

Caracterización de cápsulas a base de alginato de sodio y carboximetilcelulosa para la encapsulación de rizobacterias

Characterization of sodium alginate and carboxymethylcellulose beads for the encapsulation of rhizobacteria

Ricardo Hernández-Martínez¹, Fernando Guevara-Cordova¹ y Blanca Estela Gómez-Luna¹.

¹Universidad de Guanajuato, Campus Celaya-Salvatierra, División de Ciencias de la Salud e Ingenierías.
r.hernandez.m@ugto.mx¹

Resumen

Para la formulación de biofertilizantes basados en rizobacterias, la encapsulación ha adquirido atención como técnica para el desarrollo de estos productos, debido a su capacidad para mejorar la aplicación, viabilidad y eficacia de dichos microorganismos en suelos agrícolas. Las cápsulas deben tener propiedades físicas y mecánicas adecuadas para garantizar la protección de los microorganismos y lograr el rendimiento deseado del material encapsulado. El objetivo de la investigación fue desarrollar y caracterizar cápsulas compuestas de alginato de sodio y carboximetilcelulosa para la encapsulación de rizobacterias. Para ello, se evaluaron cuatro formulaciones de cápsulas distintas, cada una con proporciones variables de alginato de sodio y carboximetilcelulosa. Los resultados mostraron que el proceso empleado y las condiciones de formación de las cápsulas generaron estructuras esféricas. Se observaron diferencias en el peso, tamaño, hinchamiento y dureza de las cápsulas, las cuales se relacionaron con la concentración de carboximetilcelulosa, en donde el aumento de la concentración de este componente posee impactos negativos en las propiedades de las cápsulas, como una drástica reducción de la dureza e hinchamiento no uniforme. Las formulaciones con una baja concentración de carboximetilcelulosa parecen ser las más adecuadas para la encapsulación de rizobacterias, debido a sus características favorables, como su forma esférica, alto factor de forma, comportamiento de hinchamiento controlado y adecuada dureza. La elección de los materiales y su concentración puede ajustarse para obtener cápsulas con las características deseadas para aplicaciones específicas.

Palabras clave: Biofertilizantes, gelificación, rizobacterias, extrusión.

Introducción

La creciente necesidad de abordar los desafíos de la producción agrícola de manera sostenible ha impulsado el interés en la investigación y desarrollo de alternativas que sean más sostenibles y productivas. Dentro de estas alternativas encontramos a los biofertilizantes, productos basados en microorganismos vivos que se aplican a semillas, plantas o suelo, que promueven el crecimiento vegetal a través de diversos mecanismos (Bhat *et al.*, 2015). En particular, dentro de la gama de biofertilizantes, aquellos que hacen uso de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal merecen especial atención. Estos microorganismos han demostrado su capacidad para mejorar la nutrición y el crecimiento de las plantas a través de diversos mecanismos, como la fijación biológica de nitrógeno, la solubilización de nutrientes y la producción de fitohormonas (Vejan *et al.*, 2016).

En este contexto, la formulación de biofertilizantes basados en rizobacterias ha impulsado la exploración de técnicas para su elaboración, entre las cuales se destaca la encapsulación. Esta técnica se basa en el uso de materiales biocompatibles y respetuosos con el medio ambiente, como el alginato de sodio (AS) y la carboximetilcelulosa (CMC) (Balla *et al.*, 2022). La encapsulación, definida como el proceso de recubrimiento y protección de las rizobacterias mediante una matriz, ha ganado relevancia como enfoque para mejorar la aplicación, viabilidad, desempeño y eficacia de estos microorganismos en el suelo agrícola (Rojas-Sánchez *et al.*, 2022; Balla *et al.*, 2022). El AS y la CMC son materiales con propiedades deseables para la encapsulación, como la formación eficiente de películas, favorecen la retención de los compuestos deseados en los sistemas formados, ayudan a prolongar la liberación de compuestos bioactivos, poseen la capacidad de proteger a las rizobacterias de condiciones ambientales adversas, etc. (Zabot *et al.*, 2022; Saberi Riseh *et al.*, 2021).



Investigaciones respaldan la utilidad de la encapsulación en la mejora de la supervivencia y la actividad de las rizobacterias, lo que se traduce en beneficios tangibles para la salud y el rendimiento de las plantas cultivadas (Pacheco-Aguirre *et al.*, 2017). Para lograr estos beneficios, es fundamental que los biofertilizantes cumplan con ciertos criterios en las propiedades de los encapsulados. Entre estos criterios se incluyen una adecuada resistencia, tamaño y permeabilidad de las matrices encapsulantes, con el fin de garantizar la protección y viabilidad de los microorganismos en entornos edáficos (Maçik *et al.*, 2020). Por ello, el objetivo de este estudio fue desarrollar y caracterizar cápsulas basadas en AS y CMC, con la evaluación de sus propiedades físicas y mecánicas para determinar su idoneidad como sistemas de encapsulación para rizobacterias.

Metodología

Se evaluaron cuatro formulaciones distintas de cápsulas en proporciones variables de AS y CMC presentadas en la Tabla 1.

Tabla 1. Proporciones de AS/CMC.

Formulación	AS (% p/v)	CMC (% p/v)
sAC1	1	1
sAC5	2	0.5
sAC75	2	0.75
sAC21	2	1

Fuente: Elaboración propia.

Para la generación de las cápsulas se utilizó el método de gelificación iónica por la interacción entre cationes divalentes de calcio (Ca^{2+}) con los grupos carboxílicos aniónicos presentes en el AS y la CMC, Este método se implementó mediante la técnica de extrusión, tomando como base los procedimientos descritos por Liu *et al.* (2008), Davarçı *et al.* (2017), Ibrahim *et al.* (2014), Lotfipour *et al.* (2012) y Smrdel *et al.* (2008), con modificaciones. Para ello se extruyó la solución AS/CMC a través de una manguera (Masterflex C-FLEX N. L/S # 14, diámetro 1/16 in) utilizando una bomba peristáltica (MasterFlex) a un caudal volumétrico de 5 mL/min, hacia una solución de CaCl_2 (0.135 M) y Tween 20 (0.1 g/L) en agitación a 600 rpm, manteniendo una distancia de 6 cm entre la manguera y la solución.

Las cápsulas formadas se dejaron en la solución de CaCl_2 durante 1 h para permitir el desarrollo del entrecruzamiento iónico. Luego, se filtraron y enjuagaron con agua destilada en tres ocasiones para eliminar los reactivos que no reaccionaron. Se seleccionaron al azar un total de 25 cápsulas de cada formulación para evaluar los parámetros que se describen a continuación. Para las comparaciones entre las diferentes concentraciones de AS y CMC se realizó un análisis de normalización y varianza (ANOVA) y la prueba *post-hoc* de Tukey con el software estadístico InfoStat. Todos los resultados se consideraron significativos a $p < 0.05$.

Factor de forma y dimensiones

Las cápsulas se observaron en un estereomicroscopio y se fotografiaron en estado húmedo. Se determinó el diámetro medio (d_m) mediante el software de análisis de imágenes ImageJ (NIH, USA), y se calculó como el promedio entre el diámetro máximo (d_{max}) y mínimo (d_{min}). El factor de forma (ϕ) se estimó con la siguiente ecuación (Ec. 1) (Davarçı *et al.*, 2017).

$$\phi = \frac{2(d_{min})}{d_{min} + d_{max}} \quad (\text{Ec. 1})$$

Se determinó que las cápsulas exhibían una forma esférica o ligeramente ovalada en valores de $\phi > 0.950$. En caso de que el valor de $\phi < 0.900$, se evidenciaron deformaciones considerables.



Peso y volumen

Para determinar el peso de las cápsulas se empleó una balanza analítica, antes y después eliminar el exceso de humedad mediante un proceso de secado en estufa a 40°C durante 3 h (Bonda *et al.*, 2021). El volumen de las cápsulas húmedas se estimó mediante la siguiente ecuación (Ec. 2).

$$v = \left(\frac{4\pi}{3}\right) \left(\frac{d_m}{2}\right)^3 \quad (\text{Ec. 2})$$

Dureza

Se evaluó la dureza de las cápsulas húmedas mediante la medición de la fuerza necesaria para romperlas. Para ello, se colocaron cápsulas sobre una caja Petri y se sometieron a una fuerza a lo largo de su d_m , mediante el uso de pesos calibrados, hasta que se produjo la fractura de la cápsula. Los resultados obtenidos de la dureza límite (D_L) en Newton se convirtieron a Kilopascales al relacionar la fuerza aplicada con el área de la sección transversal de la cápsula (Bonda *et al.*, 2020).

Análisis de hinchamiento

Se analizó el hinchamiento en cápsulas secas en solución salina tamponada con fosfato (PBS), a pH 7.4 y 27 °C como describe Agarwal *et al.*, (2015). La capacidad de absorción de líquido se evaluó por medio de la variación en el peso. El porcentaje de hinchamiento en cada tiempo se expresó mediante la Ec. 3.

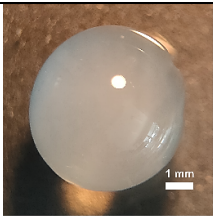
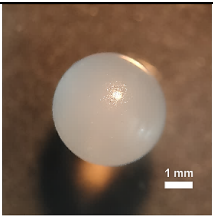
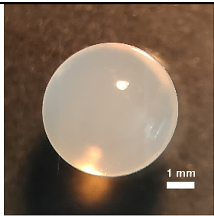
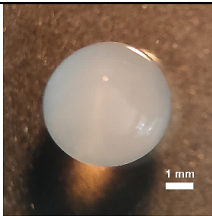
$$H(\%) = \frac{m_t - m_d}{m_0 - m_d} \cdot 100 \quad (\text{Ec. 3})$$

Donde m_0 es la masa inicial de una cápsula antes del proceso de secado, m_d la masa de la cápsula después del secado y m_t la masa de la cápsula durante el proceso de hinchamiento (Vreeker *et al.*, 2008).

Resultados y discusión

Los resultados de la evaluación de cada parámetro obtenidos de las diferentes formulaciones se presentan en la siguiente tabla (Tabla 2).

Tabla 2. Resultados parámetros de cápsulas de cada formulación.

Parámetro	Formulación			
	sAC1	sAC5	sAC75	sAC21
				
ϕ	0.954 b	0.965 ab	0.962 ab	0.968 a
W_w (mg)	75.624 a	37.704 d	55.844 c	59.864 b
W_d (mg)	1.442 c	1.188 d	1.656 b	1.788 a
V_w (mm ³)	85.980 a	40.092 d	63.815 b	53.951 c
D_m (mm)	5.437 a	4.153 d	4.963 b	4.643 c
D_L (kPa)	79.953 d	1,698.762 a	1,430.397 b	546.634 c

*Valores de las formulaciones con la misma letra en las filas, son iguales (Tukey, 5%).
 Fuente: Elaboración propia.



Se identificó que el método y las condiciones de generación de las cápsulas favorecieron la obtención de partículas con un ϕ superior a 0.950 en todos los casos, indicando una clara tendencia hacia la esfericidad. La esfericidad es un requisito fundamental para garantizar el uso efectivo de las cápsulas en aplicaciones industriales (Woo *et al.*, 2007). En este sentido, su importancia radica en varias consideraciones. En primer lugar, esta morfología es crucial para lograr una liberación uniforme del material encapsulado, como se ha informado en investigaciones previas, en donde cápsulas no esféricas presentan tasas de liberación no controladas ni uniformes en comparación con cápsulas esféricas (Zhao *et al.*, 2020), lo cual concuerda con la literatura previa, donde se indica que la esfericidad es un factor crítico que afecta los fenómenos de transferencia de masa (Partovinia & Vatankeh, 2019). Además, las partículas esféricas proporcionan un área superficial mayor del material encapsulado, lo cual puede aumentar la eficiencia de la liberación del compuesto bioactivo (Pino & Aragüez, 2021). Estos hallazgos subrayan la importancia de la forma de las cápsulas en el proceso de liberación de su contenido.

La diferencia de pesos en las formulaciones se relaciona con la concentración de los materiales encapsulantes en la solución, principalmente en concentraciones crecientes de CMC, lo que propiciaría una mayor retención de líquido en las cápsulas en estado húmedo. Esto se debe a que la CMC es un polímero más hidrofílico que el AS, ya que posee muchos más grupos hidroxilo, lo cual genera una mayor absorción de agua (Morozkina *et al.*, 2022). Del mismo modo, al aumentar la cantidad de CMC en las formulaciones se observó un aumento de viscosidad, lo cual generó que, al extraer la solución, esta quedara por más tiempo en la boquilla de la manguera y generara un mayor volumen de la cápsula.

Se observó una diferencia significativa en la dureza entre las distintas formulaciones. En concentraciones mayores de CMC y menores de AS, se generan cápsulas más débiles. Por el contrario, las cápsulas con concentraciones menores de CMC, como las cápsulas de las formulaciones sAC5 y sAC75, presentan una mayor resistencia. Esta tendencia es coherente con los hallazgos previamente reportados en la literatura, que indican que la combinación de CMC en una matriz de alginato reduce la dureza de los geles (Ramdhan *et al.*, 2020), y que un aumento en el porcentaje de alginato en las formulaciones incrementa la firmeza de las cápsulas (Rajmohan & Bellmer, 2019).

Además, se ha reportado que la resistencia del gel aumenta con el tiempo de gelificación y con la concentración de CaCl_2 , debido a que se permite un mayor desarrollo para formar enlaces iónicos con los cationes divalentes de calcio durante el proceso de gelificación, lo que conduce a un incremento en la densidad de reticulación del gel (Ramdhan *et al.*, 2019). Por lo tanto, este parámetro puede ajustarse para obtener cápsulas más duras o blandas según el contexto de uso. Sin embargo, para la formulación de encapsulados de rizobacterias, una alta dureza es una característica fundamental, ya que la capacidad de resistir tensiones de fractura es crucial para mantener la integridad, proteger el material encapsulado y evitar su liberación prematura durante la manipulación y la aplicación en suelos agrícolas.

De acuerdo con el análisis de hinchamiento, un parámetro relevante para evaluar la capacidad de las cápsulas en retener y liberar sustancias de manera controlada se observó que a excepción de la formulación sAC1, todas las formulaciones exhibieron un comportamiento similar en el proceso, como se puede apreciar en la Figura 1.

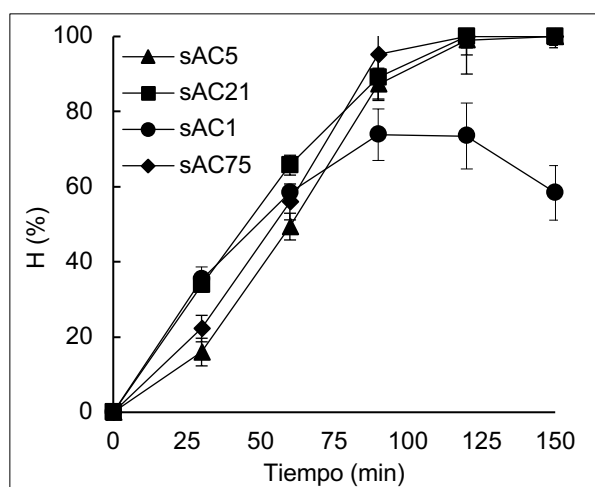


Figura 1. Comportamiento de hinchamiento en PBS de cada formulación.
Fuente: Elaboración propia.



Se identificó una disminución notable en la capacidad de absorción de líquido por parte de la solución sAC1, atribuible a la pérdida de la estructura de las cápsulas durante este proceso, lo cual resultó en dicho fenómeno. Esto podría deberse a una mayor porosidad en las cápsulas, influenciada por la proporción de CMC, tal como se ha documentado en la literatura (Ramdhan *et al.*, 2020; Ren *et al.*, 2016). A su vez, la estructura, al contener una mayor cantidad de CMC, puede volverse más hidrofílica y, por lo tanto, sería susceptible a disolverse. La porosidad podría haber facilitado la pérdida del líquido en las cápsulas. Además, es importante señalar que la pérdida y la alteración de la estructura de la cápsula durante el proceso de secado también podrían haber contribuido al fenómeno observado.

Conclusiones

Este estudio enfatiza la importancia del desarrollo de la formulación adecuada para la generación de encapsulados, basándose en sus propiedades físicas y mecánicas. La selección correcta de las concentraciones de AS y CMC puede tener un impacto significativo en estas propiedades, lo cual resulta esencial para asegurar la integridad y protección del material encapsulado. Los resultados indican que las cápsulas desarrolladas en este estudio, que exhibieron características positivas como su forma esférica, capacidad de hinchamiento controlada y adecuada resistencia, resultan idóneas para la encapsulación de rizobacterias. Sin embargo, es fundamental destacar que la efectividad de estas cápsulas como vehículos de rizobacterias debe validarse a través de pruebas que demuestren la viabilidad de las bacterias después de la encapsulación, así como ensayos en ambientes edáficos para evaluar su comportamiento en el suelo. Además, es posible ajustar la elección de los materiales y sus concentraciones para obtener cápsulas con las propiedades deseadas en aplicaciones específicas. Estos hallazgos proporcionan información valiosa para el desarrollo de biofertilizantes basados en rizobacterias y subrayan la importancia de considerar minuciosamente las características de las cápsulas en aplicaciones agrícolas.

Referencias

- Agarwal, T., Narayana, S. G., Pal, K., Pramanik, K., Giri, S., & Banerjee, I. (2015). Calcium alginate-carboxymethyl cellulose beads for colon-targeted drug delivery. *International journal of biological macromolecules*, 75, 409-417. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.12.052>.
- Balla, A., Silini, A., Cherif-Silini, H., Chenari Bouket, A., Alenezi, F. N., & Belbahri, L. (2022). Recent advances in encapsulation techniques of plant growth-promoting microorganisms and their prospects in the sustainable agriculture. *Applied Sciences*, 12(18), 9020. <https://doi.org/10.3390/app12189020>
- Bhat, T. A., Ahmad, L., Ganai, M. A., & Khan, O. A. (2015). Nitrogen fixing biofertilizers; mechanism and growth promotion: a review. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 9(2), 1675-1690.
- Bonda, A. F., Regis, L., Giovannelli, L., & Segale, L. (2020). Alginate/maltodextrin and alginate/shellac gum core-shell capsules for the encapsulation of peppermint essential oil. *International Journal of Biological Macromolecules*, 162, 1293-1302. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.194>
- Bonda, A., Candiani, A., Pertile, M., Giovannelli, L., & Segale, L. (2021). Shellac gum/carrageenan alginate-based core-shell systems containing peppermint essential oil formulated by mixture design approach. *Gels*, 7(4), 162. <https://doi.org/10.3390/gels7040162>
- Davarci, F., Turan, D., Ozcelik, B., & Poncelet, D. (2017). The influence of solution viscosities and surface tension on calcium-alginate microbead formation using dripping technique. *Food Hydrocolloids*, 62, 119-127. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.06.029>
- Ibrahim, S. M., Abou El Fadl, F. I., & El-Naggar, A. A. (2014). Preparation and characterization of crosslinked alginate-CMC beads for controlled release of nitrate salt. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 299, 1531-1537. <https://doi.org/10.1007/s10967-013-2820-4>
- Liu, C. H., Wu, J. Y., & Chang, J. S. (2008). Diffusion characteristics and controlled release of bacterial fertilizers from modified calcium alginate capsules. *Bioresource technology*, 99(6), 1904-1910. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.03.029>



Lotfipour, F., Mirzaeei, S., & Maghsoodi, M. (2012). Evaluation of the effect of CaCl₂ and alginate concentrations and hardening time on the characteristics of *Lactobacillus acidophilus* loaded alginate beads using response surface analysis. *Advanced pharmaceutical bulletin*, 2(1), 71-78. <https://doi.org/10.5681/apb.2012.010>

Maçık, M., Gryta, A., & Fraç, M. (2020). Biofertilizers in agriculture: An overview on concepts, strategies and effects on soil microorganisms. *Advances in agronomy*, 162, 31-87. <https://doi.org/10.1016/bs.agron.2020.02.001>

Morozkina, S., Strekalovskaya, U., Vanina, A., Snetkov, P., Krasichkov, A., Polyakova, V., & Uspenskaya, M. (2022). The fabrication of alginate-carboxymethyl cellulose-based composites and drug release profiles. *Polymers*, 14(17), 3604. <https://doi.org/10.3390/polym14173604>

Partovinia, A., & Vatankhah, E. (2019). Experimental investigation into size and sphericity of alginate micro-beads produced by electrospraying technique: Operational condition optimization. *Carbohydrate polymers*, 209, 389-399. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.01.019>

Pacheco-Aguirre, J. A., Ruíz-Sánchez, E., Ballina-Gómez, H. S., & Alvarado-López, C. J. (2017). ¿Mejora el encapsulamiento basado en polímeros el desempeño de los microorganismos promotores del crecimiento vegetal? Una visión de Meta-Análisis. *Agrociencia*, 51(2), 173-187.

Pino, J. A., & Aragüez, Y. (2021). Conocimientos actuales acerca de la encapsulación de aceites esenciales. *Revista CENIC Ciencias Químicas*, 52(1), 10-25.

Rajmohan, D., & Bellmer, D. (2019). Characterization of spirulina-alginate beads formed using ionic gelation. *International Journal of Food Science*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1155/2019/7101279>

Ramdhan, T., Ching, S. H., Prakash, S., & Bhandari, B. (2019). Time dependent gelling properties of cuboid alginate gels made by external gelation method: Effects of alginate-CaCl₂ solution ratios and pH. *Food hydrocolloids*, 90, 232-240. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.12.022>

Ramdhan, T., Ching, S. H., Prakash, S., & Bhandari, B. (2020). Physical and mechanical properties of alginate based composite gels. *Trends in Food Science & Technology*, 106(1), 150-159. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.10.002>

Ren, H., Gao, Z., Wu, D., Jiang, J., Sun, Y., & Luo, C. (2016). Efficient Pb (II) removal using sodium alginate-carboxymethyl cellulose gel beads: Preparation, characterization, and adsorption mechanism. *Carbohydrate polymers*, 137(1), 402-409. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.11.002>

Rojas-Sánchez, B., Guzmán-Guzmán, P., Morales-Cedeño, L., Orozco-Mosqueda, M., Saucedo-Martínez, B., Sánchez-Yañez, J., . . . Santoyo, G. (2022). Bioencapsulation of Microbial Inoculants: Mechanisms, Formulation Types and Application Techniques. *Applied Biosciences*, 1(2), 198-220. <https://doi.org/10.3390/applbiosci1020013>

Saberi Riseh, R., Skorik, Y. A., Thakur, V. K., Moradi Pour, M., Tamanadar, E., & Noghabi, S. S. (2021). Encapsulation of Plant Biocontrol Bacteria with Alginate as a Main Polymer Material. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(20), 11165. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.3390/ijms22011165>

Smrdel, P., Bogataj, M., & Mrhar, A. (2008). The influence of selected parameters on the size and shape of alginate beads prepared by ionotropic gelation. *Scientia Pharmaceutica*, 76(1), 77-90. <https://doi.org/10.3797/scipharm.0611-07>

Vejan, P., Abdullah, R., Khadiran, T., Ismail, S., & Nasrulhaq Boyce, A. (2016). Role of plant growth promoting rhizobacteria in agricultural sustainability—a review. *Molecules*, 21(5), 573. <https://doi.org/10.3390/molecules21050573>

Vreeker, R., Li, L., Fang, Y., Appelqvist, I., & Mendes, E. (2008). Drying and rehydration of calcium alginate gels. *Food Biophysics*, 3, 361-369. <https://doi.org/10.1007/s11483-008-9087-2>

Woo, J. W., Rob, H. J., Park, H. D., Ji, C. I., Lee, Y. B., & Kim, S. B. (2007). Sphericity optimization of calcium alginate gel beads and the effects of processing conditions on their physical properties. *Food Science and Biotechnology*, 16(5), 715-721.

Zabot, G. L., Schaefer Rodrigues, F., Polano Ody, L., Vinícius Tres, M., Herrera, E., Palacin, H., . . . Olivera-Montenegro, L. (2022). Encapsulation of Bioactive Compounds for Food and Agricultural Applications. *Polymers*, 14(19), 4194. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/polym14194194>

Zhao, J., Guo, Q., Huang, W., Zhang, T., Wang, J., Zhang, Y., & Tang, Y. (2020). Shape tuning and size prediction of millimeter-scale calcium-alginate capsules with aqueous core. *Polymers*, 12(3), 688. <https://doi.org/10.3390/polym12030688>

