO (Or) (%)	A.HÚMICO (AH) (%)	Agua (%)	pH
ImA	0,28	1,49	–	–	–	98,23	7,85
ImAOr	1,3	1,5	–	5,4	–	100	5,7
ImAAH	1,3	1,5	–	–	5,4	100	5,13
ImAL	1,3	1,5	5,4	–	–	100	6,2

**ImA:** Imidacloprid-alginato, **ImAOr:** Imidacloprid-alginato-orujo, **ImAAH:** Imidacloprid-alginato-ácido húmico, **ImAL:** Imidacloprid-alginato-lignina

Tras la homogeneización, las dispersiones se impulsaron 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 gotee uniformemente sobre una disolución de CaCl<sub>2</sub> 0,25 M. La disolución de CaCl<sub>2</sub> 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 tuvieran tiempo suficiente para formarse adecuadamente como gránulos. Finalmente, para separar los gránulos formados por gelificación de la disolución de  $\text{CaCl}_2$ , se utilizó un embudo Büchner. Una vez separados los gránulos se lavaron con unos 50 mL de agua destilada para eliminar el exceso de  $\text{Ca}^{2+}$  y se dejaron al aire durante 48 horas. Transcurrido este tiempo, se depositaron los gránulos en placas Petri y se introdujeron en una estufa, marca Selecta tipo aire forzado, a una temperatura de 45 °C hasta pesada constante.

### **2.5. Caracterización y evaluación de las formulaciones de liberación controlada**

#### **2.5.1. Determinación del contenido de ingrediente activo**

La determinación del contenido en ingrediente activo de las diferentes FLCs fue realizada como se describe a continuación:

Se colocaron muestras de unos 20 mg. (aproximadamente 5 gránulos secos) correspondientes a cada uno de las FLCs preparadas, en matraces erlenmeyer de 100 mL de capacidad con tapón de rosca, y una vez allí se adicionaron 5 mL de una disolución 0,03 M de tripolifosfato. 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.

Pasadas las 2 horas, 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 colocaron 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 0,20  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro y se determinó la concentración de plaguicida por cromatografía líquida de alta resolución, usando el método descrito en el apartado 2.2.

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

### 2.5.2. Masa media

Para la determinación de la masa media de los gránulos preparados se pesaron en una balanza Mettler Toledo FC 204, un grupo de 15 gránulos. Esto se repitió 5 veces con 5 grupos diferentes de gránulos.

### 2.5.3. Determinación del tamaño de gránulo

Para la determinación y estudio del tamaño de los gránulos se utilizó un microscopio óptico *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, repitiéndolo 4 veces para cada uno de los sistemas. Una vez capturadas las imágenes, con la ayuda del programa informático *Image-Pro Plus 6.0 (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.

#### **2.5.4. Determinación de las características cinéticas del proceso de liberación**

Para el estudio cinético del proceso de liberación de imidacloprid 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, añadiéndoles 500 mL de agua destilada. Los matraces se colocaron en un baño termostático a la Temperatura de 25 °C y con una agitación constante de 200 rpm. A intervalos de tiempo se retiró una alícuota de 1 mL, reponiendo dicho volumen con agua destilada. Posteriormente, se midió la concentración de ingrediente activo liberado en agua de la propia alícuota, según el método propuesto en el apartado 2.2., durante el tiempo necesario para alcanzar al menos un valor igual al 90% de ingrediente activo liberado.

Una vez finalizado el estudio, los gránulos se secan hasta pesada constante y se disgregan según el método descrito anteriormente en el apartado 2.5.1., con el objeto de determinar el resto de plaguicida que en ellos pudiera quedar. Todas las muestras se colocaron por duplicado.

Paralelamente y con el fin de obtener datos comparativos, se estudió el proceso de solubilización del producto técnico de imidacloprid, siguiendo el método anteriormente expuesto, sustituyendo los gránulos por la cantidad equivalente de ingrediente activo.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. Caracterización del plaguicida y de los materiales utilizados en la preparación de las formulaciones de liberación controlada

##### 3.1.1. Espectro de absorción UV del imidacloprid

El espectro obtenido según se describe en el apartado 2.3.2.2 se puede observar en la figura 3.1.

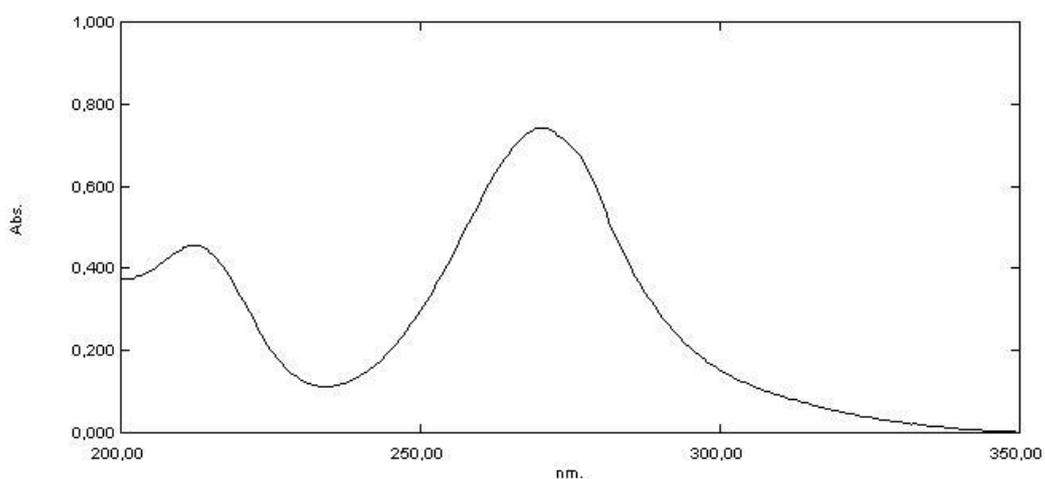


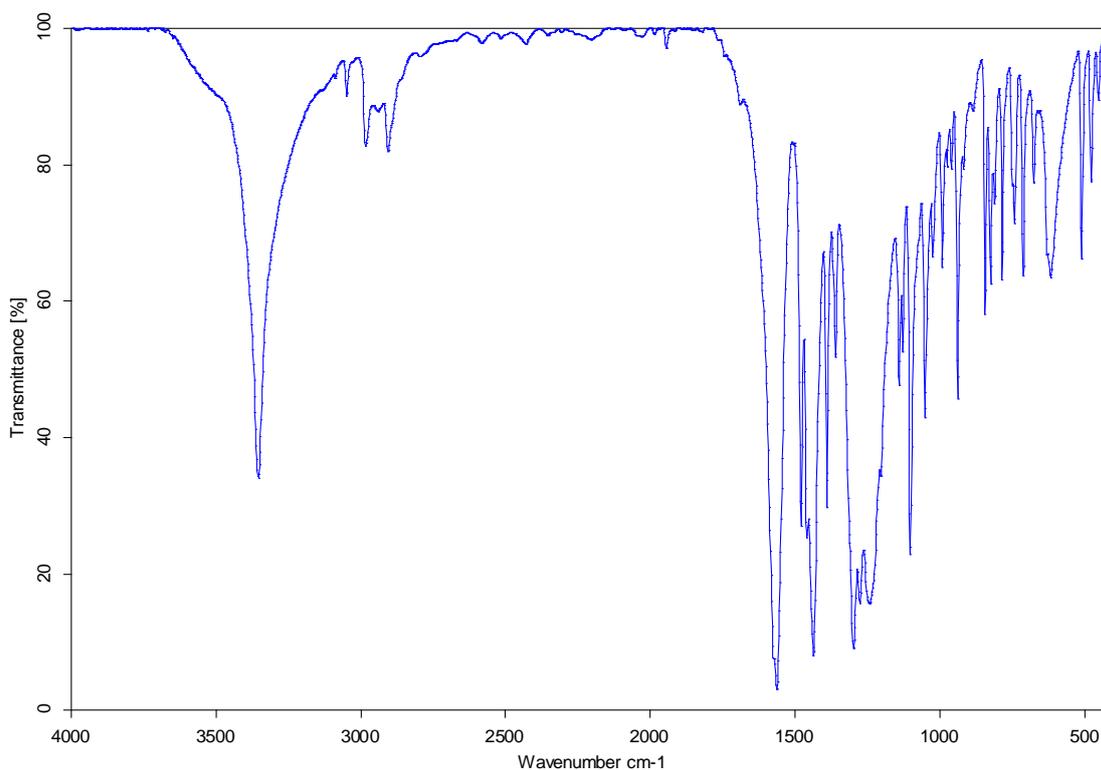
Figura 3.1. Espectro de absorción UV del imidacloprid

Este espectro de absorción UV es similar al que aparece en la bibliografía para este compuesto (Yoichi, 1994). En él podemos observar la existencia de dos máximos de absorción, uno a 270 nm y otro a 212 nm, siendo el primero de ellos el más intenso, y por tanto el que se ha seleccionado para llevar a cabo las medidas cuantitativas.

##### 3.1.2. Espectros de absorción IR

###### 3.1.2.1. Espectro de absorción IR del imidacloprid

A partir del método descrito en el apartado 2.3.2.1., se ha obtenido el espectro de absorción IR correspondiente al imidacloprid. Dicho espectro se representa en la figura 3.2.

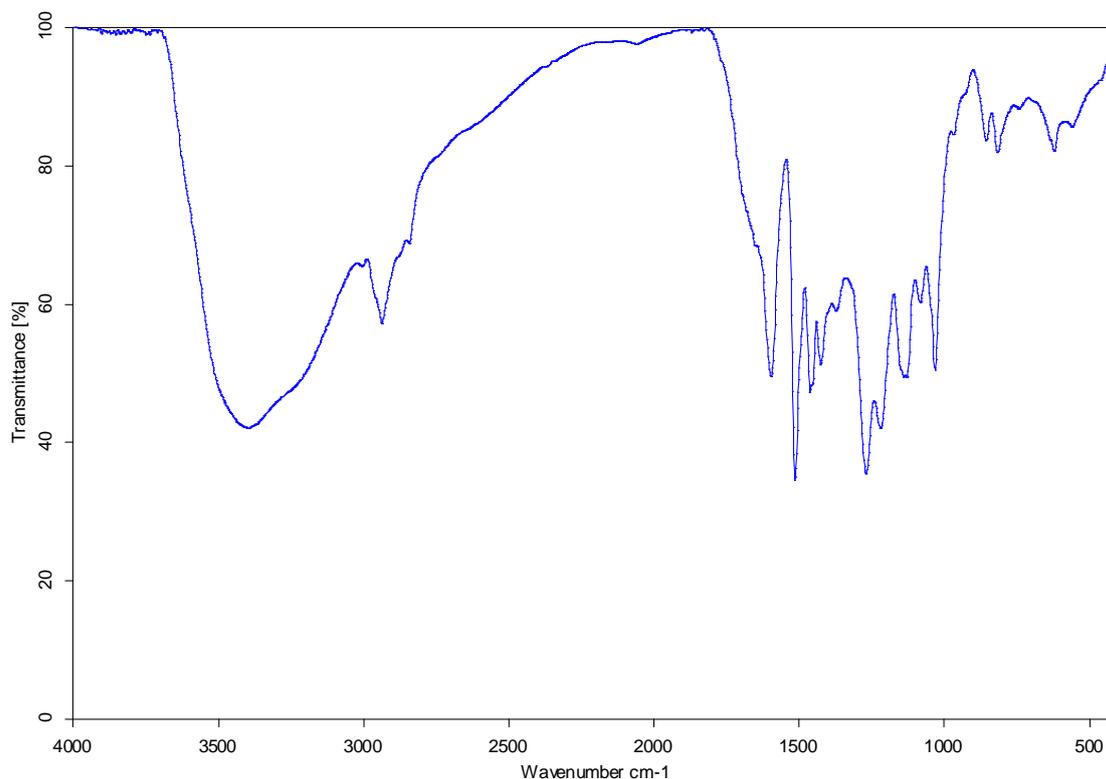


**Figura 3.2. Espectro de absorción IR del imidacloprid**

Este espectro de absorción es similar al que aparece en la bibliografía para este compuesto (NIST, 2003). En él podemos observar una banda situada en la región de los  $3350\text{ cm}^{-1}$  debida a la vibración de la tensión del grupo N-H. Otra banda en la región de  $3050\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a la vibración de tensión del enlace C-H aromático. Una banda intensa a  $1564\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a la vibración de tensión del doble enlace C=N y por último dos bandas intensas a  $\approx 1440\text{ cm}^{-1}$  y  $\approx 1275\text{ cm}^{-1}$ , debidas a la vibración de tensión asimétrica y simétrica del grupo  $\text{NO}_2$ , respectivamente.

### 3.1.2.2. Espectro de absorción IR de la lignina

A partir del método descrito en el apartado 2.3.2.1 se ha obtenido el espectro de absorción IR correspondiente a la lignina. Dicho espectro se representa en la figura 3.3.



**Figura 3.3. Espectro de absorción IR de la lignina**

Este espectro de absorción es similar al que aparece en la bibliografía para este compuesto (Tejado, 2007; Boeriu, 2004). En él podemos observar la existencia de una banda muy amplia centrada a  $3397\text{ cm}^{-1}$  atribuida a la vibración de los grupos hidroxilo en estructuras fenólicas y alifáticas. Otra centrada alrededor de  $2936\text{ cm}^{-1}$ , 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  $1425\text{ cm}^{-1}$  se corresponden a las vibraciones del anillo aromático del esqueleto de fenilpropano y la banda centrada  $1459\text{ cm}^{-1}$  a la deformación C-H combinada con la vibración del anillo aromático.

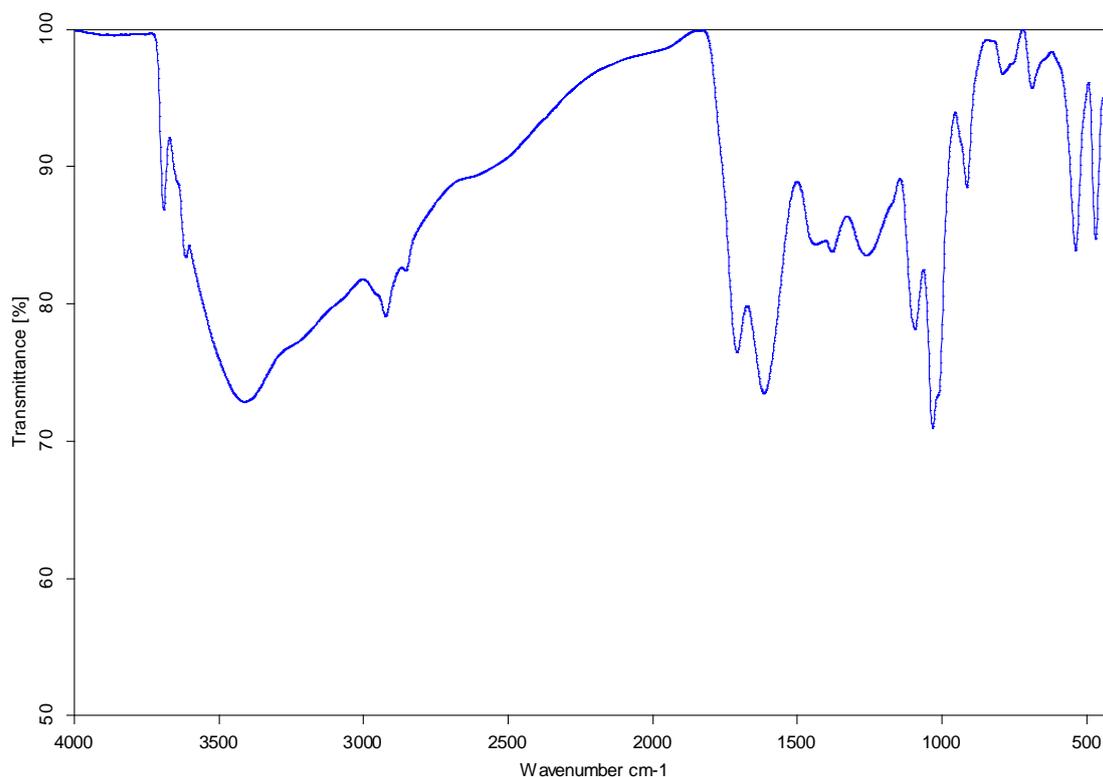
Todas estas bandas son comunes para cualquier tipo de lignina, dependiendo la intensidad de las mismas del tipo concreto de lignina estudiada (Boeriu, 2004).

La región espectral por debajo de  $1400\text{ cm}^{-1}$  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 3.3 muestra las vibraciones características de la unidad guaiacil; una banda centrada a  $1269\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al anillo G y a la vibración C=O; otra a  $1131\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a la deformación planar C-H y las bandas a  $855$  y  $816\text{ cm}^{-1}$  asignadas a vibraciones no coplanarias C-H (Tejado, 2007; Boeriu, 2004).

#### **3.1.2.3. Espectro de absorción IR del ácido húmico**

A partir del método descrito en el apartado 2.3.2.1 se ha obtenido el espectro de absorción IR correspondiente a la lignina. Dicho espectro se representa en la figura 3.4.

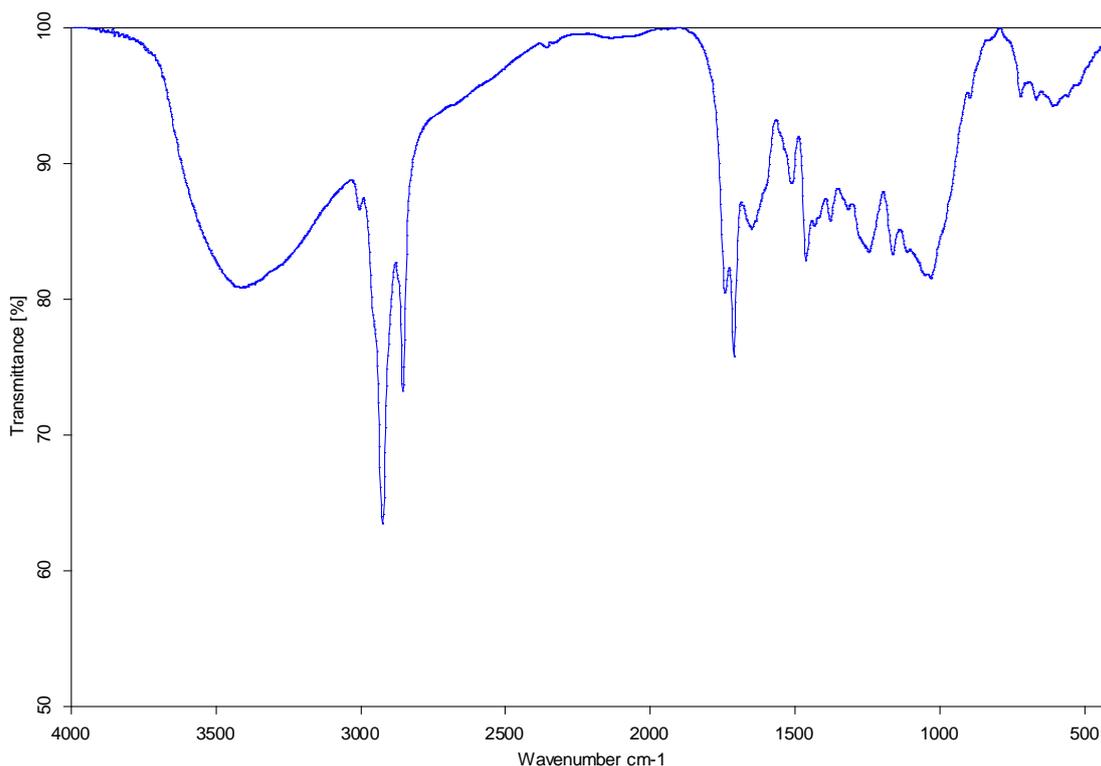


**Figura 3.4. Espectro de absorción IR del ácido húmico**

Este espectro de absorción es similar al que aparece en la bibliografía para este compuesto (D’Orazio, 2009; Liang, 2011). En él se puede observar una banda bastante ancha a  $3407\text{ cm}^{-1}$  que se asigna a la vibración de tensión de los grupos  $\text{-OH}$ , dos bandas a  $2924$  y  $2853\text{ cm}^{-1}$  que se corresponden con las vibraciones de tensión de los enlaces C-H alifáticos, una banda centrada a  $1709\text{ cm}^{-1}$  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  $1618\text{ cm}^{-1}$ , a números de onda más bajos se obtienen las bandas correspondientes a la vibración de tensión de los  $\text{-OH}$  fenólicos ( $1439\text{ cm}^{-1}$ ) y de los enlaces C-O de estructuras carboxílicas y fenólicas ( $1262\text{ cm}^{-1}$ ).

### 3.1.2.4. Espectro de absorción IR del orujo

A partir del método descrito en el apartado 2.3.2.1 se ha obtenido el espectro de absorción IR para el orujo (Figura 3.5). Dicho espectro es similar a los que parecen en bibliografía para este material (Pagnanelli, 2003)



**Figura 3.5. Espectro IR correspondiente al orujo**

La figura 3.5 refleja la naturaleza compleja de la muestra, con una gran cantidad de picos de absorción. Se observa una banda bastante ancha a  $3435\text{ cm}^{-1}$  que puede ser atribuida a las vibraciones de tensión del grupo O-H, esta banda está superpuesta con la banda correspondiente a la vibración de tensión de los grupos amino localizada entre  $3500$  y  $3200\text{ cm}^{-1}$ . Los picos mostrados a  $2925$  y  $2854\text{ cm}^{-1}$  son debidos a las vibraciones de tensión C-H de los grupos CH, CH<sub>2</sub> y CH<sub>3</sub> presentes en la estructura de la lignina. El pico a  $1712\text{ cm}^{-1}$  puede ser asignado a la vibración de

tensión C=O de los grupos carboxílicos. Dos picos a 1654 y 1465  $\text{cm}^{-1}$  son atribuidos a la tensión antisimétrica y simétrica respectivamente del grupo carboxilato. La banda centrada a 1245  $\text{cm}^{-1}$  se corresponde con la vibración de flexión de los grupos O-C-H, C-C-H y C-O-H (Pagnanelli, 2010; Tamer, 2009).

### 3.1.3. Composición química

Los resultados del análisis químico elemental de la lignina, ácido húmico y orujo utilizados en la presente memoria, así como los correspondientes a la acidez total, grupos -COOH y grupos -OH fenólicos, aparecen recogidos en las tablas 3.1 y 3.2, respectivamente.

**Tabla 3.1. Análisis químico elemental, del orujo, del ácido húmico y de la lignina**

	Carbono	Azufre	Hidrógeno	Nitrógeno	Oxígeno
(%)					
Orujo	53,91	< 1	7,32	1,18	36,59
Ácido Húmico	45,28	1,77	4,09	< 1	47,86
Lignina	62,54	1,67	5,75	< 1	29,04

Tales resultados se corresponden con los valores obtenidos por otros autores para sustancias similares (Suárez-Ruiz, 2006; Yang, 2010; Sachs, 2011).

A la vista de la tabla 3.1 se observa que los valores en carbono varían entre 62,54% para el caso de la lignina y 45,28% en el caso del ácido húmico, presentando un valor intermedio e igual a 53,91% en el caso del orujo. Por otro lado el mayor valor de oxígeno que presenta el ácido húmico estaría relacionado con una mayor presencia de grupos carboxílicos en este modificador.

Tabla 3.2. Acidez total, grupos –COOH y grupos –OH fenólicos del ácido húmico y del orujo

	Acidez total	grupos –COOH	grupos –OH
	(meq g <sup>-1</sup> )		
Orujo	8,51	0,70	7,81
Ácido Húmico	5,36	1,07	4,29

El mayor contenido en grupos carboxílicos presentes en el ácido húmico, como se observa en la tabla 3.2, estaría de acuerdo con los resultados obtenidos en el análisis elemental.

### 3.1.4. Contenido en carbono y materia orgánica total

Los valores correspondientes al contenido en carbono y materia orgánica total, obtenidos según el método propuesto en el apartado 2.3.2.4., aparecen representados en la tabla 3.3:

Tabla 3.3. Contenido en carbono y materia orgánica total de las muestras de lignina, ácido húmico y orujo

Muestra	% C.O.	% MO total
Orujo	40,12	69,01
Ácido Húmico	32,61	56,09
Lignina	50,44	86,76

El contenido de materia orgánica, así como el carbono orgánico, varía según la siguiente secuencia: Ácido húmico < Orujo < Lignina. Este orden está de acuerdo con los valores obtenidos en el análisis químico elemental para el carbono en las distintas muestras estudiadas.

### 3.2. Estudio del proceso de adsorción de imidacloprid en disolución

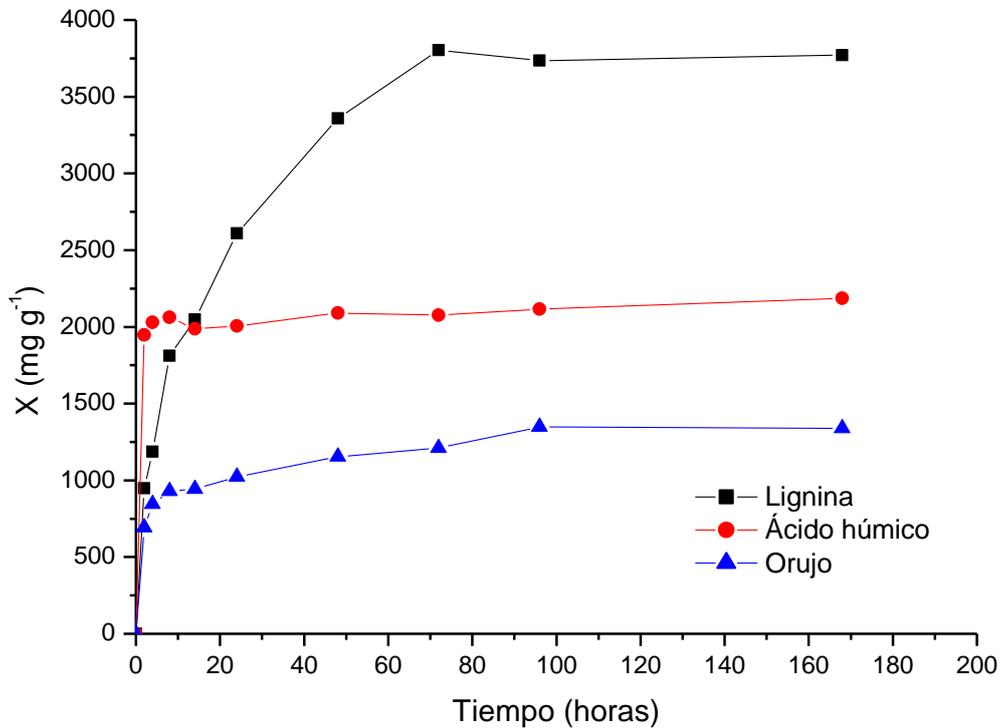
#### 3.2.1. Determinación del tiempo de equilibrio del proceso de adsorción

Operando de la forma descrita en el apartado 2.3.3.1, los resultados experimentales obtenidos para el estudio cinético de adsorción de imidacloprid sobre la lignina, el orujo y el ácido húmico, se muestra en la tabla 3.4.

**Tabla 3.4. Tiempo de equilibrio del proceso de adsorción de imidacloprid, en medio  $\text{CaCl}_2$  0,01 M, sobre las muestras de orujo, ácido húmico y lignina**

Tiempo (horas)	Lignina	Ácido Húmico	Orujo
	Cantidad retenida ( $\text{mg g}^{-1}$ )		
0	0	0	0
2	948,90	1947,79	691,71
4	1186,03	2029,46	844,68
8	1812,13	2061,77	929,83
14	2047,79	1986,15	942,08
24	2609,10	2005,27	1022,28
48	3358,65	2090,97	1153,84
72	3804,41	2076,49	1210,54
96	3735,89	2115,39	1347,56
168	3769,93	2186,85	1339,22

En la figura 3.6 aparecen las representaciones de la variación de la cantidad de imidacloprid retenido por unidad de masa de los adsorbentes en función del tiempo.



**Figura 3.6. Determinación del tiempo de equilibrio del proceso de adsorción de cada imidacloprid sobre lignina, orujo y ácido húmico**

Según se observa en la figura anterior, el tiempo de equilibrio del proceso de adsorción del imidacloprid es de 24 horas para el ácido húmico y de aproximadamente 100 horas para el orujo y la lignina. Estos tiempos de equilibrio son comparables a los obtenidos por otros autores para el proceso de adsorción sobre adsorbentes similares (González-Pradas, 1999; Van Benium, 2006). De acuerdo con lo especificado anteriormente y con objeto de asegurarnos que los datos de adsorción correspondían realmente a un estado de equilibrio, las experiencias encaminadas a la obtención de las isothermas de adsorción se realizaron a 168 horas (7 días).

## 3.2.2. Isotermas de adsorción

Operando de la forma descrita en el apartado 2.3.3.2, y utilizando el método analítico indicado en el apartado 2.2, se ha determinado para el plaguicida estudiado, los valores de X (miligramo de adsorbato retenido por gramo de adsorbente) y de C (concentración de equilibrio), los cuales aparecen reflejados en la tabla 3.5.

**Tabla 3.5. Datos correspondientes a la adsorción de imidacloprid, en medio CaCl<sub>2</sub> 0,01 M, sobre las muestras de lignina, ácido húmico y orujo**

Lignina		Ácido húmico		Orujo	
C (mg L <sup>-1</sup> )	X (mg g <sup>-1</sup> )	C (mg L <sup>-1</sup> )	X (mg g <sup>-1</sup> )	C (mg L <sup>-1</sup> )	X (mg g <sup>-1</sup> )
0	0	0	0	0	0
1,07	0,21	1,68	0,17	2,17	0,05
2,12	0,48	2,77	0,29	3,90	0,09
3,22	0,74	4,56	0,46	5,94	0,12
4,60	1,14	6,21	0,59	7,67	0,22
6,46	1,63	8,32	0,80	10,47	0,26
7,48	2,30	11,20	1,02	14,02	0,33
9,92	2,58	13,84	1,31	17,92	0,43
11,90	2,98	16,50	1,53	20,20	0,48
15,88	3,25	19,83	1,62	23,89	0,61
19,76	3,34	22,36	1,83	28,57	0,67
22,93	3,46	26,23	2,21	32,33	0,70
		29,45	2,42	36,37	0,71

Con objeto de proceder a la obtención de las isothermas experimentales de adsorción, tales datos se han representado en la forma cantidad de plaguicida adsorbida por gramo de adsorbente frente a la concentración de equilibrio de plaguicida,  $X = f(C)$ , y aparecen representados en la figura 3.7.

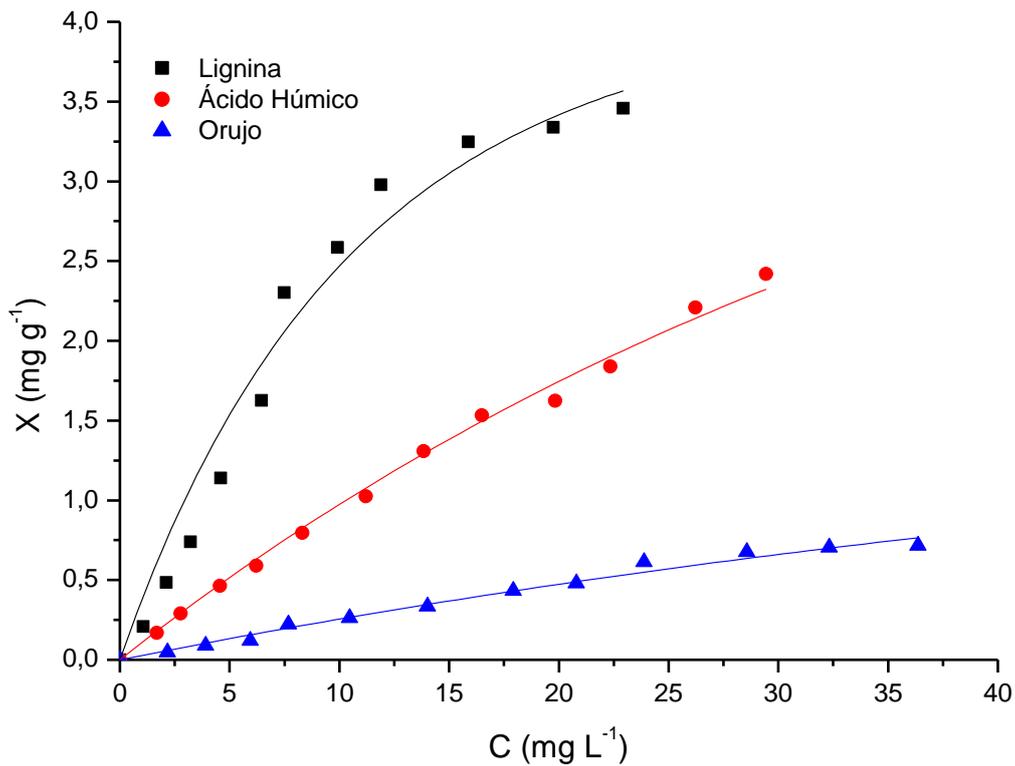


Figura 3.7. Isothermas de adsorción de imidacloprid, en medio  $\text{CaCl}_2$  0,01 M, sobre las muestras de lignina, orujo y ácido húmico

A la vista de la figura 3.7, puede observarse que en todos los casos las citadas isothermas aparecen bien definidas en el intervalo de concentraciones de equilibrio estudiado.

De la observación de las isothermas experimentales y de acuerdo con la pendiente inicial de las mismas, se pueden considerar como del tipo "C" de la

clasificación de Giles (Giles, 1960); este tipo de isothermas se obtienen cuando se produce una partición constante del adsorbato entre la disolución y el adsorbente, aproximándose las mismas, por tanto, a la linealidad. No obstante, un estudio más detallado de dichas isothermas pone de manifiesto que éstas podrían evolucionar hacia el tipo “L”, indicando una mediana afinidad de los centros activos de la superficie de los adsorbentes, sobre todo en los casos del orujo y del ácido húmico, por las moléculas de imidacloprid.

No obstante lo comentado anteriormente, si consideramos el comportamiento general de los adsorbentes estudiados frente al imidacloprid, se observa que la afinidad de los adsorbentes por las moléculas de plaguicida crece desde el orujo hasta la lignina, según el orden que se especifica:

$$\text{orujo} < \text{ácido húmico} < \text{lignina}$$

### 3.2.3. Ajuste de las isothermas de adsorción a diferentes modelos aplicables a los procesos de adsorción en disolución

Con el objetivo de determinar la capacidad de adsorción de los distintos adsorbentes por la molécula del plaguicida estudiado, las isothermas experimentales de adsorción en disolución se ajustaron a diversos modelos descritos en bibliografía (Kipling, 1980; Adamson, 1982).

El modelo más general es el propuesto por Giles y col. (Giles, 1974a), y está basado en la ecuación de Langmuir (Langmuir, 1918; Kipling, 1980).

$$X = \frac{k \cdot K_L \cdot C_e}{1 + k \cdot C_e} \quad (\text{Ec 1})$$

donde  $k = w \cdot C^\beta$ ,  $X$  = cantidad de soluto adsorbido por unidad de masa de adsorbente,  $C_e$  = concentración de equilibrio del soluto y  $K_L, w, \beta$  = constantes.

Esta ecuación permite una descripción de varios tipos de isothermas de adsorción de acuerdo con la variación de  $X$  con respecto a la concentración de equilibrio ( $C_e$ ), y del valor de  $\beta$ . Cuando  $k$  es constante aparece la ecuación clásica de Langmuir aplicable a los procesos de adsorción en disolución (Langmuir, 1918; Kipling, 1980):

$$X = \frac{b \cdot X_m \cdot C_e}{1 + b \cdot C_e} \quad (\text{Ec. 2})$$

donde  $X$  es la cantidad de soluto adsorbido por unidad de masa de adsorbente,  $C_e$  es la concentración de equilibrio del adsorbato,  $b$  ( $k$ ) es una constante relacionada con la energía de adsorción y  $X_m$  ( $K_L$ ) es la cantidad máxima de adsorbato que puede ser adsorbida.

Partiendo nuevamente de la ecuación 1, para el caso de disoluciones diluidas, es decir, para valores muy bajos de  $C_e$ , tenemos:

$$X = K_L \cdot w \cdot C_e^{\beta+1} \quad (\text{Ec. 3})$$

ó

$$X = K_f \cdot C_e^n \quad (\text{Ec. 4})$$

Estas son las expresiones de la ecuación de Freundlich (Adamson, 1982), donde  $X$  y  $C_e$  tienen el mismo significado que en las ecuaciones anteriores  $K_f = w K_L$ ;  $n = \beta + 1$  son constantes que caracterizan la capacidad de adsorción del adsorbente referida al adsorbato.  $K_f$  representa la cantidad de adsorbato adsorbido para una concentración de equilibrio de  $1 \text{ mg L}^{-1}$ , estando también relacionada con la adsorción a valores bajos de concentración del adsorbato; y  $n$  es una medida de la intensidad de la adsorción y refleja el grado en el que la adsorción es función de la concentración (Calvet, 1980).

Es interesante destacar que los valores de la constante  $n$  son en algunos casos iguales o muy próximos a la unidad; en estas circunstancias, las ecuaciones 3 y 4 describen una isoterma lineal, que viene dada por la ecuación 5 (Boast, 1973; Voice, 1983).

$$X = K_d \times C \quad (\text{Ec.5})$$

donde  $K_d$  es el coeficiente de distribución.

La aplicación de esta ecuación facilita enormemente la descripción de la adsorción. Asimismo, en los casos donde la materia orgánica es abundante, el coeficiente  $K_d$  se puede considerar como un coeficiente de reparto entre la fase acuosa y la fase sólida.

En el presente trabajo, después de ensayar los modelos anteriormente citados (Langmuir, Freundlich e isoterma lineal) y a la vista de los resultados obtenidos, se ha elegido el modelo de Freundlich para el ajuste de los datos experimentales en el proceso de adsorción de imidacloprid por los distintos adsorbentes estudiados.

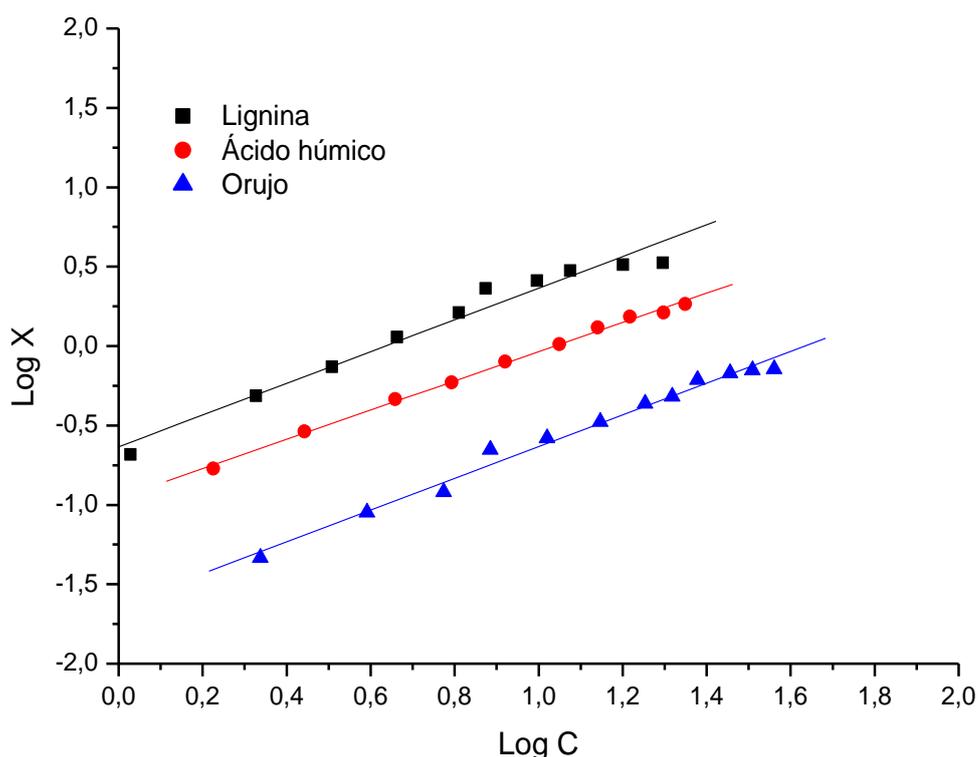
#### - Ajuste al modelo de Freundlich

La ecuación 4 puede ser expresada en forma lineal, lo cual nos permite ensayar si los datos experimentales se ajustan o no al modelo de Freundlich (Adamson, 1982).

$$\log X = \log K_f + n \cdot \log C \quad (\text{Ec. 6})$$

Si los datos experimentales se ajustan a la ecuación de Freundlich, la representación de  $\log X$  frente a  $\log C$  conduce a la obtención de una línea recta, a partir de cuya ordenada en el origen y pendiente se pueden calcular los parámetros  $K_f$  y  $n$ , característicos del modelo de Freundlich.

La representación de los datos experimentales de la tabla 3.5, correspondientes a la adsorción del imidacloprid sobre lignina, ácido húmico y orujo, en la forma  $\log X = f(\log C)$ , ha conducido a la obtención de la figura 3.8. en las que se observa una aceptable linealidad en todo el intervalo de concentraciones estudiado.



**Figura 3.8. Aplicación de la ecuación de Freundlich a los datos de adsorción de imidacloprid sobre lignina, ácido húmico y orujo**

Todas las rectas obtenidas han sido ajustadas analíticamente siguiendo el método de los mínimos cuadrados, calculándose en cada una de ellas la ordenada en el origen y la pendiente. A partir de tales datos se han calculado los valores de  $K_f$  y  $n$ , los cuales se recogen, junto con los correspondientes coeficientes de correlación ( $r$ ), en la tabla 3.6.

**Tabla 3.6. Constantes del modelo Freundlich correspondientes a la adsorción de imidacloprid sobre orujo, ácido húmico y lignina**

Adsorbente	$K_f$ ( $\text{mg}^{1-n} \text{g}^{-1} \text{L}^n$ )	n	r
Orujo	0,023	0,999	0,992
Ácido Húmico	0,111	0,919	0,998
Lignina	0,234	0,997	0,983

Ala vista de la tabla 3.6 se observa que los valores de  $K_f$  varían entre  $0,023 \text{ mg}^{1-n} \text{ g}^{-1} \text{ L}^n$  para la adsorción de imidacloprid sobre el orujo y  $0,234 \text{ mg}^{1-n} \text{ g}^{-1} \text{ L}^n$  para la adsorción de imidacloprid sobre la lignina.

Al igual que indicamos al comentar las isotermas experimentales, se puede constatar, atendiendo a los valores de  $K_f$  que la afinidad de los adsorbentes por las moléculas de imidacloprid crece según el orden orujo < ácido húmico < lignina, siendo el valor de  $K_f$  para la lignina 2 veces superior al correspondiente al ácido húmico y unas diez veces mayor con respecto al orujo.

Estos valores de  $K_f$  parecen estar de acuerdo con el distinto contenido en carbono orgánico y aromaticidad de los modificadores (Rodríguez-Cruz, 2009) que condiciona la extensión en la que se forman los enlaces de carácter hidrofóbico entre los adsorbentes y el imidacloprid. De esta forma, la lignina con un mayor contenido en carbono orgánico y grupos aromáticos presenta el valor más alto de  $K_f$  y por tanto la mayor capacidad de adsorción por el imidacloprid. Por otra parte el ácido húmico, compuesto fundamentalmente por macromoléculas aromáticas, presenta una mayor hidrofobicidad que el orujo, que en su composición presenta un elevado porcentaje de cadenas lineales hidrofílicas de hemicelulosa y celulosa (Martín-Lara, 2008; Pagnanelli, 2010).

### 3.3. Preparación, caracterización y evaluación en agua de las formulaciones de liberación controlada de imidacloprid

#### 3.3.1. Características y composición de las formulaciones de liberación controlada

En la tabla 3.7., se muestran las características y composición de los distintos sistemas de liberación controlada preparados con el ingrediente activo imidacloprid.

**Tabla 3.7. Características y composición de los sistemas de liberación controlada de imidacloprid.**

Formulado	I. A. (%)	Eficiencia de Encapsulación <sup>a</sup> (%)	Masa media (mg / gránulo)	Diámetro medio (mm)
ImA	6,32	50,51	0,84	0,92
ImAOr	9,53	60,02	3,50	1,93
ImAAH	8,74	55,11	1,88	1,42
ImAL	9,20	58,01	2,01	1,77

<sup>a</sup>Eficiencia de encapsulación: (Porcentaje experimental de imidacloprid en las formulaciones/Porcentaje teórico de imidacloprid en las formulaciones) x100

Los porcentajes de ingrediente activo de los sistemas preparados con imidacloprid en presencia de orujo, ácido húmico y lignina oscilan en un pequeño intervalo, entre 9,20% para el formulado ImAL y 9,53% para el sistema ImAOr. Los gránulos preparados en ausencia de modificadores presentan un porcentaje de ingrediente activo sensiblemente menor (6,32%) justificado por la menor eficiencia de encapsulación del ingrediente activo debido a la ausencia de modificadores en la dispersión. No obstante, todos los contenidos de ingrediente activo son adecuados

para la utilización en distintas prácticas agrícolas, tal y como se pone de manifiesto en la composición de otras formulaciones similares (Garrido-Herrera, 2006; Flores-Céspedes, 2007).

La masa media de los gránulos que contienen modificadores es similar, oscilando los valores entre 3,50 mg/gránulo para el sistema ImAOr y 1,88 mg/gránulo para el sistema ImAAH. Obviamente, la formulación que se preparó en ausencia de modificadores, presenta un valor sensiblemente menor que aquellos en los que sí estaban presentes dichos agentes, esto es, 0,84 mg/gránulo.

Finalmente, se observa que el tamaño medio de los gránulos es, en general, mayor en presencia de modificadores, y dentro de éstos, el tamaño aumenta conforme disminuye la densidad del agente modificador. El tamaño de los gránulos varía pues, según la siguiente secuencia:

$$\text{ImA} < \text{ImAAH} < \text{ImAL} < \text{ImAOr}$$

#### **3.3.2. Estudio cinético del proceso de liberación de Imidacloprid**

Operando según el método experimental descrito en el apartado 2.5.4., se han obtenido los datos del proceso de solubilización del imidacloprid técnico (tabla 3.8.) y los correspondientes a la de liberación de imidacloprid para las diferentes FLCs preparadas (tabla 3.9 y tabla 3.10).

**Tabla 3.8. Datos correspondientes al proceso de solubilización en agua del producto técnico de imidacloprid**

t (horas)	Imidacloprid técnico solubilizado (%)
0,5	91,40
1	94,32
2	99,47
3	99,67
5	100,00
7	100,00

Tabla 3.9. Datos correspondientes al estudio cinético de liberación de imidacloprid desde la formulación de liberación controlada IMA

t (horas)	Imidacloprid liberado (%)
1	13,99
3	28,47
5	40,49
7	49,18
9	57,09
11	63,49
24	88,45
26	90,46
28	92,23
31	94,57
33	95,58
35	96,79
48	99,80
52	99,92
55	100,00
59	100,00
72	100,00
83	100,00
96	100,00

**Tabla 3.10. Datos correspondientes al estudio cinético de liberación de imidacloprid desde las FLCs ImAOr, ImAAH e ImAL**

t (horas)	ImAOr	ImAAH	ImAL
	Imidacloprid liberado (%)		
0	0	0	0
1	9,37	7,94	7,24
3	14,90	14,42	12,33
6	20,70	20,64	17,28
9	30,61	29,34	25,53
23	63,81	55,84	52,31
32	75,86	69,21	62,40
48	90,29	77,13	75,05
72	97,73	88,53	83,17
144	100	96,65	98,38
193	100	97,75	99,51
248	100	98,42	100,03
311,45	100	98,61	99,75
360	100	97,13	99,83

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 3.9 se representa la curva de

liberación para las diferentes formulaciones preparadas junto a la curva correspondiente a la solubilización del producto técnico.

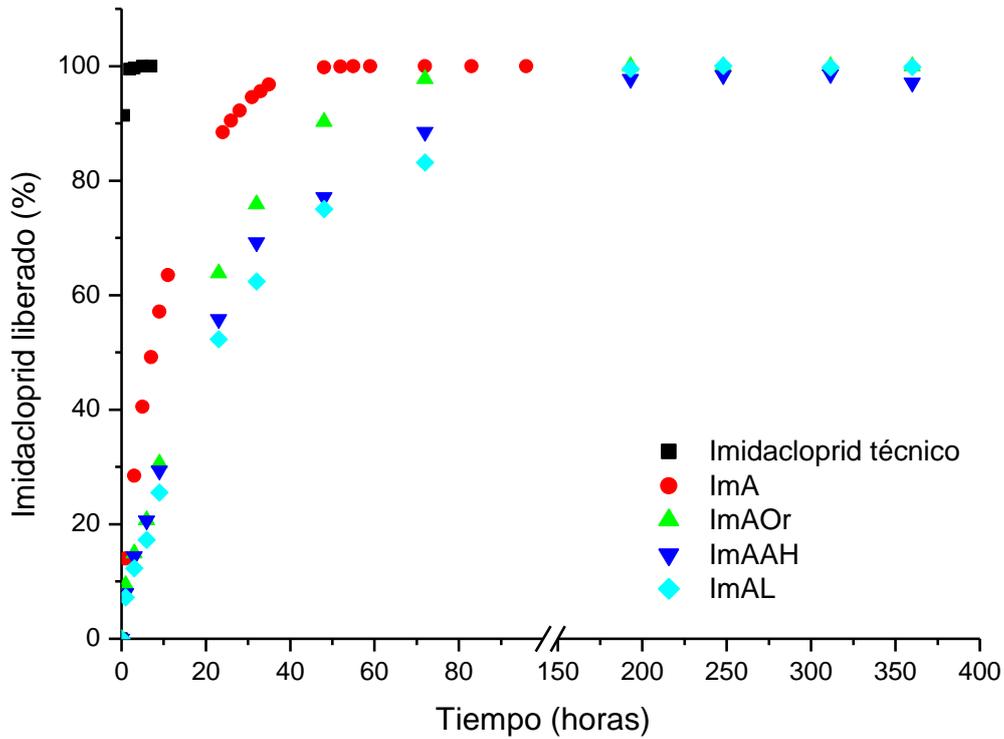


Figura 3.9. Curva de liberación de imidacloprid en agua desde los sistemas de liberación controlada preparados.

De la observación de la figura, en la que aparece representada la curva de liberación de las formulaciones preparadas con imidacloprid y la solubilización del producto técnico en agua, se deducen los siguientes comportamientos:

Los gránulos preparados con alginato e ingrediente activo (ImA) producen una ralentización del proceso de disolución de imidacloprid, en relación al producto técnico de este plaguicida. Así, se necesitan 26 horas para que se libere el 90% del imidacloprid contenido en el sistema ImA, sin embargo, para que se alcance el 90% de producto técnico solubilizado, sólo es necesario un tiempo de únicamente de 30 min.

La influencia de la presencia de modificadores, tales como lignina, ácido húmico y orujo, aparece claramente definida en todas la FLCs preparadas. Así, la introducción de tales agentes modificadores provoca, a la vista de la figura 3.9., una ralentización de la liberación de ingrediente activo con respecto a la formulación que se preparó en ausencia de ellos (ImA). Por tanto, se observa un efecto acusado en la ralentización de la liberación para los sistemas en los que se utiliza los agentes modificadores, ácido húmico, orujo y lignina, encontrándose porcentajes de liberación de ingrediente activo de ~ 90% para ImAO<sub>r</sub> tras un tiempo de 48 horas, necesitándose aproximadamente 72 horas para liberar este mismo porcentaje para la formulación ImAAH. En el caso de la formulación preparada con lignina se observa que a las 72 horas se ha alcanzado aproximadamente el 83% de la liberación del ingrediente activo.

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 lignina, ácido húmico, orujo 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 las formulaciones preparadas, 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 (Flores-Céspedes, 2007).

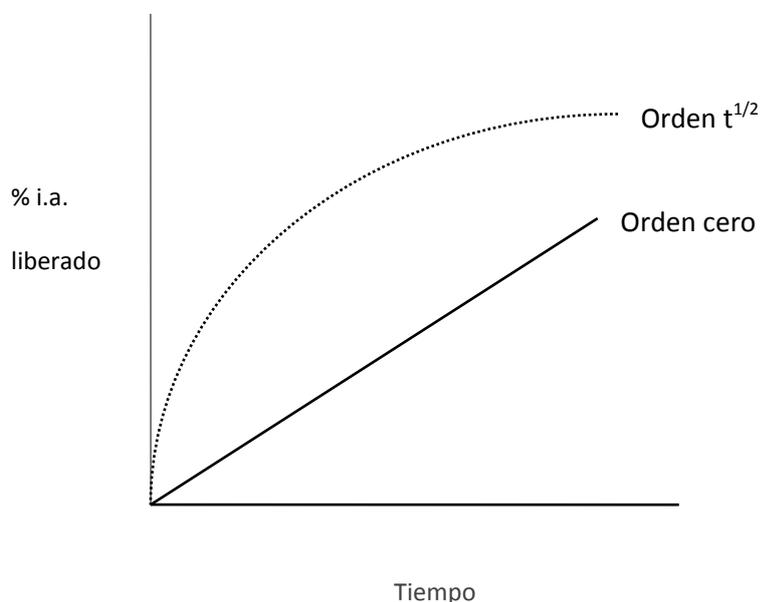
#### **3.3.2.1. Ajuste de los datos experimentales de liberación de ingrediente activo al modelo de Ritger y Peppas**

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

- Comprobar que las velocidades de liberación son las adecuadas para suministrar la concentración necesaria de ingrediente activo.
- 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 3.10.). 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 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 (figura 3.10.) (Fan, 1989).



**Figura 3.10. 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 sólo 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):

$$\frac{M_t}{M_o} = Kt^n \quad (\text{Ec. 7})$$

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 del plaguicida.

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 3.11., 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 3.11.

**Tabla 3.11. Valores de los parámetros de la ecuación de Ritger y Peppas y  $T_{50}$  correspondientes al estudio de liberación de ingrediente activo desde las FLCs que contienen imidacloprid**

Formulación	$K \cdot 10^2$ (horas <sup>-n</sup> )	n	r	$T_{50}$ (horas)
ImA	16,60	0,54	0,993	7,58
ImAOr	8,35	0,60	0,991	19,37
ImAAH	7,76	0,60	0,995	22,62
ImAL	6,65	0,62	0,993	26,22

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 de geometría irregular, 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 0,54 para la formulación ImA y 0,62 para la formulación ImAL. Es decir, dichos valores estarían en general próximos al intervalo establecido como para ser descritos por la primera ley de Fick. Las desviaciones observadas, podrían ser debidas a la interacción del imidacloprid 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  $6,65 \cdot 10^{-2}$  horas<sup>-n</sup> para la

formulación ImAL y  $16,60 \cdot 10^{-2}$  horas<sup>-n</sup> para el formulado ImA. A la vista de tales datos se pone de manifiesto, una disminución de los valores de  $K$  cuando se utilizan modificadores, observándose el siguiente orden de variación:

$$\text{ImA} > \text{ImAO}r > \text{ImAAH} > \text{ImAL}$$

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 imidacloprid (255,7 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, 1994).

Obviamente, la presencia de modificadores en el hidrogel, tales como la de orujo, ácido húmico o lignina, representan un aumento considerable de centros de interacción que conlleva una disminución de la difusión de ingrediente activo. La presencia de grupos funcionales en la superficie de los modificadores 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.

Todos estos factores provocan de forma conjunta el que la liberación del ingrediente activo desde el sistema preparado en ausencia de componentes de relleno (ImA) presente un perfil de liberación más rápido con respecto a las FLCs preparadas con orujo, ácido húmico y lignina.

Al evaluar 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 observa que el valor más bajo de  $T_{50}$ , corresponde al sistema preparado en ausencia de modificador (ImA) ( $T_{50} = 7,58$  horas), variando los valores de  $T_{50}$  para los formulados preparados con los modificadores entre 19,37 h para el sistema ImAO r y 26,22 h para el sistema ImAL. El orden de variación es:

$$\text{ImA} < \text{ImAO r} < \text{ImAAH} < \text{ImAL}$$

Este orden de variación pone de manifiesto, nuevamente, la ralentización del proceso de liberación de ingrediente activo desde las matrices preparadas en las que se ha modificado la estructura básica alginato-plaguicida mediante la adición de adsorbentes. De todos los modificadores utilizados en nuestro estudio, orujo, ácido húmico y lignina, es este último el que más ralentiza dicha liberación. Este hecho no es de extrañar si tenemos en cuenta que la extensión de la interacción entre los agentes modificadores y el plaguicida puede afectar a la velocidad de liberación del ingrediente activo desde los gránulos. De esta forma, al ser la adsorción del imidacloprid sobre lignina del orden de 10 veces superior a la correspondiente al orujo y 2 veces superior a la correspondiente al ácido húmico (apartado 3.2.3), parece lógico que la ralentización de la liberación de imidacloprid sea mayor en aquella formulación en la que se incorpora como agente modificante la lignina.

## **4. PROPUESTAS SOBRE LA CONTINUACIÓN DEL TRABAJO**

Continuando con el estudio realizado, las investigaciones futuras estarían orientadas en dos direcciones:

- Por una parte a profundizar en el estudio de las interacciones entre el plaguicida con los modificadores utilizados, así como ampliar este estudio a plaguicidas con diferentes propiedades físico químicas al imidacloprid.
- Por otro lado, con las FLCs preparadas realizaríamos ensayos en suelo encaminados al estudio de los procesos de liberación, lixiviación y degradación. Estos estudios junto con los ensayos de actividad in vitro permitirán analizar las ventajas que presentan las formulaciones aquí preparados frente a formulaciones convencionales. De esta forma podremos evaluar la optimización en la aplicación de plaguicidas en condiciones reales de campo utilizando estas formulaciones de liberación controlada.

### ***PARTE III. CONCLUSIONES***

## CONCLUSIONES

Como consecuencia del estudio realizado acerca de la aplicación de materiales bioadsorbentes en la preparación de las FLCs de imidacloprid, así como del examen de los antecedentes bibliográficos encontrados, se ha llegado, entre otras, a las siguientes conclusiones:

1.- Del estudio del proceso de adsorción del imidacloprid sobre las muestras de orujo, ácido húmico y lignina, usadas como agentes modificantes, así como de los parámetros que se derivan de los distintos modelos aplicados a las mismas, se pueden distinguir los siguientes aspectos:

1.1.- El proceso de adsorción del imidacloprid muestra tiempos de equilibrio diferentes según el adsorbente, siendo de 24 horas para el ácido húmico y de aproximadamente 100 horas para el orujo y la lignina.

1.2.- En relación a las isotermas de adsorción obtenidas y únicamente en base a la pendiente inicial de las mismas, éstas pueden ser clasificadas como del tipo "C" de la clasificación de Giles, lo cual parece indicar un reparto constante de las moléculas de plaguicida entre el disolvente y la superficie de los adsorbentes.

1.3.- Del estudio comparativo del parámetro  $K_f$ , obtenido a partir de los ajustes de Freundlich, se puede deducir la mayor capacidad de adsorción de la muestra de lignina por la molécula de imidacloprid, siendo el doble con respecto a la adsorción de éste en el ácido húmico y unas diez veces mayor con respecto al orujo. La mayor aromaticidad y contenido en carbono orgánico de la lignina, en relación al ácido húmico y el orujo, condicionan la extensión en la que tiene lugar la adsorción del plaguicida en las condiciones experimentales en las que se ha operado.

2.- El método seguido para la preparación de las FLCs basadas en matriz polimérica de alginato, permite obtener una distribución uniforme del imidacloprid en los

gránulos, una aceptable esfericidad de los mismos, así como una eficacia de encapsulación aceptable para aquellas formulaciones que contienen orujo, ácido húmico y lignina como modificantes.

2.1.- La comparación entre las curvas de solubilidad del producto técnico de imidacloprid y las curvas de liberación de este ingrediente activo desde las formulaciones preparadas, muestra que es posible retardar la liberación y, por tanto, la solubilización del ingrediente activo con el uso de las FLCs preparadas, permitiendo una acción más prolongada del imidacloprid.

2.2.- En relación a la eficacia en la ralentización del proceso de liberación de imidacloprid, se observa que los sistemas preparados en presencia de modificadores (lignina, ácido húmico y orujo) presentan valores más altos del parámetro  $T_{50}$  (tiempo necesario para que se libere el 50% de ingrediente activo presente en cada sistema), en relación a aquella formulación sin modificadores. Comparando las formulaciones que incluyen agentes modificantes, se observa que se produce un efecto de ralentización más acusado para aquella formulación que contiene lignina, lo cual está de acuerdo con la capacidad de adsorción de los diferentes modificadores por el imidacloprid.

### **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. 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**

- ADAMSON, A. "Physical chemistry of surfaces". John Wiley and Sons, Inc.; Chichester (1982).
- ARIAS-ESTÉVEZ, M.; López-Periago, E.; Martínez-Carballo, E.; Simal-Gándara, J.; Mejuto, J.C.; García-Río, L. "The mobility and degradation of pesticides in soils and the pollution of groundwater resources". *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 123, 247–260 (2008).
- BACKER, R. "Controlled release of Biologically Active Agents". New York, Wiley (1987).
- BARBASH, J.E.; Thelin, G.P.; Kolpin, D.W.; Gilliom, R.J. "Major herbicides in ground water: Results from the National Water-Quality Assessment". *Journal of Environmental Quality*, volume 30, 831-845 (2001).
- BOAST, C.W. "Modelling the movement of chemicals in soils by water". *Soil Sci.*, 115, 224- 230 (1973).
- BOERIU, C.; Bravo, D.; Gosselink, R.; van Dam, J. "Characterisation of structure-dependent functional properties of lignin with infrared spectroscopy". *Industrial Crops and Products*, 20, 205-218 (2004).
- CALVET, R. "interactions between herbicides and the soil". Hance R. Academic PRESS, LONDON, 1-30 (1980).
- CÉSAR-VALDÉS, J.; Montoya Rosales, A. "El precio medioambiental de la producción de alimentos". *Rev. Fac. Cien. Ecón. Univ. Nac. Mayor de San Marcos*, 10(28), 131-140 (2005).
- CHENG, H.H. "Pesticides in soil environment: an overview" en "Pesticides in the soil environment: processes, impacts, and modelling". Cheng, H.H. (Ed.) SSSA, Inc, Madison, Wisconsin, 1-7 (1990).

- COHEN, S.Z. "Pesticides in ground water: an overview" en "Environmental fate of pesticides". Hutson, D.H. y Roberts, T.R. (Ed.) John Wiley and Sons, Chichester, 13-26, (1990).
- 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).
- D'ORAZIO, V.; 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).
- DELLICOLLI, H.T. "Controlled release of pesticides from kraft lignin carriers". *Controlled Release Pesticides*; Scher, H.B., ACS, Washington, DC, 84-93 (1977).
- DEMIRBAS, A. "Heavy metal adsorption onto agro-based waste materials: A review". *Journal of Hazardous Materials*, 157, 220–229 (2008).
- FAN, L.T.; Singh, S.K. "Controlled Release: a Quantitative Treatment". Springer-Verlay, Berlín (1989).
- 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).
- FLORES-CÉSPEDES, F.; Fernández-Pérez, M.; Villafranca-Sánchez, González-Pradas, E. "Cosorption study of organic pollutants and dissolved organic matter in a soil". *Environmental Pollution*, 142, 449-456 (2006).
- GADD, G. "Biosorption: critical review of scientific rationale, environmental importance and significance for pollution treatment". *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 84, 13–28 (2009).
- GARRIDO HERRERA, F.J.; González Pradas, E.; Fernández Pérez, M. "Controlled release of isoproturon imidacloprid and cyromazine from alginate-bentonite-

- activated carbon formulations". *Journal of Agricultural and food Chemistry*, 54, 10053-10060 (2006).
- GILES, C.; Smith D.; Huitson A. "A general treatment and classification of the solute adsorption isotherm I". *J. Coll. Int. Sci.*, 47, 3, 755-765 (1974a).
  - GILES, C.H.; Mc Evan, T.H.; Nakhwa, S.N.; Smith, D. "Studies in adsorption. Part XI". *J. Chem. Soc.*, 111, 3973-3993 (1960).
  - GLASSER, W.G.; Kelley, S.S. "Lignin". *Concise Encyclopedia of Polymer Science and Engineering*; Kroschwitz, J.I., Wiley Interscience, New York, 544-547 (1990).
  - GOHEEN, D.W.; Hoyt, C.H. "Lignin". *Kira-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, 14; John Wiley and Sons, New York, 294-312 (1982).
  - GONZALEZ-PRADAS, E.; Fernandez Pérez, M.; Villafranca Sánchez, M.; Flores Céspedes, F. "Mobility of imidacloprid from alginate-bentonite controlled release formulations in greenhouse soils". *Pestic. Sci.*, 55, 1109-1115 (1999).
  - GRIFFITH, L. "Polymeric biomaterials". *Acta Materialia*, 48, 263-267 (2000).
  - 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).
  - JACKSON, M.L. "Análisis químico de suelos". Ed. Omega, Barcelona (1982).
  - KIM, K.; Vincent, B. "Colloidal Behaviour of Polystyrene-based Copolymer Microgels composed of a Hydrophobic Hydrogel Layer". *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 12, 91-97 (2006).
  - KIPLING, J, "Adsorption from solutions of non-electrolytes". Academic Press Inc., London (1980).

- LANGMUIR I. “The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum”. *J. Chem. Soc.*, 40, 1361-1382 (1918).
- LIANG, L.; Luo, L.; Zhang, S. “Adsorption and desorption of humic and fulvic on SiO<sub>2</sub> particles at nano- and micro-scales”. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 384, 126-130 (2011).
- MAGHSOODLOO, S.; Noroozi, B.; Haghi, A.k.; Sorial, G.A. “Consequence of chitosan treating on the adsorption of humic acid by granular activated carbon”. *Journal of Hazardous Materials*, 191, 380-387 (2011).
- MARTÍN-LARA, M.; Pagnanelli, F. “Chemical treatment of olive pomace: Effect on acid-basic properties and metal biosorption capacity”. *Journal of Hazardous Materials*, 156, 448–457 (2008).
- 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).
- NADA, A.M.A.; El-Sakhawy, M.; Kamel, S.M. “Infra-red spectroscopic study of lignins”. *Polymer Degradation and Stability*, 60, 247-251 (1998).
- NIST, Mass Spec. Data Center, S. E. Stein, director. “IR and mass spectra” in *Nist Chemistry WebBook*, NIST Standard Reference Database Number 69, Eds, W.G. Mallard and P.J. Linstrom. National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg MD 20899 (2003).
- OMIDIAN, H.; Rocca, J. “Advances in superporous hydrogels”. *Journal of Controlled Release*, 102, 3-12 (2005).

- ORACESCA, B.; Nixon; J.R.; Salomon, M.C. “Factors affecting the permeation of drugs through alginate rate controlling membrane”. *Proceed. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater*, 21, 479-480 (1994).
- PAGNANELLI, F.; Cruz, C. “Development of new composite biosorbents from olive pomace wastes”. *Applied Surface Science*, 256, 5492-5497 (2010).
- PAGNANELLI, F.; Mainelli, S. “Heavy metal removal by olive pomace: biosorbent characterization and equilibrium modeling”. *Chemical Engineering Science*, 58, 4709-4717 (2003).
- 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).
- RODRÍGUEZ-CRUZ, M.S.; Valderrábano, M.; Del Hoyo, C.; Sánchez-Martín, M.J. “Physicochemical study of the sorption of pesticides by Wood components”. *Journal of Environmental Quality*, 38, 719-728 (2009)
- 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).
- SARMENTO, B.; Martins, S. “Development and comparison of different nanoparticulate polyelectrolyte complexes as insulin carriers”. *Int. J. Pept. Res. Ther.*, 12, 131–138 (2006).
- SCHER, H. B. “Controlled-Release Delivery Systems for Pesticides”. Marcel Dekker, Inc., N.Y. (1999).

- SCHNITZER, M. "Organic matter characterization" 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).
- SCHNITZER, M.; Gupta, U.C. "Determination of acidity in soil organic matter". Soil Sci. Soc. Am. Proc., 29, 274-277 (1965).
- SHIN J.; Lim, Y. "Swelling Behavior Study of  $\gamma$ -Irradiated Gelatin Hydrogels Prepared in Organic/Aqueous Mixtures". Journal of Industrial and Engineering Chemistry, 13, 997-1001 (2007).
- SUÁREZ-RUÍZ, I.; Flores, D.; Marques, M.M.; Martínez-Tarazona, M.R.; Pis, J.; Rubiera, F. "Geochemistry, mineralogy and technological properties of coals from Rio Maior (Portugal) and Peñarroya (Spain) basins". International Journal of Coal Geology, 67, 171-190 (2006).
- TAMER, A.; Iknur, T. "An attractive agro-industrial by-product in environmental cleanup: Dye biosorption potential of untreated olive pomace". Journal of hazardous materials, 166, 1217-1225 (2009).
- TEJADO, A.; Peña, A.; Labidi, J.; Echeverria, 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: Surrey, U.K. (2002).
- VAN BEINUM, W.; Beulke, S.; D. Brown, C. "Pesticide sorption and desorption by lignin described by an intraparticle diffusion model". Environmental Science & Technology, vol. 40, 494-500 (2006).

- VOICE, T.C.; Rice, C.P.; Weber, W.J. "Effect of solids concentration on the sorptive partitioning of hydrophobic pollutants in aquatic systems". *Environ. Sci. Technol.*, 17, 513-518 (1983).
- YANG, Y.; Shu, L.; Wnag, X.; Xing, B.; Tao, S. "Effects of composition and domain arrangement of biopolymer components of soil organic matter on the bioavailability of phenanthrene". *Environmental Science and Technology*, 44, 3339-3344 (2010).
- YOICHI, Y.; Kobori, Y.; Araki, Y.; Kuroguchi, S.; Iwayo, K.; Kagabu, S. "HPLC determination of the new insecticide imidacloprid and its behaviour in rice and cucumber". *J. Agric. Food Chem.*, 42, 2917-2991 (1994).