

# Desarrollo de agroinsumos ecológicamente amigables basados en nanoarcillas funcionalizadas a escala de planta piloto

Ingeniería en Materiales

Proyecto final para optar al grado de Ingeniero en Materiales

---

Autor: Tomás Giannandrea (DNI 40.138.261 – Legajo Nº11582)

Directora: Dra. Romina Paola Ollier Primiano

Co-directores: Dra. Vera Alejandra Alvarez – Lic. Andrés Torres Nicolini

---

Área de Materiales Compuestos Termoplásticos (CoMP)  
Instituto de Investigaciones en Ciencia y Tecnología de Materiales (INTEMA)

Universidad Nacional de Mar del Plata (UNMDP) – Facultad de Ingeniería -  
Departamento de Ingeniería en Materiales

Contacto: giannandreatomas@gmail.com





RINFI es desarrollado por la Biblioteca de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de Mar del Plata.

Tiene como objetivo recopilar, organizar, gestionar, difundir y preservar documentos digitales en Ingeniería, Ciencia y Tecnología de Materiales y Ciencias Afines.

A través del Acceso Abierto, se pretende aumentar la visibilidad y el impacto de los resultados de la investigación, asumiendo las políticas y cumpliendo con los protocolos y estándares internacionales para la interoperabilidad entre repositorios



Esta obra está bajo una [Licencia Creative Commons Atribución- NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

# Desarrollo de agroinsumos ecológicamente amigables basados en nanoarcillas funcionalizadas a escala de planta piloto

Ingeniería en Materiales

Proyecto final para optar al grado de Ingeniero en Materiales

---

Autor: Tomás Giannandrea (DNI 40.138.261 – Legajo Nº11582)

Directora: Dra. Romina Paola Ollier Primiano

Co-directores: Dra. Vera Alejandra Alvarez – Lic. Andrés Torres Nicolini

---

Área de Materiales Compuestos Termoplásticos (CoMP)  
Instituto de Investigaciones en Ciencia y Tecnología de Materiales (INTEMA)

Universidad Nacional de Mar del Plata (UNMDP) – Facultad de Ingeniería -  
Departamento de Ingeniería en Materiales

Contacto: giannandreatomas@gmail.com



## AGRADECIMIENTOS

Me gustaría comenzar agradeciendo a Romina, Andrés y Vera, mi directora y co-directores en este proyecto final respectivamente, sin ellos y su experiencia en el mundo de la investigación, hubiera sido muy cuesta arriba la realización de este trabajo. Romi con su ímpetu y su empuje y Andrés con su talento innato para la docencia y siendo una rueda de auxilio en el laboratorio fueron muy importantes durante todo el proceso para que pudiera sacar adelante este proyecto. A toda la gente de COMP e IIB que me colaboraron en todo lo que necesitara.

A todos los amigos que hice en la facultad, por impulsarnos durante toda la carrera compartiendo tardes y noches de estudio, nervios, logros y también, por qué no, decepciones. Fueron y son súper importantes para mí, me pone muy contento que la vida los haya cruzado en mi camino y hayamos recorrido una parte de él juntos, y espero poder seguir compartiendo momentos con ustedes más allá del lugar donde nos conocimos.

A mis amigos de la vida, que si bien han elegido emprender otros rumbos diferentes al mío, en algún momento nuestros caminos se han cruzado y los hemos transitado juntos. Han sido mis pilares y mi cable a tierra durante todos estos años. Compartiendo mates, asados, salidas o simplemente charlas. No tengo más que palabras de agradecimiento y cariño para con todos ellos.

A toda aquella persona que haya formado parte de mi vida durante todo este período y ya no lo haga, simplemente gracias, todos ellos también han sido importantes para mí en algún momento de mi vida.

Por último, pero más importante, a mi familia, pero sobre todas las cosas a mis papás, Mónica y Gustavo, y mi hermana Nadia. No hay nadie que sepa más que ellos lo que es convivir con un joven universitario y son testigos de todo mi esfuerzo y dedicación a lo largo de toda mi carrera. A mis viejos, agradecerles por todo lo que han hecho y hacen por mí. Por cuidarme, por formarme como la persona que soy e inculcarme sus valores, que hoy llevo conmigo, y por asegurarse de que nunca me falte nada para que pueda dedicarme a mis estudios. Los amo.

## Contenido

RESUMEN.....	5
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS DE LA TESIS .....	6
Introducción .....	6
Objetivos .....	15
Objetivo general .....	15
Objetivos Específicos .....	15
Hipótesis de trabajo .....	15
CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS .....	16
Materia prima .....	16
Equipamiento utilizado para la preparación de nanoarcillas.....	17
Preparación de las nanoarcillas funcionalizadas.....	18
Técnicas de caracterización fisicoquímica de nanoarcillas.....	19
Caracterización química y estructural.....	19
Caracterización térmica .....	20
CAPÍTULO 3. PRODUCCIÓN DE BENT-Q EN PLANTA PILOTO Y CARACTERIZACIONES FÍSICAS, QUÍMICAS Y MORFOLÓGICAS .....	21
Introducción .....	21
Procedimiento experimental.....	24
Resultados y discusión .....	26
Conclusiones parciales .....	39
CAPÍTULO 4. PRODUCCIÓN DE BENT-AS EN PLANTA PILOTO Y CARACTERIZACIONES FÍSICAS, QUÍMICAS Y MORFOLÓGICAS .....	40
Introducción .....	40
Procedimiento experimental.....	41
Resultados y discusión .....	42
Conclusiones parciales .....	52
CAPÍTULO 5. PROPIEDADES BIOLÓGICAS DE LAS NANOARCILLAS OBTENIDAS EN PLANTA PILOTO .....	53
Introducción .....	53
Parte experimental.....	56
Material Vegetal .....	56
Ensayos de inducción de las proteínas de defensa.....	57
Ensayo de salinidad – Tratamiento a las semillas de tomate – <i>Priming</i> de la germinación.....	57
Resultados y discusión .....	57
Capacidad elicitor de las diferentes arcillas.....	57
Ensayo de salinidad – Tratamiento a las semillas de tomate – <i>Priming</i> de la germinación.....	58
Conclusiones parciales .....	61
CAPÍTULO 6. ESTUDIO DE FACTIBILIDAD ECONÓMICA.....	62
Definición del mercado .....	62

Segmentación del mercado.....	63
Ingeniería de producción .....	67
Capacidad de la planta.....	67
Inversión requerida.....	68
Análisis de costos .....	70
Análisis de rentabilidad .....	73
Tasa interna de retorno (TIR).....	74
Tiempo de repago .....	74
CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES GENERALES Y TRABAJOS A FUTURO .....	75
Conclusiones generales .....	75
Trabajos a futuro .....	75
Trabajos presentados en eventos científicos .....	76
Artículo científico enviado .....	76
ANEXOS.....	77
Caracterizaciones de la Bent .....	77
Caracterizaciones de la Bent-Q .....	78
Caracterización del AS.....	80
Caracterizaciones de la Bent-AS.....	81
BIBLIOGRAFÍA .....	84

## RESUMEN

El proyecto final realizado representa un trabajo de desarrollo de agroinsumos ecológicamente amigables basados en nanoarcillas funcionalizadas a escala de planta piloto, a partir de formulaciones previamente realizadas a escala laboratorio.

Para la inmovilización de principios activos, que el soporte sea biocompatible e inerte representa un requerimiento importante para que no interfiera con la estructura nativa de los mismos, y, por lo tanto, no interfiera en su actividad biológica. Notablemente, todas estas características convergen en la Bentonita (Bent).

En primer lugar, se llevaron a cabo distintas formulaciones de Bent-Q y Bent-AS modificando variables clave del proceso para lograr una optimización de la obtención de las nanoarcillas. Una vez producidas las diferentes nanoarcillas, se realizaron ensayos de caracterización en la búsqueda de determinar si las variaciones realizadas en el proceso original tienen alguna influencia en las propiedades finales de los productos y se alcanzaban resultados similares a los obtenidos a escala laboratorio. Se logró hacer un análisis cualitativo y cuantitativo a partir de los ensayos de Difracción por Rayos X, termogravimétricos, de espectrofotometría Infrarrojo, de microscopía y de otras propiedades relevantes.

Una vez finalizada la etapa de caracterización se estudió, junto con el Instituto de Investigaciones Biológicas (IIB), la efectividad de las arcillas funcionalizadas en escala planta piloto como promotoras de crecimiento y/o inductoras de tolerancia a estrés salino en plantas de tomate.

A partir de los resultados obtenidos en los ensayos de caracterización y las propiedades biológicas logradas por los distintos productos, se seleccionó la nanoarcilla Bent-Q4-5min como la formulación óptima y se hizo un análisis de factibilidad económica de su producción a escala planta piloto. Se conformó un proyecto de inversión con bases en el Parque Industrial de Mar del Plata, se realizó un estudio de mercado para estimar la potencial demanda a nivel nacional y se diseñó una planta capaz de producir hasta 14.000 kg anuales de Bent-Q. Utilizando los métodos de tasa interna de retorno y tiempo de repago se determinó que el proyecto sería rentable.

## CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS DE LA TESIS

### Introducción

La agricultura representa un extenso ámbito de la actividad humana, abarcando la ciencia y tecnología relacionadas con la producción y aprovechamiento de vegetales. Esta actividad se dedica no solo a la alimentación, sino también al desarrollo de combustibles y una amplia gama de productos industriales<sup>1</sup>. En la actualidad, enfrenta una serie de desafíos significativos, particularmente vinculados al cambio climático, la urbanización, cuestiones ambientales como la acumulación de pesticidas y fertilizantes, así como al considerable crecimiento demográfico global proyectado a superar los 9 billones de habitantes para el año 2050<sup>2</sup>. Por otro lado, los cambios ambientales asociados a las condiciones climáticas altamente dinámicas traen consigo el desarrollo de nuevas enfermedades y problemas asociados al uso extensivo de fitosanitarios en la agricultura que desafían la generación de nuevas herramientas agrotecnológicas. Además, ante la disminución de los recursos petrolíferos a nivel mundial, es previsible que los productos y materiales agrícolas vuelvan a ser considerados como la base del comercio y la manufactura, generando así demandas adicionales en la producción agrícola<sup>2</sup>.

Los pesticidas o agroquímicos son sustancias destinadas a prevenir, destruir, repeler o disminuir el daño de cualquier plaga. El término pesticida incluye un amplio rango de compuestos como insecticidas, fungicidas, raticidas, molusquicidas, herbicidas, etc. Las plagas pueden ser insectos, patógenos vegetales, microbios, aves, etc. que pueden destruir propiedades, propagar o ayudar a propagar enfermedades<sup>3,4</sup>. Gracias a los agroquímicos se ha logrado aumentar considerablemente la producción de alimentos desde mediados del siglo pasado, y la necesidad actual de aumentar la producción de alimentos debido al rápido crecimiento de la población humana mantiene la presión sobre el uso intensivo de pesticidas y fertilizantes<sup>5</sup>. Para tener una idea en número, la producción de granos alimenticios aumentó de 1783 millones de toneladas en 1994<sup>6</sup> a 2847 millones de toneladas al final del año 2023<sup>7</sup>.

En todo el mundo, el 40% de los productos agrícolas se pierde debido a enfermedades de las plantas, malezas y plagas colectivamente<sup>8</sup>. De no haber sido por los pesticidas las pérdidas de productos cosechables por malezas, enfermedades y plagas de insectos hubieran sido mucho mayores<sup>4,8</sup>. Estas pérdidas de producción habrían disminuido la oferta de productos cosechados, incrementando así los precios de los mismos. Con esto no solo se evitaron pérdidas económicas considerables para los productores, sino que también se pudo alimentar a una mayor parte de la población a un menor costo para sus bolsillos. Además, estas sustancias no solo protegen los cultivos de los daños provocados por las plagas, sino que también aumentan considerablemente los rendimientos de cultivos. Los pesticidas también previenen los brotes de enfermedades mediante el control de roedores e insectos contribuyendo a mejorar la salud humana. Se calcula que aproximadamente 7 millones de muertes de personas en todo el mundo han sido prevenidas por el uso de insecticidas, eliminando estos vectores de enfermedades, como pueden ser la fiebre amarilla, encefalitis, peste bubónica, fiebre tifoidea, etc<sup>8</sup>.

A pesar de las ventajas mencionadas en el párrafo anterior, estas sustancias traen aparejadas serias desventajas que serán analizadas a continuación. El riesgo a la salud humana por pesticidas se genera fundamentalmente de dos formas; por la exposición ocupacional durante la producción y aplicación de pesticidas y por la interacción humana con los ecosistemas afectados. Grandes cantidades de pesticidas se



dispersan lejos del punto de aplicación y llegan al suelo, aire, agua, alimento y otros sistemas. La ingesta y el contacto con agua, aire y alimentos contaminados, así como la acumulación de contaminantes a lo largo de la cadena alimentaria, pueden provocar daños en diversas formas de vida<sup>9</sup>.

La mayoría de los pesticidas no distingue entre plagas y otras formas de vida similares, como seres humanos, animales, otros organismos vivos e incluso el medioambiente. Son potencialmente dañinos si se utilizan incorrectamente. Se estima que unas 220.000 personas mueren y alrededor de 3 millones<sup>8</sup> de personas se envenenan cada año en países en desarrollo por plaguicidas. Los mayores afectados resultan ser trabajadores agrícolas<sup>3</sup>.

Entre el 80-90% de los pesticidas aplicados pueden volatizarse en cuestión de días, hecho muy común cuando se aplican con rociadores. Los pesticidas volatizados se evaporan en el aire y pueden causar daño a organismos no objetivo<sup>8</sup>. Hay una evidencia abrumadora de que algunos de estos productos químicos representan un riesgo potencial para humanos y otras formas de vida, además de efectos secundarios no deseados para el medio ambiente. Ningún segmento de la población está completamente protegido contra la exposición a plaguicidas y las enfermedades potencialmente graves que pueden traer aparejados. Sin embargo, una gran parte de los damnificados son gente de los países en desarrollo y personas de alto riesgo de cada país, como son los trabajadores de producción, mezcladores, trabajadores agrícolas y rociadores<sup>4</sup>.

Los pesticidas ingresan al cuerpo humano por inhalación, ingestión o penetración a través de la piel. Sin embargo, la mayoría de las personas se ven afectadas por la ingesta de alimentos contaminados con pesticidas<sup>8</sup>. Los efectos tóxicos que producen en la salud humana son muy variables. Pueden aparecer en días y son de naturaleza inmediata (intoxicación aguda) o pueden tardar meses o años en manifestarse y por eso se denominan efectos crónicos o a largo plazo<sup>3</sup>. Varios síntomas como dolores de cabeza, dolores corporales, erupciones cutáneas, falta de concentración, náuseas, mareos, calambres, ataques de pánico y, en casos graves, aunque raramente pasa, el coma y la muerte podrían ocurrir debido a una intoxicación aguda por pesticidas<sup>3,8</sup>.

Cualquier efecto dañino que se produzca por pequeñas dosis repetidas durante un período de tiempo se denomina "efecto crónico"<sup>3</sup>. Los efectos crónicos de los plaguicidas suelen ser letales y pueden no aparecer síntomas incluso por años<sup>8</sup>. Estos son efectos a largo plazo que pueden afectar a múltiples órganos del cuerpo. Entre dichos efectos por exposición a ciertos pesticidas se pueden incluir defectos de nacimiento, intoxicación del feto, generación de tumores benignos o malignos, cambios genéticos, trastornos sanguíneos, trastornos en nervios, alteración endocrina y efectos sobre la reproducción, alterando el nivel de hormonas reproductivas, tanto masculinas como femeninas<sup>3,8</sup>.

Los pesticidas pueden contaminar el suelo, el agua, el césped y otra vegetación. Además de matar insectos o malezas, pueden ser tóxicos para una gran cantidad de otros organismos, como las aves, peces, insectos beneficiosos y plantas no objetivo<sup>4</sup>. Los efectos de los plaguicidas en el sistema ambiental pueden variar desde desviaciones menores en el funcionamiento normal del ecosistema hasta la pérdida de diversidad de especies. Una vez que estas sustancias se liberan al medio ambiente, pueden tener muchos destinos diferentes. Cuando se rocían pesticidas en cultivos agrícolas, pueden encontrar su camino a través del aire y eventualmente terminar en otros segmentos del medio ambiente, como el suelo o el agua. Los pesticidas que se aplican directamente al suelo pueden llegar a cuerpos de agua a través de la escorrentía superficial o pueden filtrarse a través del suelo hacia capas inferiores de suelo y hacia el agua subterránea<sup>3</sup>.

El tratamiento intensivo del suelo con pesticidas puede causar que las poblaciones de microorganismos beneficiosos del suelo disminuyan. Si se pierden bacterias y hongos, entonces el suelo se degrada. El uso excesivo de fertilizantes y pesticidas químicos tienen efectos sobre los organismos del suelo que son similares al uso excesivo de antibióticos por parte de los humanos. Si bien el uso indiscriminado de productos químicos podría funcionar durante algunos años, después de un tiempo, no habría suficientes organismos benéficos del suelo para retener los nutrientes, dando como resultado suelos cada vez menos fértiles<sup>4</sup>.

Los riesgos asociados con el uso de plaguicidas han superado sus efectos beneficiosos<sup>8</sup>. Tal situación deja en evidencia la necesidad de realizar nuevos desarrollos innovadores y comprometidos con el cuidado del ambiente que aporten soluciones sostenibles en función de la calidad de vida de los habitantes y su entorno ambiental. Específicamente, desde el punto de vista agroalimenticio se pretende reducir la cantidad de productos químicos que se aplican y aumentar los rendimientos productivos a través de la optimización de los recursos tales como el agua y los nutrientes del suelo<sup>10</sup> utilizando la menor cantidad de agroinsumos tóxicos posibles<sup>11</sup>. A pesar de que los plaguicidas están sometidos a un proceso regulatorio estricto, con el fin de minimizar el impacto en la salud humana y el ambiente, se ha incrementado la preocupación respecto a los riesgos asociados a la salud. En especial los relacionados con la exposición ocupacional, en la que son afectados los trabajadores agrícolas, los de la industria química y toda persona que mezcla, carga, transporta y aplica plaguicidas formulados<sup>9</sup>. Sin embargo, la oferta de biopesticidas o compuestos de baja inocuidad ambiental es aun relativamente escasa<sup>12</sup>. Frente a este escenario, la introducción al mercado de nuevos compuestos inocuos y de alta eficacia y calidad representa una oportunidad muy promisoriosa a nivel nacional e internacional. Por eso mismo es importante la búsqueda y desarrollo de pesticidas ecológicamente amigables, basados en principios bioactivos, de modo de reducir el impacto ambiental y atenuar las graves consecuencias hacia las personas que se han mencionado en párrafos anteriores.

Un desafío permanente es garantizar que los agroquímicos utilizados produzcan la menor cantidad de efectos perjudiciales tanto para el medio ambiente como para el consumo humano. En este sentido, la obtención y aplicación de bioinsumos provenientes de recursos naturales constituye una alternativa de solución a esta problemática. Dentro de las estrategias de control integrado del cultivo se incluye el uso de compuestos biocompatibles que aumentan la tolerancia de las plantas frente a estrés y que redundarían en una reducción del uso de fitosanitarios convencionales para el control de plagas y enfermedades.

Los compuestos naturales con potencialidades como bioestimulantes y antimicrobianos, tales como extractos de plantas y de algas, hormonas, péptidos, polisacáridos y aminoácidos entre otros, se han estudiado como alternativas muy prometedoras para reducir el uso de sustancias pesticidas y agroquímicos sintéticos<sup>13</sup>. Uno de ellos es el Quitosano (Q). El Q es un polímero natural, no tóxico, biocompatible y biodegradable<sup>14,15</sup>, que es obtenido a partir de la desacetilación parcial de la quitina en medio alcalino. La quitina forma parte del exoesqueleto de crustáceos marinos y de la pared celular de algunos hongos<sup>16</sup> y es el segundo polímero natural más abundante, detrás de la celulosa<sup>17,18</sup>.

Se ha demostrado que el Q induce numerosas respuestas biológicas en plantas y mejora la respuesta de las mismas antes estreses bióticos y abióticos<sup>14,19</sup>. Cuando una planta es infectada por un patógeno, responde mediante la inducción de un mecanismo de defensa innato. Las moléculas que poseen la habilidad de activar estos mecanismos de defensa de las plantas se llaman "elicitores"<sup>15</sup>. El conocimiento sobre mecanismos

bioquímicos y moleculares de defensa de las plantas ha permitido inducir artificialmente respuestas defensivas utilizando inductores químicos o elicitores naturales<sup>20</sup>. En este sentido, el uso de Q se está volviendo muy importante ya que es un polímero amigable con el medio ambiente para la protección de cultivos<sup>14</sup>. El Q representa una alternativa al uso de pesticidas tóxicos para el tratamiento de distintos fitopatógenos incluyendo bacterias, hongos, virus, nematodos, etc.<sup>15,21-23</sup>

El potente efecto del Q sobre las enfermedades de las plantas se debe a sus propiedades antimicrobianas y actividad de elicitación de la inmunidad innata de la planta. La actividad antimicrobiana está influenciada por varios factores, como el peso molecular, solubilidad, densidad de carga positiva, modificación química, pH, concentración, capacidad quelante y tipo de microorganismo. Además, la naturaleza biodegradable, no tóxica y no alergénica del Q fomenta su uso potencial como material bioactivo<sup>24</sup>. Por lo tanto, el Q puede ser un candidato prometedor para controlar de forma segura las enfermedades de las plantas. Sin embargo, su efectividad requiere aplicaciones repetidas a lo largo del tiempo, lo que implica un uso intensivo en dosis y, en consecuencia, representa un inconveniente técnico y económico.

Otro gran candidato para el control de enfermedades y el manejo del estrés en plantas es el Ácido Salicílico (AS), que es una hormona vegetal de tipo anti-estrés. El AS es un compuesto fenólico sintetizado por las plantas con propiedades hormonales<sup>25</sup>. Regula respuestas de desarrollo, incluyendo las respuestas de defensa frente a diversos tipos de estreses bióticos (virus, bacterias y hongos)<sup>26</sup> y abióticos (sequía, temperatura, toxicidad por metales pesados y salinidad)<sup>27</sup>.

La fitohormona antiestrés AS es una hormona con funciones en varios procesos de crecimiento y desarrollo, incluida la activación de las respuestas de defensa de las plantas contra varios patógenos<sup>28</sup>. Cuando se aplica el AS en las plantas, su efecto inductor se mantiene durante 3 a 7 días, pero la vida media del AS dentro de la planta es muy corta y eso hace imprescindibles varias aplicaciones a lo largo del ciclo del cultivo lo cual conlleva a mayor operatividad y altos costos de aplicación.

Recientemente, la nanotecnología abrió una nueva era de sistemas de liberación sostenida. Se han diseñado varios nanomateriales (NMs) para la liberación de principios activos con aplicación en agricultura como se esquematiza en la **Figura 1**. Se han propuesto múltiples modos de liberación de ingredientes activos mediante la modulación de la estructura del sistema de carga (partícula, fibra, sistemas en capas, partícula porosa, cápsula, emulsión, etc.). El desarrollo de compuestos nano-encapsulados ha facilitado la estabilización y protección de los principios activos, así como también la posibilidad de incrementar su eficiencia de acción debido a la posibilidad de controlar o sostener su liberación en el sistema biológico blanco o target<sup>29</sup>. La liberación predecible y reproducible de un agente activo en un ambiente determinado y durante un período de tiempo es, sin dudas, una ventaja biológica y ambiental altamente significativa. En el contexto de la agricultura sostenible, la aplicación de sistemas basados en la nanoliberación se considera uno de los enfoques altamente prometedores.

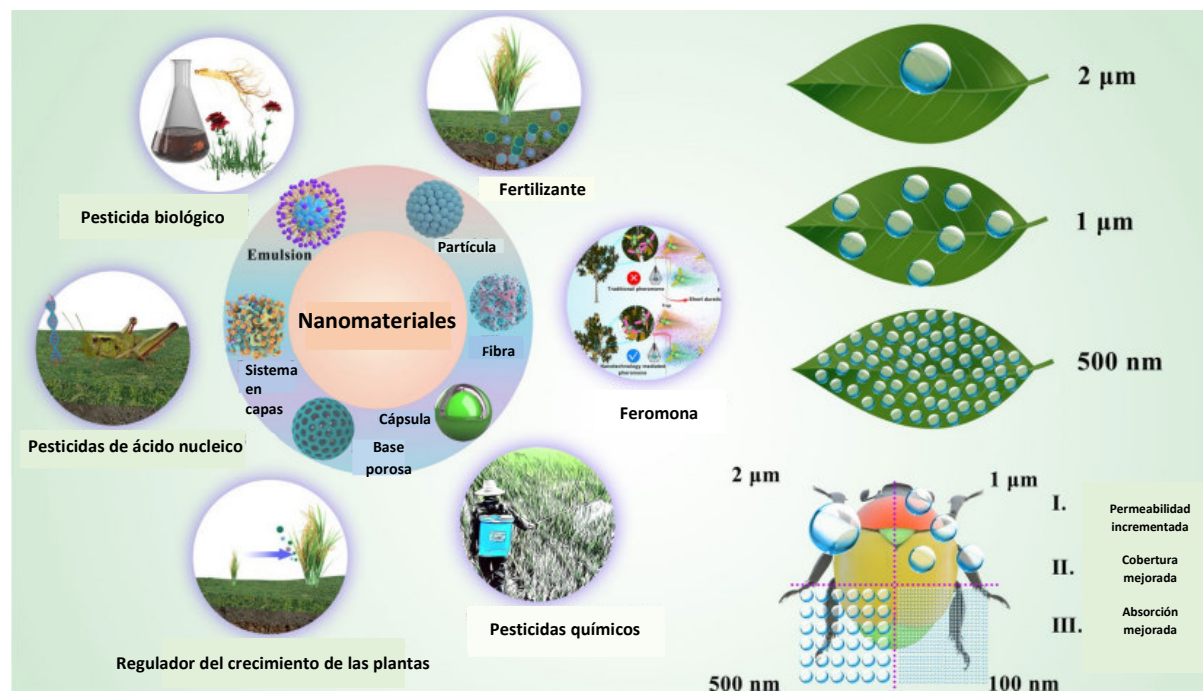


FIGURA 1. A) NANOMATERIALES CARGADOS CON DIVERSOS PRINCIPIOS ACTIVOS CON APLICACIÓN EN AGRICULTURA. MÚLTIPLES MODOS DE LIBERACIÓN DE INGREDIENTES ACTIVOS MEDIANTE LA MODULACIÓN DE LA ESTRUCTURA DEL SISTEMA DE CARGA (PARTÍCULA, FIBRA, SISTEMA EN CAPAS, BASE POROSA, CÁPSULA, EMULSIÓN). B) EFECTO DEL TAMAÑO PEQUEÑO Y LA GRAN SUPERFICIE ESPECÍFICA DE LAS NANOPARTÍCULAS PARA MEJORAR LA BIODISPONIBILIDAD DE LOS INGREDIENTES ACTIVOS.<sup>30</sup>

Aunque los nanomateriales tienen aplicaciones prometedoras en la liberación de agroquímicos, existen ciertas limitaciones principalmente relacionadas a los riesgos desconocidos para la salud de los seres humanos y las dificultades regulatorias que trae el efecto del tamaño pequeño<sup>31</sup>. La complejidad y el costo de la tecnología de fabricación también limitan el uso a gran escala de estos nanomateriales en la agricultura.

El término arcilla se usa habitualmente con diferentes significados. Desde el punto de vista mineralógico engloba un grupo de minerales cuyas propiedades físico-químicas dependen de su estructura y de su tamaño de grano, muy fino, usualmente inferior a 2  $\mu\text{m}$ . Desde el punto de vista petrológico, la arcilla es una roca sedimentaria, en la mayoría de los casos de origen detrítico, con características bien definidas. Las rocas están finamente granuladas y al ser pulverizadas adecuadamente se hacen plásticas en contacto con el agua, si luego son secadas se vuelven duras como el cuero y si se cuecen se convierten en cuerpos de permanente aspecto rocoso. Para un ceramista una arcilla es un material natural que cuando se mezcla con agua en la cantidad adecuada se convierte en una pasta plástica. Las arcillas no corresponden a una composición química o mineralógica definida sino que son mezclas de diversas especies minerales, que varían según la composición de la roca matriz y el proceso de meteorización. Contienen minerales de origen secundario y restos de minerales primarios, como feldespatos, micas, cuarzo y materia orgánica.

Con el reciente desarrollo de la nanotecnología, las arcillas han encontrado múltiples aplicaciones debido a sus excelentes propiedades físico-químicas. Más allá de sus usos tradicionales como materiales cerámicos y de construcción, las arcillas se pueden emplear como adsorbentes de contaminantes naturales e industriales, como soportes para la liberación controlada de principios activos o excipientes en formulaciones farmacéuticas, en el área de cosmética, en la fabricación de sensores y electrodos. Además, la versatilidad de

las arcillas también se refleja en su creciente uso en la industria química para diferentes reacciones catalíticas y foto catalíticas y para la preparación de nanocompuestos de matriz polimérica. Las arcillas han resultado ser una matriz inerte y biocompatible para la inmovilización y protección de numerosos principios activos con potencial aplicación en diversos campos industriales.

Las nanoarcillas son minerales naturales arcillosos que poseen al menos una de sus dimensiones en el rango nanométrico. Las mismas se incluyen dentro de una amplia variedad de minerales arcillosos y hacen referencia, principalmente, a los filosilicatos. Los filosilicatos se forman como resultado de la meteorización química de los minerales de silicato en la superficie de la tierra y consisten en capas de óxidos de aluminio y silicio apiladas unas sobre las otras (aluminosilicatos estratificados).<sup>32</sup>

Las láminas son la unidad estructural básica de las nanoarcillas y son propensas a organizarse unas sobre otras, como páginas de un libro. Las láminas individuales están compuestas de capas tetraédricas y/u octaédricas y como se ordenen es muy importante a la hora de definir y distinguir estos minerales arcillosos. En la capa tetraédrica, los tetraedros de silicio-oxígeno están unidos a los tetraedros vecinos compartiendo tres esquinas, mientras que la cuarta esquina del tetraedro forma parte de la capa octaédrica. La capa octaédrica está generalmente compuesta por aluminio o magnesio con coordinación 6 con el oxígeno de la capa tetraédrica y con el hidroxilo. Las capas pueden estar compuestas a su vez por dos, tres o hasta cuatro capas de tetraedros de silicio,  $[\text{SiO}_4]^4$ , y/u octaedros de aluminio,  $[\text{AlO}_3(\text{OH})_3]^6$ . El apilamiento de varias capas forma una “partícula”, mientras que el arreglo de varias partículas, recibe el nombre de “agregado”. Las capas pueden estar unidas entre sí por fuerzas de Van der Waals, fuerzas electrostáticas o por puentes de hidrógeno, dependiendo de cada caso en particular, y los espacios entre las capas se denominan espacios interlaminares. En función del número y la forma en que estas capas se empaquetan se pueden distinguir tres tipos de filosilicatos: 1:1, 2:1 y 2:1:1, esquematizados en la **Figura 2**.

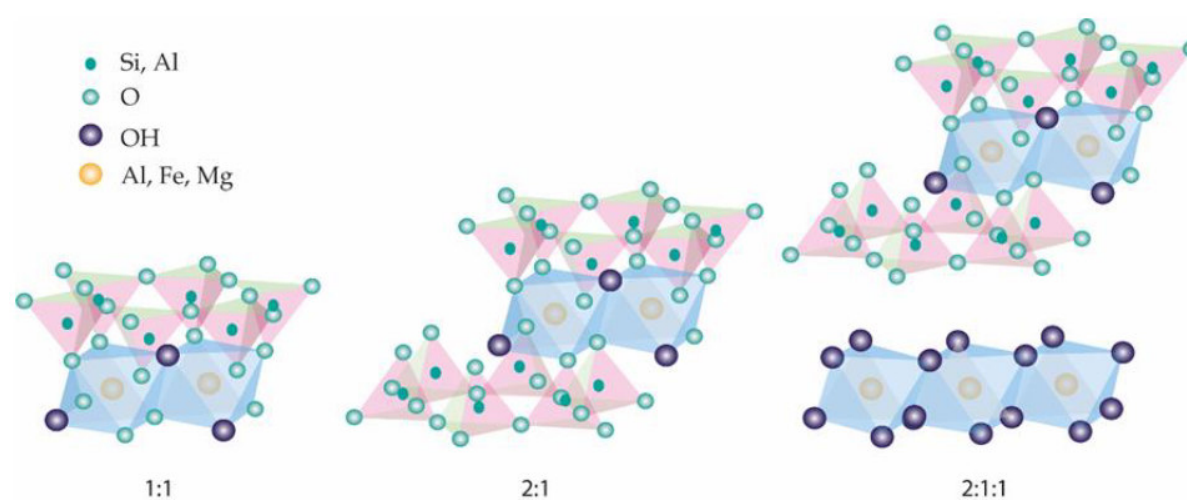


FIGURA 2. ESTRUCTURA QUÍMICA DE LAS CAPAS DE LOS FILOSILICATOS DE TIPO 1:1, 2:1 Y 2:1:1.

Los filosilicatos de tipo 1:1 están constituidos por láminas compuestas por una capa tetraédrica y otra octaédrica. Este es el caso de minerales como la caolinita, halloisita y serpentina. Los filosilicatos de tipo 2:1 son

aquellos que sus láminas están compuestas por dos capas tetraédricas intercaladas por una octaédrica. En este grupo se encuentran los minerales arcillosos vermiculita, pirofilita, mica y esmectita, entre otros. Finalmente, los de tipo 2:1:1, como por ejemplo la clorita, poseen una capa octaédrica adyacente a otra capa octaédrica dispuesta entre dos tetraédricas.<sup>32</sup>

Los filosilicatos 2:1 engloban al grupo más grande de arcillas. Éstas, además, se dividen en dos grupos de acuerdo a su capacidad de hinchamiento: expansibles y no expansibles. El término esmectita es utilizado para representar una familia del primer grupo anteriormente expuesto. Muchas nanoarcillas conocidas, tanto naturales como sintéticas, pertenecen a la familia de las esmectitas son: hectorita, nontronita, montmorillonita, saponita y laponita. Estos minerales arcillosos son ampliamente utilizados debido a su gran versatilidad y múltiples aplicaciones. Principalmente, se destaca la montmorillonita (MMT) por su amplia abundancia, ser ambientalmente amigables, su gran relación de aspecto (relación longitud/espesor de sus láminas) y su gran área superficial. Estos últimos dos atributos son los responsables de su gran utilización como refuerzo. En la **Figura 3** se puede ver la estructura típica de la MMT.<sup>32,33</sup>

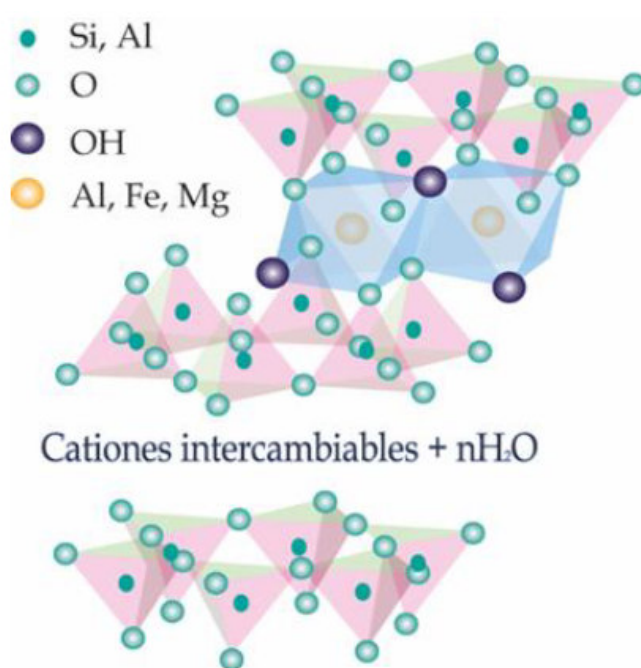


FIGURA 3. ESTRUCTURA DE LA MONTMORILLONITA.

La MMT tiene un espaciado interlamina de aproximadamente un nanómetro y sus láminas una longitud de 200-600 nm. Estas láminas están compuestas por dos capas tetraédricas y una octaédrica. Estas hojas están conectadas entre ellas de tal forma de que el tetraedro de óxido de silicio (SiO<sub>4</sub>) comparte tres de sus cuatro átomos de oxígeno con las capas octaédricas centrales. La superficie de sus láminas posee una carga negativa debido a las sustituciones isomórficas. Las mismas ocurren naturalmente y hacen referencia al reemplazo de un elemento por otro similar sin alterar la estructura química del mineral. En el caso particular de la MMT, algunos cationes Si<sup>+4</sup> de la capa tetraédrica son reemplazados por cationes Al<sup>+3</sup> y algunos cationes Al<sup>+3</sup> de la capa octaédrica son reemplazados por cationes Fe<sup>+2</sup> o Mg<sup>+2</sup>; y los Mg<sup>+2</sup> por Li<sup>+1</sup>. Esta carga negativa

superficial es contrarrestada por cationes inorgánicos hidratados como  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{Mg}^{+2}$  que se encuentran en los espacios interlaminares. Estos cationes pueden ser fácilmente reemplazados por otros cationes, tanto orgánicos como inorgánicos, o moléculas, según la química superficial requerida. Por lo tanto, a estos cationes se los conoce como “cationes intercambiables”. La capacidad que tiene la arcilla de retener estos cationes en los espacios interlaminares se conoce como “Capacidad de Intercambio Catiónico” (CEC, por sus siglas en inglés) y representa la cantidad de cationes que son retenidos por las láminas cargadas negativamente y que pueden ser potencialmente intercambiados por otros cationes. Se lo expresa como miliequivalentes de carga positiva por cada 100 g de arcilla (meq/100g).<sup>32,33</sup> Cabe recalcar que no es una medida de la naturaleza de los iones intercambiables, sino que es únicamente una medida de su cantidad. Por lo tanto, no necesariamente es una medida del grado de sustitución isomórfica. Si todos los cationes adsorbidos son intercambiables, sí lo es ya que los cationes intercambiables compensan la carga negativa debido a la sustitución isomórfica. Puede haber una gran sustitución isomórfica, debido a una gran adsorción de iones pero si estos no son intercambiables se tiene un bajo valor de CEC.

Las posibilidades que ofrece la modificación de este tipo de nanoarcillas por el simple reemplazo de sus cationes interlaminares son muchas y muy variadas. Su modificación permite entre otras cosas variar la polaridad del mineral, su espaciado interlaminar, acidez, porosidad y su desempeño en muchas y variadas aplicaciones. Además, como se mencionó anteriormente, son económicas, presentan alta disponibilidad y son amigables con el medio ambiente<sup>32</sup>. Es por ello que han sido empleadas en múltiples aplicaciones, desde materiales industriales hasta en productos de consumo relacionados con la salud<sup>33</sup>, destacándose principalmente su uso como relleno en nanocompuestos de matriz polimérica<sup>34</sup>.

La Bentonita (Bent) es una importante fuente de MMT en la naturaleza. Es una roca formada a partir de arcillas plásticas compuestas principalmente por MMT. Además de MMT, la Bent suele contener cuarzo, cristobalita y feldespatos. En general, los minerales arcillosos basados en Bent exhiben propiedades como una alta capacidad de absorción de agua y una alta capacidad de intercambio catiónico. Estas propiedades varían dependiendo la naturaleza del agua intersticial y de los cationes intercambiables presentes en las galerías<sup>32</sup>.

Las Bent se han aplicado para desarrollar diversos sistemas de administración de fármacos para superar las desventajas de muchas drogas, que incluyen baja solubilidad, baja biodisponibilidad y corta vida media biológica, es decir, propiedades farmacocinéticas<sup>35-37</sup>. Una aplicación poco extendida de la Bent es su uso como rectificador en suelos arenosos. Este tipo de suelos tiene bajo contenido de arcilla, y por lo tanto, bajo CEC<sup>38</sup>. Los suelos con estas características no tienen la capacidad de retener y suministrar los nutrientes necesarios para las plantas, lo que en consecuencia produce bajos rendimientos. Las prácticas agrícolas actuales contemplan para estos casos la adición de grandes cantidades de fertilizantes, pero dado que el suelo tiene bajo CEC, estos se pierden rápidamente por lixiviación, dejando en evidencia la escasa sostenibilidad económica y ambiental del sistema agrícola actual<sup>39</sup>.

Para la inmovilización de principios activos, que el soporte sea biocompatible e inerte representa un requerimiento importante para que no interfiera con la estructura nativa de los mismos, y, por lo tanto, no interfiera en su actividad biológica. Notablemente, todas estas características convergen en la Bent. Adicionalmente, se ha reportado que las nanoarcillas protegen a los agroquímicos de la degradación por luz UV<sup>40</sup>. En ese sentido, El-Nahhal y col.(1999)<sup>41</sup> demostraron que la incorporación de MMT a formulaciones de los

herbicidas fotosensibles al calor incrementaba varias veces el tiempo de vida media con respecto a las formulaciones comerciales, debido principalmente a la fotoprotección provista por la arcilla. Resultados similares fueron reportados por Giroto y col.(2015)<sup>42</sup> en el que la presencia de MMT en formulaciones de almidón/ametrina impartió un efecto fotoprotector, absorbiendo la radiación UV-C, evitando así la fotodegradación del herbicida.

Dada la necesidad de crear productos sustentables, innovadores y biocompatibles con el mercado agrícola para reemplazar el uso de agroquímicos que impactan negativamente en el medio ambiente, en este proyecto final se plantea el desarrollo de agroinsumos, protectores y promotores del crecimiento de las plantas (PPC), basados en el uso de Bent como recurso natural y de origen nacional para vehicular principios activos. En este sentido, se propone el escalado para la producción en planta piloto de nanoformulaciones basadas en Bent con Q o AS para desarrollar agroinsumos ecológicamente amigables e ino cuos para la salud humana que cumplan, además, con exigencias de alta eficacia biológica, mejor eficiencia operativa y, relativamente, bajo costo.

Este proyecto fue desarrollado en el marco de una estrecha colaboración entre dos grupos de investigación, el área de Materiales Compuestos Termoplásticos (CoMP) de INTEMA y el grupo de Fisiología del Estrés de Plantas del IIB (ambos dependientes de UNMDP y CONICET), debido al trabajo interdisciplinario que requiere. Hasta el momento, se han desarrollado en escala laboratorio Bent funcionalizadas con diferentes tipos de compuestos: hormonas vegetales (patente WO/2017/060869 A1, Mansilla y col., 2020<sup>43</sup>), proteínas de origen vegetal (Mansilla y col., 2018<sup>44</sup>), aminoácidos libres (Registro patente INPI N°20190101523, Merino y col., 2021<sup>45</sup>) y Q (Registro patente INPI N°20170103008, Merino y col., 2018<sup>46</sup>). En resumen, las experiencias obtenidas a escala de laboratorio arrojan resultados altamente promisorios para avanzar en la aplicación de estos nuevos nanomateriales de precisa funcionalidad biológica y alta estabilidad química para su aplicación en cultivos de tomate. Los ensayos en campo e invernáculo son esenciales para la validación de la nanotecnología desarrollada y para ello el escalado a nivel de planta piloto es fundamental. Por lo tanto, en este proyecto final se pretende realizar la optimización de la preparación de dos PPC de línea verde, denominados Bent-Q y Bent-AS, para sentar las bases científico-tecnológicas para el escalado de los nuevos nanoprod uctos a nivel industrial. La aplicación de estas arcillas es complementaria al uso de fertilizantes, buscando reducir las dosis aplicadas de los mismos. La arcilla se rocía sobre los cultivos mediante la utilización de pulverizadores manuales de aire comprimido, aunque también se puede llevar a cabo utilizando avionetas o tractores adaptados para tal fin. De esta manera, la arcilla se utiliza en forma de suspensión acuosa para facilitar su correcta dispersión y pulverización, siendo posible también la adición de adyuvantes y/o emulsionantes, como por ejemplo el producto marca Silwet, para favorecer que las partículas se mantengan en suspensión y las gotas rociadas tengan una mejor adherencia a las hojas .

Cabe destacar que, en Argentina, actualmente no se identifica ningún registro de producto formulado con los principios bioactivos que se proponen en este proyecto. Aún no existe una oferta desarrollada de productos naturales, que sean inductores de la respuesta de defensa innata de las plantas y promotores del crecimiento. Existen otros productos que cumplen con la función de optimizar el crecimiento de las plantas, pero son más costosos y son más nocivos con el medio ambiente.



## Objetivos

### Objetivo general

El objetivo general del presente proyecto es optimizar el escalado para la producción en planta piloto de agroinsumos innovadores, ecológicamente amigables e inocuos para la salud humana basados en una arcilla de tipo Bent de origen nacional como nanovehículo de Q y AS como principios bioactivos que impactan en el mejoramiento del crecimiento y rendimiento de las plantas.

### Objetivos Específicos

- Adaptar la obtención de Bent funcionalizadas con principios bioactivos a escala piloto en base a desarrollos previos en el laboratorio con AS y Q.
- Realizar una caracterización fisicoquímica de las Bent funcionalizadas.
- Evaluar el efecto biológico de las nanoarcillas funcionalizadas en plantas de tomate.
- Seleccionar las condiciones de obtención óptimas a escala piloto para cada sistema (tiempo, temperatura de reacción, cantidad de insumos, etc.) en función del desempeño biológico.

## Hipótesis de trabajo

La siguiente hipótesis de trabajo se construyó en base a los antecedentes previos y mediante un análisis de la bibliografía existente sobre el tema.

**Hipótesis general:** La aplicación de Bent, que se utilizan para la funcionalización de nano-vehículos de bioactivos a escala planta piloto tienen efectos superadores sobre el crecimiento y rendimiento de las plantas, respecto a los mismos bioactivos aplicados libres o en solución.

### **Hipótesis específicas:**

- √ Las Bent son soportes naturales y constituyen nano-vehículos adecuados para la liberación sostenida de compuestos bioactivos. Debido a su estructura en láminas, las arcillas son capaces de acomodar una gran variedad de moléculas en sus espacios interlaminares incluyendo, proteínas, hormonas o biopolímeros.
- √ Es posible modificar nanoarcillas con Q y AS para obtener materiales con propiedades inductoras de los mecanismos de defensa de plantas de tomate y protectoras frente a estrés salino.
- √ La vehiculización de Q y AS en Bent permite mantener la estabilidad y facilitar la disponibilidad de los mismos en los sistemas blanco donde se los aplique. Esto mejora la funcionalidad biológica del bioactivo respecto al mismo compuesto libre o sin estabilizar.
- √ Es posible optimizar los parámetros de obtención de los nanoformulados Bent-Q y Bent-AS en planta piloto tomando como base los procedimientos desarrollados en el laboratorio.
- √ Los nuevos nanoformulados desarrollados se diferencian de otros agroinsumos convencionales por su mayor biocompatibilidad, estabilidad y efectividad de la respuesta, y permiten reducir las dosis de aplicación y mantener la acción biológica a lo largo del tiempo en plantas de tomate.
- √ Los materiales a desarrollarse confieren valor agregado a recursos naturales y son amigables tanto con el medio ambiente como para la salud humana.

## CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### Materia prima

La Bent utilizada en este trabajo proviene de Neuquén, Argentina, y fue proporcionada por Minarmco S.A. No se le realizó ningún tratamiento previo a su modificación con Q y AS. Su CEC, determinada por el método de intercambio con azul de metileno, fue 105 meq/100 g de arcilla<sup>47</sup>. Este dato nos indica la cantidad de sitios catiónicos con los que cuenta la arcilla y que pueden ser reemplazados por modificador. A partir de los patrones de Difracción de Rayos X (DRX) de la Bent (que se muestran en la **Figura A1**), se identificaron las fases cristalinas que componen la arcilla empleando el software QualX, siendo la MMT la fase principal, con el cuarzo y la labradorita como fases secundarias<sup>48</sup>. La composición química principal se obtuvo en estudios realizados previamente<sup>48</sup> por Fluorescencia de Rayos X (FRX) y los resultados se muestran en la **Tabla 1**. Dicha Bent tiene una relación SiO<sub>2</sub>/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> de 3.99 lo que está en el rango típico de las bentonitas y permite esperar una buena estabilidad tanto térmica como frente a los ácidos<sup>49</sup> (aspecto importante en las funcionalizaciones con AS). Además, posee un alto contenido de hierro, que se puede atribuir a la ubicación del depósito del que se extrajo. En la **Figura 4** se muestra una fotografía de la arcilla utilizada.

TABLA 1. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA BENT EXPRESADA COMO ÓXIDOS\*\*.

Muestra	Composición (% (p/p))							
	SiO <sub>2</sub>	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	MgO	CaO	K <sub>2</sub> O	TiO <sub>2</sub>	Otros*
Bent	52.3	13.1	22.1	1.9	4.7	1.3	2	2.4

\*Otros = % SO<sub>3</sub> + % Cl

\*\* El equipo de FRX donde se analizó la arcilla permite detectar elementos a partir del Mg, por lo que no fue posible determinar la cantidad de Na<sub>2</sub>O.



FIGURA 4. BENTONITA UTILIZADA PARA LOS ENSAYOS.

El Q, marca Parafarm, utilizado para la preparación de las nanoarcillas, se obtuvo comercialmente de la Droguería Saporiti (Buenos Aires, Argentina). Su grado de desacetilación obtenido por resonancia magnética nuclear de <sup>1</sup>H de acuerdo con el método de Lavertu y col. (2003)<sup>50</sup> fue mayor al 90% y su masa molar, determinada por viscosimetría capilar de acuerdo con el método seguido por De la Paz y col. (2013)<sup>51</sup>, fue de

531 KDa. Además, se utilizaron ácido acético (HAc) y AS adquiridos en Biopack (Buenos Aires, Argentina) y Química Kubo (Mar del Plata, Argentina), respectivamente.

### Equipamiento utilizado para la preparación de nanoarcillas

- √ **Placa calefactora con agitación magnética (Figura 5a):** Marca Dlab, modelo MS7 H550-S con sonda de temperatura PT100 con control de agitación y temperatura. Rango de velocidad: 0-1500 rpm. Máxima temperatura de calentamiento: 550 °C. Este equipo fue utilizado para calefaccionar durante la preparación de las soluciones de Q y AS previo a verterlas en el reactor.
- √ **Agitador mecánico a hélice (Figura 5b):** Para la preparación de las soluciones de Q y AS, se empleó un agitador marca DLAB modelo OS20-S, con control de velocidad de agitación en el rango de 50-2200 rpm.
- √ **Reactor (Figura 5c).** Se utilizó un reactor multipropósito de vidrio borosilicato marca Figmay con control de temperatura y agitación. Capacidad: 10 L. Sistema de calefacción mediante velas calefactoras de cuarzo y sonda de temperatura PT100. Sistema de agitación mecánica con eje agitador 4 de paletas (hélices) a 45°. Rango de velocidad: 0-300 rpm. Máxima temperatura de calentamiento: 150 °C. El reactor fue utilizado para obtener las nanoarcillas modificadas mediante agitación constante (previamente configurada) y programando la temperatura a la que se deseaba que ocurra la reacción.
- √ **Ultracentrífuga (Figura 5d).** Se dispuso de una Ultracentrífuga marca Heal Force modelo Neofuge 15. Capacidad máxima: 300 ml, rango de velocidad: 0-16000 rpm. Se utilizó con el propósito de separar la arcilla del sobrenadante una vez modificada y posteriormente lavarla sucesivas veces con agua destilada.
- √ **Centrífuga (Figura 5e).** Se empleó una Centrífuga marca Giumelli Z-29 con rango de velocidad de hasta 3500 rpm, adaptada con un rotor para centrifugar hasta 4 frascos de 200 ml. Fue utilizada como reemplazo de la ultracentrífuga para poder centrifugar una mayor cantidad del producto obtenido en el reactor.
- √ **Liofilizador (Figura 5f).** Se usó un liofilizador con cámara de secado de acrílico marca Columbia International. En el interior de la cámara contiene un armazón de acero inoxidable que permite colocar como máximo 4 bandejas de 300 mm de diámetro y 20 mm de altura para contener producto a secar. Sistema de vacío mediante una bomba de doble etapa de 140 Lts./min. de caudal y un vacío final del orden de 20 micrones Hg. Temperatura de condensación hasta -50°C. La liofilización es un proceso de deshidratación que consiste en congelar rápidamente un material y luego eliminar el agua presente en él en estado sólido mediante sublimación, es decir, pasando directamente del estado sólido al estado gaseoso, sin pasar por el estado líquido. Este proceso se lleva a cabo bajo vacío, lo que permite que el agua sublimada se elimine eficientemente, dejando el material deshidratado y preservando sus propiedades físicas y químicas. Este proceso de secado permite conservar las propiedades de los principios bioactivos en las nanoarcillas modificadas y facilita el proceso posterior de molienda y tamización, comparado con otros procesos típicos de secado como por ejemplo en estufa a 110 °C.

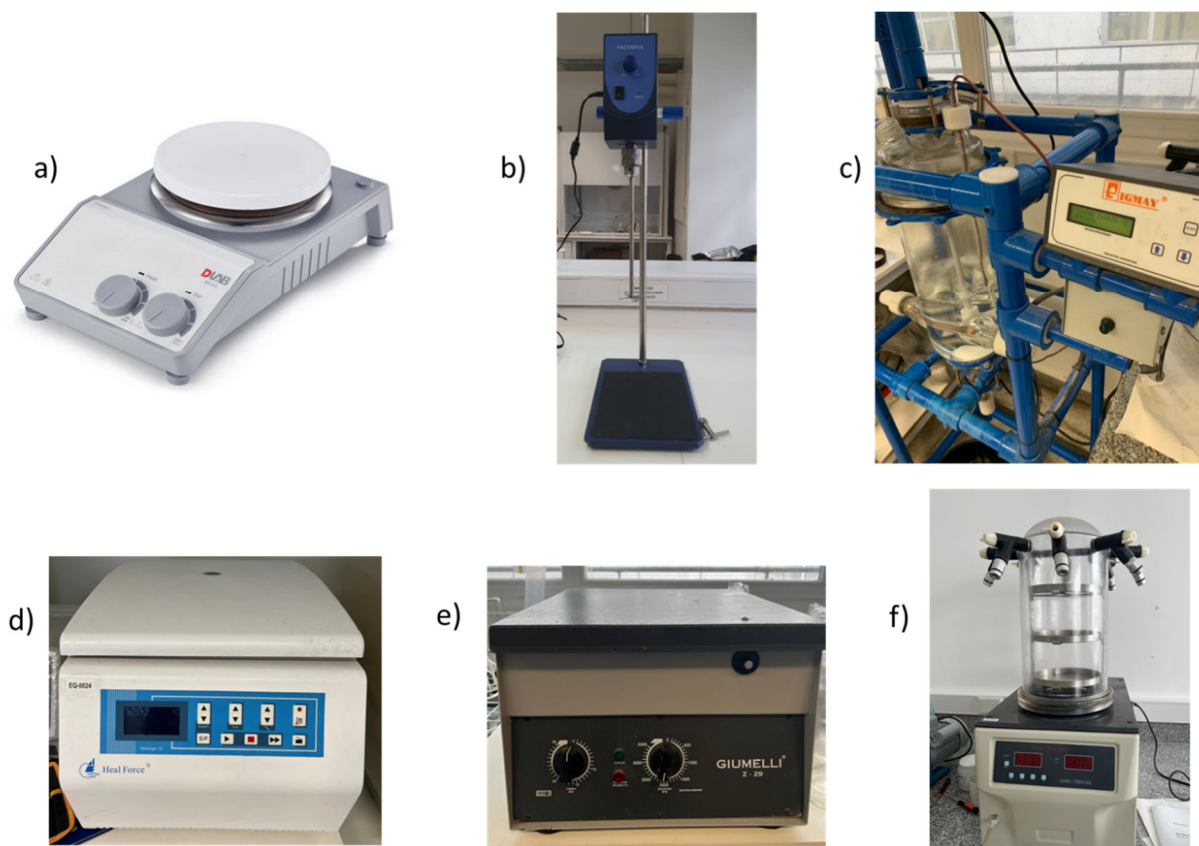


FIGURA 5. EQUIPAMIENTO EMPLEADO PARA LA PREPARACIÓN DE LAS NANOARCILLAS EN ESCALA DE PLANTA PILOTO: A) PLACA CALEFACTORA CON AGITACIÓN MAGNÉTICA; B) AGITADOR MECÁNICO A HÉLICE; C) REACTOR DE 10L FIGMAY CON PANEL PARA AJUSTAR REVOLUCIONES Y TEMPERATURA; D) ULTRACENTRÍFUGA HEAL FORCE MODELO NEOFUGE 15; E) CENTRÍFUGA GIUMELLI Z-29; F) LIOFILIZADOR MARCA COLUMBIA INTERNATIONAL.

### Preparación de las nanoarcillas funcionalizadas

A la Bent natural se le realizaron una serie de modificaciones químicas con Q<sup>46</sup> y AS<sup>43</sup>. En base a los resultados previos<sup>46</sup>, se seleccionaron aquellas Bent funcionalizadas con propiedades prometedoras desde el punto de vista biológico. Se realizó el escalado a planta piloto de su preparación adaptando la metodología esquematizada en la **Figura 6**, correspondiente a los tratamientos desarrollados en pequeña escala.

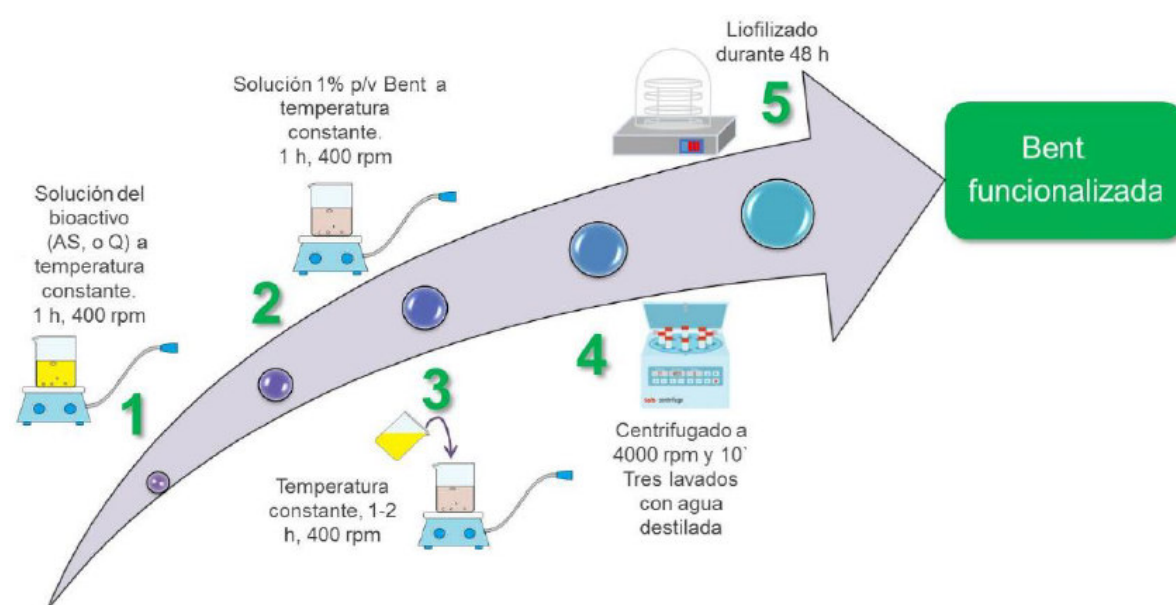


FIGURA 6. RESUMEN ESQUEMÁTICO DEL PROCEDIMIENTO EMPLEADO PARA LA PREPARACIÓN DE BENT FUNCIONALIZADAS A ESCALA DE LABORATORIO.

En términos generales, se partió de una suspensión de Bent en agua destilada y se incorporó la solución con el bioactivo. El sistema se mantuvo con agitación y temperatura constante durante un tiempo determinado. Estos parámetros se ajustaron para cada tipo de funcionalización teniendo en cuenta como antecedente que al pasar de agitación magnética en un vaso de precipitados a la agitación mecánica del reactor, el mezclado es más eficiente y se reducen considerablemente los tiempos de reacción<sup>47</sup>. Luego se procedió a separar la Bent tratada mediante centrifugación o filtrado al vacío, se realizaron sucesivos lavados con agua destilada y finalmente se evaluaron alternativas de secado aplicables a escala industrial.

## Técnicas de caracterización fisicoquímica de nanoarcillas

Las arcillas fueron caracterizadas mediante distintas técnicas fisicoquímicas y térmicas, las cuales se describen a continuación.

### Caracterización química y estructural

**Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR).** Las especies presentes en los componentes de los materiales poseen modos normales de vibración de sus enlaces, generando un espectro característico al interactuar con la radiación IR. Por lo tanto, los grupos funcionales pueden asociarse con bandas de absorción características en el espectro obtenido. En este trabajo, esta técnica se utilizó para caracterizar las nanoarcillas y corroborar que el Q y el AS estén presentes en las mismas. Las medidas se realizaron en un equipo Nicolet 6700 Thermo Scientific (**Figura 7a**), adquiriendo 32 barridos entre 4000 y 400  $\text{cm}^{-1}$  en la modalidad transmisión. Las muestras analizadas se prepararon mezclando las arcillas con KBr (Biopack) y homogeneizando en un mortero. La mezcla finamente triturada se introdujo en un molde y se comprimió por aplicación de presión hasta obtener una pastilla transparente. En todos los espectros graficados se puede evidenciar un corte entre 2250 y 2500  $\text{cm}^{-1}$  que se debe a los picos relacionados con el  $\text{CO}_2$  en el entorno.

**Difracción de rayos X (DRX).** Esta técnica permite la caracterización de materiales cristalinos, como son las arcillas. Los difractogramas de las arcillas en polvo se obtuvieron en un difractómetro X-Pert Pro (**Figura 7b**), funcionando a 40 kV y 30 mA, con radiación  $\text{CuK}\alpha$  ( $\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$ ), a una velocidad de exploración de 1  $^\circ/\text{min}$  y tamaño de paso de 0.02  $^\circ$ . Las nanoarcillas fueron previamente trituradas en un mortero de ágata y comprimidas sobre un soporte de vidrio.

El objetivo de esta técnica de caracterización fue examinar si había cambios en la estructura cristalina en general y concretamente en los espaciados interlaminares de la Bent para verificar que hubiera ocurrido satisfactoriamente el intercambio o modificación con el bioactivo. Los espaciados interlaminares (valores  $d_{001}$ ) se calcularon a partir de los valores  $2\theta$  usando la ecuación de Bragg<sup>52</sup> (**Ecuación 1**).

$$n = 2d_{hkl} \sin\theta$$

ECUACIÓN 1. ECUACIÓN DE BRAGG.

Donde  $n$  es un número entero,  $d_{hkl}$  es el espaciado de la red cristalina,  $\lambda$  la longitud de onda y  $\theta$  el ángulo incidente.

En las MMT, el pico 001 está asociado al espaciado basal, es decir, la distancia existente entre dos láminas T-O-T que es igual a la suma del espesor de una lámina T-O-T más el espacio interlaminar, brindando

información respecto a la modificación del espaciado interlaminar. Un corrimiento hacia ángulos más bajos del pico 001 indicará un aumento de este espaciado ( $d_{001}$ ) y se lo puede asociar al grado de expansión o hinchamiento provocado por modificaciones en el espacio de las galerías de las láminas de la arcilla.

**Ensayos de absorción de humedad.** Este ensayo brinda información relacionada con los cambios en la hidrofiliidad de las Bent como consecuencia de su modificación con los bioactivos. Las arcillas, previamente secadas en estufa a 110°C, se colocaron en una cuba cerrada herméticamente con un 90% de humedad relativa (HR) a 21°C. Este valor de HR se preparó a partir de una solución al 34% de glicerina en agua destilada<sup>53</sup>. Luego de 24 hs, las muestras se pesaron cuidadosamente en una balanza analítica. El grado de absorción de humedad (AbsH) se calculó por medio de la siguiente ecuación (**Ecuación 2**):

$$AbsH_{24}(\%) = \frac{M_{24} - M_0}{M_0} \cdot 100$$

ECUACIÓN 2. ECUACIÓN DE ABSORCIÓN DE HUMEDAD.

Donde  $M_{24}$  es la masa de la muestra hidratada a un tiempo de 24 hs y  $M_0$  es la masa inicial de la muestra seca. Cada muestra se ensayó por duplicado.

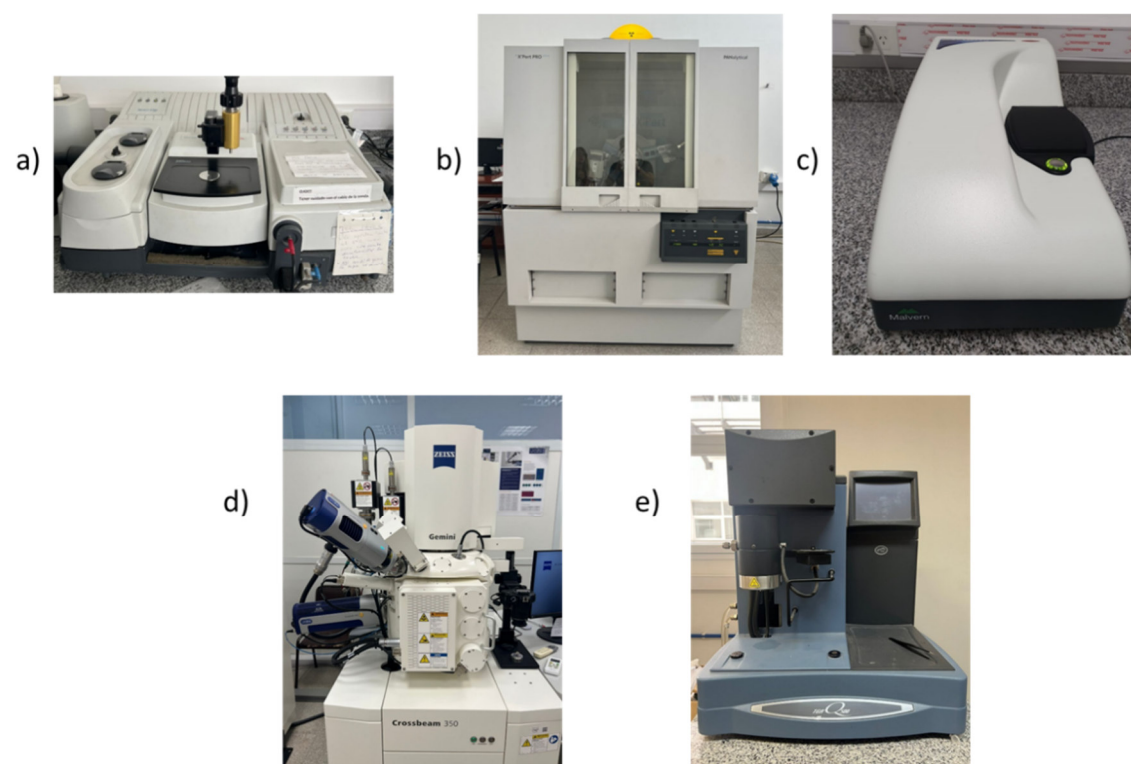
**Determinación del tamaño de partícula en suspensión.** Considerando que la aplicación de las nanoarcillas funcionalizadas con AS y Q será mediante sprays foliares de suspensiones acuosas de las mismas, se realizaron ensayos para determinar las distribuciones de tamaños de partícula de las muestras utilizando un equipo Dinamic Light Scattering, marca Malvern serie Zetasizer Nano S90 modelo ZEN1690 (**Figura 7c**). Para el análisis se preparó una suspensión de cada nanoarcilla en una concentración de 1 mg/ml en agua desionizada. Para favorecer la dispersión, cada suspensión se trató durante 1 minuto en el homogeneizador ultrasónico (marca Sonics Materials modelo VCX750) con un 20 % de amplitud utilizando la micropunta. Las suspensiones se colocaron en una cubeta de polimetilmetacrilato (PMMA) de 10x10mm y se realizaron 3 corridas sucesivas (a 25 °C, con un ángulo de medición de 90°) de la misma muestra, cada una de ellas constituida por el promedio de 10 mediciones de 10 segundos. Debido a que este método fue desarrollado con el modelo matemático más sencillo, es decir, suponiendo que las partículas en suspensión son esféricas, para las nanoarcillas se mide un diámetro aparente de partículas.

**Microscopía Electrónica de Barrido de Emisión de Campo (FESEM por sus siglas en inglés):** Las nanoarcillas se analizaron por FESEM con el fin de estudiar su morfología superficial. Las imágenes se obtuvieron en un microscopio marca ZEISS modelo Crossbeam 350 con una tensión de aceleración de 5 kV (**Figura 7d**). El equipo está equipado con un detector de electrones de rayos X (EDX), que permite obtener la composición elemental de las muestras a partir de las imágenes registradas con una tensión de aceleración de 15 kV. Sobre un vidrio portaobjetos, se depositó una gota de una suspensión diluida de la nanoarcilla en agua desionizada (1 mg/ml) y se dejó evaporar al aire. Una vez secas, las muestras fueron recubiertas con cromo para asegurar la conducción eléctrica.

#### Caracterización térmica

**Análisis Termogravimétrico (TGA por sus siglas en inglés).** Esta técnica de caracterización permite estudiar la pérdida de masa de una muestra en función de la temperatura. Así, es posible determinar las pérdidas

de masa dadas por procesos como secados, descomposiciones, oxidaciones, etc. En este trabajo, los ensayos de caracterización por TGA se utilizaron para cuantificar la cantidad de agua adsorbida, y de Q o AS que se lograron incorporar efectivamente en la arcilla luego de cada uno de los tratamientos. Se utilizó un analizador térmico Modelo Q500 HI-Res (TA Instruments), como el de la **Figura 7e**, a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min y desde temperatura ambiente hasta 900 °C en flujo de nitrógeno. La masa de todas las muestras estuvo en el rango de 20-30 mg. Las temperaturas de los eventos de degradación (Tdeg) se obtuvieron a partir del máximo de cada evento en las curvas derivadas de TGA (DTGA). Por otro lado, a partir de la pérdida de masa observada en la región donde se descomponen las moléculas orgánicas (150-500 °C), se calculó el contenido orgánico en las Bent funcionalizadas con Q y AS<sup>48</sup>.



**FIGURA 7. EQUIPAMIENTO UTILIZADO PARA CARACTERIZAR LOS MATERIALES: A) FTIR NICOLET 6700 THERMO SCIENTIFIC; B) DIFRACTÓMETRO X-PERT PRO; C) EQUIPO MALVERN SERIE ZETASIZER NANO S90 MODELO ZEN1690; D) MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO MARCA ZEISS MODELO CROSSBEAM 350; E) ANALIZADOR TÉRMICO MODELO Q500 HI-RES (TA INSTRUMENTS).**

### CAPÍTULO 3. PRODUCCIÓN DE BENT-Q EN PLANTA PILOTO Y CARACTERIZACIONES FÍSICAS, QUÍMICAS Y MORFOLÓGICAS

#### Introducción

El Q es un polímero natural, no tóxico, biocompatible y biodegradable. Se trata de un polisacárido catiónico lineal que se compone de unidades de N-acetil-D-glucosamina y  $\beta$ -1,4-D-glucosamina, como se muestra en la **Figura 8**. El Q se obtiene a partir de la desacetilación parcial de la quitina en un medio alcalino<sup>14,15</sup>.

La quitina es un componente que se encuentra en el exoesqueleto de algunos crustáceos marinos, como cangrejos y camarones, así como en la pared celular de ciertos hongos. El proceso de desacetilación

produce quitosanos que tienen cierta heterogeneidad, ya que son una serie de copolímeros que pueden tener diferentes grados de desacetilación y peso molecular. Estas diferencias afectan a las propiedades físico-químicas y biológicas del Q, por lo que es necesario llevar a cabo una caracterización previa en cada caso<sup>15</sup>.

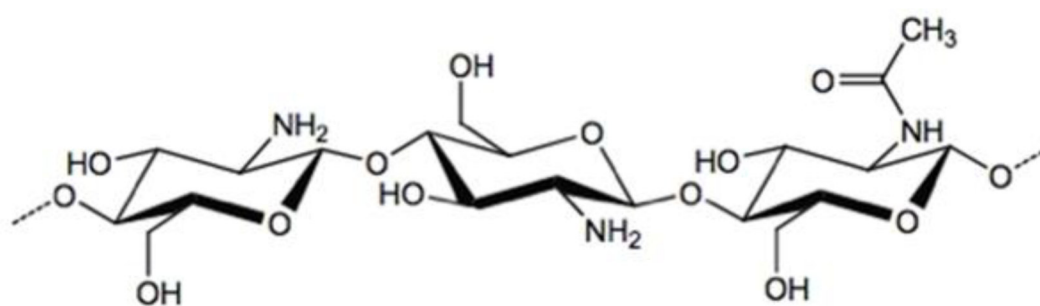


FIGURA 8. ESTRUCTURA QUÍMICA DEL QUITOSANO.

El Q es un polímero excepcional debido a sus propiedades y su potencial. Tiene un amplio espectro de aplicaciones en diversas industrias, como la cosmetología, alimentos, farmacología y medicina<sup>14</sup>. Desde la síntesis y caracterización de grandes cantidades de Q realizadas en los años 80, se ha avanzado mucho en su aplicación en la agricultura, y desde entonces se han descubierto numerosas propiedades y aplicaciones. Los resultados muestran que el Q tiene la capacidad de mejorar la tolerancia de las plantas a una variedad de patógenos, protegiendo los cultivos de muchas enfermedades antes y después de la cosecha<sup>14,54</sup>.

Se ha comprobado que el Q tiene la capacidad de inducir la muerte celular en una amplia variedad de hongos patógenos, así como de inhibir el crecimiento de bacterias patógenas y la replicación de virus y viroides<sup>15</sup>. No obstante, aún no se comprende con precisión cómo actúa el Q. Se han propuesto al menos tres mecanismos que no se excluyen mutuamente. Se cree que el Q podría interactuar con los patógenos a través de la interacción electrostática entre las cargas positivas del Q y las negativas en la superficie de los microorganismos, lo que provocaría una alteración en su superficie y un aumento en la permeabilidad de la membrana. Por otro lado, se sugiere que el Q podría ser adsorbido sobre la célula patógena, impidiendo la entrada de nutrientes y generando cambios en la excreción de metabolitos. Por último, otro posible mecanismo consiste en que el Q actúe quelando iones metálicos traza, los cuales son necesarios para el crecimiento de estos microorganismos<sup>15</sup>.

Como ya se mencionó, el Q tiene la capacidad de estimular las respuestas defensivas de las plantas ante factores bióticos y abióticos, además de regular su crecimiento y desarrollo<sup>14</sup>. Cuando una planta es infectada por un agente patógeno, su sistema de defensa innato se activa mediante el reconocimiento del patógeno, lo que produce una muerte celular rápida en el sitio de la infección (respuesta hipersensible). Posteriormente, en los órganos no infectados, se desencadenan reacciones que protegen a la planta de una posible infección sistemática. Como parte de esta respuesta, la planta activa genes relacionados con la defensa, como antioxidantes y proteínas relacionadas con la patogénesis, como quitinasas y glucanasas<sup>55</sup>. También se activa la expresión de genes relacionados con la producción de moléculas activas, como fitoalexinas y antocianinas<sup>56</sup>. Los inductores o "elicitores" son agentes químicos que pueden activar estos mecanismos de defensa en las plantas, ya sea aplicándolos exógenamente o sintetizándolos por parte del microorganismo o la misma planta<sup>15</sup>. Por lo tanto, el uso de inductores se está convirtiendo en una alternativa más sostenible para controlar la acción de los



microorganismos patógenos, en lugar de recurrir a plaguicidas tóxicos y convencionales, o al menos para reducir su uso<sup>15</sup>.

Los microorganismos patógenos, como bacterias, virus y hongos, pueden ocasionar graves enfermedades y pérdidas en la calidad y cantidad de los cultivos, tanto antes como después de la cosecha<sup>16,54</sup>. Aunque la aplicación excesiva de productos agroquímicos ha permitido aumentar la productividad, también ha generado problemas como la contaminación del ambiente, la aparición de plagas resistentes y riesgos para la salud pública. Por lo tanto, la agricultura enfrenta el desafío de satisfacer la demanda global de alimentos sin generar impactos negativos en el suelo y la salud humana.

La aplicación de Q en las plantas ha resultado promisorio para la protección de varios cultivos, sin embargo, presenta algunas desventajas, como su solubilidad en medios ácidos suaves, volatilización, lixiviación y escorrentía. Esto implica que se deba aplicar repetidamente en altas dosis, lo que genera costos económicos desfavorables<sup>57</sup>. Por lo tanto, la inmovilización y protección del Q en arcillas del tipo Bent representa una innovación que ofrece ventajas adicionales en comparación con el Q tradicional. Además, se mantienen bajos niveles de toxicidad y se reducen los costos de producción.

Si bien durante las últimas dos décadas las propiedades de este sistema (Bent-Q) han sido estudiadas en áreas muy variadas, la aplicación en el sector agrícola permanece aún sin explorar. La mayor parte de las publicaciones relacionadas al sistema Bent-Q describen su utilización como adsorbentes eficaces en la remediación de aguas contaminadas, por ejemplo con metales pesados<sup>58-64</sup>, como sensores electroquímicos<sup>65,66</sup>, rellenos antimicrobianos en la preparación de películas nanocompuestas para la preparación de envases activos para alimentos<sup>60,67,68</sup> y como sistema de liberación de fármacos para aplicaciones médicas<sup>69</sup>. Las escasas publicaciones relacionadas con su utilización agrícola indican su uso como adsorbente de agroquímicos en sistemas acuosos<sup>70-72</sup>. Los tiempos de reacción reportados en bibliografía para la obtención de las nanoarcillas funcionalizadas con Q a escala laboratorio van desde 30 minutos a 48 horas, siendo muy común la formulación realizada por Wang<sup>73</sup> en la que se emplean 6 horas de reacción. Además, en la literatura se ha encontrado que las funcionalizaciones se realizan con temperaturas mayores a 50°C, siendo 60°C la más común<sup>19,46,61,73</sup>.

El nanotransportador Bent-Q obtenido recientemente en escala laboratorio se destacó por su capacidad de vehicular Q entre sus láminas nanométricas y ejercer actividad antibacteriana y antifúngica frente a importantes microorganismos patógenos que afectan a la planta de tomate (*Pseudomonas syringae pv tomato* DC3000 y *Fusarium solani f sp eumartii*, respectivamente). Adicionalmente, esta nanoarcilla presentó actividad como inductor de la respuesta de defensa en plantas de tomate<sup>46</sup> y, en particular, como reguladora del sistema antioxidante de las plantas, mediado por las actividades enzimáticas SOD y catalasa<sup>46</sup>. En resumen, las experiencias obtenidas a escala de laboratorio arrojan resultados altamente promisorios para ahondar en la optimización de su formulación a mayor escala pensando en una futura producción para su comercialización. Los ensayos en campo e invernáculo son esenciales para la validación de la nanotecnología desarrollada y para ello el escalado a nivel de planta piloto es fundamental. Por lo tanto, el objetivo del presente Capítulo fue adaptar y optimizar el método de obtención de Bent modificada con Q (Bent-Q) para su producción en escala de planta piloto, y llevar a cabo sus caracterizaciones física, química y morfológica.

## Procedimiento experimental

Se prepararon distintos lotes de bentonitas modificadas con Q con el objetivo de minimizar el tiempo de reacción, la temperatura a la que se realiza cada tratamiento y la cantidad de insumos requeridos. Los mismos se describen a continuación:

**Lote 1:** En primer lugar, se realizó una réplica de la arcilla Bent-Q escalando el protocolo previamente desarrollado en el laboratorio en la tesis doctoral de Danila Merino<sup>46</sup>. A partir de este trabajo preliminar se seleccionó la arcilla con mejores propiedades biológicas, cuya formulación emplea una relación 0.1 g Q/ g Bent, y para su preparación en escala piloto se respetaron todas las proporciones y temperaturas.

Se dispersaron 60 g de Bent (previamente secada en estufa durante 24 horas a 110 °C y tamizada con un tamiz de malla N° 60) en 6 L de agua destilada a 60 °C con agitación vigorosa durante 15 min en un reactor de 10 L y se obtuvo una suspensión homogénea al 1% p/v. Por otro lado, se preparó 0.6 L de solución al 1% (p/v) de Q en una solución 1% (v/v) de ácido acético (relación 0.1 g Q/ g Bent). Luego de 1 hora de agitación magnética a temperatura ambiente se ajustó el pH de la solución en 5 con NaOH 5 M y a continuación se vertió sobre la dispersión de arcilla. La mezcla se mantuvo con agitación constante (100 rpm) a 60 °C y se extrajeron alícuotas del reactor a 5, 15 y 30 minutos de reacción para su posterior análisis. Cabe desatacar que en el estudio realizado en el laboratorio, el tiempo mínimo de reacción estudiado fue 30 minutos, por lo que en el presente trabajo se propone reducir aún más este tiempo. Para optimizar el proceso de separación y lavado de la arcilla se utilizó filtración por vacío en vez del ultracentrifugado. La arcilla resultante se lavó 3 veces con agua destilada y se liofilizó. El proceso general se esquematiza en la **Figura 9**.

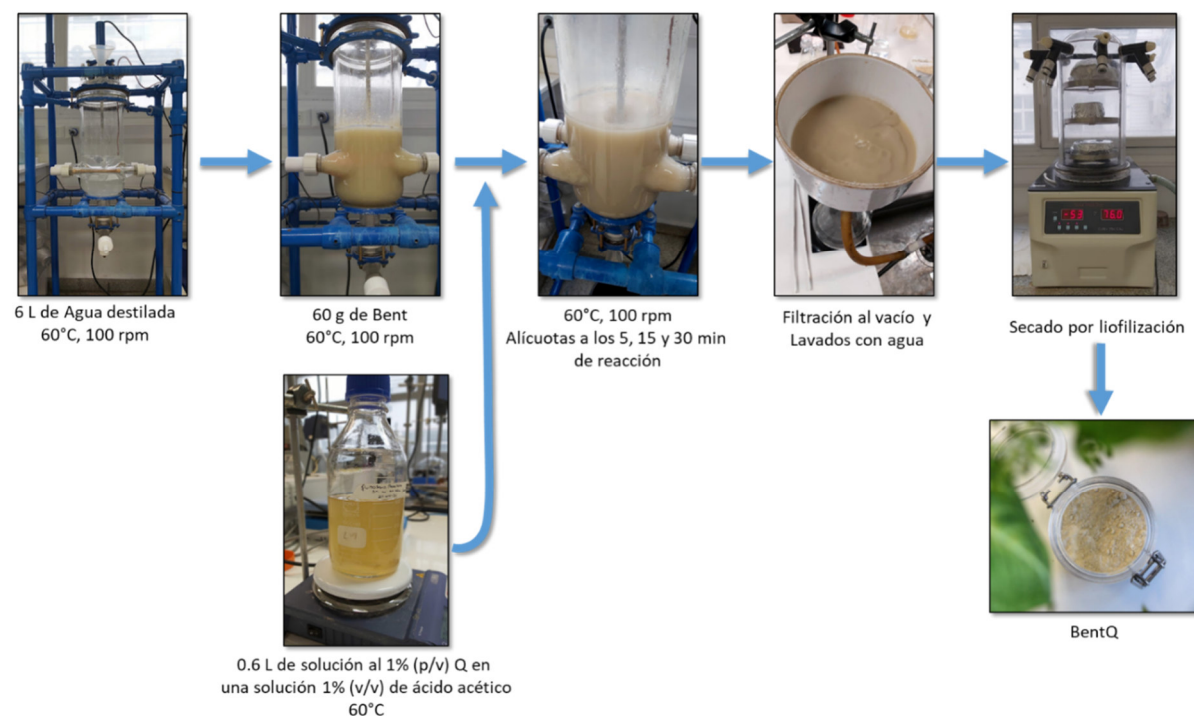


FIGURA 9. ESQUEMA DE LA OBTENCIÓN DEL LOTE 1 DE BENT-Q.

Luego, se procedió a realizar modificaciones del procedimiento inicial, de tal manera de poder optimizar el proceso. Por este motivo, se aumentaron las cantidades de Bent en la suspensión inicial y Q, manteniendo la relación 0.1 g Q/ g Bent y se empleó otro tipo de agitación para disolver el Q en la solución de ácido acético. Como la arcilla modificada del *Lote 1* se pudo separar por filtración al vacío, se continuó con ese método de separación.

**Lote 2:** Se dispersaron 150 g de Bent (previamente secada en estufa durante 24 horas a 110 °C y tamizada con un tamiz de malla N° 60) en 6 L de agua destilada a 60 °C con agitación vigorosa durante 15 minutos en el reactor y se obtuvo una suspensión homogénea al 2,5 % p/v. Por otro lado, se preparó 0.6 L de solución al 2,5% (p/v) de Quitosano (Q) en una solución 1% (v/v) de ácido acético (misma relación 0.1 g Q/ g Bent). En este caso, se empleó agitación mecánica con una paleta con 4 hélices a 45 °C y una velocidad de 700 rpm. Este cambio favoreció el proceso de disolución que demoró 20 minutos y no fue necesario ajustar el pH con NaOH ya que se registró un valor de pH=5 en la solución resultante. A continuación, esta solución se incorporó a la dispersión de arcilla en el reactor. La mezcla se mantuvo con agitación constante (100 rpm) a 60 °C y se extrajeron alícuotas a 5, 15 y 30 minutos de reacción para su posterior análisis. La arcilla modificada se separó por filtración al vacío, se lavó 3 veces con agua destilada y se liofilizó.

**Lote 3:** En este caso, el parámetro que se ajustó fue la temperatura de reacción. Las cantidades fueron las mismas que en el *Lote 2*. La única diferencia es que la modificación en el reactor se realizó a 40 °C.

**Lote 4:** En este caso se incrementaron las cantidades de Bent y Q, sin modificar su relación, y se disminuyó aún más la temperatura de reacción. Se dispersaron 180 g de Bent (previamente secada en estufa durante 24 horas a 110 °C y tamizada) en 6 L de agua destilada a 25 °C con agitación vigorosa durante 15 min en el reactor y se obtuvo una suspensión homogénea al 3 % p/v. Por otro lado, se preparó 0.6 L de solución al 2,5% (p/v) de Q en una solución 1% (v/v) de ácido acético (relación 0.1 g Q/ g Bent). A continuación, esta solución se incorporó a la dispersión de arcilla en el reactor. La mezcla se mantuvo con agitación constante (100 rpm) a 25 °C y se extrajeron alícuotas a 5, 15 y 30 minutos de reacción. La arcilla modificada no se pudo filtrar al vacío, el motivo se explicará en la sección de Resultados y discusión. Se separó por centrifugación a 2500 rpm durante 5 minutos, se lavó 3 veces con agua destilada y se liofilizó.

En la **Tabla 2** se muestra un resumen de las variables empleadas en cada lote.

**TABLA 2. RESUMEN DE LAS VARIABLES EMPLEADAS EN LA PREPARACIÓN DE CADA LOTE DE BENT-Q.**

<i>Lote</i>	<i>Concentración de Bent en la suspensión (% p/v)</i>	<i>Masa Q/ Masa Bent (g/g)</i>	<i>Concentración de Q en la sn inicial (% p/v)</i>	<i>Temperatura de reacción (°C)</i>
1	1	0,1	1	60
2	2,5	0,1	2,5	60
3	2,5	0,1	2,5	40
4	3	0,1	2,5	25

## Resultados y discusión

En cuanto a las modificaciones procedimentales en comparación a la obtención en escala laboratorio, la filtración al vacío se pudo realizar sin inconvenientes en los lotes 1, 2 y 3, lo que permitió reducir notablemente el tiempo requerido para este paso. La Bent-Q del lote 4, obtenida con una mayor cantidad de Bent en la suspensión inicial, se tuvo que separar por centrifugación porque presentó dificultades para ser separado por filtración al vacío dado que el papel filtro se tapaba ralentizando el filtrado. Por lo tanto, un 2,5% p/v de Bent en la suspensión inicial es la cantidad óptima para que no se dificulte la separación por filtración al vacío. Se evaluaron dos opciones de centrifugación utilizando los equipos disponibles en el instituto. En primer lugar, se utilizó la ultracentrífuga con un rotor para 6 tubos de 50 ml, donde las arcillas se centrifugaron inicialmente a 3000 rpm durante 10 minutos. Sin embargo, se observó que la separación del sobrenadante era satisfactoria a menores tiempos, por lo que se redujo el tiempo de centrifugación a 7 minutos. A pesar de que este equipo permite alcanzar altas velocidades de centrifugación, la limitación en el volumen de centrifugado para separar el sobrenadante de cada paso de lavado tiene un impacto significativo en una de las variables clave a optimizar: el tiempo. Es por esta razón que se decidió explorar otra opción.

Posteriormente, se implementó una segunda alternativa utilizando una centrífuga con un rotor para 4 frascos de aproximadamente 200 ml, donde las suspensiones de arcillas se centrifugaron a 2500 rpm durante 5 minutos. Este equipo permitió reducir significativamente el tiempo requerido para separar y lavar la Bent-Q del lote 4. No obstante, es importante destacar que el método de centrifugación, tanto en una ultracentrífuga como en una centrífuga, sigue siendo una técnica laboriosa, ya que es necesario abrir los recipientes que contienen la nanoarcilla y el sobrenadante cada vez que se completa un ciclo de centrifugado, retirar el sobrenadante, lavar con agua destilada y volver a pesar todos los recipientes para asegurar que estén nivelados en peso y completar con el agua destilada necesaria.

A continuación, se muestran las caracterizaciones de las arcillas Bent-Q de los distintos lotes, obtenidas en cada caso con 5, 15, y 30 minutos de reacción. Se empleará la siguiente nomenclatura: Bent-QX-Y min, donde X es el número de lote e Y es el tiempo de reacción en minutos. A partir de los distintos ensayos de caracterización realizados, se analizará la factibilidad de reducir el tiempo y la temperatura de reacción.

Mediante TGA se evaluó la estabilidad térmica de las Bent y Bent-Q, y la cantidad de Q incorporado en las diferentes Bent-Q a partir de la pérdida porcentual de masa registrada en el intervalo de temperatura entre 170 y 350 °C. En la **Figura 10 (a-d)** se muestran las curvas de masa residual y DTGA en función de la temperatura para los distintos lotes de Bent-Q obtenidos con diferentes tiempos de reacción. En la **Tabla 3** se resumen los resultados obtenidos de cada lote.

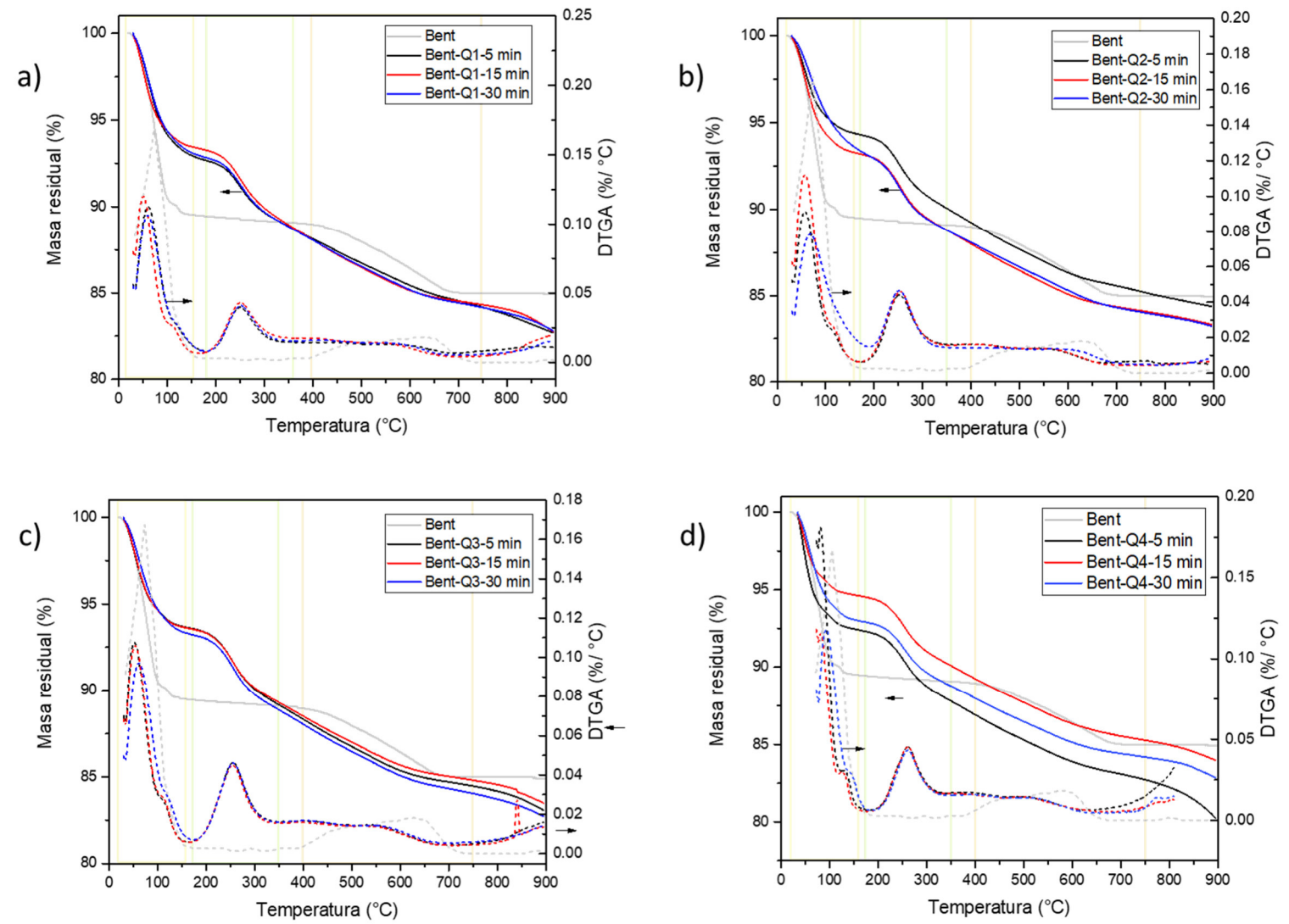


FIGURA 10. CURVAS DE MASA RESIDUAL Y DTGA EN FUNCIÓN DE LA TEMPERATURA PARA LOS LOTES DE BENT-Q OBTENIDOS CON DISTINTOS TIEMPOS DE REACCIÓN: A) LOTE 1; B) LOTE 2; C) LOTE 3; D) LOTE 4. LOS LÍMITES DE CADA RANGO DE TEMPERATURA SE INDICAN CON LÍNEAS VERTICALES PUNTEADAS.

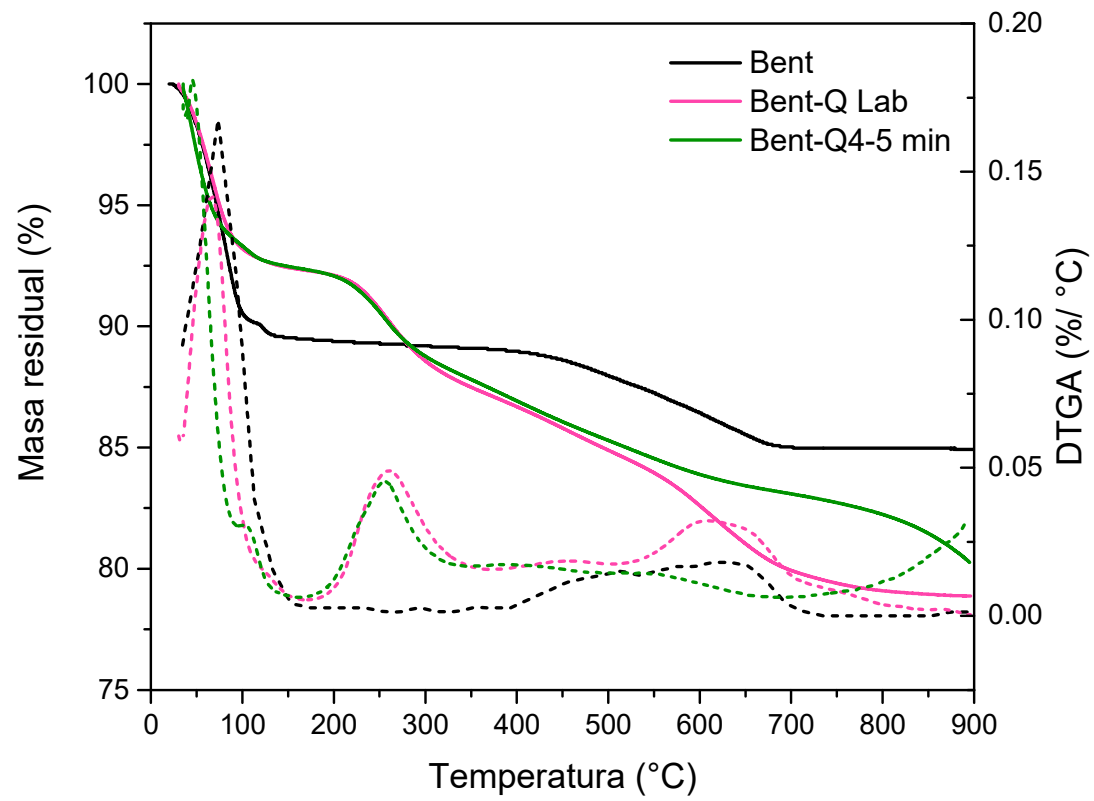


FIGURA 11. COMPARACIÓN DE LOS TERMOGRAMAS DE BENT-Q PREPARADA EN EL LABORATORIO (30 MIN DE REACCIÓN A 60°C) POR MERINO Y COL. (2018)<sup>46</sup> Y LA REALIZADA EN EL LOTE 4 (5 MINUTOS DE REACCIÓN A 25 °C).

TABLA 3. PARÁMETROS OBTENIDOS A PARTIR DE LOS TERMOGRAMAS DE LAS BENT-Q DE LOS DISTINTOS LOTES.

Lote	Tiempo de reacción (min)	Contenido de Q		$T_{deg}$ (°C)
		(% en peso)	mmol Q/g arcilla	
1	5	4,0	0.75	250,5
	15	4,5	0.85	251,2
	30	4,0	0.75	251,1
2	5	4,2	0.79	253,2
	15	4,4	0.83	251,6
	30	4,6	0.87	251,6
3	5	4,3	0.81	255,1
	15	4,2	0.79	255,0
	30	4,3	0.81	255,5
4	5	4,3	0.81	256,0
	15	4,2	0.79	255,5
	30	4,1	0.77	255,0
Laboratorio <sup>46</sup>	30	5	0.94	258,8

En las curvas de DTGA de la Bent (**Figuras 10 y 11**) se puede observar la presencia de dos eventos térmicos. El primero, entre temperatura ambiente y 150 °C, donde ocurre la deshidratación debido a la pérdida de moléculas de agua fisisorbidas y las que rodean a los cationes interlaminares (agua no estructural); y el otro, que tiene lugar entre los 400 y los 700 °C, asociado con la pérdida de los grupos hidroxilo presentes en su estructura laminar<sup>59</sup>. En este intervalo, se produce un 4% de pérdida de masa. Por otro lado, en las curvas de DTGA de los distintos lotes de Bent-Q se puede observar la presencia de tres eventos térmicos. El primero, entre temperatura ambiente y 150 °C, está asociado a la desorción de moléculas de agua (aproximadamente 6.5% (p/p)). Allí, se puede notar que la curva de Bent pura presenta una caída más abrupta que la de Bent-Q (en la Bent la pérdida es de un 10,5%, mientras que para las Bent-Q esa pérdida de masa ronda el 5%), lo que da cuenta que posee una mayor cantidad de agua adsorbida en su estructura. Esto se puede atribuir a la formación de nuevas interacciones entre Bent y Q, lo que produce una ligera reducción del carácter hidrofílico de la arcilla<sup>48</sup>. El segundo evento tiene lugar entre los 170 y los 350 °C, el cual es atribuido a la degradación del Q presente en la arcilla. Esta es la etapa que se utiliza para medir el contenido de Q en la arcilla, que resulta de la diferencia en la pérdida de masa porcentual en este intervalo. Es importante destacar que la alta estabilidad térmica de estos materiales se evidencia por la elevada temperatura requerida para eliminar la materia orgánica presente en las Bent-Q, que en estado puro ocurre a menor temperatura. En la última zona, que está comprendida entre los 400 - 900 °C, se encuentran solapados dos eventos: la ya mencionada pérdida de los grupos hidroxilo presentes en la estructura de la Bent<sup>59</sup> y la degradación del residuo carbonoso producido en la etapa de degradación del Q<sup>46</sup>.

Las curvas obtenidas son similares a las de trabajos realizados por Merino y col. (2018)<sup>46</sup> o Liu y col. (2015)<sup>61</sup>. En ambos casos, los resultados son de arcillas modificadas a escala laboratorio. Comparando con lo obtenido en este trabajo, que los resultados de los distintos lotes tengan un gran parecido con estos trabajos es muy satisfactorio porque comprueba que este proceso se puede llevar a cabo a una mayor escala y, además, es posible optimizar y minimizar los distintos parámetros que gobiernan el proceso como lo son el tiempo y la temperatura de la reacción.

En la **Tabla 3** se puede notar que el contenido de Q en las nanoarcillas se encuentra en el rango entre el 4 y 4,4 % p/p. Lo mismo se puede decir de las alícuotas retiradas a distintos tiempos de reacción en cada lote. Todo el Q que se ubica interestrato necesita de poco tiempo para intercambiarse porque para cualquier tiempo de reacción en un mismo lote, el contenido de Q permanece prácticamente invariable. Este resultado es esperable debido a la gran afinidad del Q por la Bent, dada su naturaleza policationica. Esta similitud de resultados se puede ver claramente en la **Figura A 7**, donde se comparan las alícuotas de 15 minutos de todos los lotes. Allí se observa el gran parecido entre las 4 curvas.

Por otro lado, y en concordancia con las observaciones efectuadas en el primer evento de pérdida de masa en los ensayos de TGA, todas las Bent-Q evidenciaron una disminución en el grado de absorción de humedad como se muestra en la **Tabla 4**.

TABLA 4. RESULTADOS OBTENIDOS DEL ENSAYO DE ABSORCIÓN DE HUMEDAD PARA DISTINTOS BENT-Q.

Lote	Tiempo de reacción (min)	AbsH <sub>24</sub> (%)
2	5	12,85±0,25
	15	13,17±0,07
	30	12,78±0,02
3	5	15,49±0,13
	15	15,46±0,01
	30	15,71±0,01
4	5	12,60±0,25
	15	12,38±0,46
	30	12,42±0,12
Bent	-	18,01±0,10

Según lo exhibido en la **Tabla 4** se puede evidenciar que en todos los lotes el grado de absorción de humedad de la arcilla es menor comparado con el de la Bent sin modificar. Es decir, que se confirma la presencia de Q en la arcilla. Si bien se observa una disminución, no es muy notoria ya que las modificaciones son con moléculas que no afectan tanto el grado de hidrofiliidad como lo es el Q. En concordancia con el ensayo de TGA estos cambios en la hidrofiliidad de la arcilla permanecen prácticamente invariables para los distintos tiempos de reacción.

La técnica de DRX es ampliamente utilizada para la caracterización de arcillas naturales y modificadas dado que permite obtener información acerca de la estructura cristalina y el grado de intercalación de una dada sustancia mediante la medición del espaciado interlaminar a través del uso de la ecuación de Bragg.

A partir del difractograma de la Bent pura (**Figura A 1**) se identificaron las fases cristalinas que componen la arcilla, siendo la montmorillonita la fase principal, con cuarzo, feldspatos y labradorita como fases secundarias<sup>47</sup>. El primer pico se sitúa alrededor de  $2\theta = 6.6^\circ$  y es característico de la montmorillonita. Corresponde al plano 001 de esta estructura y se corresponde con un  $d_{001}=13.32 \text{ \AA}$ . Como consecuencia de la modificación con Q, se produce una pérdida de cristalinidad de la fase montmorillonita, evidenciada en picos más anchos y menos intensos en los difractogramas, mientras que los picos de las fases secundarias permanecen inalterados tras la integración de Q, como se ha observado en general en las modificaciones por intercambio catiónico.



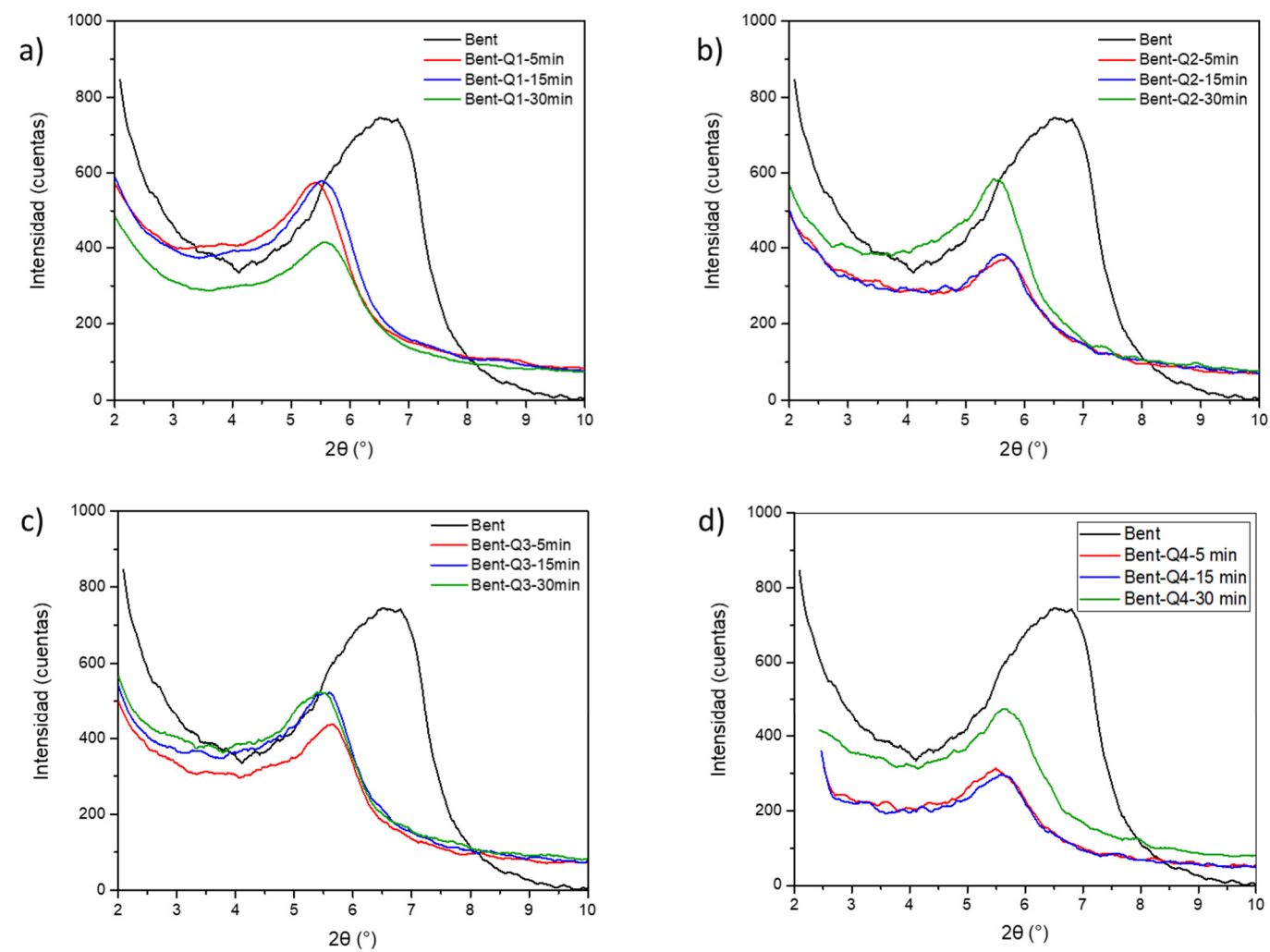


FIGURA 12. COMPARACIÓN DE LOS DIFRACTOGRAMAS DE LAS DISTINTAS ARCILLAS BENT-Q, LOTE 1 (A), LOTE 2 (B), LOTE 3 (C) Y LOTE 4 (D), MODIFICADAS CON DISTINTOS TIEMPOS DE REACCIÓN.

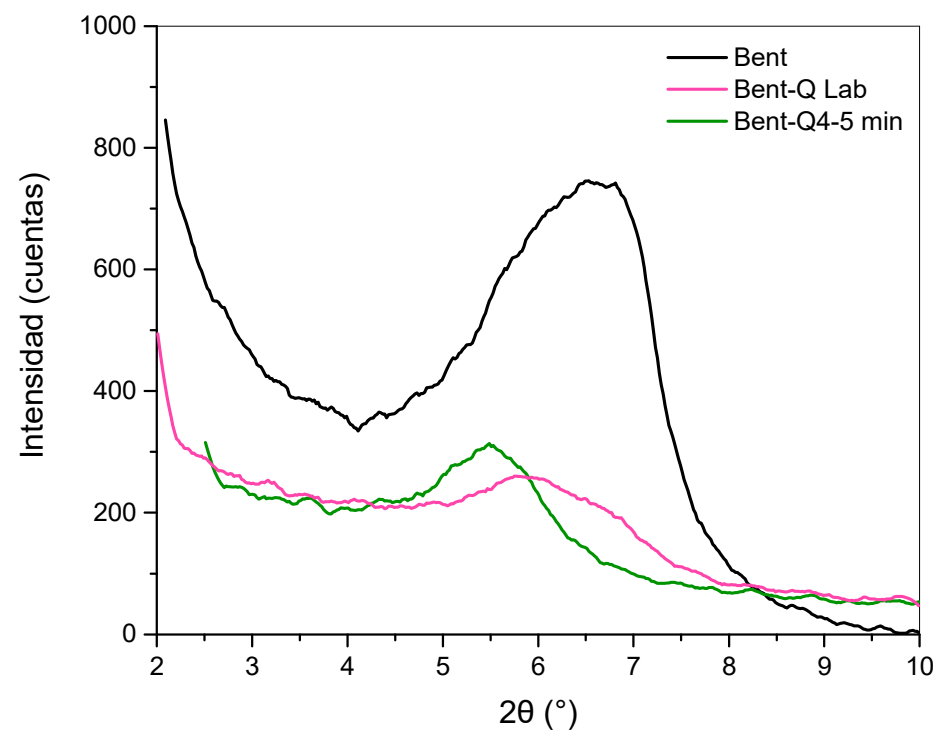


FIGURA 13. COMPARACIÓN DE LOS DIFRACTOGRAMAS DE BENT-Q PREPARADA EN EL LABORATORIO (30 MIN DE REACCIÓN A 60°C) POR MERINO Y COL. (2018)<sup>46</sup> Y LA REALIZADA EN EL LOTE 4 (5 MINUTOS DE REACCIÓN A 25 °C).

TABLA 5. ESPACIADOS INTERLAMINARES  $d_{001}$  DE LAS ARCILLAS.

Lote	Tiempo de reacción (min)	$d_{001}$ (Å)	$\Delta d_{001}$ (Å)
Bent	-	13,32	-
1	5	16,32	<b>3,00</b>
	15	16,01	2,69
	30	15,87	2,55
2	5	15,52	2,20
	15	15,73	2,41
	30	16,09	<b>2,77</b>
3	5	15,69	2,37
	15	16,01	2,69
	30	16,17	<b>2,85</b>
4	5	16,09	<b>2,77</b>
	15	15,78	2,46
	30	15,60	2,28
Laboratorio <sup>46</sup>	30	15,05	<b>1,73</b>

En el caso de los difractogramas de las Bent-Q, el ensayo de DRX se realizó con el fin de determinar si el Q se encontraba intercalado entre las láminas de Bent, como es de esperarse cuando se ha producido una reacción de intercambio catiónico<sup>73</sup>. Sin embargo, hay que considerar la posibilidad de que el Q no se encuentre totalmente interestrato, sino que una parte se haya adsorbido en la superficie de las láminas de Bent. Como se mencionó anteriormente, el parámetro a observar es la posición de pico de difracción 001 ya que éste se desplaza a ángulos menores a medida que aumenta la distancia interlaminar,  $d_{001}$ <sup>74</sup>. La **Figura 12(a-d)** muestra comparativamente los patrones de difracción de la Bent y las Bent-Q de los distintos lotes obtenidos con 5, 15 y 30 minutos de reacción, en el rango de 2 a 10° (2 $\theta$ ), en donde es posible visualizar con claridad el desplazamiento del pico de difracción mencionado. Se puede notar que en todos los casos el pico de difracción 001 se desplazó completamente a menores valores de 2 $\theta$ . Los mayores desplazamientos logrados en términos porcentuales, tomando la alícuota en la que mayor corrimiento de pico se observó de cada lote, son:

- 22,5% en el Lote 1 (5 min), equivalente a  $\Delta d_{001} = 3 \text{ \AA}$
- 20,8% en el Lote 2 (30 min) , equivalente a  $\Delta d_{001} = 2,77 \text{ \AA}$
- 21,4% en el Lote 3 (30 min) , equivalente a  $\Delta d_{001} = 2,85 \text{ \AA}$
- 20,8% en el Lote 4 (5 min) , equivalente a  $\Delta d_{001} = 2,77 \text{ \AA}$
- 13,0% en el la Bent-Q obtenida previamente en el laboratorio por Danila Merino<sup>46</sup>, equivalente a  $\Delta d_{001} = 1,73 \text{ \AA}$

De acuerdo con otros estudios previos, estos valores de espaciados interlaminares indican que las moléculas de Q están orientadas formando una monocapa, como se esquematiza en la **Figura 23**<sup>62,65,66</sup>. La distancia entre láminas de Bent aumentó siempre y con resultados muy similares entre los distintos lotes, lo cual es muy interesante teniendo en cuenta las condiciones en las que se llevó a cabo cada experiencia, reafirmando lo visto en los ensayos de TGA. Si bien el máximo corrimiento del pico en los lotes 2 y 3 se da al mayor tiempo de reacción, es decir, que habría una mayor cantidad de Q interlaminar cuánto más tiempo se dejó reaccionar a la arcilla, las diferencias con los otros tiempos de reacción (5 y 15 min) no son significativas. Por otro lado, el mayor corrimiento del pico en los lotes 1 y 4 se da en el menor tiempo de reacción (5 min). En el primer caso se logra el mayor desplazamiento del pico, mientras que en el segundo caso se alcanza el mismo corrimiento logrado que en el lote 2 y menos de un punto porcentual por debajo del lote 3. Las diferencias encontradas entre los máximos corrimientos de cada lote son mínimas (menos de 2 puntos porcentuales), pero las condiciones de reacción a las que ello sucede son muy diferentes. Es por eso que los resultados del lote 4 son tan promisorios. El Q intercalado es apenas menor que en los que se obtiene en los demás lotes, pero se logra una gran optimización de las condiciones (Temperatura, tiempo de reacción y cantidad de arcilla por lote) que se traducirá en mejoras de factibilidad económica de su producción a gran escala.

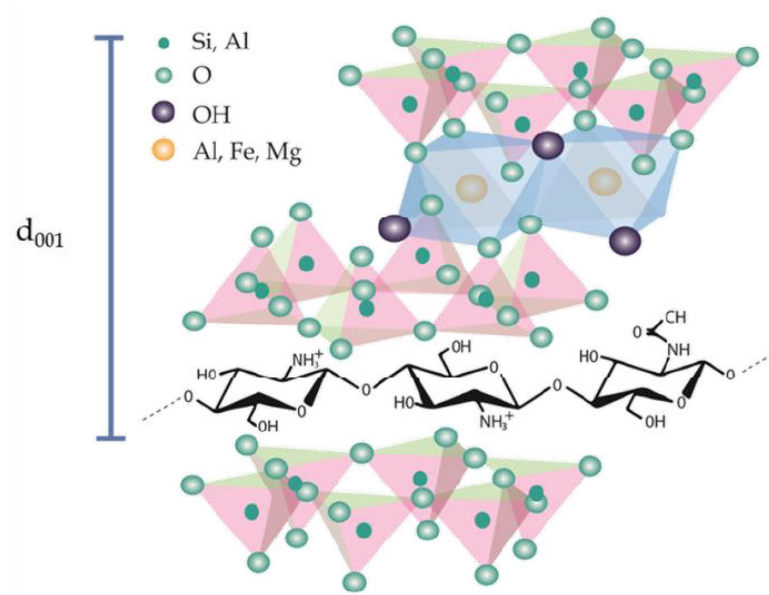


FIGURA 14. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA ESTRUCTURA DE LA NANOARCILLA BENT-Q SEGÚN LA CUAL LAS CADENAS DE Q SE ENCUENTRAN INTERCALADAS FORMANDO UNA MONOCAPA ENTRE LAS LÁMINAS DE BENT<sup>46</sup>.

Por otro lado, es interesante notar que comparando el mismo tiempo de reacción para todos los casos, la distancia interlaminar de las arcillas modificadas en todos los lotes (con iguales o menores tiempos y temperaturas de reacción) es mayor que la lograda en el laboratorio por Merino y col.<sup>46</sup>. En una primera aproximación se podría suponer que una mayor cantidad de Q se intercambió a una mayor escala con todos los cambios que se realizaron respecto de la formulación original. Sin embargo, según los resultados obtenidos en los ensayos de TGA el % de Q presente en la Bent es un poco menor en las pruebas realizadas en este proyecto. Por lo cual, una posible teoría es que el Q esté intercalado de una manera diferente, ocupando un espacio levemente mayor entre las láminas de arcilla. Si nos focalizamos en la Bent-Q4-5 min que parecería ser la arcilla sintetizada en condiciones de tiempo y temperatura óptimas en el reactor, el desplazamiento del pico 001 es unos 7,8 puntos porcentuales mayores que el registrado en la Bent-Q de laboratorio.

La técnica de FTIR brinda información sobre las frecuencias de vibración de los enlaces presentes en la estructura química de un material y permite, gracias a la aparición o desaparición de algunas de sus bandas o incluso a su corrimiento o cambios de intensidad, detectar los cambios que este ha experimentado al cabo de una determinada reacción química.

La **Tabla 6** resume las principales bandas de absorción de la Bent (**Figura A2**), típicas en esta clase de minerales, con sus correspondientes asignaciones.

TABLA 6. PRINCIPALES BANDAS DE ABSORCIÓN EN EL ESPECTRO FTIR DE LA BENT<sup>62,65,75</sup>.

Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	Asignación
3621	Estiramiento de los grupos OH estructurales
3400	Estiramiento del enlace O-H de las moléculas de agua de adsorbidas
1635	Flexión H-O-H de las moléculas de agua adsorbidas sobre la superficie arcillosa
1050	Estiramiento del enlace Si-O
918	Vibraciones de deformación del enlace Al-OH
881	Deformaciones del enlace Al-Fe-OH
795	Vibraciones de flexión del enlace Si-O-Al
520	Vibraciones de estiramiento del enlace Si-O-Al en la capa octaédrica
463	Vibraciones de flexión del enlace Si-O en la capa tetraédrica

Por otro lado, el Q puro presenta, principalmente, bandas centradas en 1589 y 1645 cm<sup>-1</sup>. La primera de ellas se debe a la flexión del grupo amino -NH<sub>2</sub><sup>73,75</sup>. La posición de esa banda está usualmente entre 1550 y 1595 cm<sup>-1</sup>. El desplazamiento del pico a mayor frecuencia está relacionado con un aumento en la extensión de la N-acetilación y también, con la presencia de puentes de hidrógeno<sup>75</sup>. Cuando se comparó con el espectro infrarrojo de Bent-Q, se observó un corrimiento en la banda del grupo amino protonado hacia una frecuencia más baja. El pico aparece a 1535 cm<sup>-1</sup>, lo que sugiere una fuerte interacción electrostática con Bent, como ha sido descrito previamente por Merino y col. (2018)<sup>46</sup>, Han y col. (2010)<sup>67</sup> y por Monvisade & Siriphannon (2009)<sup>62</sup>. La banda que aparece a 1645 cm<sup>-1</sup> en el Q puro se relaciona con la banda de amida (estiramiento C=O en amidas) y, en la nanoarcilla Bent-Q, aparece a 1633 cm<sup>-1</sup> solapada con la banda de vibración de flexión de moléculas de agua adsorbidas sobre Bent<sup>65</sup>. La **Figura 15 (a-d)** muestra los espectros FTIR de las diferentes Bent-Q con los controles de la Bent natural, y el Q. A partir de los mismos pudo confirmarse la presencia de Q en la arcilla.

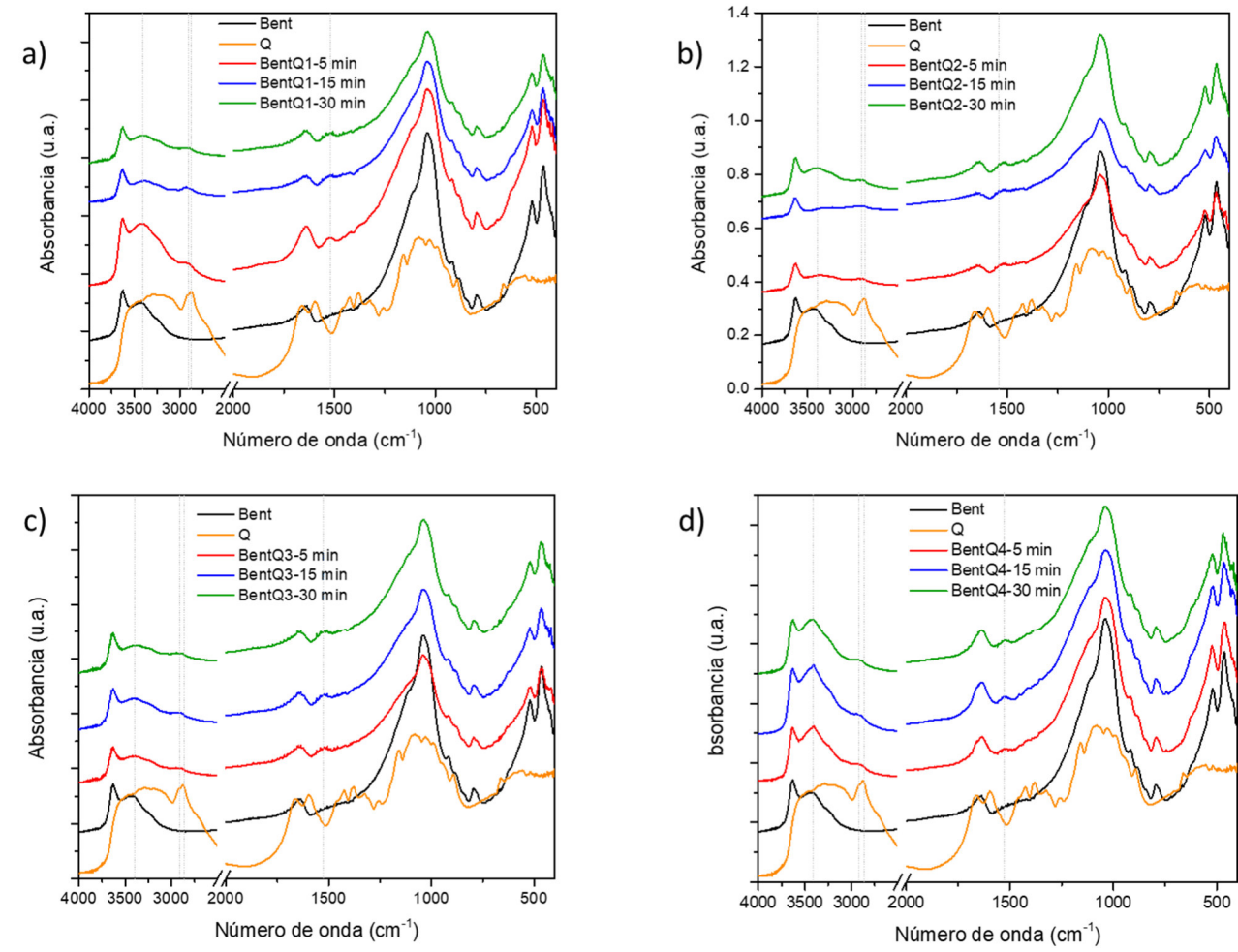
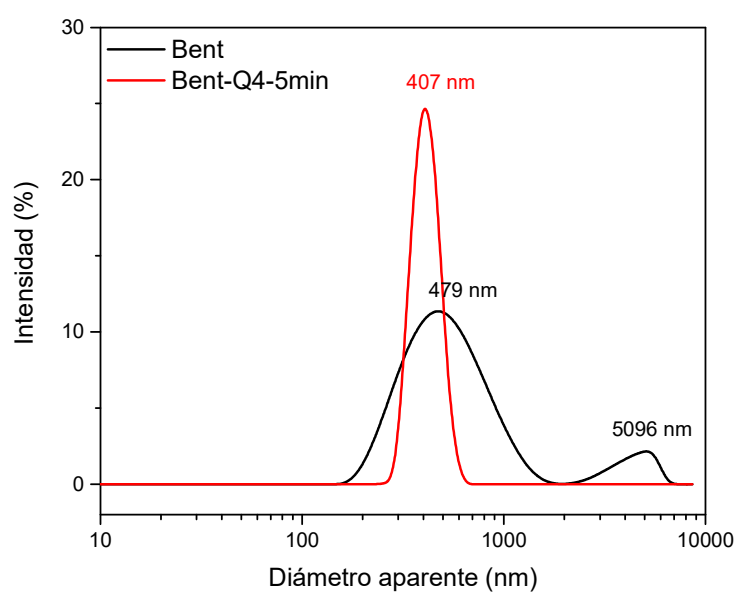


FIGURA 15. COMPARACIÓN DE LOS ESPECTROS FTIR DE LAS DISTINTAS ARCILLAS BENT Y BENT-Q OBTENIDOS CON 5, 15 Y 30 MIN DE REACCIÓN: (A) LOTE 1, (B) LOTE 2, (C) LOTE 3, (D) LOTE 4

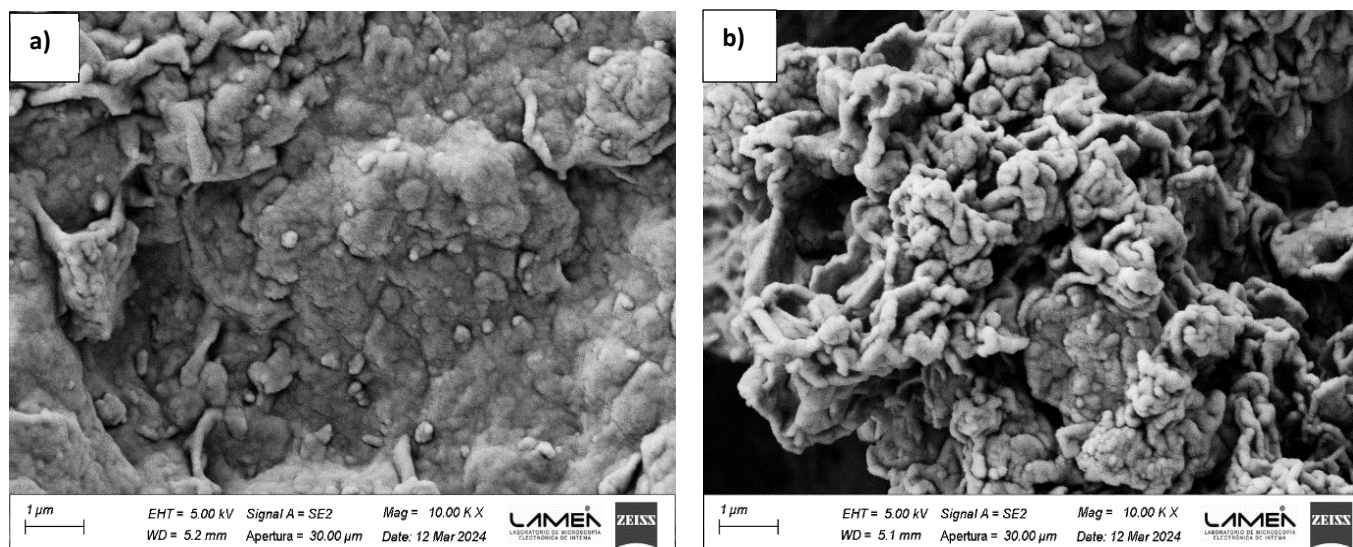
En base a los resultados obtenidos, se seleccionó la Bent-Q4-5min como formulación óptima y se procedió a caracterizarla con mayor detalle. Con esta arcilla, se preparó una suspensión en agua con una concentración de 1 mg/ml. En la **Figura 16** se muestra la curva de distribución aparente de diámetros de partícula de la arcilla en suspensión evidenciando una distribución unimodal con un pico en 468 nm, levemente menor y con menos polidispersidad en comparación a la Bent natural sin tratar. Sin embargo, la estabilidad de la suspensión solo duró pocos minutos y luego se comenzaron a ver sedimentos en el fondo del recipiente. Esta menor estabilidad de la suspensión está asociada al menor carácter hidrofílico de la Bent-Q evidenciado en los resultados anteriores. Por esta razón, como trabajo a futuro se evaluará la incorporación de un agente dispersante o surfactante inocuo para la aplicación planteada en este proyecto, que permita mantener la arcilla en suspensión estable y evitar posibles inconvenientes con la obstrucción del spray foliar. Esta incorporación en la formulación del producto será un parámetro clave si la idea es comercializar la arcilla como un producto sólido el cual será dispersado en agua por la persona que realizará la aplicación en campo.



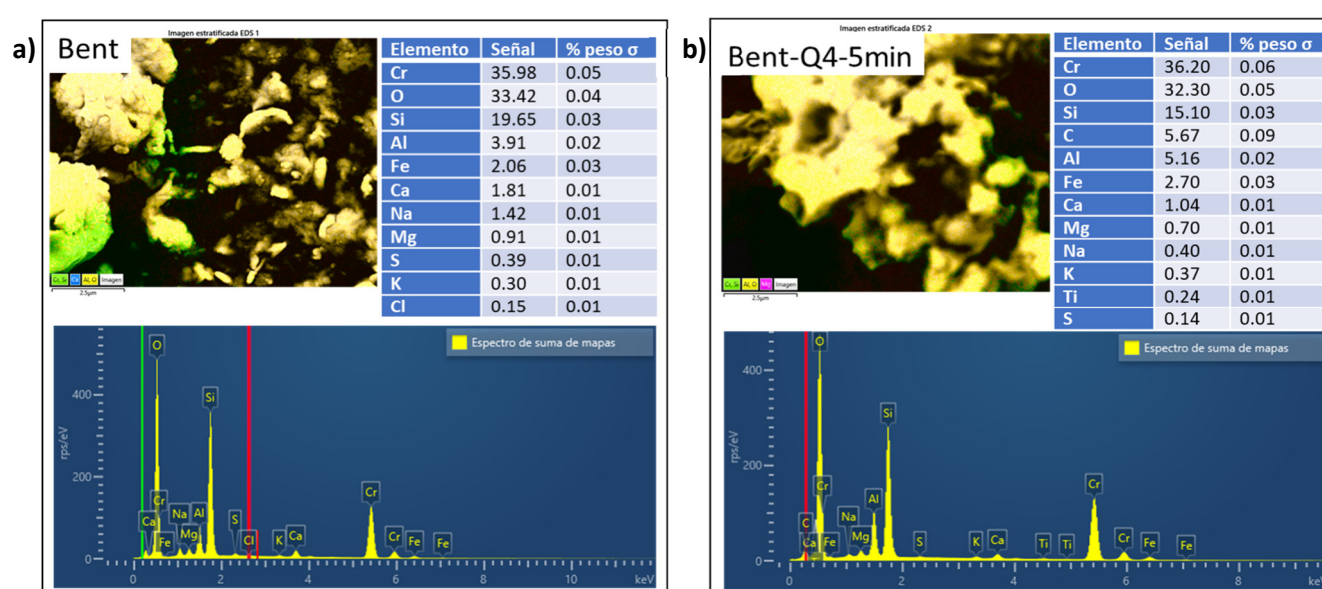
**FIGURA 16. CURVA DE DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑO DE PARTÍCULA DE SUSPENSIÓN DE BENT-Q4-5MIN EN AGUA DESTILADA, 1 MG/ML.**

Finalmente, se procedió a observar las partículas de la formulación óptima mediante microscopía FESEM y se compararon con la Bent sin tratar. El análisis de la **Figura 17 a)** permitió dilucidar la presencia de agregados muy compactos de partículas con un aspecto más uniforme y homogéneo para Bent, con pocas irregularidades. Por otro lado, la **Figura 17 b)** muestra que la formulación óptima de la Bent-Q seleccionada tiene una estructura más abierta, notándose un cambio en la rugosidad superficial. Estos resultados visuales se pueden correlacionar con la presencia de partes de las cadenas de Q, no solo entre las láminas de Bent sino que también recubriendo las mismas. Resultados similares fueron reportados por Merino y col. (2018)<sup>46</sup> a escala laboratorio. Como complemento, con EDS se obtuvieron las composiciones elementales de la Bent-Q y de la Bent, como se muestra

en la **Figura 18 (a-b)**. En la Bent se puede observar un mayor porcentaje de Si y la presencia de Ca, Al, Na, Fe y Mg, los cuales son característicos de este tipo de material (no se considera el Cr dado que es el elemento empleado como recubrimiento de las muestras para la técnica). La presencia de Mg y Al se debe a las sustituciones isomórficas de Mg por Al en las capas octaédricas y de Al por Si en las tetraédricas. En el caso de la Bent-Q, además de estos elementos, se puede observar una reducción en la relación Na/Si (0.07 para la Bent y 0.026 para la Bent-Q) y además una cantidad apreciable de Carbono, que es asociable con la incorporación del Q a la arcilla y demuestra, una vez más, que se ha intercambiado satisfactoriamente.



**FIGURA 17. MICROGRAFÍAS FESEM DE LAS ARCILLAS: A) BENT; B) BENTQ4-5MIN**



**FIGURA 18. MICROANÁLISIS POR EDS DE LA SUPERFICIE DE LAS ARCILLAS Y COMPOSICIÓN ELEMENTAL: A) BENT; B) BENTQ4-5MIN.**



## Conclusiones parciales

Los resultados de FTIR, TGA, DRX y FESEM indicaron que el Q se incorpora efectivamente en la Bent, que interactúan a través de fuertes interacciones electrostáticas y que se intercala en las láminas de Bent en una disposición de monocapa. La cantidad de Q presente en la Bent-Q4-5 min fue de aproximadamente 4.5% (p/p). Un resultado muy similar al obtenido por Merino y col. (2018)<sup>46</sup> a escala laboratorio. Es muy importante notar los ajustes en las concentraciones logradas por lote, así como en parámetros de producción tales como la temperatura y el tiempo (**Tabla 7**). La optimización de todas estas variables está relacionada en su mayoría por la naturaleza del Q y de la Bent. En la afinidad de las cargas positivas del Q con las cargas negativas características de las láminas de la Bent y la capacidad de la arcilla de alojar cationes orgánicos está la explicación de esta optimización. Por esta razón, el Q se intercambia catiónicamente tan rápido y se ubica interestrato en la arcilla, razón por la cual los resultados de las alícuotas extraídas en cada lote son tan parecidos, por lo que en realidad no se requeriría de tiempos de modificación tan prolongados y temperaturas superiores a 25 °C, como se propone en la bibliografía.

Resumiendo, se ha obtenido una nanoarcilla con propiedades muy similares a la obtenida por Merino y col. (2018)<sup>46</sup>, con la diferencia apreciable de la escala a la que se trabajó. Esta última es la gran variable a optimizar cuando se trata de producción en masa a escala industrial. Particularmente, se logró incrementar un orden de magnitud la cantidad producida, pasando de unos 20 gr a unos 200 gr de nanoarcilla por lote. Al ser este el caso en el que los resultados son tan favorables, se consideró incorporar en esta Tesis un análisis de mercado y plan de negocios sobre esta nanoarcilla. No obstante, es muy importante recalcar que todo el trabajo realizado en los laboratorios de INTEMA fue hecho con el equipamiento que se encontraba disponible. Es por eso, que se puede concluir que se logró el objetivo de optimizar el proceso con los recursos que se contaban. Sin embargo, se puede seguir logrando la reducción de tiempos mediante equipamientos superiores, permitiendo que todo el procedimiento se realice de una forma más continua.

Finalmente, por la naturaleza menos hidrofílica de la Bent-Q4-5min en comparación a la Bent natural, se considera fundamental un estudio a futuro con respecto a la formulación que debe incluir un coadyuvante o un agente, idealmente biocompatible e inócuo, que permita la correcta suspensión de esta nanoarcilla en agua, teniendo en cuenta que esto será efectuado por la persona encargada de pulverizarla en el campo.

**TABLA 7. COMPARACIÓN ENTRE ARCILLAS OBTENIDAS A DISTINTA ESCALA.**

	Bent-Q1-30min (Formulación escala laboratorio)	Bent-Q1-5min (Formulación escala planta piloto)
Concentración de Bent en la suspensión (% p/V)	1	3
Concentración de Q en la solución inicial (% p/V)	1	2,5
Temperatura de reacción (°C)	60	25
Tiempo de reacción (min)	30	5
Cantidad aproximada de Bent-Q producida (gr)	20	200

## CAPÍTULO 4. PRODUCCIÓN DE BENT-AS EN PLANTA PILOTO Y CARACTERIZACIONES FÍSICAS, QUÍMICAS Y MORFOLÓGICAS

### Introducción

El ácido salicílico (AS), o ácido 2-hidroxibenzoico, es un compuesto orgánico cuya estructura química se compone de un anillo aromático de benceno con un grupo carboxilo (-COOH) y otro hidroxilo (-OH) (**Figura 19**), lo que le confiere propiedades ácidas, con un pKa de 2.97<sup>76</sup>. Este compuesto es un sólido cristalino blanco a temperatura ambiente y tiene un punto de fusión de 159°C. Además, es soluble en disolventes orgánicos como el alcohol, éter, cloroformo y benceno, pero tiene una solubilidad limitada en agua (Solubilidad en agua, g/100ml a 20°C: 0.2).

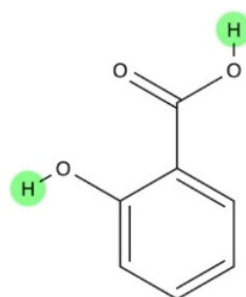


FIGURA 19. ESTRUCTURA QUÍMICA DEL AS.

El AS ha sido ampliamente estudiado debido a sus diversas aplicaciones en la medicina y la industria. Tiene propiedades antiinflamatorias, analgésicas y antipiréticas, lo que lo hace útil en el tratamiento de una variedad de condiciones médicas como la fiebre, el dolor y la inflamación. También se utiliza en la producción de productos químicos, cosméticos y como conservante de alimentos.

El AS es un compuesto orgánico que se encuentra de manera natural en algunas plantas, como la corteza de sauce blanco. Es un compuesto estable y resistente a la oxidación, lo que lo hace adecuado para su uso en materiales resistentes al fuego y a la intemperie. Además, tiene propiedades antifúngicas, queratolíticas y antibacterianas, lo que lo hace útil en la fabricación de materiales para aplicaciones médicas y agrícolas. Durante siglos ha sido utilizado para aliviar el dolor y reducir la inflamación por sus propiedades medicinales. En la actualidad, el AS se utiliza en una amplia variedad de aplicaciones, que van desde la industria farmacéutica hasta la cosmética y la agricultura.

El AS es un ácido fenólico beta hidroxilado y se produce ampliamente en procariotas y plantas. Durante mucho tiempo, el AS ha sido conocido más por sus aplicaciones como medicamento que por su función en las plantas. Una de las razones es que, en las plantas, se descubrió que el AS se comporta como mensajero químico en la regulación de procesos biológicos a concentraciones relativamente bajas. Ahora, el AS es mejor conocido como una hormona relacionada con la defensa de plantas. Las primeras observaciones de que el SA estaba involucrado en la inmunidad de las plantas fueron reportadas por Raymond F. White en 1979, quien describió que la aplicación de aspirina (acetil-SA) en tabaco susceptible a virus confería resistencia contra el virus del mosaico del tabaco (TMV, por sus siglas en inglés). Esto indicó un papel protector del AS en la resistencia de las plantas y que podría desempeñar un papel como señal interna de defensa para la inmunidad de las plantas<sup>25</sup>.

La resistencia sistémica adquirida (SAR, por sus siglas en inglés) ha sido reconocida como una respuesta de las plantas al estrés biótico durante casi 100 años<sup>77</sup>. Una vez que se sintetiza el AS, este actúa a través de receptores que pertenecen a la familia de factores de transcripción NPR (por sus siglas en inglés, no expresores de proteínas relacionadas con la patogénesis) para inducir aún más genes relacionados con la defensa que contribuyen a la activación del patrón molecular asociado a patógenos, desencadenando inmunidad activada por efectores (ETI, por sus siglas en inglés) y SAR<sup>28</sup>. Hoy en día, el AS se acepta como una hormona esencial tanto para la resistencia local como para la SAR<sup>78</sup>. La aplicación de AS en plantas induce la acumulación endógena de AS que confiere a la planta resistencia frente a diferentes patógenos<sup>79</sup>.

Sin embargo, el AS tiene roles controvertidos en el desarrollo y crecimiento de las plantas dependiendo de su concentración, el pH de las soluciones de aplicación, así como de las especies vegetales y etapas de desarrollo<sup>27</sup>. Por ejemplo, dependiendo de la especie vegetal, una dosis alta de AS (>1-2 mM AS) no solo mejora la resistencia de la planta, sino que también regula negativamente los procesos de desarrollo vegetal que afectan la productividad de los cultivos<sup>80</sup>. Davies y col.<sup>81</sup> han informado que el SA inhibe la germinación de las semillas y bloquea la respuesta a las heridas. Otro aspecto a considerar para la aplicación exógena de AS es que, en general, el pH de la solución de AS es ácido y la absorción de AS por las células vegetales depende del pH. Por ejemplo, Chen y Kuc<sup>82</sup> demostraron que en células de tabaco, la absorción de AS está inversamente correlacionada con el aumento del pH del medio. Por lo tanto, tanto el ajuste fino del pH como las dosis de aplicación de AS podrían ser críticos en la modulación de la señalización de defensa de las plantas mediada por AS<sup>83,84</sup>.

Una de las desventajas del AS es su baja solubilidad en agua. Este es un factor importante que ha limitado las variantes de síntesis de la arcilla modificada con este compuesto. Si bien existen algunas estrategias para mejorar la solubilidad del AS en agua, como la modificación química del compuesto, modificaciones del pH, o la utilización de surfactantes, las mismas no fueron probadas en este trabajo.

El objetivo de este Capítulo fue adaptar y optimizar el método de obtención de Bent modificada con AS (Bent-AS) previamente formulada en escala laboratorio<sup>43</sup> para su producción en escala de planta piloto, y llevar a cabo sus caracterizaciones física, química y morfológica.

### Procedimiento experimental

Se realizaron distintos ensayos con el objetivo de minimizar el tiempo de reacción, la temperatura a la que se realiza cada tratamiento y la cantidad de insumos requeridos usando como referencia la arcilla obtenida por Mansilla y col. (2020)<sup>43</sup>. A diferencia de las nanoarcillas obtenidas en el **Capítulo 3** no se realizó un primer lote a escala planta piloto respetando las mismas condiciones iniciales que la arcilla de base. Resumiendo, la Bent-AS óptima se obtuvo en el laboratorio empleando los siguientes parámetros:

- Volumen de suspensión: 500 ml
- Cantidad de Bent Dispersada: 5gr
- Relación AS/Bent: 0,17 gr AS/1 gr Bent
- Tiempo de proceso: 60 minutos
- Temperatura de proceso: 70 °C
- Método de separación: Centrifugación

- Método de secado: Liofilización

A continuación, se describen los procedimientos seguidos para obtener los dos lotes de Bent-AS en planta piloto:

**Lote 1:** Se disolvieron 25 g de AS en 1,5 L de agua destilada a 70 °C. Luego se dispersaron 150 g de Bent en 4,5 L de agua destilada con agitación vigorosa durante 15 min en un reactor de 10 L de capacidad y la suspensión obtenida se calentó a 70 °C. Se agregó la solución de AS a la suspensión de arcilla obteniendo una concentración 2,5 % p/V de Bent. La mezcla se mantuvo con agitación y temperatura constante y se extrajeron alícuotas del reactor a distintos tiempos (5, 15, 30 y 60 minutos) para su posterior análisis. Finalmente, se evaluaron distintos métodos de separación de la arcilla (filtración al vacío y centrifugación), se lavó 3 veces con agua destilada y se liofilizó.

**Lote 2:** El procedimiento fue similar al del lote uno. La única diferencia fue la temperatura de la reacción en el reactor, que fue 50°C.

TABLA 8. RESUMEN DE LAS VARIABLES EMPLEADAS EN CADA LOTE.

Lote	V de suspensión en reactor (L)	Concentración de Bent en la suspensión (% p/V)	Masa AS/ Masa Bent (g/g)	T de reacción (°C)
1	6	2,5	0,17	70
2	6	2,5	0,17	50

## Resultados y discusión

En cuanto a las modificaciones procedimentales en comparación a la arcilla obtenida a escala laboratorio por Mansilla y col. (2020)<sup>43</sup>, la filtración al vacío no se pudo realizar satisfactoriamente ya que el proceso era muy lento a pesar de haber testeado papeles de filtro con diversos tamaños de poro, y se tuvo que recurrir nuevamente a la centrifugación, un método más laborioso y que toma más tiempo. A diferencia de lo ocurrido en el capítulo anterior, todavía no se había evaluado la segunda alternativa a la que se hace referencia, sino que se utilizó la primera técnica de ultracentrifugado previamente desarrollada. Por lo tanto, en el proceso de centrifugado de todas las arcillas se convivió con la misma problemática: el escaso volumen que se podía centrifugar para separar el sobrenadante de la arcilla, traducándose en mayores tiempos de obtención del producto final.

Igualmente, la gran limitación detectada a la hora de hacer variaciones al procedimiento de obtención de las arcillas, con el fin de optimizar el proceso, fue principalmente la solubilidad del AS en agua. En el primer lote se tuvo que enfrentar con complicaciones de este tipo desde el inicio ya que la solubilidad del AS en agua es muy baja. De esta manera, fue necesario disolverlo en una gran cantidad de agua (1,5 L), por lo que se perdió mucho tiempo intentando que se disuelva todo el AS por los tiempos necesarios para calentar la solución. Además, no es lo ideal trabajar con temperaturas tan altas (70°C) ya que se traduce en mayor gasto energético, económico y de tiempo.

Por todo lo esgrimido, se intentó un segundo ensayo con el objetivo de optimizar el proceso, disminuyendo la temperatura de reacción. Como los problemas que se tuvieron en el primer ensayo se

acentuaron, ya que fue aún más complicado lograr que se solubilizara el AS en el agua a 50 °C, no se realizaron otros lotes de Bent-AS. Es fundamental tener el AS en solución ya que lo que se está tratando de lograr es que este se incorpore efectivamente en la arcilla<sup>85</sup>. Si el AS no está bien disuelto, se hace imposible que ingrese en un espacio del orden de los nanómetros, si bien el agua ayuda hinchando a la arcilla. Por otro lado, cabe recordar que el AS es un ácido con un  $Pk_a = 2,97^{76}$  por lo que en solución tiende a disociarse para dar lugar al ion salicilato. La carga negativa de este ion hace que se dificulte su ingreso en los espacios interestrato ya que las láminas de arcilla están cargadas negativamente y la fuerza impulsora de este proceso de intercambio es la fuerza de atracción electrostática. No obstante, existe otro fenómeno que, por el contrario, beneficia la carga de AS en la arcilla y es la formación de un complejo quelato entre los iones salicilato y el  $Fe^{+3}$  presente en cantidad apreciable en la arcilla<sup>85</sup>. Este complejo posee un color característico violeta y es el que le otorga esta coloración a las Bent-AS obtenidas como se muestra en la **Figura 20**.



**FIGURA 20. ASPECTO DE LA BENT-AS EN POLVO.**

A continuación, se muestran las caracterizaciones de las arcillas Bent-AS de los distintos lotes, obtenidas en cada caso con 5, 15, 30 y 60 minutos de reacción. Se empleará la siguiente nomenclatura: BentASX-Y min, donde X es el número de lote e Y es el tiempo de reacción en minutos. A partir de los distintos ensayos de caracterización realizados, se analizará la factibilidad de reducir el tiempo y la temperatura de reacción.

La estabilidad térmica de la Bent, el AS y la Bent-AS se evaluaron mediante el TGA y las curvas obtenidas se muestran en la **Figura 30 (a-b)**. Por otro lado, la **Tabla 9** resume los principales parámetros obtenidos a partir de este ensayo. La Bent exhibe dos pérdidas de masa importantes, las cuales fueron explicadas en el capítulo anterior.

A diferencia de las Bent-Q, las distintas Bent-AS muestran una dispersión en sus contenidos de AS, como se muestra en la **Tabla 9**. Esta dispersión genera que sus curvas de TGA no estén solapadas como las arcillas del capítulo anterior. Esto se puede notar principalmente en la pérdida de agua, que fluctúa para todas las arcillas de un mismo lote. Al aumentar el % de AS presente en la arcilla, se reduce la hidrofiliidad de la misma, traduciéndose en una menor pérdida de agua por los motivos explicados en el capítulo anterior. Si bien no es tan significativa, se puede hacer esta relación en líneas generales, comparando los resultados obtenidos en cada lote.

Por otro lado, el AS se degrada en un único evento, centrado en 195,5 °C (**Figura A 8**). Este mismo proceso está presente en las distintas arcillas de Bent-AS1, pero situado a mayores temperaturas (entre 170 y 490°C) y desdoblado en dos picos detectados en la gráfica de DTGA, cuyos máximos se registran en 246 y 410 °C. Una posible explicación de la presencia estos dos picos es que primero se degrada el AS que no logra situarse interestrato sino que se ha adsorbido superficialmente, dando origen al primer pico. Luego, se degrada el AS que se ubica satisfactoriamente interestrato y que interactúa más fuertemente con la arcilla. Ese pico indicaría un retraso en la degradación del AS intercalado en la Bent y supondría un efecto protector en la arcilla. Además, el AS efectivamente cargado en la Bent se determinó mediante la diferencia porcentual de masas entre la Bent y la nanoarcilla, entre los 170 y los 490 °C.

**TABLA 9. PARÁMETROS OBTENIDOS A PARTIR DE LOS TERMOGRAMAS DE LAS ARCILLAS.**

<i>Lote</i>	<i>t de reacción (min)</i>	<i>Contenido de AS (% en peso)</i>	<i>Pérdida de agua (% en peso)</i>	<i>T<sub>deg</sub> (°C)</i>
1	5	2,45	6,60	241,4
	15	2,59	7,04	241,3
	30	2,52	5,48	246,6
	60	3,15	7,77	246,7
2	5	1,93	6,04	254,0
	15	2,01	7,43	245,5
	30	1,85	8,51	243,2
	60	2,01	7,53	252,6
Laboratorio <sup>43</sup>	60	2,02	6,89	245,6

Por otro lado, se puede observar que los resultados de las alícuotas del lote 1 obtenidas a distintos tiempos de reacción son levemente distintos. En líneas generales, cuanto más tiempo se deja reaccionar a la arcilla, más AS se incorpora en la arcilla, aunque los cambios son leves. Por lo que se deduce que el proceso de funcionalización es más lento que en el caso de la Bent-Q debido a la baja afinidad electroestática entre el salicilato y las láminas de la Bent.

En el caso de las curvas de DTGA de las BentAS2, no se observa ningún pico en el intervalo de T entre 170 y 490 °C. Esto significaría que nada o muy poco AS se pudo intercambiar en la arcilla. Al intentar optimizar el proceso disminuyendo la temperatura de la reacción a 50°C, la disolución del AS en agua es más dificultosa, suceso clave para poder llevar adelante el procedimiento satisfactoriamente. Entonces, como resultado de lo mencionado anteriormente, no se produciría la funcionalización con AS de manera efectiva.

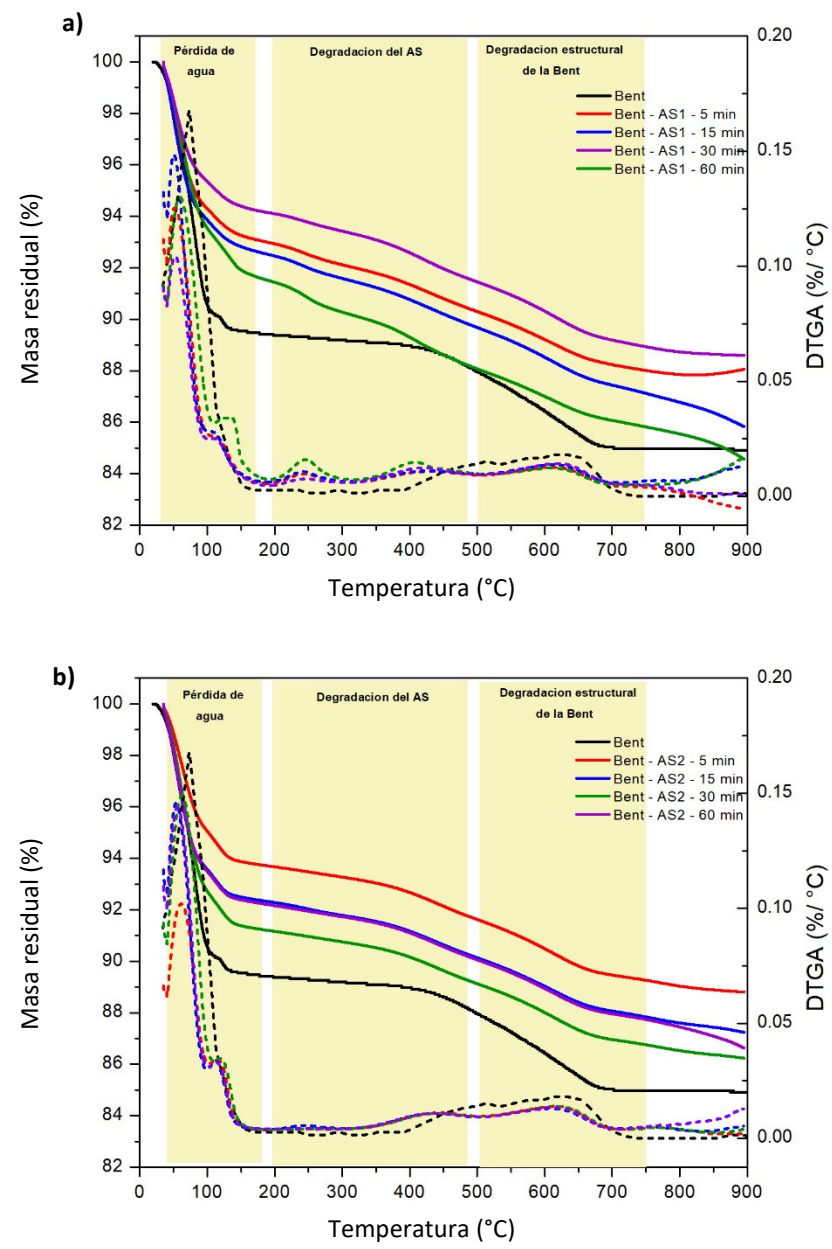


FIGURA 21. CURVAS DE MASA RESIDUAL Y DTGA EN FUNCIÓN DE LA TEMPERATURA PARA LOS DISTINTOS LOTES DE BENT-AS OBTENIDOS CON DISTINTOS TIEMPOS DE REACCIÓN: A) LOTE 1; B) LOTE 2.

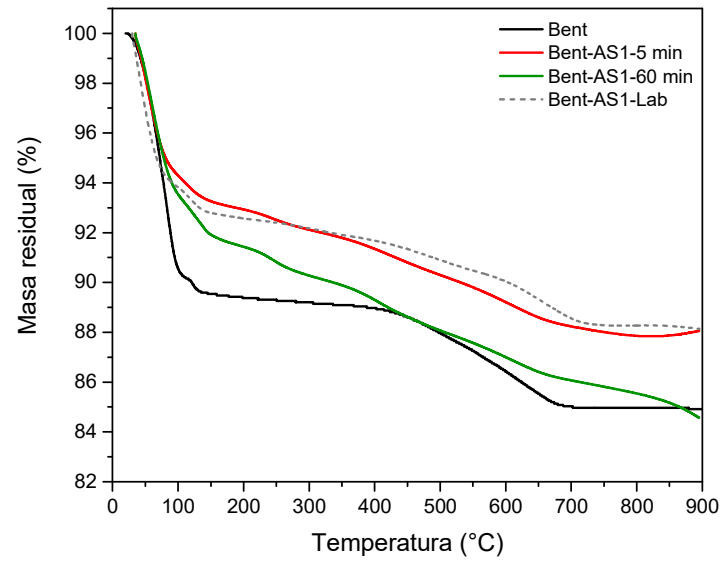


FIGURA 22. CURVAS DE MASA RESIDUAL EN FUNCIÓN DE LA TEMPERATURA DE LA BENT-AS OBTENIDA EN ESCALA LABORATORIO<sup>43</sup> COMPARADA CON LOS DISTINTOS LOTES DE BENT-AS OBTENIDOS CON 5 Y 60 MIN DE REACCIÓN.

Las curvas obtenidas en el lote 1, en especial la de Bent-AS1-5min, son muy similares a la del trabajo realizado por Mansilla y col. (2020)<sup>43</sup> (Figura 22). En este último caso, los resultados son de la Bent modificada con AS a escala laboratorio con la misma relación másica, a 70 °C y 1 h de reacción. Si bien los resultados obtenidos a distintas escalas no difieren demasiado, se puede ver que con 5 minutos de reacción en el reactor de planta piloto se obtiene una arcilla similar a la preparada en el laboratorio con más tiempo de reacción. Por lo tanto, a pesar de no ser posible una reducción en la temperatura como ocurrió en el caso de la Bent-Q, se podría ajustar el tiempo de reacción lo que se traduce en un menor costo energético.

El ensayo de DRX se realizó con el fin de determinar si el AS se encontraba intercalado entre las láminas de Bent<sup>73</sup>. El parámetro a observar es la posición de pico de difracción (001) ya que éste se desplaza a ángulos menores a medida que aumenta la distancia interlaminar,  $d_{001}$ <sup>74</sup>. La Figura 23 (a-b) muestra los patrones de difracción de Bent y Bent-AS en el rango de 2 a 10° (2θ). Como se puede apreciar en la Tabla 10, el patrón de DRX de la Bent mostró un pico a  $2\theta \approx 6.63^\circ$ , lo que corresponde a un espaciado interlaminar de 13.32 Å, como se mencionó en el capítulo anterior.

TABLA 10. ESPACIADOS INTERLAMINARES  $d_{001}$  DE LAS ARCILLAS.

Lote	t de reacción (min)	$d_{001}$ (Å)	$\Delta d_{001}$ (Å)
Bent	-	13,32	-
1	5	15,18	1,86
	15	15,38	2,06
	30	15,38	2,06

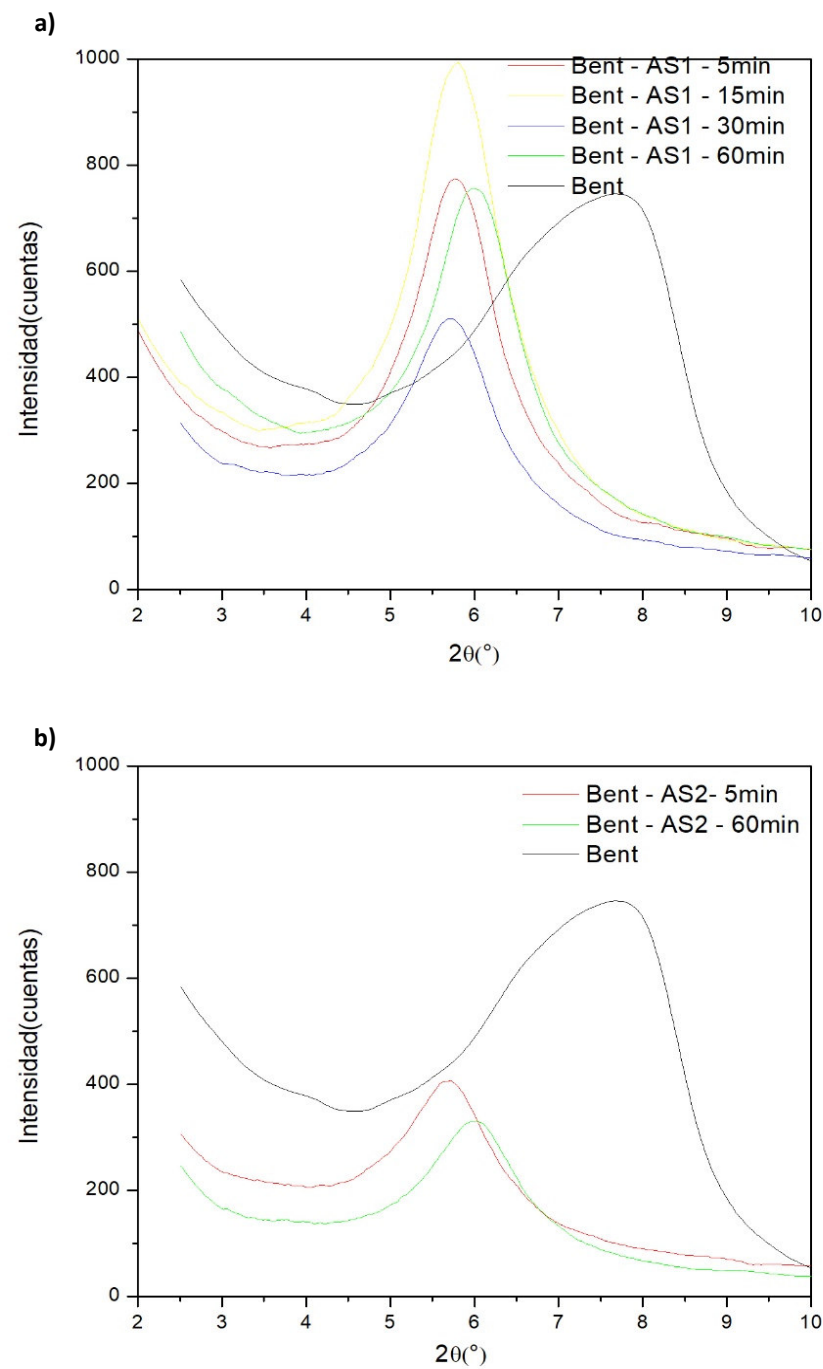


	60	15,46	<b>2,14</b>
2	5	15,46	<b>2,14</b>
	60	14,73	1,41
Laboratorio <sup>43</sup>	60	15,46	2,14

Se puede notar que en todos los casos el pico de difracción se desplazó a menores valores de  $2\theta$  (tomando la alícuota en la que mayor corrimiento de pico se observó de cada lote):

- 16,1% en el Lote 1 (60 min) , equivalente a  $\Delta d_{001} = 2,14 \text{ \AA}$
- 16,1% en el Lote 2 (5 min) , equivalente a  $\Delta d_{001} = 2,14 \text{ \AA}$

El incremento del espaciado interlaminar de las arcillas modificadas con AS, indica que, al menos algo de la fitohormona se intercaló interestrato, pero en muy baja cantidad. Es por esta razón, sumado a los datos obtenidos en los TGA, que no se analizaron exhaustivamente los ensayos de las alícuotas intermedias para el Lote 2, previendo la imposibilidad de seguir optimizando el proceso.



**FIGURA 23. COMPARACIÓN DE LOS DIFRACTOGRAMAS DE LAS DISTINTAS ARCILLAS BENTAS, LOTE 1 (A), LOTE 2 (B), MODIFICADAS CON DISTINTOS TIEMPOS DE REACCIÓN.**

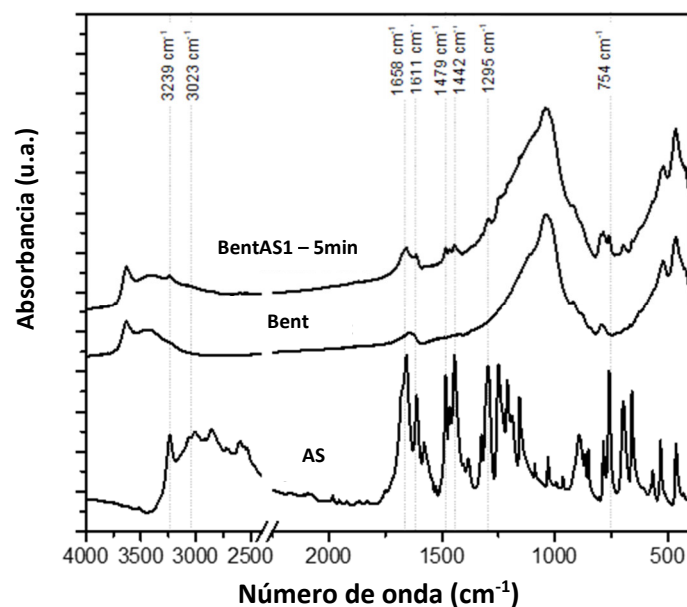
Por otro lado, en la **Tabla 11** se muestran los resultados obtenidos del ensayo de absorción de humedad realizado a las Bent-AS1. Si bien a partir del ensayo de TGA se puede deducir la cantidad de agua innata que contiene la muestra y el ensayo de absorción de humedad sirve para determinar qué cantidad de agua es capaz de incorporar la arcilla, ambas técnicas dan evidencia del grado de hidrofiliidad de las arcillas. Dada la baja

cantidad de AS presente en la arcilla, es esperable obtener un producto con una hidrofiliidad levemente menor que el de la Bent pura. Como ya se argumentó anteriormente, esto ocurre al observar los DTGA correspondientes al Lote 1, mientras que no sucede lo mismo al analizar los resultados del ensayo de absorción de humedad. No se observan variaciones significativas con respecto a los valores de la Bent sin modificar, sino que se mantiene dentro de los valores de esta.

**TABLA 11. RESULTADOS OBTENIDOS DEL ENSAYO DE ABSORCIÓN DE HUMEDAD PARA BENT-AS1.**

Lote	Tiempo de reacción (min)	AbsH <sub>24</sub> (%)
1	5	19,36±0,56
	15	20,77±0,22
	30	18,14±0,55
	60	19,70±1,17
Bent	-	18,01±0,10

En base a los resultados obtenidos, se seleccionó la Bent-AS-5min como la formulación óptima y se procedió a caracterizarla con mayor detalle. La **Figura 24** muestra los espectros FTIR de la Bent, BentAS1 – 5min y AS. A partir de los mismos se intentó confirmar la presencia de AS en la arcilla. Adicionalmente, se realizaron ensayos de FTIR a las distintas arcillas que se muestran en la **Figura A 11** (para el Lote 2 se ensayó únicamente la arcilla que se dejó reaccionar por 60 minutos).



**FIGURA 24. COMPARACIÓN DE LOS ESPECTROS FTIR DE BENT, AS Y BENTAS1-5MIN.**

Comparando los espectros de FTIR entre la Bent y la Bent-AS, se ven muy similares pero en esta última se observan numerosos picos de baja intensidad que no se habían presentado en el espectro de la Bent. Los

picos característicos que se atribuyen a la presencia de AS en la arcilla funcionalizada pueden visualizarse a  $1659\text{ cm}^{-1}$  debido a las vibraciones de estiramiento del enlace C=O del ácido carboxílico, a  $1442$  y  $1479\text{ cm}^{-1}$  debido a las vibraciones de estiramiento C=C, a  $1295\text{ cm}^{-1}$  debido a las vibraciones de estiramiento C-O en la estructura fenólica del AS y a  $754\text{ cm}^{-1}$  debido a la deformación de estiramiento C-H.

Este resultado coincide con los obtenidos en el TGA, donde se pudo determinar que el AS es capaz de incorporarse a la arcilla. Al comparar los resultados entre las distintas arcillas de este mismo lote, no se encuentran diferencias entre los espectros debido al bajo contenido en las mismas. El AS se podría estar intercalando entre los estratos de la Bent o situándose superficialmente, obteniéndose curvas similares incluso entre las arcillas del mismo lote, con distintos tiempos de reacción. Sumando la información obtenida con los anteriores ensayos si bien, a priori, no son resultados tan promisorios desde el punto de vista procedimental se deben estudiar más a fondo, con otras técnicas de caracterización. Además, para confirmar realmente que la cantidad de AS que se intercala sea suficiente.

De la misma forma que coincide lo observado en el TGA con el FTIR del lote 1, lo mismo sucede para los casos del lote 2. Los espectros de FTIR obtenidos resultan idénticos al FTIR de la Bent. Por esta razón, también se podría afirmar que el AS no fue capaz de incorporarse de manera significativa en la Bent.

Con la misma arcilla BentAS1-5min, se preparó una suspensión en agua con una concentración de  $1\text{ mg/ml}$ . En la **Figura 25** se muestra la curva de distribución aparente de diámetros de partícula de la arcilla en suspensión, que es muy similar a la de la Bent. El tratamiento con el ácido débil no modificó el tamaño de partícula de arcilla, como sí podría ocurrir con ácidos fuertes. En comparación con la formulación Bent-Q-5min, esta suspensión fue mucho más estable en el tiempo. Esta mayor estabilidad de la suspensión puede estar asociada al mayor carácter hidrofílico que el de la Bent-Q evidenciado en los resultados anteriores.

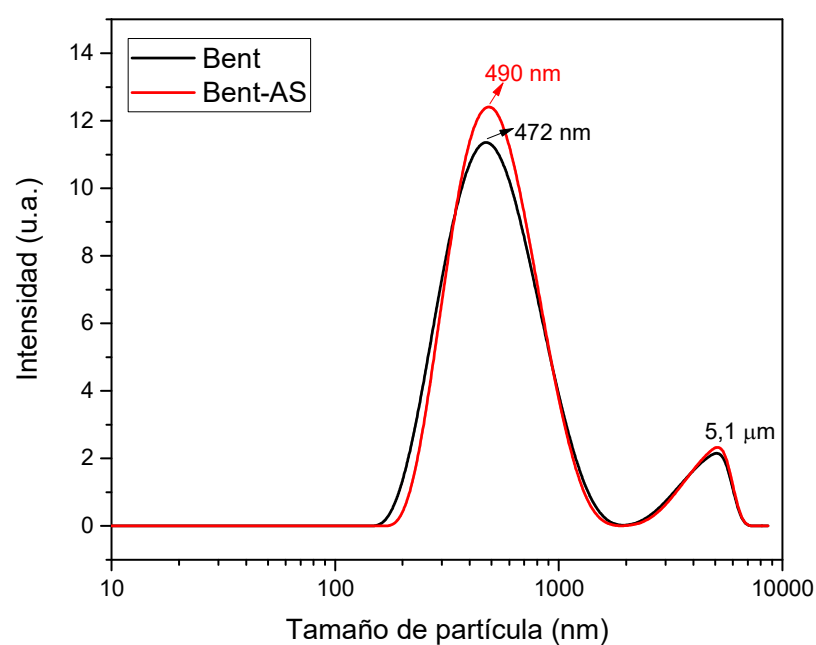


FIGURA 25. CURVA DE DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑO DE PARTÍCULA DE SUSPENSIÓN DE BENT-AS1-5MIN EN AGUA DESTILADA, 1 MG/ML.

De manera complementaria, se analizó por medio de la técnica de microscopía FESEM la microestructura de la BentAS1-5min. En la **Figura 26** se puede observar la microestructura obtenida para esta arcilla. Comparándola con la de la Bent (**Figura 17 a**)), no se logran apreciar grandes diferencias en las láminas ni en la superficie, como sí se podía ver en la Bent-Q. Además, en la **Figura 27** se exhibe la composición química obtenida a partir del ensayo EDS la Bent-AS. Nuevamente, si se compara con la de la Bent (**Figura 18 a**)), no se observan diferencias sustanciales ni cambios de composición, cuando debería encontrarse un mayor % de Carbono, tal como sucedió con el Q. Sin embargo, esto no sería concluyente ya que el AS es una molécula mucho más chica y, según los resultados previos, se habría intercambiado en mucha menor cantidad, como el C es un átomo tan chico, la detección y cuantificación se hace menos confiable y se requeriría algún equipo mucho más preciso. Tampoco se ven cambios significativos en la relación Na/Si, porque en este caso la modificación no se da por intercambio catiónico.

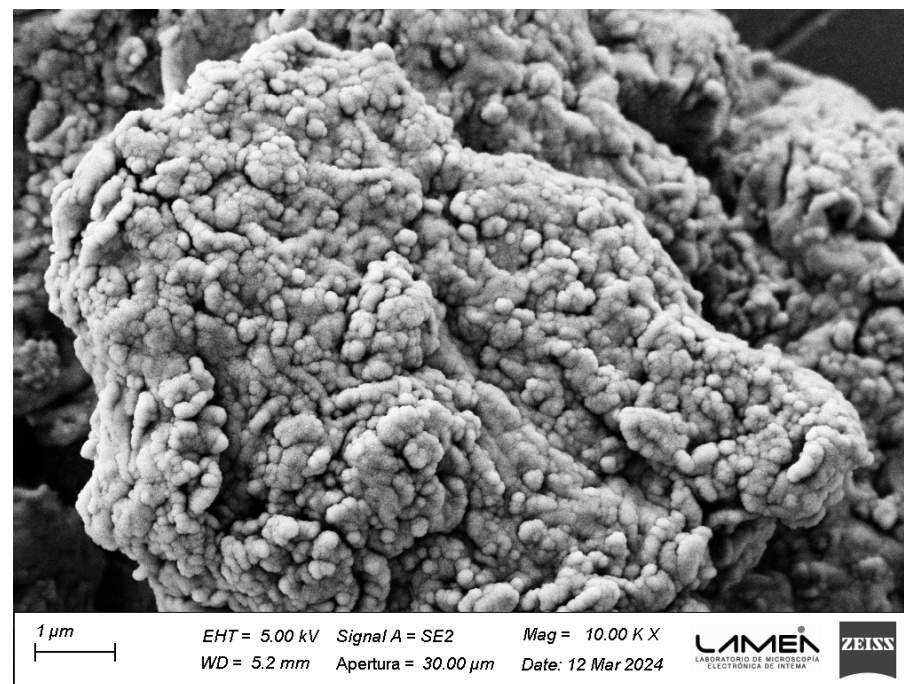


FIGURA 26. MICROSCOPIA SEM DE BENTAS1-5MIN.

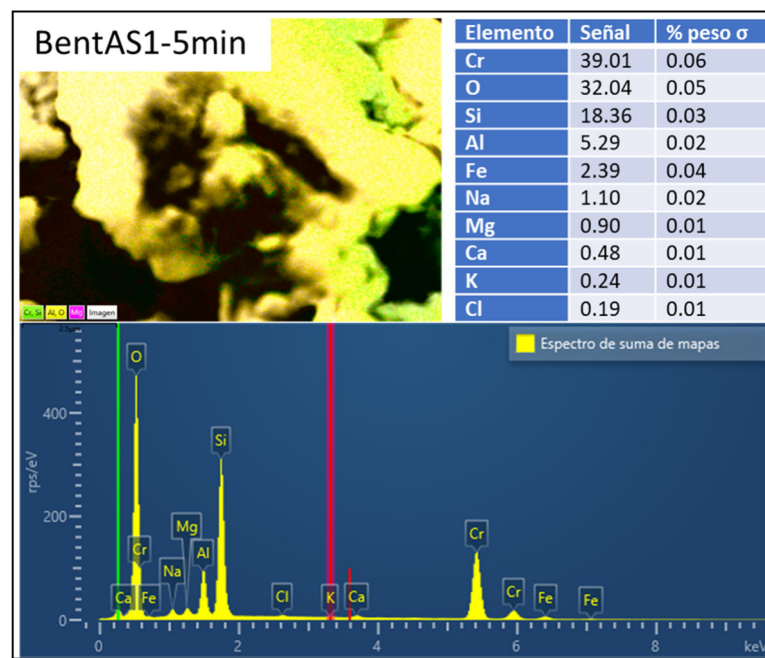


FIGURA 27. MICROANÁLISIS POR EDS DE LA SUPERFICIE DE LAS ARCILLAS Y COMPOSICIÓN ELEMENTAL DE BENT-AS1-5MIN.

### Conclusiones parciales

Los resultados de FTIR, TGA y DRX indicaron que solamente en los ensayos realizados a las BentAS1 el AS se incorpora de manera significativa en la Bent e interactúa con la misma de dos maneras. Una es en el espacio entre capas de la arcilla a través de la formación de complejos con los iones  $Fe^{+3}$  presentes en estas arcillas, y la otra es por adsorción en la superficie de la misma. Mientras que en el resto de las Bent-AS obtenidas a menor temperatura con respecto a lo reportado a escala laboratorio no se observó la incorporación de AS de manera significativa. Se logró optimizar a gran escala los resultados esperados únicamente para el primer lote, en comparación con los que habían logrado Mansilla y col. (2020)<sup>43</sup>. La poca solubilidad que tiene en el agua el AS a temperaturas inferiores a 70°C y la carga aniónica del ion salicilato limitaron las posibilidades de optimizar el proceso de funcionalización de la Bent con AS. Para poder solubilizar al AS en agua es necesario trabajar a temperaturas bastante por encima de la ambiente, dejando una variable importante del proceso fija, que se traduce en un mayor consumo energético. En cuanto al tiempo de reacción, quedó demostrado que la formulación con la que se obtenían los resultados más similares a los obtenidos en el laboratorio fue para la Bent-AS1-5min. Si bien no se logró optimizar completamente el proceso, es una mejora considerable en la búsqueda de disminuir los costos de producción.

Resumiendo, las nanoarcillas obtenidas no concretaron los resultados esperados en cuanto a la reducción de la temperatura del proceso de funcionalización, a diferencia de lo observado en los sistemas Bent-Q, y por ese motivo no se siguió intentando optimizar el proceso en este aspecto realizando distintas formulaciones. No obstante, queda pendiente estudiar el desempeño biológico de las BentAS1 obtenidas con distinto tiempo de reacción para evaluar si, aun teniendo un leve menor contenido de AS, la BentAS1-5min, resulta igualmente efectiva que la BentAS1-60min lo que permitiría al menos reducir el tiempo de reacción.

## CAPÍTULO 5. PROPIEDADES BIOLÓGICAS DE LAS NANOARCILLAS OBTENIDAS EN PLANTA PILOTO

### Introducción

La agroindustria es una actividad estratégica en Argentina. El tomate (*Solanum lycopersicum*) es la segunda hortaliza más consumida en nuestro país, su consumo ronda los 16 kg/persona/año, y es uno de los cultivos que ocupa mayor extensión de suelo y producción<sup>86</sup>. Las principales zonas productoras de tomate son las provincias de Mendoza y San Juan (región cuyana) Salta y Jujuy (región NOA), Corrientes y Formosa (NEA), Río Negro, y Buenos Aires, provincia en la cual se destacan los cinturones hortícolas bonaerense y La Plata, Mar del Plata y Sur de Bs.As<sup>87</sup>. La superficie cultivada varía de año en año, dado que gran parte de los cultivos son anuales; comprende alrededor de 600.000 hectáreas y emplea alrededor de 10 millones de personas por año, lo que la transforma en una de las actividades de mayor valor social. El tomate se cultiva a lo largo de todo el año, en la medida que se puedan controlar diferentes situaciones de estrés. El manejo del tomate varía desde la conducción a campo (cuando las condiciones climáticas lo permiten) hasta el cultivo bajo cobertura, por lo que se pueden distinguir tres sistemas productivos: a campo, semiforzado e invernadero<sup>88</sup>.

Además de su interés económico, el tomate posee ciertas características agronómicas que lo convierten en una planta adecuada para ensayos de experimentación. Algunas de estas características más destacables son: la posibilidad de cultivar tomate en diferentes condiciones, lo que permite comprender la adaptabilidad del tomate a diferentes estreses abióticos, como por ejemplo el estrés salino; su ciclo de vida relativamente corto; su insensibilidad al fotoperíodo, es decir, la capacidad de floración, y posteriormente la producción de semillas independientemente de las condiciones de la duración del día; la facilidad de polinización controlada e hibridación; la simplicidad de su genética con un genoma relativamente pequeño y la falta de duplicación de genes; y su capacidad para propagarse asexualmente por injerto, o para regenerar plantas enteras de diferentes partes de la planta.

El tomate es una planta susceptible a estrés biótico y abiótico. Para enfrentar esta problemática, se recurre a la aplicación de agroquímicos de elevado impacto ambiental a lo largo del ciclo. Se han registrado más de 40 aplicaciones con agroquímicos en un cultivo de tomate convencional a lo largo de su ciclo descuidándose el tiempo de carencia el cual es el tiempo que se debe esperar entre la aplicación del producto y la cosecha. Por ende, la investigación de alternativas ecológicamente más amigables adquiere una gran relevancia.

Las plantas están continuamente sometidas a situaciones bióticas y abióticas adversas, y ante cualquier ataque de patógenos o condición de estrés las plantas cuentan con mecanismos de defensa. Dentro de los mecanismos de defensa de las plantas se pueden enunciar dos tipos: 1) los pasivos y 2) los activos. Los primeros están referidos a las defensas físicas de las plantas como cutículas, tricomas y ceras, así como a las barreras químicas, que consisten en la síntesis de sustancias químicas por parte de la planta antes de cualquier infección por patógenos; tales sustancias son saponinas, alcaloides, proteínas antifúngicas o enzimas inhibidoras. Por otra parte, los mecanismos activos tienen que ver generalmente con la producción endógena o aplicación exógena de elicitores. Estas sustancias, naturales o sintéticas incluyen carbohidratos, lípidos, glicopéptidos y glicoproteínas cuyo objetivo es actuar como activadores de reacciones defensivas, es decir, inducir la producción de fitoalexinas o estimular cualquier mecanismo de defensa de la planta para protegerse. El funcionamiento de

estas sustancias se basa en imitar la acción que producen los microorganismos patógenos al interactuar con la planta, promoviendo diferentes modos de defensa de la planta (**Figura 37**). Estos activan las vías de transducción de señales relacionadas con la defensa a través del reconocimiento de las moléculas que son liberadas durante la interacción planta-patógeno<sup>89</sup>. Una vez percibidos por las células vegetales se producen especies de oxígeno reactivas (ROS), la biosíntesis de fitoalexinas, un engrosamiento de la pared celular de las plantas, la acumulación de proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) y otros metabolitos secundarios<sup>89,90</sup>. La rápida generación de ROS, conocido como explosión oxidativa, conduce a una respuesta hipersensible (HR) que consiste en la muerte celular rápida de las células afectadas y permite delimitar la infección generada por el patógeno. Adicionalmente, esta respuesta puede provocar una resistencia a una infección adicional en partes distales de la planta, fenómeno conocido como resistencia sistémica adquirida (SAR). Por lo tanto, como estrategia para mitigar los efectos del estrés biótico, relacionado a infecciones fúngicas, bacterianas o virales que producen pérdidas importantes en los rendimientos de los cultivos y al mismo tiempo para adoptar una actitud respetuosa con el ambiente, los agricultores podrían incorporar el uso de sustancias capaces de inducir la activación de las vías de defensa de las plantas. Por lo tanto, al aplicar un elicitor en la planta de forma preventiva se ayuda a reducir o evitar daños producidos por enfermedades, plagas o factores abióticos adversos. Por todos estos beneficios que desencadenan, el uso de los elicitores en los cultivos ha crecido notablemente.

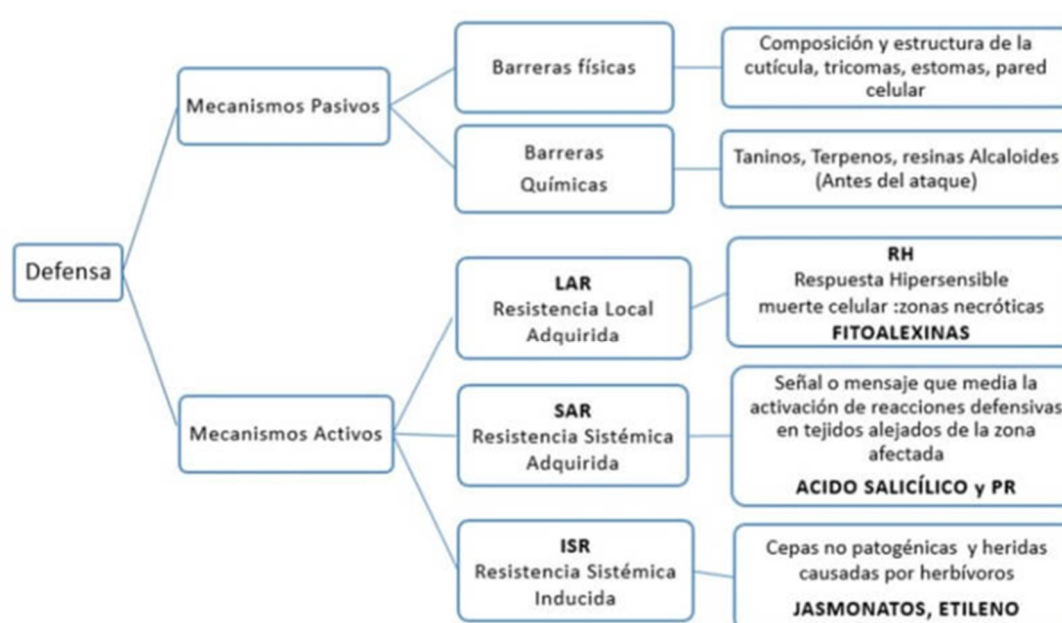


FIGURA 28. RESPUESTA Y MECANISMOS DE DEFENSA DE PLANTAS ANTE SITUACIONES BIÓTICAS Y ABIÓTICAS.

Por otro lado, los estreses abióticos como la salinidad, la sequía y las altas temperaturas tienen efectos indeseables en la productividad y la calidad de los cultivos. La salinidad, en particular, es un factor limitante importante, que provoca un bajo rendimiento con una calidad inferior. El cambio climático se considera uno de los principales factores que contribuyen a la salinización del suelo. La mala calidad del agua de riego es otro factor importante que contribuye a la salinización del suelo. Los efectos adversos de la salinidad han dañado al menos el 20% de los cultivos en todo el mundo<sup>91</sup>. La salinidad está causada principalmente por esta acumulación



excesiva de sales en el suelo, afectando al crecimiento y desarrollo de las plantas. El NaCl es la sal más soluble y extendida que provoca estrés salino a las plantas, por lo que algunas plantas presentan mecanismos de tolerancia<sup>92</sup>. Sin embargo, a veces no resultan lo suficientemente eficientes generando deficiencias nutricionales, alteración del metabolismo y otros daños<sup>93</sup>. El cultivo del tomate en áreas con problemas de salinidad provoca en las plantas diferentes efectos fisiológicos, morfológicos y bioquímicos, tales como disminución de la fotosíntesis, un menor peso de los frutos y cambios cuantitativos y cualitativos en la síntesis de proteínas por cambios en la expresión de genes a causa de la salinidad <sup>94</sup>(Figura 29). La magnitud de las respuestas de las plantas se encuentra estrechamente relacionada a la concentración de las sales, a la duración del estrés a que están expuestas y a la especie o cultivar que se trate. A nivel de germinación, a medida que aumenta la concentración de sales en el medio, el porcentaje de germinación disminuye y se prolonga el tiempo en el cual las semillas llevan a cabo este proceso<sup>95</sup>. A nivel de raíces, las sales alteran la absorción de agua fenómeno que se denomina componente osmótico, y sería el efecto inicial que padecen las plantas afectando el crecimiento de estos órganos; por lo que éstas alcanzan una menor longitud de modo que el volumen de suelo que prospectan es menor. También se desencadenan desequilibrios iónicos en las plantas por la excesiva absorción de sodio y cloruros, los que generan efectos secundarios como problemas de toxicidad y nutricionales vinculados a la absorción de iones esenciales para el crecimiento y desarrollo de las plantas<sup>96</sup>. La parte aérea de las plantas de tomates igualmente es afectada por la salinidad: las plantas alcanzan una menor altura, las hojas se presentan en menor número y a la vez manifiestan una disminución en su densidad estomática en la cara adaxial, presentan clorosis y necrosis principalmente en los bordes de las hojas. El área foliar también disminuye<sup>97</sup>. Los frutos se afectan adversamente en su rendimiento<sup>98</sup>, pero positivamente en cuanto a algunos atributos organolépticos y/o de interés para la agroindustria, puesto que presentan un mayor contenido de compuestos solubles, sólidos totales, acidez titulable y carotenoides<sup>92</sup>. Se encontró que la aplicación de hormonas vegetales exógenas en plantas estresadas por sal alivia los efectos negativos de la salinidad en las características morfológicas (área foliar, masa seca), fisiológicas (contenido de clorofila, conductancia estomática, tasa fotosintética) y rendimiento de los cultivos mencionados<sup>99</sup>.

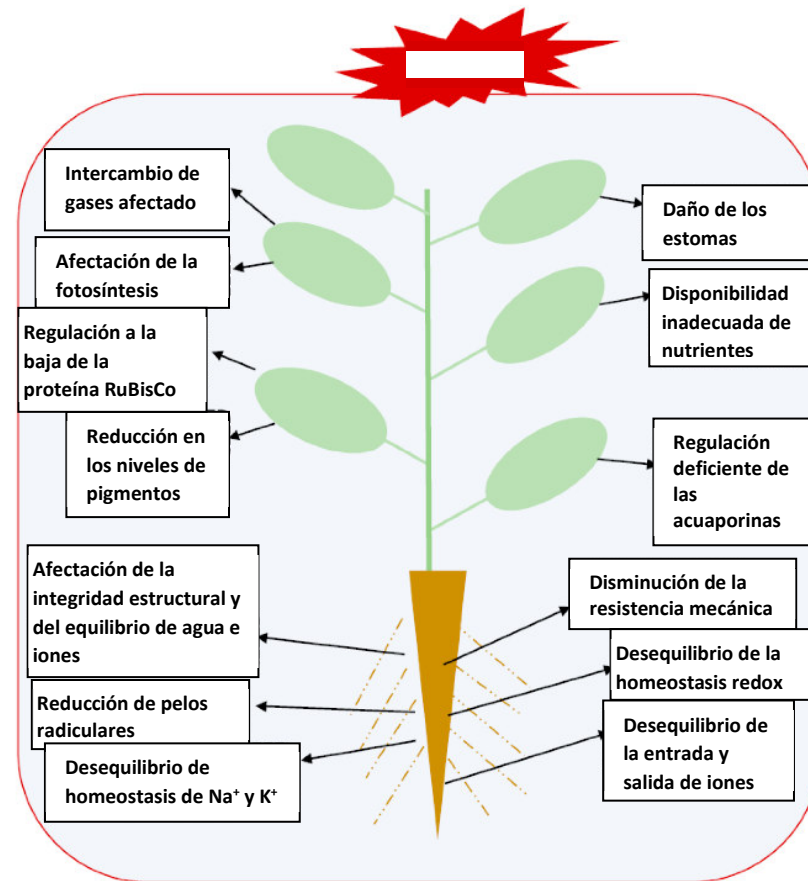


FIGURA 29. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LOS DAÑOS CAUSADOS POR ESTRÉS SALINO EN PLANTAS DE TOMATE.

La producción de tomates orgánicos libre de agroquímicos ofrecería un nicho productivo de reconocido valor social y ambiental. Ante el sostenido crecimiento de la demanda mundial de alimentos orgánicos, existen en nuestro país, grandes posibilidades para este tipo de producción. Sin embargo, las alternativas de productos disponibles a los agroquímicos tradicionales para los cultivos orgánicos son aún escasas. Por lo tanto, el objetivo planteado en el presente capítulo consiste en evaluar la efectividad de las arcillas funcionalizadas en escala planta piloto como promotoras de crecimiento y/o inductoras de tolerancia a estrés salino en plantas de tomate. Los ensayos fueron realizados en el laboratorio del Fisiología del Estrés en Plantas del Instituto de Investigaciones Biológicas en colaboración con la Dra. A. Yamila Mansilla.

## Parte experimental

### Material Vegetal

Se emplearon semillas de tomate correspondientes a la especie *Solanum lycopersicum L. cv. Platense*. El tomate criollo 'Platense' es una variedad local que se adaptó durante la década de 1930 a las propiedades climáticas y del suelo de la franja hortícola de La Plata<sup>100</sup>.

### Ensayos de inducción de las proteínas de defensa

Se estudiaron las propiedades de inducción de los mecanismos de defensa de las plantas ante la aplicación de nanoarcillas funcionalizadas. Para ello, se analizaron los niveles de la enzima quitinasa (PR3) como marcador de defensa inducida. Las quitinasas han sido descritas como enzimas hidrolíticas fuertemente asociadas con los mecanismos de defensa de las plantas contra estrés biótico<sup>101</sup>. Las quitinasas hidrolizan los enlaces  $\beta$ -1,4 de polímeros de N-acetil glucosamina presentes en componentes de las paredes celulares de microorganismos y plantas. Estas proteínas inhiben el crecimiento y desarrollo de patógenos e hidrolizan polímeros en las paredes celulares de las plantas que amplifican la respuesta de defensa contra patógenos<sup>102</sup>. Estudios anteriores revelaron que el Q podía inducir resistencia al aumentar las actividades de  $\beta$ -1,3-glucanasa y quitinasa en pepinos, peras y duraznos<sup>103-105</sup>.

Para evaluar las propiedades de inducción de las nanoarcillas obtenidas a escala planta piloto, se obtuvieron extractos proteicos a partir de plántulas de tomate de 10 días tratadas por spray foliar con 1 mg/ml de las distintas arcillas. Se utilizaron los lotes 2, 3 y 4 de las Bent-Q preparadas con 5 minutos de reacción y la BentAS15min. Se seleccionó la concentración de 1 mg/ml por los antecedentes previos con Bent-Q obtenido a escala laboratorio <sup>46</sup>. Las plántulas se esprayearon con agua como control negativo (C). Luego de 24 hs de tratamiento, se extrajeron proteínas solubles. Las proteínas se analizaron por SDS-PAGE y transfirieron a una membrana de nitrocelulosa para su detección con el anticuerpo anti quitinasa (PR3).

### Ensayo de salinidad – Tratamiento a las semillas de tomate – *Priming* de la germinación

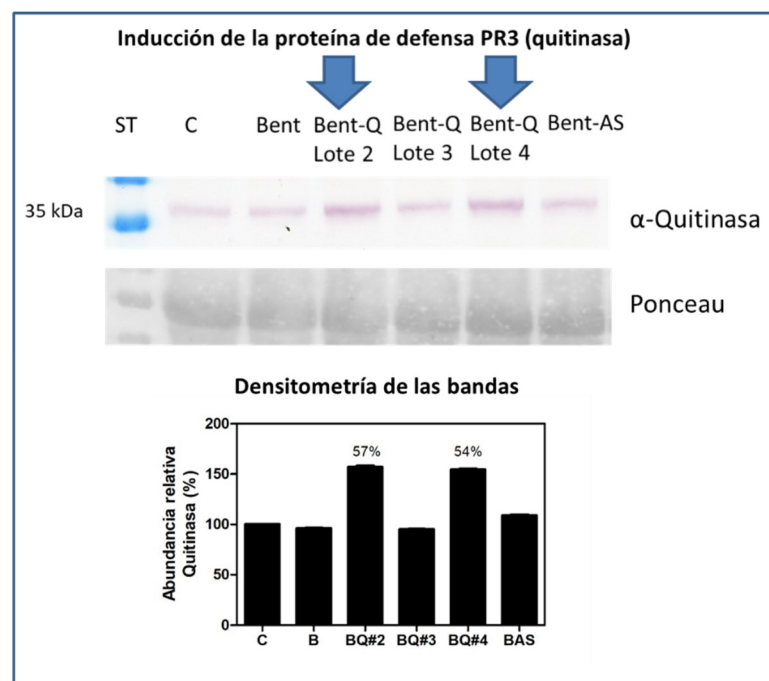
Las semillas de tomate fueron tratadas con suspensiones de arcillas obtenidas a escala planta piloto (1 mg/ml), durante 15 minutos con agitación. Luego se secaron en papeles de filtro a temperatura ambiente durante 24 hs. Finalmente, se colocaron las semillas en papeles de filtro embebidos en agua (control) o 50 mM NaCl (estrés salino leve). A los 2, 4 y 6 días post-imbibición de las semillas se evaluó el % de germinación (100% corresponde al total de las semillas colocadas en cada placa).

## Resultados y discusión

Como se destacó anteriormente, la aplicación de soluciones con Q y AS presenta diversas limitaciones. En este sentido, la inmovilización de estos principios activos en Bent otorga una gran versatilidad en su forma de aplicación y en su efecto a lo largo del tiempo.

### Capacidad elicitor de las diferentes arcillas

En la **Figura 30** se muestra el análisis inmunoquímico de la proteína relacionada con la patogénesis PR3 ( $\alpha$ -quitinasa) para las plántulas de tomate tratadas con las distintas arcillas Bent-Q y Bent-AS obtenidas y los controles de agua (C) y Bent (B).



**FIGURA 30. ANÁLISIS INMUNOQUÍMICO DE LA PROTEÍNA RELACIONADA CON LA PATOGÉNESIS PR3. EN EL PANEL INFERIOR, SE MUESTRA EL CONTROL DE CARGA PARA UNA PROTEÍNA DESCONOCIDA TEÑIDA POR PONCEAU. EN EL HISTOGRAMA, SE EXPRESA LA ABUNDANCIA RELATIVA DE LAS ISOFORMAS DE QUITINASAS MOSTRADAS EN EL PANEL SUPERIOR.**

Se observó un aumento del 57% y 54% de la proteína PR3, en las plántulas de tomate tratadas con las Bent-Q de los lotes 2 y 4, respectivamente (ambas 5 minutos), con respecto al control con agua. Esto indica que ambas nanoarcillas poseen asociada la actividad de elicitor o de inductor de los *mecanismos* de defensa de las plantas mediados por las proteínas PRs. Debido a que no se observó actividad biológica en Bent-Q3-5 min, se realizó un nuevo bioensayo incluyendo el tiempo de 15 min (dato no mostrado). No se detectó actividad inductora de PR3 en ninguna de las dos, al menos en las condiciones ensayadas.

Por otro lado, para la Bent-AS no fue posible detectar actividad biológica mediante este bioensayo. El hecho de no registrar actividad biológica en la Bent-AS o en las Bent-Q3 no es concluyente, ya que se ha visto en otros casos que con 48 hs de inducción sí se ha podido detectar actividad biológica.

#### Ensayo de salinidad – Tratamiento a las semillas de tomate – Priming de la germinación

En la **Figura 31 (a-b)** se muestran las gráficas del efecto del pre-tratamiento de las semillas con diferentes bentonitas funcionalizadas sobre la germinación de las plántulas de tomate en condiciones salinidad (NaCl 50 mM) en comparación al control con H<sub>2</sub>O. Se cuantificaron las semillas germinadas a los distintos tiempos y se expresaron como % germinación, donde el 100 % representa el total de las semillas colocadas por placa. Los resultados se expresaron como promedio de tres ensayos independientes. Por otro lado, las **Figuras 32 y 33** muestran imágenes representativas de uno de los ensayos a los 4 días de su imbibición en agua (control) y en 50 mM NaCl, respectivamente.

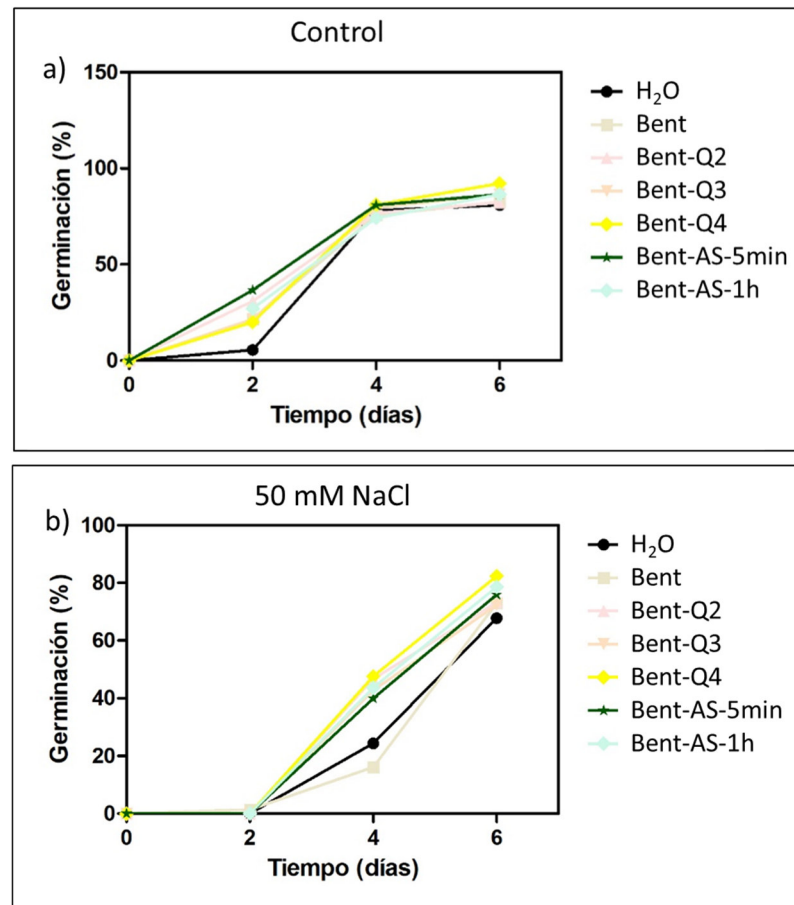


FIGURA 31. EFECTO DEL PRE-TRATAMIENTO DE LAS SEMILLAS CON DIFERENTES BENTONITAS FUNCIONALIZADAS SOBRE LA GERMINACIÓN DE LAS PLÁNTULAS DE TOMATE EN CONDICIONES DE: (A) CONTROL CON H<sub>2</sub>O Y (B) SALINIDAD (NaCl 50 mM).

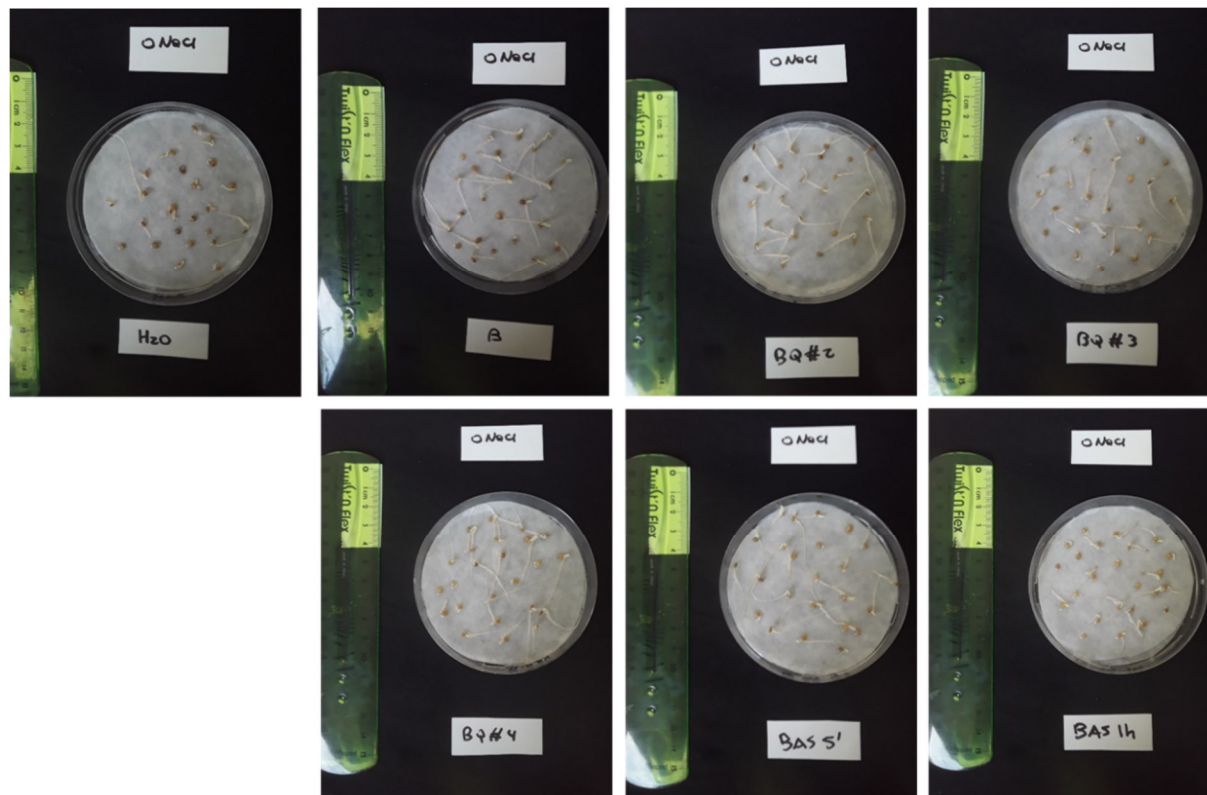


FIGURA 32. IMÁGENES REPRESENTATIVAS DE UNO DE LOS ENSAYOS A LOS 4 DÍAS DE SU IMBIBICIÓN EN AGUA (CONTROL).

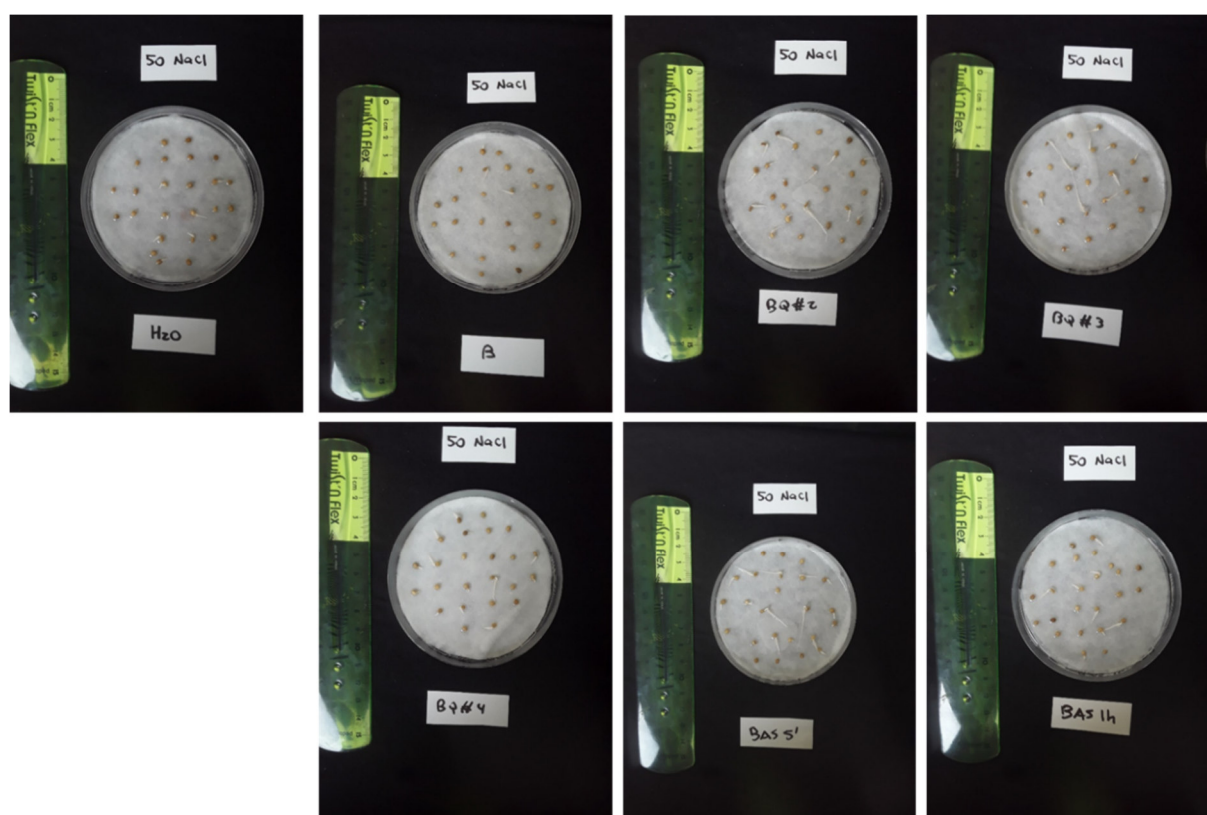


FIGURA 33. IMÁGENES REPRESENTATIVAS DE UNO DE LOS ENSAYOS A LOS 4 DÍAS DE SU IMBIBICIÓN EN 50 MM NaCl.

A los 2 días luego de la imbibición, las semillas de tomate crecidas en condiciones control (H<sub>2</sub>O), tratadas con las todas las nanoarcillas analizadas, mostraron mayor índice germinativo respecto a las semillas controles. Siendo este aumento mayormente significativo el tratamiento con Bent-Q2 y Bent-AS1-5 min. Al cuarto día

dichos índices fueron semejantes evidenciándose que los biocompuestos analizados tienen un efecto de inducción o de “priming” de la germinación. En las semillas de tomate crecidas en condiciones de salinidad leve (50 mM NaCl), se observó un retraso considerable en la germinación. Al cuarto día se obtuvieron porcentajes de germinación cercanos al 30% para las semillas pre-tratadas con H<sub>2</sub>O y Bent como control. Sin embargo, las semillas pre-tratadas con las Bent funcionalizadas con Q y AS mostraron incremento en el índice de germinación de entre el 100 al 200% respecto al control con agua. Al sexto día dichos índices fueron semejantes evidenciándose nuevamente que los biocompuestos analizados tienen un efecto de *priming* de la germinación en condiciones de estrés salino. El adelanto en la germinación inducido por el efecto *priming* de los biocompuestos no solo favorece una emergencia temprana de las semillas bajo condiciones de estrés salino, sino que también contribuye a un establecimiento más rápido y vigoroso de las plántulas. Esto mejora su capacidad de adaptación al entorno adverso, incrementando el potencial de crecimiento y supervivencia a lo largo del ciclo de vida de la planta.

### Conclusiones parciales

Los resultados obtenidos en este capítulo confirman las observaciones de los capítulos anteriores, demostrando que las distintas formulaciones desarrolladas en los capítulos 3 y 4 mantienen la actividad biológica, siendo capaces de activar los mecanismos de defensa en plántulas de tomate y promoviendo la germinación en situaciones de estrés.

Por un lado, las Bent-Q demostraron tener propiedades similares en cuanto a la inducción de la expresión de la proteína de defensa PR3, excepto la Bent-Q3, que no mostró los resultados esperados y no coincidió con lo observado en las caracterizaciones previas. Sin embargo, estos resultados no son concluyentes, ya que la falta de respuesta de Bent-Q3 podría deberse a la necesidad de un mayor tiempo de inducción para activar el efecto elicitor.

Por otro lado, las Bent-AS siguen mostrando resultados variables. Si bien demostraron mejorar el índice de germinación en condiciones de estrés salino, no se evidenció la activación de los mecanismos de defensa mediados por la proteína PR3. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, esos resultados no son concluyentes y deberían ensayarse diferentes tiempos de inducción.

## CAPÍTULO 6. ESTUDIO DE FACTIBILIDAD ECONÓMICA

### Definición del mercado

La utilización de agroquímicos ha experimentado un notable incremento en los últimos 25 años, atribuido a la expansión de la actividad agrícola y al aumento en la producción. En Argentina, el consumo de agroquímicos y fertilizantes aumentó un 13% en el año 2022 con respecto a 2016, según el Informe de Cadenas de Valor de Agroquímicos e Insumos presentado por el Ministerio de Economía de la República Argentina<sup>106</sup>. Aproximadamente el 63% de este consumo fue producto de importaciones. La valoración de los agroquímicos y fertilizantes importados totalizó aproximadamente 2.766 millones de dólares, frente a los 1.846 millones de dólares importados en 2017, lo que representa un incremento del 50%<sup>106</sup>.

El segmento con mayor facturación entre los distintos tipos de fitosanitarios es el de los herbicidas, cuyo componente principal es el glifosato. Le siguen en orden de importancia los insecticidas, los fungicidas, los cura-semillas y los coadyuvantes, como se evidencia en la **Figura 34**. El 75% del mercado mundial está dominado por cuatro grandes multinacionales: Chemchina-Syngenta (China), Bayer-Monsanto (Alemania-EE.UU.), BASF (Alemania) y Corteva Agriscience (Estados Unidos - Francia). Las estrategias de estas empresas ejercen una significativa influencia en los flujos comerciales globales.

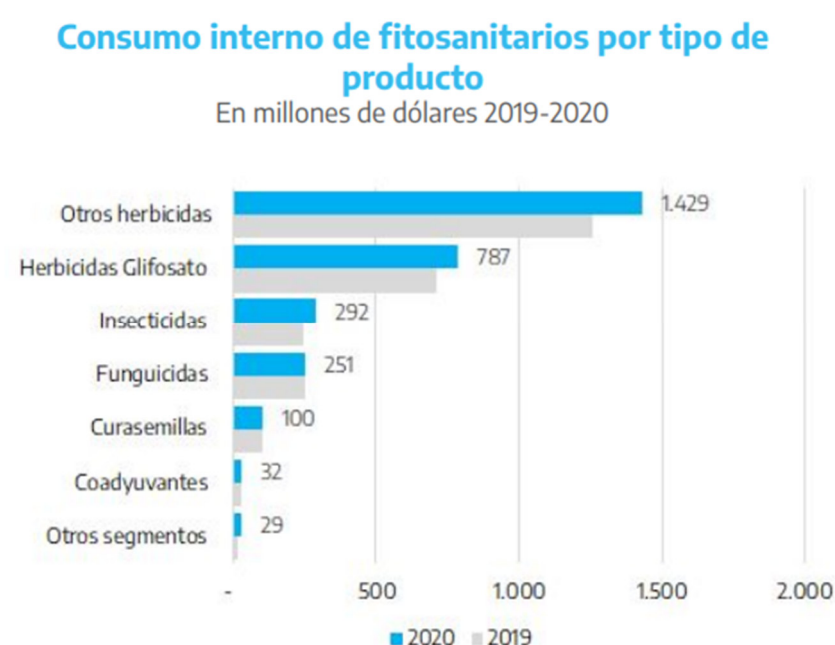


FIGURA 34. CONSUMO INTERNO DE FITOSANITARIOS POR TIPO DE PRODUCTO. FUENTE: MINISTERIO DE ECONOMÍA DE LA REPÚBLICA ARGENTINA<sup>106</sup>.

El mercado argentino de fitosanitarios está mayormente abastecido por empresas multinacionales, incluyendo a Monsanto, Bayer, Syngenta, DuPont, Dow y Basf, las cuales forman parte de la Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes (CASAFE), junto con otras 23 organizaciones.

Los Productos de Protección y Control (PPC) son compuestos que están ganando cada vez más atención en la agricultura moderna, principalmente debido a su inocuidad ambiental y alimentaria. Sin embargo, su



clasificación según las normativas nacionales o internacionales de agroinsumos tradicionales (fitosanitarios, bioestimulantes, biopesticidas, entre otros) resulta desafiante, dado que poseen propiedades combinadas de varios de estos productos. Asimismo, y a los fines de analizar y acotar el mercado, se tomó en cuenta su pertenencia al mercado de bioestimulantes, aunque podrían pertenecer a más de un segmento.

Un reciente informe de mercado de Future Market Insights (FMI) pronostica que el mercado global de bioestimulantes alcanzará los 4.109,5 millones de dólares en 2025<sup>107</sup>. Dentro de este mercado, América Latina experimenta un rápido crecimiento, con estimaciones de tasas de crecimiento anual compuestas de dos dígitos y perspectivas futuras prometedoras en términos de desarrollo, producción y comercialización.

Considerando que se espera un incremento del consumo global de fertilizantes del 0,8-1% en las próximas décadas, mientras que el mercado global de bioestimulantes está experimentando tasas de crecimiento del 12% o superiores<sup>108</sup>, se evidencia el considerable interés técnico y comercial que estos productos demandan en la agricultura del siglo XXI. En América Latina, Brasil, México y Argentina son los principales consumidores de bioestimulantes, representando el 43%, 24% y 15% del mercado, respectivamente<sup>109</sup>. Según la información de la Cámara Argentina de Bioinsumos (CABIO), basada en registros de SENASA (2018), en el país hay 88 empresas productoras de inoculantes/bioinductores con 653 marcas comerciales, y 15 empresas de biocontroladores que ofrecen 27 tipos de productos<sup>110</sup>. Sin embargo, muchos de estos productos no están disponibles en el mercado local, ya que 91 están registrados exclusivamente para la exportación, y algunos han sido reemplazados por nuevas marcas comerciales. La mayoría de los inoculantes están diseñados para la soja y otras leguminosas, y la mayoría de ellos están registrados bajo producción nacional.

En general, el mercado está dominado por empresas argentinas, que conviven con algunas empresas transnacionales. De las 88 empresas presentes en el mercado nacional, el 75% son argentinas, que van desde pequeños laboratorios regionales hasta productores y distribuidores de agroquímicos<sup>110</sup>.

### Segmentación del mercado

En la **Figura 35** se presenta el ranking de facturación de empresas de agroquímicos en Argentina. Se destaca la presencia de Atanor, Agrofina, Rizobacter y Red Surcos como las empresas con mayor participación en el mercado, ninguna de las cuales ofrece agroinsumos basados en Bent.

Ranking	Companies	2019 Sales (USD million)
1	Atanor	284.0
2	Agrofina	118.0
3	Rizobacter	111.3
4	Red Surcos	107.0
5	ACA	96.0
6	Tecnomyt	66.7
7	Sigma-Agro	40.0
8	YPF	30.0
9	GLEBA	27.0
10	Lanther Quimica	20.0

FIGURA 35. FACTURACIÓN DE EMPRESAS DE AGROQUÍMICOS EN ARGENTINA EN EL AÑO 2019<sup>111</sup>.

Los productos tendrán prioritariamente como mercado estratégico a los grandes productores frutihortícolas que adhieran a prácticas verdes o sustentables en el manejo de sus cultivos tanto del mercado nacional como internacional, fundamentalmente por su gran capacidad de compra y su relativa baja sensibilidad al precio. Sin embargo, no se descartan los pequeños productores o intermediarios.

La primera segmentación para este mercado tiene que ver con la naturaleza de la actividad llevada a cabo, como por ejemplo, plantación de oleaginosas, de hortalizas, de frutas, de algodón y de caña de azúcar. Por otro lado, dentro de cada sector productivo se demanda una gama de productos que satisfacen necesidades complementarias y se debe tener en cuenta además la peligrosidad de estos agroquímicos. Por lo tanto, la nanoarcilla Bent-Q se centrará en satisfacer las necesidades del mercado de fungicidas, fitorreguladores y antibióticos de banda verde aptos para la aplicación sobre cultivos frutihortícolas.

Asimismo, en la **Figura 36** se presenta un análisis sobre los diferentes segmentos presentes en el mercado.

		Grandes productores agrícolas	Pequeños productores agrícolas	Consumidores domésticos
<b>Perfil del segmento</b>	Sensibilidad al precio	Baja	Media	Alta
	Productos solicitados	Específicos	Estándar	Estándar
	Volumenes de compra	Altos	Medios	Bajos
	Poder de negociación	Moderado	Bajo	Bajo
<b>Factores clave de éxito</b>	Rendimiento	4 (mayor)	3	1 (menor)
	Calidad	3	2	2
	Precio	2	3	4
	Asesoramiento técnico	3	4	4
<b>Mercado</b>	Financiación	3	4	1
	Tamaño	> 65%	30%	< 5%
	Participación	Aún no comercializado	Aún no comercializado	Aún no comercializado
	Competencia	Media	Media	Fuerte

FIGURA 36. MICROSEGMENTACIÓN DEL MERCADO NACIONAL DE FITOSANITARIOS<sup>112</sup>.

La empresa definirá como segmento estratégico prioritario a los grandes productores del sector, debido a su elevada capacidad de compra y a su relativamente baja sensibilidad al precio, mientras que los pequeños productores se ubicarán dentro del segmento estratégico sin ser prioritarios debido a su menor capacidad de compra. Por último, los consumidores domésticos (línea jardín) no representarán segmentos estratégicos para la empresa, debido a su elevada sensibilidad al precio, a la discontinuidad de su consumo y a los reducidos volúmenes demandados<sup>113</sup>.

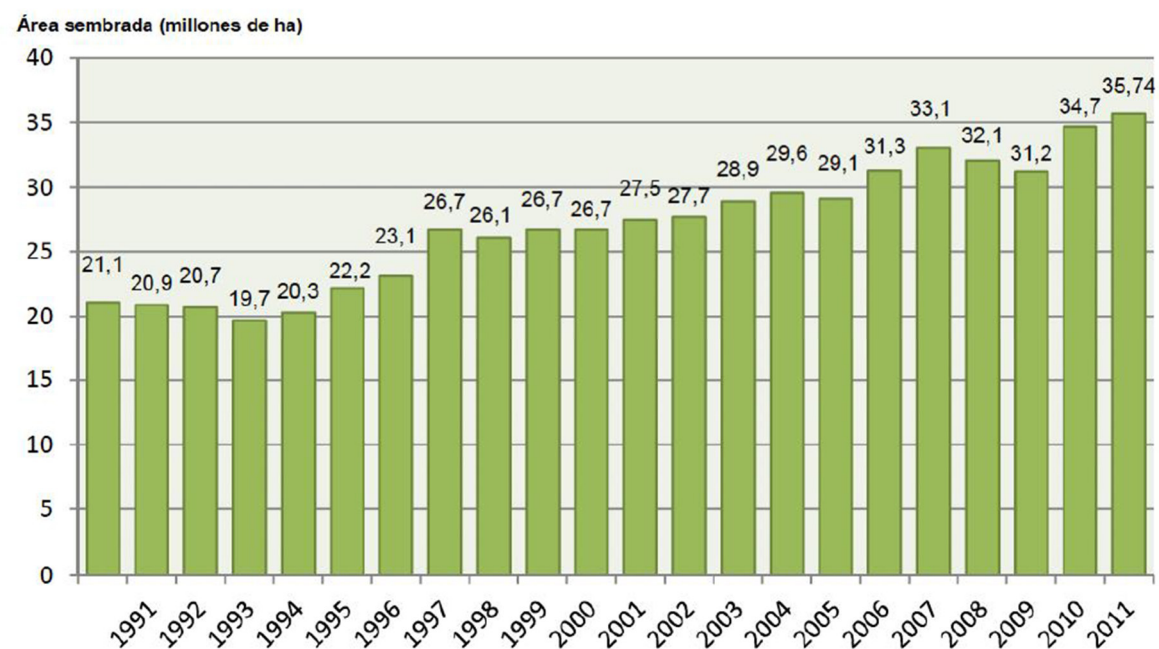


FIGURA 37. ÁREA SEMBRADA EN MILLONES DE HECTÁREAS<sup>114</sup>.

En la **Figura 37** se muestra la cantidad de área sembrada en millones de hectáreas desde el año 1991 hasta el 2011.

En Argentina, los principales cultivos agrícolas son los de soja, maíz y trigo. En la **Figura 38** se puede ver los cultivos realizados en el país.

El sector frutihortícola compone el 3,66% de los cultivos en el país según los datos de la bolsa de cereales de Buenos Aires y Rosario (2021).

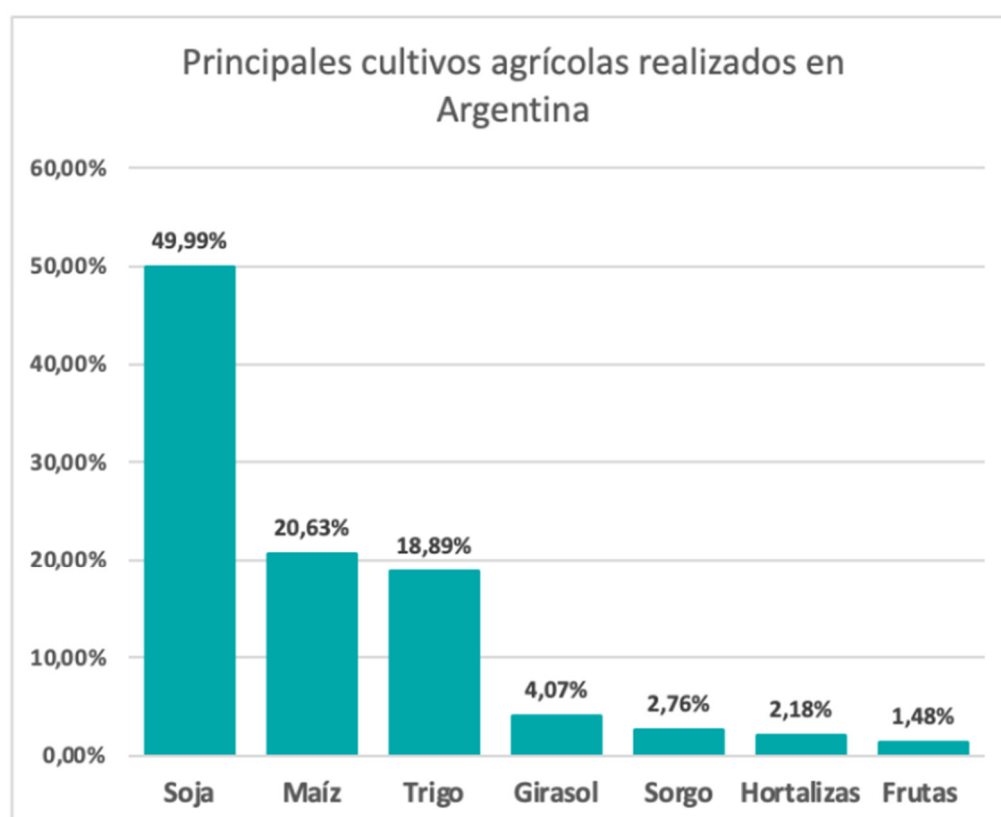


FIGURA 38. PRINCIPALES CULTIVOS AGRÍCOLAS REALIZADOS EN ARGENTINA<sup>115</sup>.

La demanda nacional que tendrán los agroinsumos PPC dependerá directamente de la cantidad de hectáreas cultivadas dedicadas a la producción frutihortícola, de la participación objetivo en el mercado y de la cantidad de producto que deba ser aplicada por cada hectárea. Por esta razón resulta necesario hacer una estimación del área que será sembrada en los próximos 8 años a partir de los datos históricos mediante una regresión lineal que se presenta en la **Tabla 11**.

TABLA 12. PROYECCIÓN DE ÁREA SEMBRADA EN LA ARGENTINA (EN MILLONES DE HECTÁREAS).

2022	2023	2024	2025	2026	2027	2028	2029
42.66	43.39	44.12	44.85	45.58	46.31	47.04	47.77

Considerando que un 3,66% del área sembrada pertenece al sector frutihortícola, se ajustan los datos y se presentan en miles de hectáreas en la **Tabla 12**.

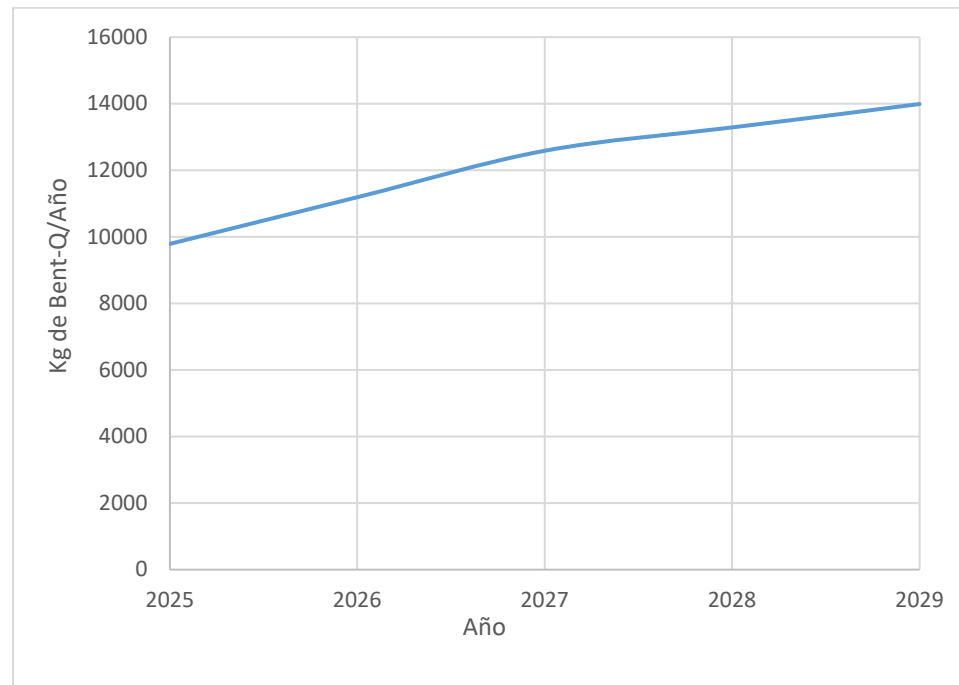
TABLA 13. PROYECCIÓN DE ÁREA SEMBRADA (EN MILES DE HA) EN LA ARGENTINA CORRESPONDIENTE AL SECTOR FRUTIHORTÍCOLA.

2022	2023	2024	2025	2026	2027	2028	2029
1561	1588	1615	1641	1668	1695	1722	1748

### Ingeniería de producción

Aunque pueda considerarse viable la aplicación de los compuestos PPC para satisfacer las demandas del sector frutihortícola argentino, es necesario tener en cuenta la amplia diversidad de productos presentes en el mercado que buscan cumplir con esas mismas necesidades. Por consiguiente, al estimar la demanda de las Bent funcionalizadas, es crucial considerar su participación en las ventas dentro de dicho mercado. En el contexto de un proyecto a cinco años, se emplearán los datos de la **Tabla 12** correspondientes al año 2025 en adelante.

Los estudios preliminares indican que el producto obtenido se debe diluir con agua a razón de 1 mg/ml y que se considera que se debe aplicar el producto dos veces por campaña, con una aplicación de 400 litros/ha por dosis. Por lo tanto, 800 g de Bent-Q son suficientes para una campaña por cada ha. Se proyecta abarcar el 1% del mercado del sector frutihortícola en el último año del proyecto. Por lo tanto, se estima que las cantidades de producto vendidas al mercado nacional durante los próximos años serán las indicadas en la **Figura 39**.



**FIGURA 39. PROYECCIÓN DE VENTAS DEL PROYECTO.**

Luego de haber llevado a cabo un estudio de mercado y una estimación de la participación del producto en el mismo, se realizó un análisis de la ingeniería de producción. En base a los métodos utilizados para la síntesis del material en el laboratorio y los resultados exhibidos en la **Figura 39**, se diseñó una planta para la producción de Bent-Q.

Con el objetivo que los resultados puedan reflejar de manera más objetiva la realidad, se definió realizar el análisis económico financiero en moneda extranjera. Para ello se tomó como base para el análisis el dólar estadounidense (USD 1 = \$900).

### Capacidad de la planta

La capacidad de la planta representa la producción anual máxima que alcanza la planta en su configuración establecida, y el porcentaje de utilización es el nivel de producción de la planta en relación a la

capacidad misma. Por lo tanto, se debe establecer un punto de operación máximo a partir del cual se diseñará el proceso de producción y determinará el equipamiento y configuración necesarios para alcanzar ese punto de operación.

La planta se diseñó con una capacidad de producción de 14.000 kg por año de BentQ, que se fabricará en jornadas de 9 horas diarias, 22 días al mes durante todos los meses del año. De este modo, se estima una capacidad máxima de 53 kg/día. La utilización máxima de la planta de producción será de 13.986 kg de BentQ al año. En la **Tabla 13** se puede observar la evolución del proyecto con el % de utilización de la planta y su producción total anual.

**TABLA 14. EVOLUCIÓN DEL PROYECTO.**

<i>Año</i>	<i>Utilización (%)</i>	<i>Producción (Kg/año)</i>
1	70	9.790
2	80	11.189
3	90	12.588
4	95	13.287
5	100	13.986

#### **Inversión requerida**

La inversión requerida (o inversión total, IT) para poner en operación el proyecto se divide en dos componentes principales: la inversión fija total (IFT) y el capital de trabajo (IW).

La inversión fija total está compuesta por el presupuesto necesario para adquirir el equipamiento y construir la planta de producción (inversión fija, IF) y el valor del terreno en el cual se construye la planta. Para calcular la IF, se utilizó el método de estimación por factores; de este modo, la IF se calcula utilizando el valor de los equipos instalados (IE) y una serie de factores que abarcan los componentes de inversión directa ( $f_i$ ) e inversión indirecta ( $f_{ii}$ ).

Para llevar a cabo el proceso productivo, acorde con los volúmenes de producción pronosticados, se requerirán los siguientes equipos:

- Estufa industrial: Necesaria para secar la Bent durante 24 hs antes de ser utilizada y disminuir sus % de humedad.
- Tamiz industrial: se utiliza para obtener un tamaño uniforme de partícula de la Bent.
- Reactores: allí se preparan las soluciones y se lleva a cabo la reacción química. Se controlan allí las variables críticas del proceso, como temperatura y velocidad de agitación. Se dispondrá de un reactor de 50 litros donde se preparará la solución de Q, y otro de 400 litros donde se preparará la Bent y se producirá la reacción química, luego de agregarse la solución de Q.
- Centrífuga industrial: se utiliza para separar el agua de la Bent-Q durante los lavados del producto.
- Secador por spray: necesario para el secado de Bent-Q.

- Elevador hidráulico manual: necesario para llevar a cabo movimientos de equipos, materias primas y/o productos terminados.
- Balanza analítica: necesaria para el pesaje de precisión de reactivos químicos.

Para cada uno de los equipos mencionados, se detallan sus especificaciones y precios de compra, incluyendo costos de nacionalización y fletes en la **Tabla 14**.

**TABLA 15. COSTOS DE EQUIPAMIENTO DE LA PLANTA DE PRODUCCIÓN.**

	<i>Marca</i>	<i>Modelo</i>	<i>Consumo (kW)</i>	<i>Características</i>	<i>Cantidad</i>	<i>Precio (USD)</i>
<i>Estufa industrial</i>	Haida <sup>116</sup>	HD-E804 (9075A)	1.1	-	1	2.500
<i>Tamiz industrial</i>	Shengxiang <sup>117</sup>	150	0.15	-	1	800
<i>Reactor con agitador secundario</i>	Touch Science <sup>118</sup>	DJR-400L	0.75	Capacidad: 400L	1	6.000
<i>Reactor con agitador principal</i>	Touch Science <sup>119</sup>	S-50L	0.09	Capacidad: 50L	1	4.000
<i>Centrífuga industrial</i>	CONOVAL <sup>120</sup>	DHY/DH C 270	7.5	Capacidad: 500L	1	11.800
<i>Secador por spray</i>	Shinma <sup>121</sup>	LPG-500	80	Capacidad: 500 kg/h	1	76.000
<i>Balanza</i>	Distribal <sup>122</sup>	BV200-DB50-EC	-	Capacidad: 200kg	1	800
<i>Autoelevador</i>	Michigan <sup>123</sup>	ME2 545 T	-	Capacidad: 2.5 Ton	1	17.000
<b>Total General</b>						<b>118.900</b>

En la inversión en equipamiento se debe incluir el costo de instalación, que depende de la complejidad de los equipos y de la planta diseñada. En este caso, la inversión necesaria para la instalación de los equipos puede estimarse en un 37.5% del costo de equipos, debido a que se trata de equipos de ingeniería compleja. Por lo tanto, la inversión en equipos principales de proceso se puede estimar en USD 163.488. De acuerdo con los cálculos realizados empleando el método de estimación por factores se encontró que será necesaria una inversión fija estimada de **USD 772.478**.

Para calcular la IFT (**Ecuación 3**) se debe sumar a la IF el valor del terreno. La planta de producción estará localizada en el Parque Industrial de la ciudad de Mar del Plata, que cuenta con lotes de distintas dimensiones aptos para la construcción de plantas de producción de diversas industrias. El predio cuenta con acceso a las redes de energía eléctrica, gas natural, cloacas y desagüe pluvial, que minimizan los costos para acceder a los servicios básicos. A su vez, el municipio de General Pueyrredón cuenta con políticas que fomentan el desarrollo económico e industrial como la exención de algunas tasas e impuestos municipales (Seguridad, Higiene y Servicios Urbanos) y provinciales (Ingresos Brutos, Inmobiliario y Automotor). Estos beneficios,

sumados a la cercanía a la ciudad y la comunicación con el resto de la región convierten al Parque Industrial en la opción más viable a la hora de realizar un proyecto de inversión con bases en la ciudad de Mar del Plata y alrededores.

Se consideró un valor estimado de USD 100.000 para el terreno. Teniendo en cuenta el precio del terreno, según la **Ecuación 5** la IFT totaliza **USD 872.478**.

$$IFT = IF + Terreno$$

**ECUACIÓN 3. INVERSIÓN FIJA TOTAL.**

Finalmente, para conocer el valor de la IT se precisa adicionar la inversión en capital de trabajo (IW). En general, para productos que ingresan en mercados más establecidos y con más información disponible, la IW puede calcularse como los requerimientos de capital para operar la planta durante un período de tiempo. En este caso, al no contar con información sobre las condiciones de comercialización, se puede estimar la IW como el 10% de la IF, resultando en un total de **USD 77.245**. Por lo tanto, siguiendo la **Ecuación 4**, se calcula una IT de **USD 949.726**.

$$IT = IFT + IW$$

**ECUACIÓN 4. INVERSIÓN TOTAL.**

**Análisis de costos**

El análisis de costos engloba el estudio de los costos de producción y la clasificación de los mismos según se consideren variables o fijos. La estructura de costos no sólo influye en la rentabilidad de un proyecto de inversión, sino que permite evaluar el impacto de cada uno de ellos e informa sobre los aspectos más críticos para reducir los gastos.

**Costos variables**

Los costos variables son aquellos que, como el término indica, varían según el nivel de producción o utilización de la planta. Un proyecto de inversión cuyos costos predominantes sean variables se verán menos afectados por fluctuaciones en el mercado que disminuyan la demanda del producto.

**Materia prima**

Es el costo variable presente en cualquier proyecto de inversión, y abarca todos los gastos en materia prima necesarios para la producción. En este caso, se necesita Bentonita, Quitosano, Ácido acético y agua destilada.

En la **Tabla 15**, se detallan los costos y las cantidades de materia prima por año de proyecto.

**TABLA 16. COSTO DE LAS MATERIAS PRIMAS.**

	<b>Año 1</b>	<b>Año 2</b>	<b>Año 3</b>	<b>Año 4</b>	<b>Año 5</b>	<b>Costo Unitario</b>
<b>Bent (Kg)</b>	10.041	11.476	12.910	13.628	14.345	0,74 USD/Kg
<b>Q (Kg)</b>	1.996	2.281	2.566	2.709	2.780	205 USD/Kg
<b>HAc (L)</b>	1.996	2.281	2.566	2.709	2.780	3,33 USD/L
<b>Agua destilada (L)</b>	478.639	547.016	615.393	649.582	683.770	0,015 USD/L



#### Envase

La comercialización del producto se realizará en envases de 1kg, a granel, como en la presentación genérica que se muestra en la **Figura 40**.



**FIGURA 40. PRESENTACIÓN GENÉRICA DEL PRODUCTO FRACCIONADO EN UNIDADES DE 1 KG.**

Finalmente, se presentan en la **Tabla 16** los costos variables totales para cada año del proyecto de inversión.

**TABLA 17. COSTOS VARIABLES TOTALES.**

<i>Costos variables</i>					
	<i>Año 1</i>	<i>Año 2</i>	<i>Año 3</i>	<i>Año 4</i>	<i>Año 5</i>
<i>Producción (Kg)</i>	9.790	11.189	12.588	13.287	13.986
<i>Materia prima</i>	USD 430.416	USD 491.904	USD 553.392	USD 584.136	USD 600.030
<i>Envase</i>	USD 34.266	USD 39.161	USD 44.057	USD 46.504	USD 48.952
<i>Mano de obra</i>	USD 49.896	USD 57.024	USD 64.152	USD 67.716	USD 71.280
<i>Supervisión</i>	USD 16.632	USD 19.008	USD 21.384	USD 22.572	USD 23.760
<i>Servicios</i>	USD 27.713	USD 31.672	USD 35.631	USD 37.610	USD 39.590
<i>Mantenimiento</i>	USD 35.148	USD 40.169	USD 45.190	USD 47.701	USD 50.211
<i>Suministros</i>	USD 4.056	USD 4.635	USD 5.214	USD 5.504	USD 5.794
<i>Laboratorio</i>	USD 5.988	USD 6.843	USD 7.698	USD 8.126	USD 8.554
<i>Regalías y patentes</i>	USD 17.623	USD 20.140	USD 22.658	USD 23.916	USD 25.175

<b>Total</b>	<b>USD 621.737</b>	<b>USD 710.556</b>	<b>USD 799.376</b>	<b>USD 843.786</b>	<b>USD 873.345</b>
--------------	--------------------	--------------------	--------------------	--------------------	--------------------

#### Costos fijos

Los costos fijos son aquellos que se mantienen constantes con la modificación de la producción. Generalmente se asocian a los gastos administrativos, depreciación y pago de impuestos, entre otros aspectos que no dependen de la productividad de la empresa; un proyecto de inversión cuyos costos predominantes sean fijos se beneficiará más de un aumento en la producción.

#### Depreciación

El costo de depreciación contempla la disminución en valor del equipamiento a medida que crece su antigüedad. Esta pérdida de valor se reconoce como un gasto de operación. Existen distintos métodos para calcular la depreciación de la inversión; en este caso se utilizará el método de la línea recta que se muestra en la **Ecuación 5**, donde  $n$  es la vida útil del proyecto (5 años) y  $L$  es el valor residual al finalizar la vida útil (25%).

$$D = \frac{1}{n} * (IF - L)$$

**ECUACIÓN 5. CÁLCULO DE DEPRECIACIÓN DE EQUIPAMIENTO.**

Finalmente, se presentan en la **Tabla 17** los costos fijos totales para cada año del proyecto de inversión.

**TABLA 18. COSTOS FIJOS TOTALES.**

<b>Costos fijos</b>					
	<b>Año 1</b>	<b>Año 2</b>	<b>Año 3</b>	<b>Año 4</b>	<b>Año 5</b>
<b>Depreciación</b>	USD 115.872	USD 115.872	USD 115.872	USD 115.872	USD 115.872
<b>Impuestos</b>	USD 7.725	USD 7.725	USD 7.725	USD 7.725	USD 7.725
<b>Seguros</b>	USD 5.794	USD 5.794	USD 5.794	USD 5.794	USD 5.794
<b>Ventas y distribución</b>	USD 52.868	USD 60.420	USD 67.973	USD 71.749	USD 75.526
<b>Administración y dirección</b>	USD 17.464	USD 19.958	USD 22.453	USD 23.701	USD 24.948
<b>Investigación y desarrollo</b>	USD 13.217	USD 15.105	USD 16.993	USD 17.937	USD 18.881
<b>Total</b>	USD 212.939	USD 224.874	USD 236.810	USD 242.777	USD 248.745
<b>Total sin depreciación</b>	USD 97.067	USD 109.002	USD 120.938	USD 126.906	USD 132.873

#### Precio de venta

El carácter diferenciador de este producto hace que sea imposible comparar su precio con el de productos existentes. El valor final de Bent-Q quedará definido por la aceptación que éste tenga en el mercado.

Sin embargo, luego del análisis de mercado se ha determinado un precio de venta de USD 144 por campaña (dos aplicaciones de 400 gr/ha).

### Análisis de rentabilidad

Teniendo en cuenta lo desarrollado anteriormente, se confeccionó el cuadro de fuentes y usos de fondos del proyecto con el objetivo de obtener los flujos de caja del mismo (**Tabla 18**). A partir de los mismos, se aplican los métodos de estimación de rentabilidad de tasa interna de retorno (TIR) y tiempo de repago (nR). Se consideró una tasa de rentabilidad mínima aceptable (TRMA) del 20% y una carga impositiva del 30%.

**TABLA 19. CUADRO DE FUENTES Y USOS DEL PROYECTO.**

	<b>Año 1</b>	<b>Año 2</b>	<b>Año 3</b>	<b>Año 4</b>	<b>Año 5</b>
<b>FUENTES</b>					
<i>Capital propio (IT)</i>	USD 949.726	-	-	-	-
<i>Crédito banco</i>	-	-	-	-	-
<i>Ventas netas</i>	USD 1.762.262	USD 2.014.014	USD 2.265.766	USD 2.391.641	USD 2.517.517
<b>Subtotal</b>	<b>USD 2.711.988</b>	<b>USD 2.014.014</b>	<b>USD 2.265.766</b>	<b>USD 2.391.641</b>	<b>USD 2.517.517</b>
<b>USOS</b>					
<i>Activo fijo (IF)</i>	USD 872.478	-	-	-	-
<i>Capital de trabajo (IW)</i>	USD 77.248	-	-	-	-
<i>Costos de producción s/ depreciación</i>	USD 718.803	USD 819.559	USD 920.314	USD 970.691	USD 1.006.218
<b>Subtotal</b>	<b>USD 1.668.530</b>	<b>USD 819.559</b>	<b>USD 920.314</b>	<b>USD 970.691</b>	<b>USD 1.006.218</b>
<i>Beneficio Bruto</i>	USD 1.043.459	USD 1.194.455	USD 1.345.452	USD 1.420.950	USD 1.511.299
<i>Depreciación</i>	USD 115.872	USD 115.872	USD 115.872	USD 115.872	USD 115.872
<b>BNAI</b>	USD 927.587	USD 1.078.584	USD 1.229.580	USD 1.305.079	USD 1.395.427
<i>Impuestos (30%)</i>	USD 278.276	USD 323.575	USD 368.874	USD 391.524	USD 418.628
<b>BN</b>	USD 649.311	USD 755.008	USD 860.706	USD 913.555	USD 976.799
<b>Flujo de caja (BN + D)</b>	<b>USD 765.183</b>	<b>USD 870.880</b>	<b>USD 976.578</b>	<b>USD 1.029.427</b>	<b>USD 1.092.671</b>

### Tasa interna de retorno (TIR)

La TIR se calculó utilizando la **Ecuación 6**, siendo  $FC_i$  el flujo de caja para cada año del proyecto,  $R$  la tasa de rentabilidad mínima aceptable e  $IT$  la inversión total del proyecto. Además, al último flujo de caja se le suma la liquidación del terreno y del valor residual de la inversión fija.

$$\sum_{i=1}^n \frac{FC_i}{(1+R)^i} - IT = 0$$

**ECUACIÓN 6. ESTIMACIÓN DE LA TIR.**

Se calculó una TIR del 71,11% para el proyecto de inversión que, al ser superior a la TRMA establecida del 20%, califica al proyecto de inversión como rentable.

### Tiempo de repago

El tiempo de repago se determinó utilizando el método gráfico, puesto que los flujos de caja son diferentes año a año. De esta forma, se calcula el momento en el que se amortiza la inversión fija depreciable del proyecto y se ingresa en la etapa de ganancia. En la **Figura 41** se muestra la evolución del flujo de caja y el punto del tiempo de repago.



**FIGURA 41. TIEMPO DE REPAGO DEL PROYECTO DE INVERSIÓN.**

La curva muestra que el flujo de caja acumulado se vuelve positivo al poco tiempo de alcanzar el primer año de vida útil del proyecto. Debido a que el tiempo de repago es menor a la mitad de la vida útil (2,5 años), se puede concluir que el proyecto sería rentable.

## CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES GENERALES Y TRABAJOS A FUTURO

### Conclusiones generales

A partir del trabajo realizado en este proyecto se puede concluir que se logró obtener de manera exitosa distintas formulaciones de Bent-Q y Bent-AS a una mayor escala.

Se consiguió escalar y optimizar la producción tanto de Bent-Q como de Bent-AS, agilizando el proceso de obtención. En el caso de la Bent-Q el resultado fue más satisfactorio ya que se lograron optimizar más variables que solo el tiempo, como lo son la temperatura o la concentración de Bent y Q en solución. Durante el proceso, las nanoarcillas fueron caracterizadas utilizando técnicas y ensayos de laboratorio típicos de la ciencia e ingeniería de materiales (TGA, FTIR, FESEM, entre otros).

Las caracterizaciones biológicas realizadas a las Bent-AS no fueron concluyentes, por lo que no se realizó un análisis de factibilidad económica. Sin embargo, existen indicios suficientes para continuar desarrollando esta nanoarcilla en el futuro, con el objetivo de obtener resultados más consistentes.

La Bent-Q óptima, obtenida a mayor escala mostró evidencias de comportamiento como inductor de los mecanismos de defensa de las plántulas de tomate. Dicha acción biológica le confiere a Bent-Q un alto potencial de aplicación en agricultura, al mismo tiempo que representa un insumo de alta inocuidad ambiental y para la salud humana.

Gracias a los resultados obtenidos, se elaboró un proyecto de factibilidad económica orientado a la comercialización de la formulación óptima seleccionada de Bent-Q. La planta diseñada tiene la capacidad de fabricar 14.000 kg de nanoarcilla por año y se radicaría en Mar del Plata. Considerando una TRMA del 20%, con una TIR del 71% y un tiempo de repago levemente mayor a un año, el proyecto se puede considerar rentable.

### Trabajos a futuro

Los avances logrados con la concreción de la presente tesis de grado permitieron validar el uso de las formulaciones óptimas de Bent-Q y Bent-AS para la aplicación planteada y en base a los resultados obtenidos se plantean distintas líneas para continuar estudiando.

Por un lado, en relación a la Bent-Q se avanzará en el desarrollo de formulaciones con coadyuvantes que permitan obtener suspensiones estables de las nanoarcillas en medios acuosos.

Se efectuarán ensayos de aplicación de la BentQ4-5min en plantas de tomate en escala de invernáculo, en el Instituto de Investigaciones Biológicas. A partir de estos ensayos se estudiará en detalle el efecto de las aplicaciones foliares de la nanoarcilla en el desarrollo de las plantas.

En relación a la nanovehiculización del AS se evaluarán estrategias para incrementar la carga del principio bioactivo en la nanoarcilla. Por un lado, se trabajará con una Bentonita previamente modificada orgánicamente con una especie permita incrementar su afinidad con el AS. Una de estas opciones podría ser la modificación con Q, y mediante su posterior tratamiento con AS, se podría generar un nanovehículo con ambos principios bioactivos. Por otro lado, se evaluarán otras nanoarcillas distintas a la Bent, que puedan actuar como matriz inorgánica. Por ejemplo, los hidróxidos dobles laminares que se caracterizan por su estructura en láminas pero, a diferencia de la Bent, con cargas positivas.

### Trabajos presentados en eventos científicos

J. Benjamin, G. Peña Ramirez, T. Giannandrea, A. Garrote, M. F. Salcedo, L. Cano, C. Casalongué, V. Alvarez, Romina Ollier Primiano, A. Yamila Mansilla. Nueva generación de bioproductos protectores y promotores del crecimiento vegetal basados en nanoarcillas. Nanomercosur 2022. CABA, Bs. As, 16-18/11/2022.

### Artículo científico enviado

Tomás Giannandrea, Jeremías Benjamin, Andres Torres Nicolini, Vera Alejandra Alvarez, Andrea Yamila Mansilla, Romina Paola Ollier Primiano. PILOT-SCALE PRODUCTION OF FUNCTIONALIZED NANOCCLAYS FOR SUSTAINABLE AGRICULTURAL APPLICATIONS: PROCESS SCALE-UP AND OPTIMIZATION. Discover Chemical Engineering. Enviado el 2/10/24. En proceso de revisión.

## ANEXOS

### Caracterizaciones de la Bent

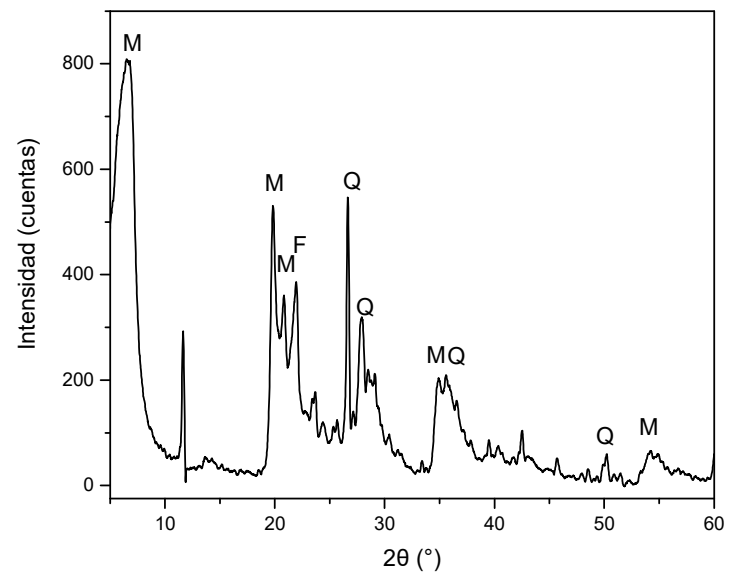


FIGURA A 1. DIFRACTOGRAMA DE LA BENT.

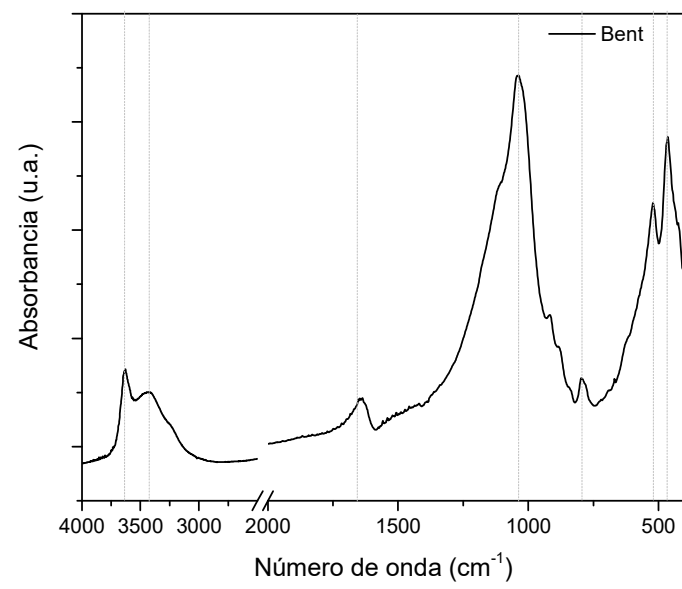


FIGURA A 2. ESPECTRO FTIR DE LA BENT.

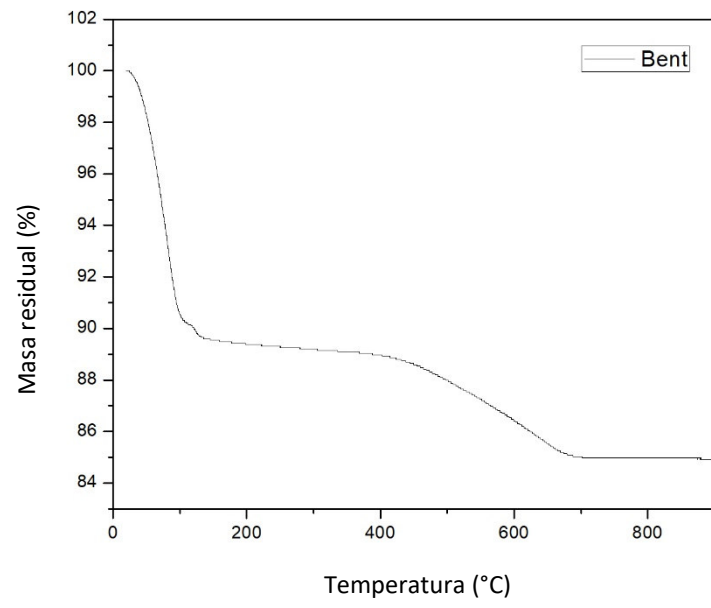


FIGURA A 3. TERMOGRAMA DE LA BENT.

Caracterizaciones de la Bent-Q

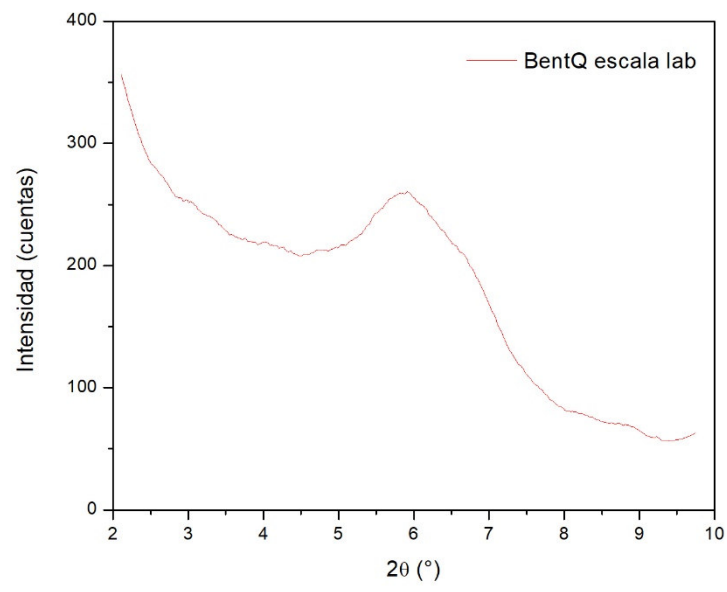


FIGURA A 4. DRX DE LA BENT-Q OBTENIDA A ESCALA LABORATORIO<sup>46</sup>.



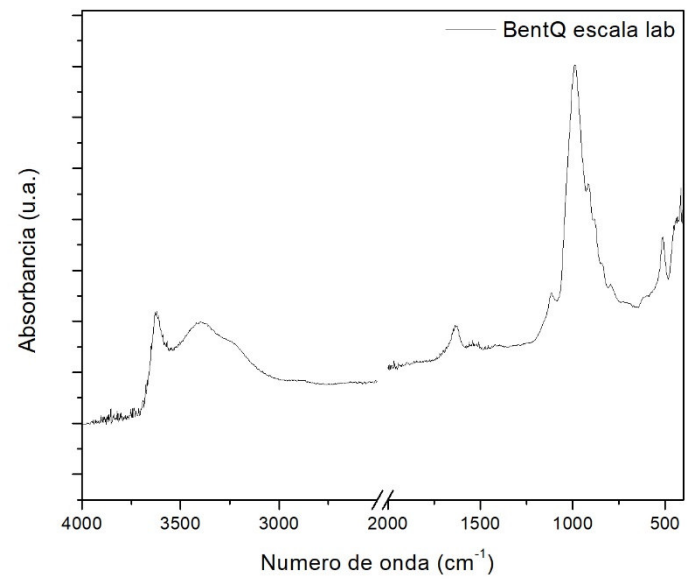


FIGURA A 5. ESPECTRO FTIR DE LA BENT-Q OBTENIDA A ESCALA LABORATORIO<sup>46</sup>.

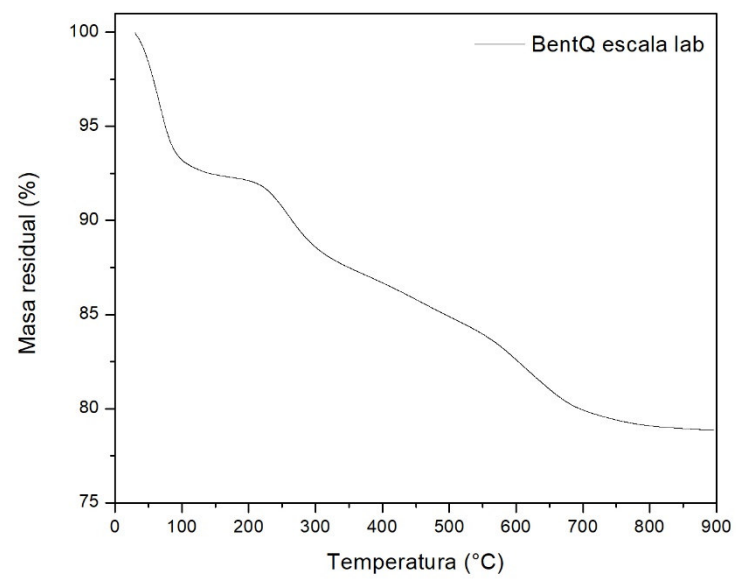


FIGURA A 6. TERMOGRAMA DE LA BENT-Q OBTENIDA A ESCALA LABORATORIO<sup>46</sup>.

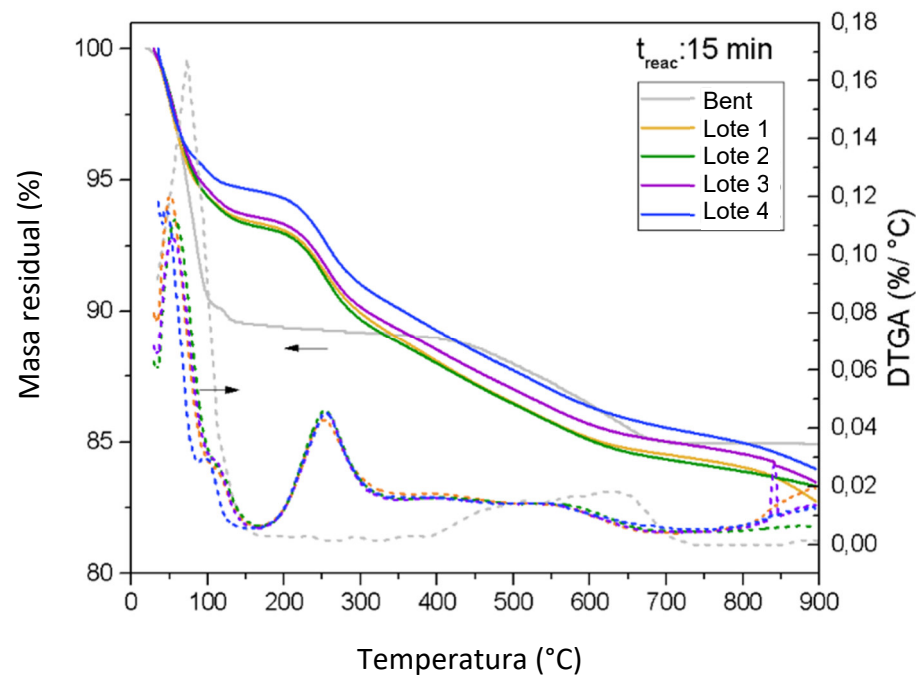


FIGURA A 7. COMPARACIÓN DE LOS TERMOGRAMAS DE LAS ARCILLAS DE LOS LOTES 1 A 4 OBTENIDOS CON 15 MIN DE REACCIÓN.

### Caracterización del AS

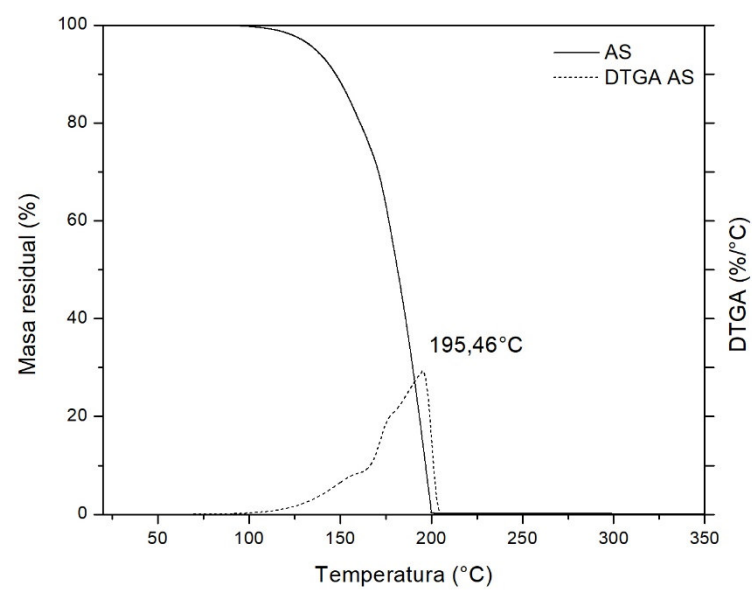


FIGURA A 8. TERMOGRAMA DEL AS PURO.

## Caracterizaciones de la Bent-AS

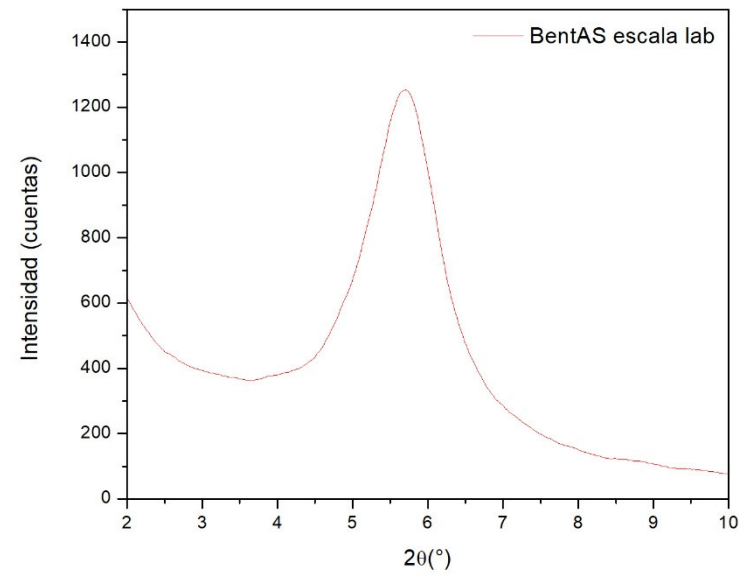


FIGURA A 9. DIFRACTOGRAMA DE LA BENTAS OBTENIDA A ESCALA LABORATORIO<sup>43</sup>.

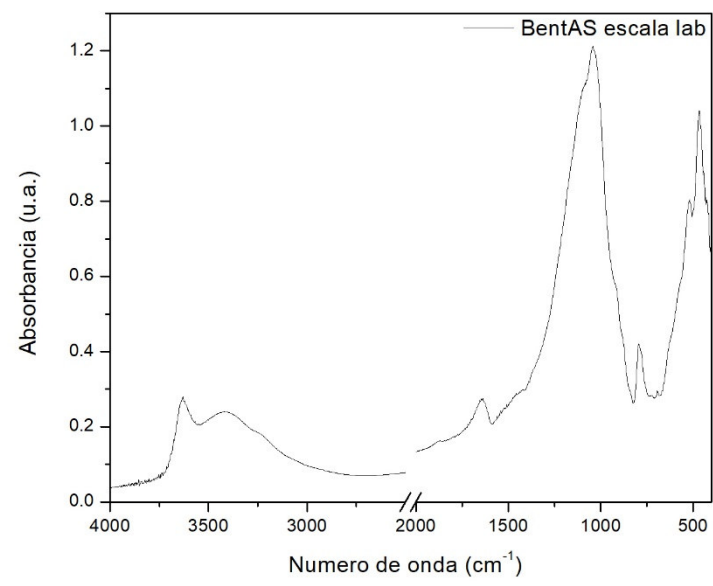


FIGURA A 10. ESPECTRO FTIR DE LA BENTAS OBTENIDA A ESCALA LABORATORIO<sup>43</sup>.

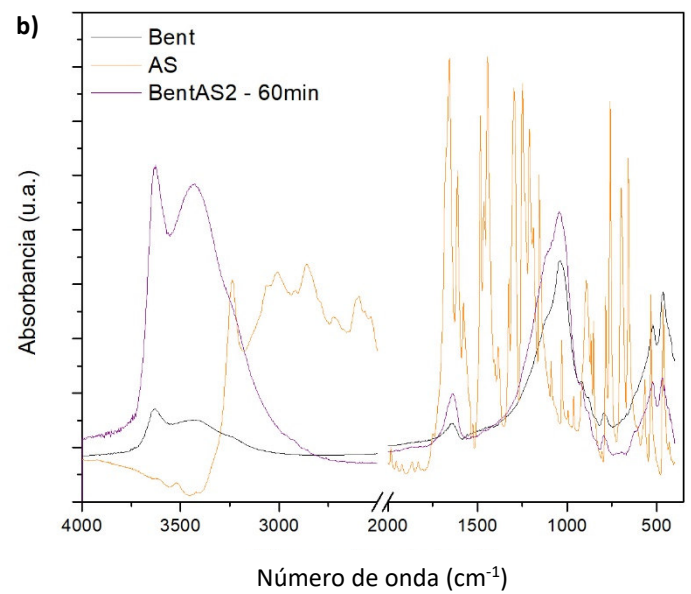
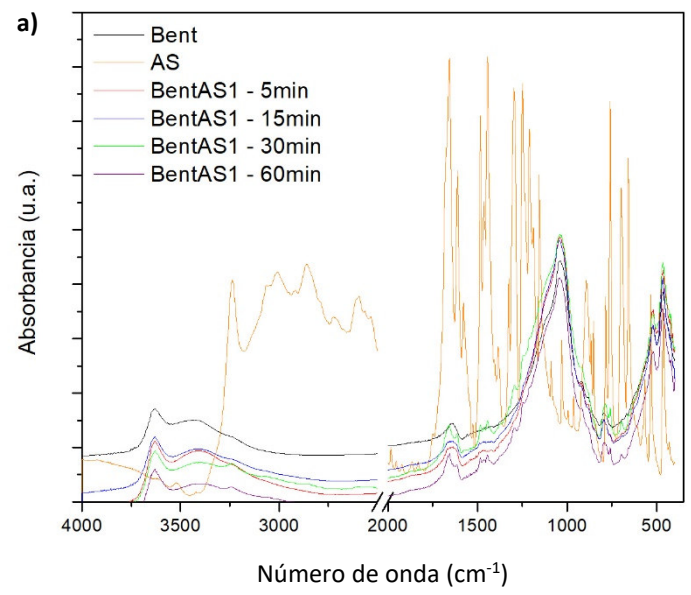


FIGURA A 11. COMPARACIÓN DE LOS ESPECTROS FTIR DE LAS DISTINTAS ARCILLAS - BENTAS, LOTE 1 (A), LOTE 2 (B), MODIFICADAS CON DISTINTOS TIEMPOS DE REACCIÓN.

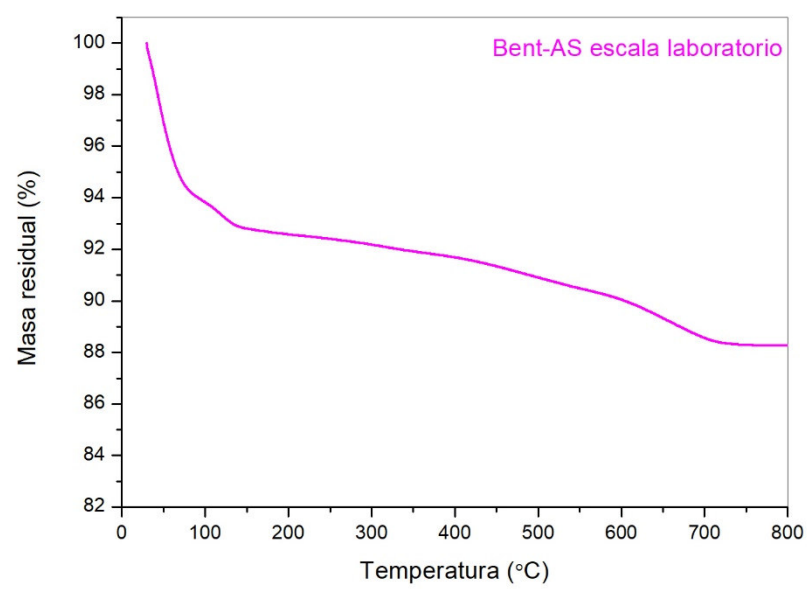


FIGURA A 12. TGA DE LA BENTAS OBTENIDA A ESCALA LABORATORIO<sup>43</sup>.

TABLA A 1. SOLUBILIDAD DEL AS EN AGUA A DISTINTAS TEMPERATURAS<sup>124</sup>.

<i>Solubilidad en agua (g/L)</i>	<i>Temperatura (°C)</i>
1,24	0
2,48	25
4,14	40
17,41	75
77,79	100

## BIBLIOGRAFÍA

1. Ramsden, J. J. Nanotechnology in Agriculture. *Ann. Agrar. Sci.* **10**, 101–104 (2012).
2. Chen, H. & Yada, R. Nanotechnologies in agriculture: New tools for sustainable development. *Trends Food Sci. Technol.* **22**, 585–594 (2011).
3. Kaur, R., Mavi, G. K., Raghav, S. & Khan, I. Pesticides Classification and its Impact on Human and Environment. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* **8**, 1889–1897 (2019).
4. Aktar, W., Sengupta, D. & Chowdhury, A. Impact of pesticides use in agriculture: Their benefits and hazards. *Interdiscip. Toxicol.* **2**, 1–12 (2009).
5. Carvalho, F. P. Pesticides, environment, and food safety. *Food Energy Secur.* **6**, 48–60 (2017).
6. RESUMEN DE LA SITUACION DE LA OFERTA Y LA DEMANDA;  
<https://www.fao.org/4/w4136s/w4136s04.htm>.
7. Situación Alimentaria Mundial;  
<https://www.fao.org/worldfoodsituation/csdb/es#:~:text=Al%20ir%20terminando%20la%20campa%C3%B1a,de%20la%20producci%C3%B3n%20en%202022>.
8. Hakeem, K. R., Akhtar, M. S. & Abdullah, S. N. A. Effects of Pesticides on Environment. *Plant, Soil Microbes Vol. 1 Implic. Crop Sci.* 1–366 (2016).
9. González López, G. C., Quevedo Guerrero, J. N. & García Batista, R. M. Pesticides; classification, need of an integrated management and alternatives to reduce its undue consumption: a review. *Rev. científica Agroecosistemas* **6**, 56–62 (2018).
10. Parisi, C., Vigani, M. & Rodríguez-Cerezo, E. Agricultural nanotechnologies: What are the current possibilities? *Nano Today* **10**, 124–127 (2015).
11. Khot, L. R., Sankaran, S., Maja, J. M., Ehsani, R. & Schuster, E. W. Applications of nanomaterials in agricultural production and crop protection: A review. *Crop Prot.* **35**, 64–70 (2012).
12. Brown, P. & Saa, S. Biostimulants in Agriculture. *Front. Plant Sci.* **6**, 671 (2015).
13. Cota-arriola, O., Cortez-rocha, M. O. & Ezquerro-brauer, J. M. Controlled release matrices and micro / nanoparticles of chitosan with antimicrobial potential : development of new strategies for microbial control in agriculture Abstract : (2013) doi:10.1002/jsfa.6060.
14. Malerba, M. & Cerana, R. Chitosan Effects on Plant Systems. 1–15 (2016) doi:10.3390/ijms17070996.
15. Orzali, L., Corsi, B., Forni, C. & Riccioni, L. Chitosan in Agriculture: A New Challenge for Managing Plant Disease. (2017).
16. Malerba, M. & Cerana, R. Recent Advances of Chitosan Applications in Plants. (2018).
17. Wang, X., Chi, N. & Tang, X. Preparation of estradiol chitosan nanoparticles for improving nasal absorption and brain targeting. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **70**, 735–740 (2008).
18. Zubareva, A. A. *et al.* PROTEIN DELIVERY BY NANOPARTICLES FORMED BY CHITOSAN-N-ACYL DERIVATIVES. **XVI**, 61–70.
19. Zhang, X., Li, K., Liu, S. & Zou, P. The relationship between the degrees of polymerization of chitooligomers and its activity of affecting the growth of wheat seedlings under salt stress. (2016)

doi:10.1021/acs.jafc.6b03665.

20. Kumar, M. N. V. R. A review of chitin and chitosan applications q. **46**, 1–27 (2000).
21. Chittenden, C. & Singh, T. In vitro evaluation of combination of *Trichoderma harzianum* and chitosan for the control of sapstain fungi. *Biol. Control* **50**, 262–266 (2009).
22. López-mondéjar, R., Blaya, J., Obiol, M., Ros, M. & Pascual, J. A. Evaluation of the effect of chitin-rich residues on the chitinolytic activity of *Trichoderma harzianum* : In vitro and greenhouse nursery experiments. **103**, 1–8 (2012).
23. Khalil, M. S. & Badawy, M. E. I. Nematicidal Activity of a Biopolymer Chitosan at Different Molecular Weights against Root-Knot Nematode , *Meloidogyne incognita*. **48**, 170–178 (2012).
24. Hemantaranjan, D. K. A. Chitosan as a promising natural compound to enhance potential physiological responses in plant : a review. (2015) doi:10.1007/s40502-015-0139-6.
25. Ding, P. Stories of Salicylic Acid : A Plant Defense Hormone. *Trends Plant Sci.* **1**, 1–17 (2020).
26. Wani, A. B., Chadar, H., Wani, A. H., Singh, S. & Upadhyay, N. Salicylic acid to decrease plant stress. *Environ. Chem. Lett.* (2016) doi:10.1007/s10311-016-0584-0.
27. Vicente, M. R. & Plasencia, J. Salicylic acid beyond defence : its role in plant growth and development. **62**, 3321–3338 (2018).
28. Zhang, Y. & Li, X. Salicylic acid: biosynthesis, perception, and contributions to plant immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.* **50**, 29–36 (2019).
29. Duhan, J. S., Kumar, R., Kumar, N., Kaur, P. & Nehra, K. Nanotechnology : The new perspective in precision agriculture. **15**, 11–23 (2017).
30. An, C. *et al.* Nanomaterials and nanotechnology for the delivery of agrochemicals: strategies towards sustainable agriculture. *J. Nanobiotechnology* **20**, 1–19 (2022).
31. Guha, T., Gopal, G., Kundu, R. & Mukherjee, A. Nanocomposites for Delivering Agrochemicals: A Comprehensive Review. *J. Agric. Food Chem.* **68**, 3691–3702 (2020).
32. Nazir, M. S. *et al.* Characteristic Properties of Nanoclays and Characterization of Nanoparticulates and Nanocomposites. 35–55 (2016).
33. Uddin, F. Clays, nanoclays, and montmorillonite minerals. *Metall. Mater. Trans. A Phys. Metall. Mater. Sci.* **39**, 2804–2814 (2008).
34. Pavlidou, S. & Papaspyrides, C. D. A review on polymer-layered silicate nanocomposites. *Prog. Polym. Sci.* **33**, 1119–1198 (2008).
35. Mcnerny, D. Q., Leroueil, P. R. & Baker, J. R. Understanding specific and nonspecific toxicities : a requirement for the development of dendrimer-based pharmaceuticals. (2010) doi:10.1002/wnan.79.
36. Savjani, K. T., Gajjar, A. K. & Savjani, J. K. Drug Solubility : Importance and Enhancement Techniques. (2012) doi:10.5402/2012/195727.
37. Mould, D. R., Walz, A., Lave, T., Gibbs, J. P. & Frame, B. Developing Exposure / Response Models for Anticancer Drug Treatment : Special Considerations. 12–27 (2015) doi:10.1002/psp4.16.
38. Czaban, J. & Siebielec, G. Effects of bentonite on sandy soil chemistry in a long-term plot experiment (II); effect on pH, CEC, and macro- and micronutrients. *Polish J. Environ. Stud.* **22**, 1669–1676 (2013).
39. Satje, A. & Nelson, P. Bentonite treatments can improve the nutrient and water holding capacity of

- sugarcane soils in the wet tropics. *Proc. Aust. Soc. sugarcane Technol.* **31**, 166–176 (2009).
40. Ghormade, V., Deshpande, M. V. & Paknikar, K. M. Perspectives for nano-biotechnology enabled protection and nutrition of plants. *Biotechnol. Adv.* **29**, 792–803 (2011).
  41. El-Nahhal, Y., Nir, S., Margulies, L. & Rubin, B. Reduction of photodegradation and volatilization of herbicides in organo-clay formulations. *Appl. Clay Sci.* **14**, 105–119 (1999).
  42. Giroto, A. S. *et al.* Photoprotective effect of starch/montmorillonite composites on ultraviolet-induced degradation of herbicides. *React. Funct. Polym.* **93**, 156–162 (2015).
  43. Mansilla, A. Y. *et al.* Characterization of functionalized bentonite as nanocarrier of salicylic acid with protective action against *Pseudomonas syringae* in tomato plants. (2020).
  44. Mansilla, A. Y., Lanfranconi, M., Alvarez, V. A. & Casalongué, C. A. Development and characterization of bentonite/wGLP systems. *Appl. Clay Sci.* **166**, 159–165 (2018).
  45. Merino, D., Iglesias, M. J., Mansilla, A. Y., Casalongué, C. A. & Alvarez, V. A. Fighting Against Plant Saline Stress: Development of a Novel Bioactive Composite Based on Bentonite and L-Proline. *Clays Clay Miner.* **69**, 232–242 (2021).
  46. Merino, D., Mansilla, A. Y., Casalongué, C. A. & Alvarez, V. A. Agricultural and Environmental Chemistry Preparation, characterization and in vitro testing of nano-clay antimicrobial activities and elicitor capacity Preparation, characterization and in vitro testing of nano-clay antimicrobial activities and elicitor. (2018) doi:10.1021/acs.jafc.8b00049.
  47. Rivas-Rojas, P. C., Ollier, R. P., Alvarez, V. A. & Huck-Iriart, C. Enhancing the integration of bentonite clay with polycaprolactone by intercalation with a cationic surfactant: effects on clay orientation and composite tensile properties. *J. Mater. Sci.* **56**, 5595–5608 (2021).
  48. D'Amico, D. A., Ollier, R. P., Alvarez, V. A., Schroeder, W. F. & Cyras, V. P. Modification of bentonite by combination of reactions of acid-activation, silylation and ionic exchange. *Appl. Clay Sci.* **99**, 254–260 (2014).
  49. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926860X21004403>.
  50. Lavertu, M. *et al.* A validated <sup>1</sup>H NMR method for the determination of the degree of deacetylation of chitosan. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **32**, 1149–1158 (2003).
  51. De La Paz, N. *et al.* Evaluación Viscosimétrica Del Quitosano Derivado De La Quitina De Langosta. *Rev. Iberoam. Polímero Vol. Iberoam. Polim. Play. La Habana. Cuba. Recib. Noviembre* **14**, 84–91 (2013).
  52. Core, C. *X-Ray and EUV Imaging*. vol. 0 (2017).
  53. American, A. & Standard, N. Designation: D 5032-97 (Reapproved 2003) Maintaining Constant Relative Humidity by Means of Aqueous Glycerin Solutions 1. **97**, 1–3 (2003).
  54. Sharif, R. *et al.* The multifunctional role of chitosan in horticultural crops; a review. *Molecules* **23**, 1–20 (2018).
  55. Gupta, P., Ravi, I. & Sharma, V. Induction of  $\beta$ -1,3-glucanase and chitinase activity in the defense response of *Eruca sativa* plants against the fungal pathogen *Alternaria brassicicola*. *J. Plant Interact.* **8**, 155–161 (2013).
  56. Vargas-Rincón, C., Sánchez-León, G. & Jiménez-Morales, P. La Producción de Metabolitos Secundarios en la Familia Brassicaceae. *Rev. Fac. Ciencias Básicas* **9**, 282 (2014).



57. Pandey, P., Kumar Verma, M. & De, N. Chitosan in Agricultural Context-A Review. *Bull. Env. Pharmacol. Life Sci* **7**, 87–96 (2018).
58. Wang, L. & Wang, A. Adsorption characteristics of Congo Red onto the chitosan/montmorillonite nanocomposite. *J. Hazard. Mater.* **147**, 979–985 (2007).
59. Futralan, C. M. *et al.* Comparative and competitive adsorption of copper, lead, and nickel using chitosan immobilized on bentonite. *Carbohydr. Polym.* **83**, 528–536 (2011).
60. Lertsutthiwong, P., Noomun, K., Khunthon, S. & Limpanart, S. Influence of chitosan characteristics on the properties of biopolymeric chitosan–montmorillonite. *Prog. Nat. Sci. Mater. Int.* **22**, 502–508 (2012).
61. Liu, Q., Yang, B., Zhang, L. & Huang, R. Adsorption of an anionic azo dye by cross-linked chitosan/bentonite composite. *Int. J. Biol. Macromol.* **72**, 1129–1135 (2015).
62. Monvisade, P. & Siriphannon, P. Applied Clay Science Chitosan intercalated montmorillonite : Preparation , characterization and cationic dye adsorption. *Appl. Clay Sci.* **42**, 427–431 (2009).
63. Wan Ngah, W. S., Teong, L. C. & Hanafiah, M. A. K. M. Adsorption of dyes and heavy metal ions by chitosan composites: A review. *Carbohydr. Polym.* **83**, 1446–1456 (2011).
64. An, J. H. & Dultz, S. Adsorption of tannic acid on chitosan-montmorillonite as a function of pH and surface charge properties. *Appl. Clay Sci.* **36**, 256–264 (2007).
65. Darder, M., Colilla, M. & Ruiz-Hitzky, E. Biopolymer-clay nanocomposites based on chitosan intercalated in montmorillonite. *Chem. Mater.* **15**, 3774–3780 (2003).
66. Darder, M., Colilla, M. & Ruiz-Hitzky, E. Chitosan-clay nanocomposites: Application as electrochemical sensors. *Appl. Clay Sci.* **28**, 199–208 (2005).
67. Han, Y. S., Lee, S. H., Choi, K. H. & Park, I. Preparation and characterization of chitosan-clay nanocomposites with antimicrobial activity. *J. Phys. Chem. Solids* **71**, 464–467 (2010).
68. Kabiri, K., Mirzadeh, I. & Zohuriaan, M. J. Highly rapid preparation of a bio-modified nanoclay with chitosan. *Iran. Polym. J. (English Ed.)* **16**, 147–151 (2007).
69. Onnainty, R. *et al.* Targeted chitosan-based bionanocomposites for controlled oral mucosal delivery of chlorhexidine. *Int. J. Pharm.* **509**, 408–418 (2016).
70. Ba, K. *et al.* Use of chitosan-modified bentonite for removal of Cu<sup>2+</sup>, Cl<sup>-</sup> and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) from aqueous solution. *Kem. u Ind. Chem. Chem. Eng.* **63**, 253–258 (2014).
71. Celis, R., Adelino, M. A., Hermosín, M. C. & Cornejo, J. Montmorillonite-chitosan bionanocomposites as adsorbents of the herbicide clopyralid in aqueous solution and soil/water suspensions. *J. Hazard. Mater.* **209–210**, 67–76 (2012).
72. Ding, C., Gong, D., Yu, P., Shao, J. & Zhong, M. E. Removal of quinclorac herbicide from aqueous solution by chitosan/montmorillonite bionanocomposite. *Desalin. Water Treat.* **57**, 24970–24981 (2016).
73. Wang, S. F. *et al.* Biopolymer chitosan/montmorillonite nanocomposites: Preparation and characterization. *Polym. Degrad. Stab.* **90**, 123–131 (2005).
74. Günister, E., Pestreli, D., Ünlü, C. H., Atici, O. & Güngör, N. Synthesis and characterization of chitosan-

- MMT biocomposite systems. *Carbohydr. Polym.* **67**, 358–365 (2007).
75. Domszy, J. G. & Roberts, G. A. F. Evaluation of infrared spectroscopic techniques for analysing chitosan. *Die Makromol. Chemie* **186**, 1671–1677 (1985).
  76. Hasanain, F. & Wang, Z. Y. New one-step synthesis of polyimides in salicylic acid. *Polymer (Guildf)*. **49**, 831–835 (2008).
  77. Ryals, J. A. *et al.* Systemic acquired resistance. *Pestic. Outlook* **9**, 34 (1998).
  78. Durrant, W. E. & Dong, X. Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* **42**, 185–209 (2004).
  79. Vallad, G. E. & Goodman, R. M. Systemic Acquired Resistance and Induced Systemic Resistance in Conventional Agriculture. 1920–1934 (2004).
  80. Koo, Y. M., Heo, A. Y. & Choi, H. W. Salicylic acid as a safe plant protector and growth regulator. *Plant Pathol. J.* **36**, 1–10 (2020).
  81. Davies, H. Introduction. *Palgrave Macmillan Stud. Fam. Intim. Life* 1–17 (2015) doi:10.1057/9781137030078\_1.
  82. Lin, Y., Chen, H., Hou, W. & Kuc, J. Ca<sup>2+</sup>-dependent and Ca<sup>2+</sup>-independent excretion modes of salicylic acid in tobacco cell suspension culture. *J. Exp. Bot.* **52**, 1219–1226 (2001).
  83. Karlidag, H., Yildirim, E. & Turan, M. Exogenous applications of salicylic acid affect quality and yield of strawberry grown under antifrost heated greenhouse conditions. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* **172**, 270–276 (2009).
  84. Dempsey, D. A. & Klessig, D. F. How does the multifaceted plant hormone salicylic acid combat disease in plants and are similar mechanisms utilized in humans? *BMC Biol.* **15**, 1–11 (2017).
  85. Ernst, Z. L. & Menashi, J. Complex formation between the Fe<sup>3+</sup> ion and some substituted phenols. Part 1.-Spectrophotometric determination of the stability constant of ferric salicylate. *Trans. Faraday Soc.* **59**, 1794–1802 (1963).
  86. Programa para el aumento de la competitividad de la industria del tomate. Informe progresos 2021-2022.
  87. Galmarini, C. Desafíos y Oportunidades de La Horticultura En Argentina. In Congreso Argentino de Horticultura; Mendoza, Argentina, 2018.
  88. Subsecretar, A. & Secretar, A. Dirección de Producción Agrícola La Producción de Tomate en Argentina. 1–14 (2020).
  89. Thakur, M. & Sohal, B. S. Role of Elicitors in Inducing Resistance in Plants against Pathogen Infection: A Review. *ISRN Biochem.* **2013**, 1–10 (2013).
  90. González-Bosch, C. Priming plant resistance by activation of redox-sensitive genes. *Free Radic. Biol. Med.* **122**, 171–180 (2018).
  91. Hussain, M. *et al.* *Rice in Saline Soils: Physiology, Biochemistry, Genetics, and Management. Advances in Agronomy* vol. 148 (Elsevier Inc., 2018).
  92. Goykovic Cortés, V. & Saavedra del Real, G. Algunos Efectos De La Salinidad En El Cultivo Del Tomate Y Prácticas Agronómicas De Su Manejo. *Idesia (Arica)* **25**, 47–58 (2007).
  93. Kibria, M. G. & Hoque, M. A. A Review on Plant Responses to Soil Salinity and Amelioration Strategies. *Open J. Soil Sci.* **09**, 219–231 (2019).

94. SINGH, K. N.; CHATRATH, R. 2001. Breeding for adaptation to environmental factors. Chapter 8. Salinity Tolerance.
95. Cuartero, J. & Fernández-Muñoz, R. Tomato and salinity. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. **78**, 83–125 (1998).
96. Yokoi, S., Bressan, R. A. & Hasegawa, P. M. Salt stress tolerance of plants. *JIRCAS Work. Rep.* 25–33 (2002).
97. R. Romero-Aranda, Soria, T. & Cuartero, J. Tomato plant-water uptake and plant-water relationships under saline growth conditions. **160**, 265–272 (2001).
98. Carvajal, M., Cerdá, A. & Martínez, V. Modification of the response of saline stressed tomato plants by the correction of cation disorders. *Plant Growth Regul.* **30**, 37–47 (2000).
99. Shahid, M. A. *et al.* Insights into the physiological and biochemical impacts of salt stress on plant growth and development. *Agronomy* **10**, (2020).
100. Amado Cattáneo, R., McCarthy, A. N. & Feingold, S. E. Evidence of genetic diversity within *Solanum Lycopersicum* L. 'Platense' landrace and identification of various subpopulations. *Genet. Resour. Crop Evol.* **67**, 2057–2069 (2020).
101. Ceasar, S. A. & Ignacimuthu, S. Genetic engineering of crop plants for fungal resistance: Role of antifungal genes. *Biotechnol. Lett.* **34**, 995–1002 (2012).
102. Van Loon, L. C., Rep, M. & Pieterse, C. M. J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* **44**, 135–162 (2006).
103. Ma, Z., Yang, L., Yan, H., Kennedy, J. F. & Meng, X. Chitosan and oligochitosan enhance the resistance of peach fruit to brown rot. *Carbohydr. Polym.* **94**, 272–277 (2013).
104. Meng, X., Yang, L., Kennedy, J. F. & Tian, S. Effects of chitosan and oligochitosan on growth of two fungal pathogens and physiological properties in pear fruit. *Carbohydr. Polym.* **81**, 70–75 (2010).
105. El Ghaouth, A. *et al.* Effect of Chitosan on Cucumber Plants: Suppression of *Pythium Aphanidermatum* and Induction of Defense Reactions.
106. Informes de Cadena de Valor Agroquímicos y Bioinsumos;  
[https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/ficha\\_sectorial\\_agroquimicos\\_2023\\_-\\_web.pdf](https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/ficha_sectorial_agroquimicos_2023_-_web.pdf).
107. <https://www.ainia.es/ainia-news/apuesta-por-la-innovacion-verde-los-bioestimulantes/>.
108. <https://www.agribio.com.ar/noticias/estiman-que-el-mercado-de-bioestimulantes-tendra-un-crecimiento-sustancial>.
109. Precio, F., Uan, M., Fma, T. S. A., Sft, F. D. A. & En, S. F. S. Boletín N°86 Fertilización de cultivos de invierno. (2021).
110. [https://www.magyp.gob.ar/sitio/areas/observatorio\\_bioeconomia/indicadores/04/index.php](https://www.magyp.gob.ar/sitio/areas/observatorio_bioeconomia/indicadores/04/index.php).
111. [rupolosgrobo.com/en/ideas-to-transform/media/ranking-list-of-2019-top-10-local-agrochemical-companies-in-argentina](http://rupolosgrobo.com/en/ideas-to-transform/media/ranking-list-of-2019-top-10-local-agrochemical-companies-in-argentina).
112. Proietti. Microsegmentación del mercado nacional de fitosanitarios. (2016).
113. Armstrong, Gary y Kotler, Philip; (2003) "Fundamentos de Marketing".
114. Nudelman. Área sembrada en millones de hectáreas. (2016).
115. Casadinho. Principales cultivos agrícolas realizados en Argentina. (2021).
116. Estufa industrial: <https://spanish.alibaba.com/p-detail/Mini->

- 1600760335298.html?spm=a2700.galleryofferlist.normal\_offer.d\_image.1c998440gjbWwC.
117. Tamiz industrial: [https://www.alibaba.com/product-detail/Linear-Vibrating-Sieve-Machine-Grain-Sorting\\_1600089740394.html?spm=a2700.rank\\_detail.6622646540.3.584a54d74sRoyz&cardType=101001155&cardId=10001311575](https://www.alibaba.com/product-detail/Linear-Vibrating-Sieve-Machine-Grain-Sorting_1600089740394.html?spm=a2700.rank_detail.6622646540.3.584a54d74sRoyz&cardType=101001155&cardId=10001311575).
  118. Reactor secundario: [https://spanish.alibaba.com/p-detail/50-60666067827.html?spm=a2700.galleryofferlist.normal\\_offer.d\\_price.6d0520297w1JWf](https://spanish.alibaba.com/p-detail/50-60666067827.html?spm=a2700.galleryofferlist.normal_offer.d_price.6d0520297w1JWf).
  119. Reactor principal: [https://spanish.alibaba.com/p-detail/Stainless-1600385095163.html?spm=a2700.galleryofferlist.normal\\_offer.d\\_price.11ce6bdcfp0Oqr](https://spanish.alibaba.com/p-detail/Stainless-1600385095163.html?spm=a2700.galleryofferlist.normal_offer.d_price.11ce6bdcfp0Oqr).
  120. Centrífuga industrial: [https://spanish.alibaba.com/p-detail/Industrial-60531488441.html?spm=a2700.galleryofferlist.normal\\_offer.d\\_price.271d74acaOM4e4](https://spanish.alibaba.com/p-detail/Industrial-60531488441.html?spm=a2700.galleryofferlist.normal_offer.d_price.271d74acaOM4e4).
  121. Secador por spray: [https://spanish.alibaba.com/p-detail/LPG-150-1600557827312.html?spm=a2700.galleryofferlist.normal\\_offer.d\\_title.682326c8byjYIW](https://spanish.alibaba.com/p-detail/LPG-150-1600557827312.html?spm=a2700.galleryofferlist.normal_offer.d_title.682326c8byjYIW).
  122. Balanza: [https://articulo.mercadolibre.com.ar/MLA-749322176-bascula-balanza-veterinaria-animal-distribal-200kg-nacional-\\_JM?searchVariation=56496099756#searchVariation=56496099756&position=13&search\\_layout=stack&type=item&tracking\\_id=a4e800b9-e5aa-49a3-82](https://articulo.mercadolibre.com.ar/MLA-749322176-bascula-balanza-veterinaria-animal-distribal-200kg-nacional-_JM?searchVariation=56496099756#searchVariation=56496099756&position=13&search_layout=stack&type=item&tracking_id=a4e800b9-e5aa-49a3-82).
  123. Autoelevador: [https://vehiculo.mercadolibre.com.ar/MLA-1396550933-auto-elevador-michigan-25tn-45mts-diesel-nuevo-desplazador-\\_JM#position=3&search\\_layout=stack&type=item&tracking\\_id=72dd8402-b6e2-4e88-aaca-633d0aabbbe1](https://vehiculo.mercadolibre.com.ar/MLA-1396550933-auto-elevador-michigan-25tn-45mts-diesel-nuevo-desplazador-_JM#position=3&search_layout=stack&type=item&tracking_id=72dd8402-b6e2-4e88-aaca-633d0aabbbe1).
  124. Atherton Seidell, W. F. L. Solubilities of Inorganic and Organic Compounds: A Compilation of Solubility Data from the Periodical Literature. (1952).