

Calcium-loaded gelatin nanoparticles as a source of agricultural fertilizer

Nanopartículas de gelatina cargadas con calcio como fuente de fertilizante agrícola

Erwin San Juan-Martínez¹; Manuel Sandoval-Villa²; Libia Iris Trejo-Téllez²; Yolanda Jiménez-Flores³; Miguel Ángel Aguilar-Méndez^{1*}

¹Instituto Politécnico Nacional, CICATA-Legaria. Calzada Legaria núm. 694, Ciudad de México, C. P. 11500, MÉXICO.

²Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Carretera México-Texcoco km 38.5, Texcoco, Estado de México, C. P. 56230, MÉXICO.

³Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, ECOCATAL. Av. San Rafael Atlixco núm. 186, col. Reyes de Reforma, Iztapalapa, C. P. 09340, MÉXICO.

*Corresponding author: maguilarme@ipn.mx, tel. 55 57 29 60 00 ext. 67778.

Abstract

Introduction: The productivity of current agricultural practices depends largely on the use of fertilizers. A major limitation of conventional fertilizers is their low crop yields, so the development and application of new types of fertilizers using nanotechnology are potentially effective options for increasing agricultural production.

Objective: To synthesize and characterize calcium-loaded gelatin nanoparticles, and evaluate their behavior as controlled-release systems.

Methodology: The nanoparticles were obtained by spray drying. The physicochemical characteristics of the particles were analyzed by scanning electron microscopy and FTIR spectroscopy, while their behavior as controlled release systems was evaluated by *in vitro* tests.

Results: Calcium-loaded gelatin nanoparticles with average sizes below 700 nm, mainly spherical morphology and smooth microstructure were obtained. FTIR spectra showed the formation of electrostatic interactions between the charge and the gelatin. *In vitro* tests allowed to assume that the biopolymer matrix acted adequately in the controlled release of calcium ions.

Limitations of the study: The physicochemical characteristics of nanomaterials only apply to the processing conditions used.

Originality: There are no reports on calcium-loaded biopolymer nanomaterials with potential application in agriculture.

Conclusions: Gelatin nanoparticles, with adequate morphology and sizes, which act as controlled calcium release systems were obtained.

Keywords: nanomaterial, nanofertilizer, biopolymer, controlled release.

Resumen

Introducción: La productividad de las prácticas agrícolas actuales depende en gran medida del uso de fertilizantes. Una limitación importante de los fertilizantes convencionales es su bajo aprovechamiento por parte de los cultivos, por lo que el desarrollo y la aplicación de nuevos tipos de fertilizantes utilizando nanotecnología son una opción potencialmente efectiva para incrementar la producción agrícola.

Objetivo: Sintetizar y caracterizar nanopartículas de gelatina cargadas con calcio, y evaluar su comportamiento como sistemas de liberación controlada.

Metodología: Las nanopartículas se obtuvieron mediante secado por aspersión. Las características fisicoquímicas de las partículas se analizaron mediante microscopía electrónica de barrido y espectroscopia FTIR, mientras que su comportamiento como sistemas de liberación controlada se evaluó mediante pruebas *in vitro*.

Resultados: Se obtuvieron nanopartículas de gelatina cargadas con calcio, con tamaños promedio menores a 700 nm, morfología principalmente esférica y microestructura lisa. Los espectros FTIR evidenciaron la formación de interacciones electrostáticas entre la carga y la gelatina. Las pruebas *in vitro* permitieron suponer que la matriz biopolimérica actuó adecuadamente en la liberación controlada de iones de calcio.

Limitaciones del estudio: Las características fisicoquímicas de los nanomateriales solo aplican para las condiciones de elaboración utilizadas.

Originalidad: No existen reportes sobre nanomateriales biopoliméricos cargados con calcio con potencial aplicación en la agricultura.

Conclusiones: Se obtuvieron nanopartículas de gelatina, con morfología y tamaños adecuados, que actúan como sistemas de liberación controlada de calcio.

Palabras clave: nanomaterial, nanofertilizante, biopolímero, liberación controlada.

Please cite this article as follows (APA 6): San Juan-Martínez, E., Sandoval-Villa, M., Trejo-Téllez, L. I., Jiménez-Flores, Y., & Aguilar-Méndez, M. A. (2020). Calcium-loaded gelatin nanoparticles as a source of agricultural fertilizer. *Ingeniería Agrícola y Biosistemas*, 12(1), 69-77. doi: 10.5154/r.inagbi.2019.08.055

Introduction

In the context of sustainable agriculture, the incorporation of nanotechnology in the design and manufacture of innovative fertilizers is a strategy with the potential to significantly increase crop production and encourage the development of profitable agriculture, thus feeding the world's population, which has a high growth rate (Guo, White, Wang, & Xing, 2018).

Recent advances in nanotechnology have led to the development of nanomaterials of different sizes and shapes. These advances are the basis to synthesize particles with unique properties and directed to specific applications; however, its use in agriculture, especially in the protection and production of plants, is an area little explored by the scientific community (Khot, Sankaran, Maja, Ehsani, & Schuster, 2012). Nevertheless, as the study of nanotechnology advances, the potential use of nanostructured materials to generate controlled-release fertilizers and other strategies to improve the efficiency in the use of fertilizers has generated a great interest in the scientific community, governments, industry and the public sector (Milani, França, Balieiro, & Faez, 2017).

Lee, Heng, Ng, Chan, and Tan (2011) mention that the definition of nanoparticles depends on each discipline; some define nano objects as those materials that present one, two or three dimensions in the range of 0.1 to 100 nm. On the other hand, in fertilizers the definition seems to be in use, because there are patents and publications that have denominated "nano" to those materials that present different properties to those of the bulk material and that have one, two or three dimensions inferior to 1000 nm (Rai, Ribeiro, Mattoso, & Duran, 2015).

According to Liu and Lal (2015), nanofertilizers are expected to significantly improve crop growth and yield, as well as plant use efficiency, and reduce nutrient losses, adverse environmental impacts, application frequency, and labor costs. The above due to the fact that the nanofertilizers could prolong the longevity of nutrients in the environment, which would maintain a continuous and effective supply for the crops during a longer growth period (Guo et al., 2018).

Polymers are a class of soft materials with numerous and versatile mechanical and chemical properties that can be applied in agriculture. Smart agricultural supplies (controlled or slow-release agrochemicals and super absorbents) and bio absorbents form an expanding niche using polymer technology (Milani et al., 2017). Recent studies refer to the use of biodegradable polymers and their compounds as materials for the controlled release of agrochemicals. Milani et al. (2017) mention some polymers that, due to their specific

Introducción

En el contexto de la agricultura sostenible, la incorporación de nanotecnología en el diseño y fabricación de fertilizantes innovadores es una estrategia con potencial para aumentar significativamente la producción de los cultivos y fomentar el desarrollo de una agricultura rentable, para, de esta manera, alimentar a la población mundial, la cual presenta una tasa alta de crecimiento (Guo, White, Wang, & Xing, 2018).

Los avances recientes en la nanotecnología han llevado a la elaboración de nanomateriales de diferentes tamaños y formas. Estos avances son la base para sintetizar partículas con propiedades únicas y dirigidas a aplicaciones específicas; sin embargo, su uso en la agricultura, especialmente en la protección y producción de plantas, es un área poco explorada por la comunidad científica (Khot, Sankaran, Maja, Ehsani, & Schuster, 2012). No obstante, a medida que avanza el estudio de la nanotecnología, el uso potencial de materiales nanoestructurados para generar fertilizantes de liberación controlada y otras estrategias para mejorar la eficiencia en el uso de fertilizantes ha generado un gran interés en la comunidad científica, los gobiernos, la industria y el sector público (Milani, França, Balieiro, & Faez, 2017).

Lee, Heng, Ng, Chan, y Tan (2011) mencionan que la definición de nanopartícula depende de cada disciplina; algunas definen a los nano objetos como aquellos materiales que presentan una, dos o tres dimensiones en el rango de 0.1 a 100 nm. Por su parte, en los fertilizantes la definición parece estar en uso, pues existen patentes y publicaciones que han denominado "nano" a aquellos materiales que presentan propiedades diferentes a las del material a granel y que poseen una, dos o tres dimensiones inferiores a 1000 nm (Rai, Ribeiro, Mattoso, & Duran, 2015).

De acuerdo con Liu y Lal (2015), se espera que los nanofertilizantes mejoren significativamente el crecimiento y rendimiento de los cultivos, así como la eficiencia en su uso por parte de las plantas; además, que reduzcan las pérdidas de nutrientes, los impactos ambientales adversos, la frecuencia de aplicación y el costo de la mano de obra. Lo anterior debido a que los nanofertilizantes podrían prolongar la longevidad de los nutrientes en el ambiente, lo que mantendría un suministro continuo y efectivo para los cultivos durante un período de crecimiento más largo (Guo et al., 2018).

Los polímeros son una clase de materiales blandos con numerosas y versátiles propiedades mecánicas y químicas que pueden aplicarse en la agricultura. Los suministros agrícolas inteligentes (agroquímicos y súper-absorbentes controlados o de liberación lenta)

application capacity, uses, useful life and economic viability, have been studied in recent years as matrices for controlled release in agriculture.

A key aspect to consider when formulating slow-release nanomaterials is that their components must be biodegradable and must not form toxic substances upon degradation (Kumar, Ashfaq, & Verma, 2018); furthermore, nanofertilizers must release nutrients on demand to prevent them from prematurely turning into chemical/gaseous forms that plants cannot absorb. To achieve this, nutrients must be prevented from interacting with soil, water, and microorganisms, and it must be ensured that nutrients are released only when the plant can internalize them directly (de Rosa, Monreal, Schnitzer, Walsh, & Sultan, 2010).

Considering the above, the aim of the present work was to elaborate and characterize calcium-loaded gelatin nanoparticles, and to evaluate their behavior as a controlled release system.

Materials and methods

Chemical substances

In the production of the nanoparticles, gelatin type A (Sigma-Aldrich, USA), $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Meyer, Mexico) and citric acid (Merck, Germany) were used as crosslinking agents. Deionized water was used in all experiments and analyses ($18 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$).

Synthesis of calcium-loaded gelatin nanoparticles

To synthesize the nanoparticles, 3.8 g of $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ were weighed and dissolved in 300 mL of deionized water; simultaneously, 4.5 g of gelatin were dissolved in 700 mL of deionized water at 80°C . Before being mixed together, both solutions were filtered through $0.45 \mu\text{m}$ PVC membranes (Millipore, Ireland). The resulting solution was kept in agitation for 2.5 h at 80°C and sonicated for 15 min in an ultrasonic bath (TI-H-5, Elma, Germany). Subsequently, 1.2 g of citric acid was added to the solution and kept in agitation for 12 h at room temperature. Finally, the solution was sonicated for 15 min and filtered with a PVC membrane with a pore diameter of $0.22 \mu\text{m}$ (Millipore, Ireland).

A Nano Spray Dryer B-90 (Büchi, B-90, Switzerland) with a $4 \mu\text{m}$ grid was used to generate the nanoparticles. The drying temperature was 100°C at a pressure of 3500 Pa and 100 % nozzle opening. To obtain the nanoparticles without calcium loading (control), the methodology mentioned above was used, but without the addition of calcium nitrate in the process.

y bioabsorbentes forman un nicho en expansión que utilizan la tecnología de polímeros (Milani et al., 2017). Estudios recientes hacen referencia al uso de polímeros biodegradables y sus compuestos como materiales para la liberación controlada de agroquímicos. Milani et al. (2017) mencionan algunos polímeros que, debido a su capacidad de aplicación específica, usos, vida útil y viabilidad económica, se han estudiado en los últimos años como matrices para liberación controlada en la agricultura.

Un aspecto clave a considerar al formular nanomateriales de liberación lenta es que sus componentes deben ser biodegradables y no deben formar sustancias tóxicas al momento de su degradación (Kumar, Ashfaq, & Verma, 2018); además, los nanofertilizantes deben liberar los nutrimentos a pedido para evitar que se conviertan prematuramente en formas químicas/gaseosas que las plantas no puedan absorber. Para lograr lo anterior se debe evitar que los nutrimentos interactúen con el suelo, el agua y los microorganismos, y se debe asegurar que los nutrimentos se liberen solo cuando la planta los puede internalizar directamente (de Rosa, Monreal, Schnitzer, Walsh, & Sultan, 2010).

Considerando lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue elaborar y caracterizar nanopartículas de gelatina cargadas con calcio, y evaluar su comportamiento como un sistema de liberación controlada.

Materiales y métodos

Sustancias químicas

En la elaboración de las nanopartículas se empleó gelatina tipo A (Sigma-Aldrich, EUA), $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Meyer, México) y ácido cítrico (Merck, Alemania) como agente entrecruzante. En todos los experimentos y análisis se utilizó agua desionizada ($18 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$).

Síntesis de nanopartículas de gelatina cargadas con calcio

Para sintetizar las nanopartículas se pesaron 3.8 g de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ y se disolvieron en 300 mL de agua desionizada; de manera simultánea, se disolvieron 4.5 g de gelatina en 700 mL de agua desionizada a 80°C . Previo a ser mezcladas entre sí, ambas soluciones se filtraron a través de membranas de PVC de $0.45 \mu\text{m}$ (Millipore, Irlanda). La solución resultante se mantuvo en agitación durante 2.5 h a 80°C y se sonicó por 15 min en un baño ultrasónico (TI-H-5, Elma, Alemania). Posteriormente, se agregaron a la solución 1.2 g de ácido cítrico y se mantuvo en agitación por 12 h a temperatura ambiente. Finalmente, se sonicó la solución durante 15 min y se filtró con una membrana de PVC con diámetro de poro de $0.22 \mu\text{m}$ (Millipore, Irlanda).

Scanning electron microscopy

The morphology and size of the particles were studied with a scanning electron microscope (JSM-6390LV, JEOL, Japan). Prior to analysis, the samples were coated with gold-palladium by sputtering (Desk IV, Denton Vacuum). The micrographs were obtained at a magnification of 10000 X with an accelerating voltage of 20 kV. The average size was calculated from the measurement of 400 particles with the Scandium software (Olympus, ResAlta Research Technologies, Golden, CO, USA, 2010).

Fourier transform infrared spectroscopy

To evaluate possible interactions between calcium load and gelatin within the nanoparticle, FTIR determinations were performed with the Cary 630 equipment (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). A total attenuated reflectance (TRA) cell, a range of 4000 to 600 cm^{-1} and a resolution of 4 cm^{-1} at 32 scans were used for the analyses.

Calcium quantification and release testing

The quantification of total calcium contained in the nanomaterials was performed with an inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy equipment (ICP-OES 725, Agilent Technologies, USA). Prior to the determinations, the samples were subjected to the wet digestion procedure proposed by Alcántar-González and Sandoval-Villa (1999).

Calcium release through time was determined following the methodology proposed by Miranda-Villagómez et al. (2019), using an atomic absorption spectrometer (PinAAcle 900, PerkinElmer, USA). For the determination, several solutions were prepared with 0.30 g of the encapsulated material and 50 mL of deionized water, which were kept in constant agitation for 30, 60, 90 and 120 min, 24, 48 and 72 h. At the same time, the release of Ca^{2+} by $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ and the uncharged nanoparticles (control) was evaluated.

Statistical analysis

The data obtained, from the quantification and release of calcium, were subjected to an analysis of variance and, subsequently, to a Fisher mean comparison test ($P \leq 0.05$), for which the statistical software Design Expert ver 8.0 was used. (Stat-Ease, Inc. MN, USA). The analyses were performed in triplicate and the results presented as mean \pm standard deviation.

Results and discussion

Scanning electron microscopy

The size and shape of the nanoparticles obtained in this research are the result of the synthesis conditions

Para generar las nanopartículas se empleó un Nano Spray Dryer B-90 (Büchi, B-90, Suiza) con una rejilla de 4 μm . La temperatura de secado fue de 100 $^\circ\text{C}$ a una presión de 3500 Pa y 100 % de apertura de boquilla. Para obtener las nanopartículas sin carga de calcio (testigo), se utilizó la metodología mencionada anteriormente, pero sin la adición de nitrato de calcio en el proceso.

Microscopia electrónica de barrido

La morfología y tamaño de las partículas se estudiaron con un microscopio electrónico de barrido (JSM-6390LV, JEOL, Japón). Previo al análisis, las muestras se recubrieron con oro-paladio mediante sputtering (Desk IV, Denton Vacuum). Las micrografías se obtuvieron a una magnificación de 10000 X con un voltaje acelerador de 20 kV. El tamaño promedio se calculó a partir de la medición de 400 partículas con el programa Scandium (Olympus, ResAlta Research Technologies, Golden, CO, USA, 2010).

Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier

Para evaluar las posibles interacciones entre la carga de calcio y la gelatina dentro de la nanopartícula, se realizaron determinaciones de FTIR con el equipo Cary 630 (Agilent Technologies, Santa Clara, EUA). Para los análisis se utilizó una celda de reflectancia total atenuada (ATR), un intervalo de 4000 a 600 cm^{-1} y una resolución de 4 cm^{-1} a los 32 scans.

Cuantificación de calcio y pruebas de liberación

La cuantificación de calcio total contenido en los nanomateriales se realizó con un equipo de espectroscopia de emisión atómica de inducción por plasma acoplado (ICP-OES 725, Agilent Technologies, EUA). Previo a las determinaciones, las muestras se sometieron al procedimiento de digestión húmeda propuesto por Alcántar-González y Sandoval-Villa (1999).

La liberación de calcio a través del tiempo se determinó siguiendo la metodología propuesta por Miranda-Villagómez et al. (2019), utilizando un espectrómetro de absorción atómica (PinAAcle 900, PerkinElmer, EUA). Para la determinación se prepararon varias soluciones con 0.30 g del material encapsulado y 50 mL de agua desionizada, las cuales se mantuvieron en agitación constante durante 30, 60, 90 y 120 min, 24, 48 y 72 h. Paralelamente, se evaluó la liberación de Ca^{2+} por parte del $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ y de las nanopartículas sin carga (testigo).

Análisis estadístico

Los datos obtenidos, de la cuantificación y liberación de calcio, se sometieron a un análisis de varianza y,

and the technique used, since these two factors provide the means to adapt the properties of the materials to a specific application (Li, Anton, Arpagaus, Belleteix, & Vandamme, 2010).

Figure 1 shows the morphology and size distribution of gelatin particles with and without calcium loading. Figures 1A and 1C show that, independently of calcium incorporation, both groups of particles had defined perimeters, with mostly spherical shapes and smooth surfaces. In terms of size and distribution (Figures 1B and 1D), no changes were observed when Ca^{2+} ions were incorporated, since the average particle sizes, with and without charge, were 680 and 698 nm, respectively.

The size and morphology of the particles can be attributed to factors such as the nature of the polymer used and its concentration, the diameter of the grid hole used in the Nano Spray Dryer B-90 equipment (Beck-Broichsitter et al, 2012; Schafroth, Arpagaus, Jadhav, Makne, & Douroumis, 2012), the drying temperature, the gas flow or feed rate (Richard & Benoit, 2000) and the solutes content within each drop formed before drying (Kumar, Bhanjana, Sharma, Sidhu, & Dilbaghi, 2014). In the latter, it has been found that there is a close correlation between the size of the drop to be sprayed and the size of the solid particle obtained after drying, as reported by

posteriormente, a una prueba de comparación de medias de Fisher ($P \leq 0.05$), para lo cual se empleó el programa estadístico Design Expert ver. 8.0 (Stat-Ease, Inc. MN, EUA). Los análisis se realizaron por triplicado y los resultados se presentaron como la media \pm desviación estándar.

Resultados y discusión

Microscopia electrónica de barrido

El tamaño y la forma de las nanopartículas obtenidas en esta investigación son el resultado de las condiciones de síntesis y de la técnica empleada, ya que estos dos factores proveen los medios para adaptar las propiedades de los materiales a una aplicación específica (Li, Anton, Arpagaus, Belleteix, & Vandamme, 2010).

La Figura 1 muestra la morfología y la distribución de tamaño de las partículas de gelatina con y sin carga de calcio. En las Figuras 1A y 1C se observa que, independientemente de la incorporación de calcio, ambos grupos de partículas presentaron perímetros definidos, con formas mayoritariamente esféricas y superficies lisas. En cuanto al tamaño y su distribución (Figuras 1B y 1D), no se observaron cambios al incorporar iones de Ca^{2+} , ya que los tamaños promedio de las

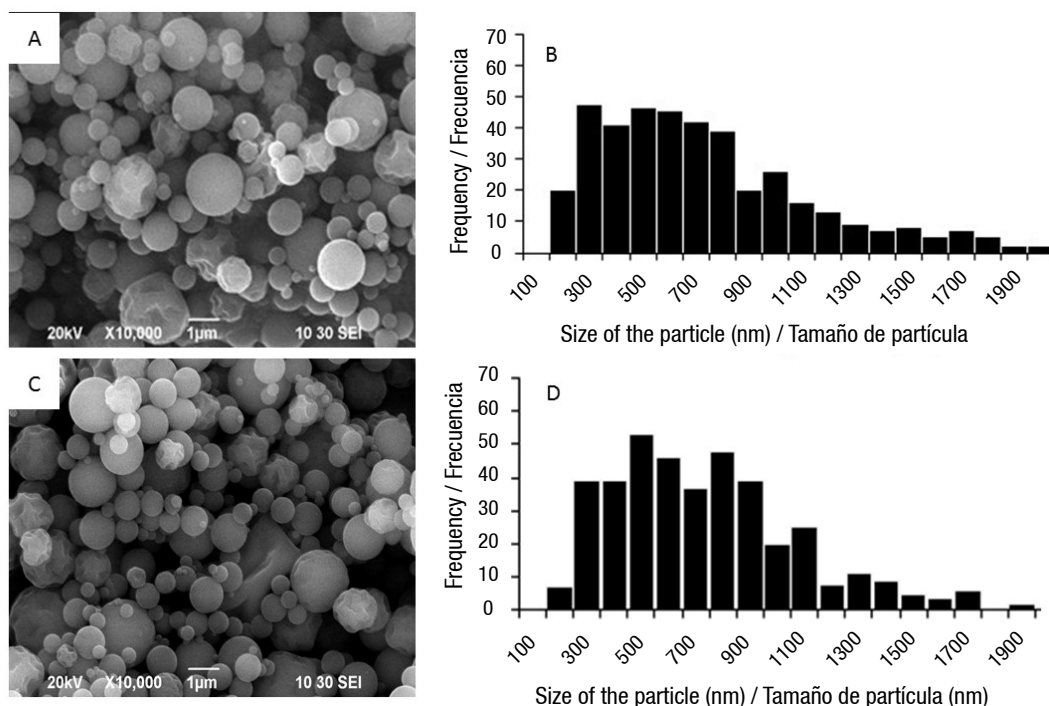


Figure 1. Morphology and size distribution of gelatin nanoparticles with and without calcium loading. Micrography of calcium loaded (A) and non-loaded (C) particles. Histogram of particle size distribution with calcium load (B) and without load (D).

Figura 1. Morfología y distribución de tamaño de nanopartículas de gelatina con y sin carga de calcio. Micrografía de partículas con carga de calcio (A) y sin carga (C). Histograma de distribución de tamaño de partículas con carga de calcio (B) y sin carga (D).

Schmid, Arpagaus, and Friess (2011) in work done with bovine serum albumin. On the other hand, Li et al. (2010) mention that the particle size distribution of sodium chloride, obtained with the same type of equipment, was related to the concentration of the sample.

Fourier transform infrared spectroscopy

Figure 2 shows the FTIR spectra of calcium nitrate and nanoparticles, with and without load. The spectrum of the unloaded (control) particles revealed characteristic absorption bands of the gelatin at 1633 cm^{-1} (amide I, C=O stretching) and 1529 cm^{-1} (amide II, N-H bending and C-N stretching) (Lai, Chenga, Yang, & Yen, 2018). On the other hand, the absorption bands recorded in the range of 1300 to 1500 cm^{-1} in the $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ spectrum are allocated to asymmetrical stretching of the N-O bonds in the nitrate ions (Ofer-Rozovsky et al., 2019).

The incorporation of calcium into the gelatin led to identifiable changes in the FTIR spectrum of the nanofertilizer. The widening and shifting of the band at 1310 cm^{-1} , and the marked decrease in the intensity of the band at 1415 cm^{-1} are visible. Additionally, a decrease in the intensity of the bands corresponding to protein amides I and II is observed. With these results it can be inferred that Ca^{2+} ions were adsorbed by the gelatin molecules by coordinating the ions with the carbonyl groups (C=O) of the amide.

partículas, con y sin carga, fueron de 680 y 698 nm , respectivamente.

El tamaño y morfología de las partículas se pueden atribuir a factores como la naturaleza del polímero empleado y su concentración, el diámetro del orificio de la rejilla empleada en el equipo Nano Spray Dryer B-90 (Beck-Broichsitter et al., 2012; Schafroth, Arpagaus, Jadhav, Makne, & Douroumis, 2012), la temperatura de secado, el caudal de gas o velocidad de alimentación (Richard & Benoit, 2000) y el contenido de solutos dentro de cada gota formada antes del secado (Kumar, Bhanjana, Sharma, Sidhu, & Dilbaghi, 2014). En esto último, se ha encontrado que existe una correlación estrecha entre el tamaño de la gota a pulverizar y el tamaño de partícula sólida obtenida después del secado, tal como lo reportan Schmid, Arpagaus, y Friess (2011) en trabajos realizados con albumina de suero bovino. Por su parte, Li et al. (2010) mencionan que la distribución del tamaño de partículas de cloruro de sodio, obtenidas con el mismo tipo de equipo, estuvo relacionada con la concentración de la muestra.

Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier

La Figura 2 muestra los espectros FTIR del nitrato de calcio y de las nanopartículas, con y sin carga. El espectro de las partículas sin carga (testigo) reveló bandas de absorción características de la gelatina a

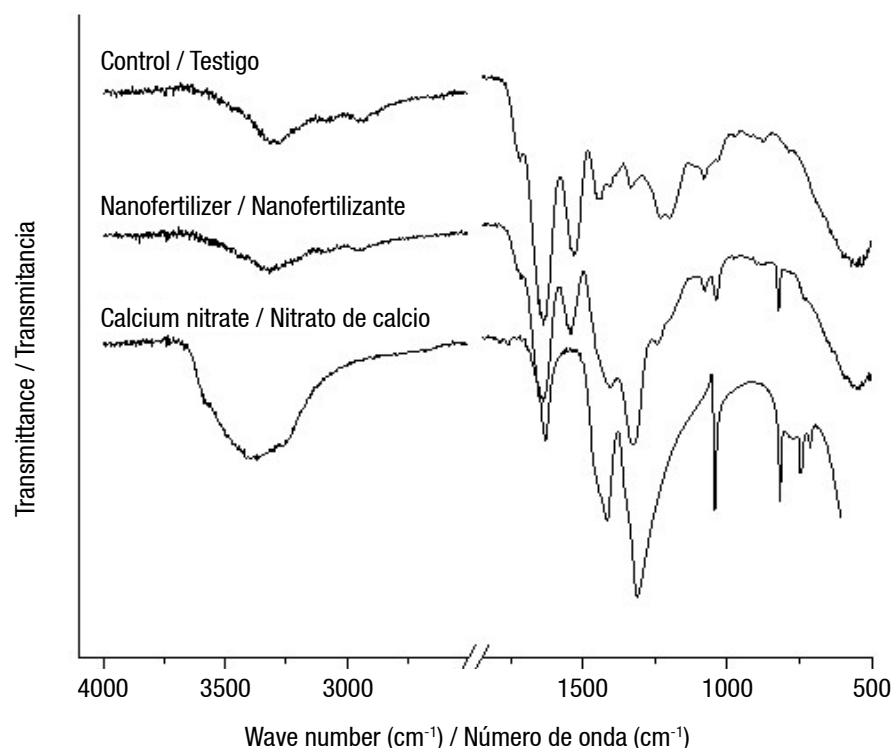


Figure 2. FTIR spectra of the calcium source and of the gelatin nanoparticles with and without calcium loading.
Figura 2. Espectros de FTIR de la fuente de calcio y de las nanopartículas de gelatina con y sin carga de calcio.

Quantification of calcium and release tests

The quantification of calcium by ICP showed that the loaded nanoparticles contained $60.28 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ of calcium, which is similar to the calculated theoretical value ($67.20 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), and the concentration in calcium nitrate was as expected ($163.12 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ of calcium). On the other hand, the unfilled particles showed a concentration of $0.876 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ of calcium, which can be attributed to the gelatin, since a concentration of $0.840 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ of calcium was obtained in that material.

Figure 3 shows the calcium release curves of the nanoparticles, calcium nitrate and gelatin, through time. In this figure it can be seen that only the loaded particles showed an increase from 97.6 to $154.1 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ in the calcium concentration as time went by. These values were significantly different ($P < 0.05$) from those obtained with calcium nitrate, with the exception of the 72-hour determination where this compound presented a value of $164.2 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$. This allows to assume that at this point the total release of the biopolymer matrix load was achieved. The other analyzed compounds presented a small variation in the concentration of calcium, obtaining average values of $3.7 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ in the unfilled particles and $2.9 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ in the gelatin.

Due to the observed behavior of calcium-loaded nanoparticles, they can be defined as a diffusion control system, more specifically as a nanosphere system, since the active agent is uniformly distributed throughout the polymer matrix and the release rate is determined by the load or concentration of the dispersed agent, the nature of the components and

1633 cm^{-1} (amida I, tensión del enlace C=O) y 1529 cm^{-1} (amida II, tijereteo del enlace N-H y tensión del enlace C-N) (Lai, Chenga, Yang, & Yen, 2018). Por su parte, las bandas de absorción registradas en el intervalo de 1300 a 1500 cm^{-1} en el espectro del $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ son atribuidas a tensiones asimétricas de los enlaces N-O en los iones nitrato (Ofer-Rozovsky et al., 2019).

La incorporación del calcio en la gelatina conllevó a cambios identificables en el espectro FTIR del nanofertilizante. El ensanchamiento y desplazamiento de la banda a 1310 cm^{-1} , y la notable disminución en la intensidad de la banda a 1415 cm^{-1} son visibles. Adicionalmente, se observa una disminución en la intensidad de las bandas correspondientes a las amidas I y II de la proteína. Con estos resultados se puede inferir que los iones de Ca^{2+} fueron adsorbidos por las moléculas de gelatina mediante la coordinación de los iones con los grupos carbonilo (C=O) de la amida.

Cuantificación de calcio y pruebas de liberación

La cuantificación de calcio por ICP arrojó que las nanopartículas cargadas contenían $60.28 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ de calcio, valor que resulta semejante al teórico calculado ($67.20 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), y la concentración en el nitrato de calcio resultó ser la esperada ($163.12 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ de calcio). Por su parte, las partículas sin carga presentaron una concentración de $0.876 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ de calcio, la cual se puede atribuir a la gelatina, ya que en dicho material se obtuvo una concentración $0.840 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ de calcio.

La Figura 3 muestra las curvas de liberación de calcio de las nanopartículas, el nitrato de calcio y la gelatina,

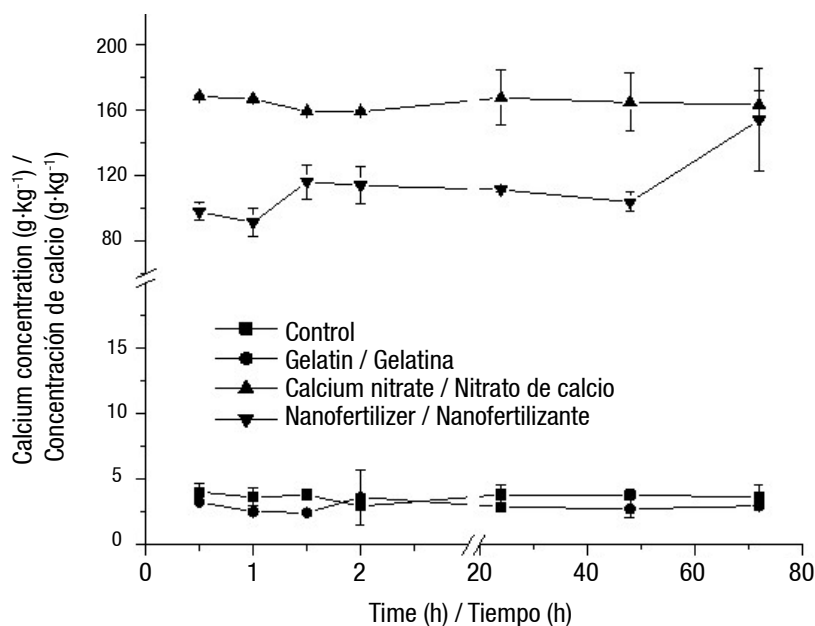


Figure 3. Calcium release curve over time.

Figura 3. Curva de liberación de calcio a través del tiempo.

the shape of the particle (Lshizawa and Nakamatsu, 2002). Rai et al. (2015) mention that the preparation of nanometric formulations of nutrient inputs can have an effect on the efficiency of the fertilizer, causing a different behavior than a conventional fertilizer. This can be seen in Figure 3, where the concentration of calcium in solution showed a slight increase in the first hour and a half of agitation, and then remained almost constant until 48 h and increased again at 72 h, indicating that the polymer formulation helped to delay the release of calcium. This would imply that the calcium ions near the surface of the particles will be the ones that are first detached from the matrix, leaving cavities that become pathways through which the calcium from the interior can be released more quickly, which causes an increase of the element in the medium.

Conclusions

Calcium-loaded gelatin nanoparticles with spherical morphology, smooth microstructure and average size below 700 nm were obtained by spray-drying. FTIR spectra confirmed the establishment of electrostatic interactions between Ca^{2+} ions and the carbonyl groups of the biopolymer. The elaborated nanomaterials showed the characteristic of a controlled release system, since calcium was slowly released through time. In general, the results observed are promising and create a real possibility that the processed material may be used as a source of agricultural fertilizer.

Acknowledgements

San Juan Martínez thanks CONACYT and COFAA-IPN for the scholarships granted. Aguilar-Méndez thanks the SIP-IPN for the financial support granted for this project (SIP Code: 20181062).

End of English version

References / Referencias

- Alcántar-González, G., & Sandoval-Villa, M. (1999). *Manual de análisis químico de tejido vegetal: guía de muestreo, preparación, análisis e interpretación*. Chapingo, México: Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo, A.C.
- Beck-Broichsitter, M., Schweiger, C., Schmehl, T., Gessler, T., Seeger, W., & Kissel, T. (2012). Characterization of novel spray-dried polymeric particles for controlled pulmonary drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 158(2), 329-335. doi: 10.1016/j.jconrel.2011.10.030
- De Rosa, M. C., Monreal, C., Schnitzer, M., Walsh, R., & Sultan, Y. (2010). Nanotechnology in fertilizers. *Nature Nanotechnology*, 5(2), 91. doi: 10.1038/nnano.2010.2
- Guo, H., White, J. C., Wang, Z., & Xing, B. (2018). Nano-enabled fertilizers to control the release and use efficiency

a través del tiempo. En dicha figura se puede observar que solo las partículas cargadas presentaron un incremento de 97.6 a 154.1 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ en la concentración de calcio conforme transcurrió el tiempo. Dichos valores fueron significativamente diferentes ($P < 0.05$) de los obtenidos con el nitrato de calcio, a excepción de la determinación a las 72 h en donde este compuesto presentó un valor de 164.2 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. Lo anterior permite asumir que en este punto se logró la liberación total de la carga de la matriz biopolimérica. Los otros compuestos analizados presentaron una variación pequeña en la concentración de calcio, obteniéndose valores promedio de 3.7 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ en las partículas sin carga y de 2.9 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ en la gelatina.

Debido al comportamiento observado de las nanopartículas cargadas con calcio, estas se pueden definir como un sistema de control de difusión, más específicamente como un sistema de nanoesfera, ya que el agente activo se encuentra distribuido uniformemente en toda la matriz polimérica y la velocidad de liberación está determinada por la carga o concentración del agente disperso, la naturaleza de los componentes y la forma de la partícula (Lshizawa y Nakamatsu, 2002). Rai et al. (2015) mencionan que la preparación de formulaciones nanométricas de insumos de nutrientes puede tener un efecto sobre la eficiencia del fertilizante, provocando un comportamiento diferente al de un fertilizante convencional. Lo anterior se puede observar en la Figura 3, donde la concentración de calcio en solución presentó un ligero aumento en la primera hora y media de agitación, para después mantenerse casi constante hasta las 48 h e incrementar nuevamente a las 72 h, lo que indica que la formulación polimérica ayudó a retardar la liberación del calcio. Lo anterior implicaría que los iones de calcio cercanos a la superficie de las partículas serán los que se desprenden primero de la matriz, dejando cavidades que se convierten en vías por las cuales el calcio del interior puede liberarse más rápidamente, lo que ocasiona un incremento del elemento en el medio.

Conclusiones

Se obtuvieron nanopartículas de gelatina cargadas con calcio, con morfología esférica, microestructura lisa y tamaños promedio menores a 700 nm, mediante secado por aspersion. Los espectros FTIR confirmaron el establecimiento de interacciones electrostáticas entre los iones Ca^{2+} y los grupos carbonilo del biopolímero. Los nanomateriales elaborados presentaron la característica de un sistema de liberación controlada, ya que el calcio fue liberado lentamente a través del tiempo. En general, los resultados observados son prometedores y crean una posibilidad real de que el material elaborado pueda ser utilizado como fuente de fertilizante agrícola.

- of nutrients. *Current Opinion in Environmental Science & Health*, 6, 77-83. doi: 10.1016/j.coesh.2018.07.009
- Khot, L. R., Sankaran, S., Maja, J. M., Ehsani, R., & Schuster, E. W. (2012). Applications of nanomaterials in agricultural production and crop protection: A review. *Crop Protection*, 35, 64-70. doi: 10.1016/j.cropro.2012.01.007
- Kumar, R., Ashfaq, M., & Verma, N. (2018). Synthesis of novel PVA-starch formulation-supported Cu-Zn nanoparticle carrying carbon nanofibers as a nanofertilizer: controlled release of micronutrients. *Journal of Materials Science*, 53(10), 7150-7164. doi: 10.1007/s10853-018-2107-9
- Kumar, S., Bhanjana, G., Sharma, A., Sidhu, M. C., & Dilbaghi, N. (2014). Synthesis, characterization and on field evaluation of pesticide loaded sodium alginate nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, 101, 1061-1067. doi: 10.1016/j.carbpol.2013.10.025
- Lai, Y. L., Chenga, P. Y., Yang, C. C., & Yen, S. K. (2018). Electrolytic deposition of hydroxyapatite/calcium phosphate-heparin/gelatin-heparin tri-layer composites on NiTi alloy to enhance drug loading and prolong releasing for biomedical applications. *Thin Solid Films*, 649, 192-201. doi: 10.1016/j.tsf.2018.01.051
- Lee, S. H., Heng, D., Ng, W. K., Chan, H. K., & Tan, R. B. (2011). Nano spray drying: A novel method for preparing protein nanoparticles for protein therapy. *International Journal of Pharmaceutics*, 403(1-2), 192-200. doi: 10.1016/j.ijpharm.2010.10.012
- Li, X., Anton, N., Arpagaus, C., Belleiteix, F., & Vandamme, T. F. (2010). Nanoparticles by spray drying using innovative new technology: The Büchi Nano Spray Dryer B-90. *Journal of Controlled Release*, 147(2), 304-310. doi: 10.1016/j.jconrel.2010.07.113
- Liu, R., & Lal, R. (2015). Potentials of engineered nanoparticles as fertilizers for increasing agronomic productions. *Science of the Total Environment*, 514C, 131-139. doi: 10.1016/j.scitotenv.2015.01.104
- Lshizawa, C., & Nakamatsu, J. (2002). Matrices poliméricas para liberación controlada de sustancias activas. *Revista de Química PUCP*, 16(1-2), 13-23. Retrieved from <http://revistas.pucp.edu.pe/index.php/quimica/article/view/18649/18902>

Agradecimientos

San Juan Martínez agradece al CONACYT y a la COFAA-IPN por las becas otorgadas. Aguilar-Méndez agradece a la SIP-IPN por el apoyo económico otorgado para la realización de este proyecto (Clave SIP: 20181062).

Fin de la versión en español

- Milani, P., França, D., Balieiro, A. G., & Faez, R. (2017). Polymers and its applications in agriculture. *Polímeros*, 27(3), 256-266. doi: 10.1590/0104-1428.09316
- Miranda-Villagómez, E., Aguilar-Méndez, M. Á., Gómez-Merino, F. C., Ronquillo-de Jesús, E., Sandoval-Villa, M., Sánchez-García, P., & Trejo-Télez, L. I. (2019). Synthesis of biopolymeric particles loaded with phosphorus and potassium: characterisation and release tests. *IET Nanobiotechnol*, 13(5), 493-497. doi: 10.1049/iet-nbt.2018.5035
- Ofer-Rozovsky, E., Haddad, M. A., Bar-Nes, G., Borojovich, E. J., Binyamini, A., Nikolski, A., & Katz, A. (2019). Cesium immobilization in nitrate-bearing metakaolin-based geopolymers. *Journal of Nuclear Materials*, 514, 247-254. doi: 10.1016/j.jnucmat.2018.11.003
- Rai, M., Ribeiro, C., Mattoso, L., & Duran, N. (2015). *Nanotechnologies in Food and Agriculture*. Switzerland: Springer, Cham.
- Richard, J., & Benoit, J. P. (2000). *Microencapsulation*. Francia: *Techniques de l'ingénieur Génie Procédés*.
- Schafroth, N., Arpagaus, C., Jadhav, U. Y., Makne, S., & Douroumis, D. (2012). Nano and microparticle engineering of water insoluble drugs using a novel spray-drying process. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 90(1), 8-15. doi: 10.1016/j.colsurfb.2011.09.038
- Schmid, K., Arpagaus, C., & Friess, W. (2011). Evaluation of the Nano Spray Dryer B-90 for pharmaceutical applications. *Pharmaceutical Development and Technology*, 16(4), 287-94. doi: 10.3109/10837450.2010.485320

