



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Licenciatura en Ciencias Biológicas

Tesis de Licenciatura

Evaluación de la cinética de formación de cápsulas de alginato de calcio *in situ*, mediante el desarrollo de una metodología de video-microscopía de transmisión

Autor: Andrés Posbeyikian

Directora: Dra. Gabriela Amodeo

Codirectora: Dra. Mercedes Perullini

Lugar de trabajo: Laboratorio de Relaciones Hídricas en Plantas | Acuaporinas, Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental (DBBE), Instituto de Biodiversidad y Biología Experimental y Aplicada (IBBEA), Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FCEN), Universidad de Buenos Aires (UBA).

Fecha de Defensa: 22 de diciembre 2021

Buenos Aires, 1 de diciembre 2021

Andrés Posbeyikian

Dra. Gabriela Amodeo

Dra. Ana Mercedes Perullini

ÍNDICE

Agradecimientos	2
I. Resumen	3
II. Abstract.....	4
III. Introducción.....	5
A. Estado actual de la agricultura.....	5
B. Estructura y aplicaciones del alginato.....	6
C. Dinámicas presentes en la formación de la cápsula de alginato. Expulsión de líquido (sinéresis) y migración del frente de gelación.....	6
D. Sistema experimental para el estudio de las cinéticas de gelación por video-microscopía de campo claro y tinciones.....	9
IV. Objetivos e Hipótesis	11
V. Materiales y Métodos	12
A. Generación de microesferas de Alg-Ca(II)	12
B. Análisis de imágenes en <i>Fiji</i>	12
C. Procesamiento de datos	13
D. Obtención de datos manuales.....	13
E. Ajustes estadísticos y comparación entre sistemas.....	13
VI. Resultados	14
A. Protocolo para la medición de la cinética de sinéresis. Descripción y validación	14
B. Comparación de sinéresis entre sistemas empleando el método automático	17
C. Descripción y validación del protocolo para la medición del frente de gel	18
(i) Análisis automático de imágenes con código Macro en <i>Fiji</i> y obtención de señal a partir de imagen.....	18
(ii) Procesamiento de señales usando librerías de Python 3 (<i>SciPy</i> , <i>Pandas</i> y <i>Seaborn</i>)	20
(iii) Validación del método automático de medición de cinética de frente de gelación usando un método manual	22
D. Comparación de la cinética de migración del frente de gelación entre sistemas distintos usando el método automático	23
VII. Discusión y Conclusiones.....	24
VIII. Figuras Suplementarias	27
IX. Referencias Bibliográficas	28
X. ANEXO	29

Agradecimientos

A mi abuelo Juan y mi abuela Margarita, por su confianza en mí;

A mis padres y hermano, que me acompañan con mucho amor;

A mi primo Alec, que me enseñó de constancia y voluntad;

A Gabriela, que me dio su confianza y me enseña a ver el bosque y no el árbol;

A Mercedes y Patricio, por su apoyo, su vasto conocimiento sobre alginatos, y su calidez;

A Esteban, por su creatividad, compañerismo y amabilidad constantes;

A mis compañeros de laboratorio, por generar un ambiente estimulante y un clima laboral amigable;

A Lena, por alegrar mis mañanas de viaje a la facultad y jugarme al veo-veo en estaciones de tren varias;

Y a Mariano, que como el sol, siempre está.

I. Resumen

La agronomía se encuentra hoy ante un desafío tanto estimulante como ineludible: adoptar prácticas más sustentables, sin perjuicio de sus rendimientos. El desarrollo de tecnologías de encapsulamiento a base de alginato de calcio (Alg-Ca(II)) está permitiendo llevar a cabo esquemas de fertilización de cultivos más eficientes y controlados. El alginato es un polisacárido biodegradable que tiene la capacidad de formar hidrogeles en presencia de cationes di- o tri-valentes, y la facilidad de su uso ha contribuido a su aplicación en diversos desarrollos biotecnológicos, principalmente para inmovilizar bio-entidades. Durante su síntesis por gelación ionotrópica, acontecen dos procesos simultáneos: la sinéresis (expulsión de agua) y el movimiento de un frente de gelación desde el medio entrecruzante hacia el centro de la microesfera. El desarrollo de metodologías de caracterización de estos sistemas permite correlacionar las variables de síntesis con las propiedades de las encapsulaciones obtenidas, a fin de lograr un diseño racional de estos dispositivos. Este trabajo propone dos metodologías con dos tinciones diferentes (caolín y azul de metileno) para estudiar estas dinámicas mediante video-microscopía óptica. Las imágenes obtenidas durante el proceso de síntesis de las cápsulas fueron analizadas de manera automática utilizando macros ejecutados en el software de análisis de imágenes de distribución gratuita *Fiji* y librerías de análisis de señales en *Python*, bajo la hipótesis de que la estandarización del procesamiento de las imágenes presentaría resultados en tiempos más acotados y con menor variabilidad que métodos similares manuales. Se realizaron ajustes matemáticos sencillos para los datos de cambio de volumen y de movimiento del frente de gelación a lo largo del tiempo, extraídos de imágenes de la síntesis de Alg en concentración 2,0% y 3,0%, en un medio entrecruzante CaCl_2 0,1 M. Estos ajustes permitieron hallar parámetros que caracterizan las cinéticas estudiadas, y confirman las hipótesis planteadas, ya que se logró desarrollar herramientas que reducen el tiempo de análisis hasta en un 300%, y llegan a reducir el ruido de las determinaciones hasta en un orden de magnitud. Las herramientas aquí desarrolladas podrían ser de utilidad para la amplia comunidad de científicos y fabricantes que requieren métodos fáciles y rápidos de análisis de sus formulaciones, y también para abrir un marco que permita desentrañar las características cinéticas de los procesos involucrados en la síntesis de microesferas de Alg.

II. Abstract

***In situ* evaluation of the formation kinetics of calcium alginate beads, through the development of a new transmission video-microscopy methodology**

Agronomic practices are currently facing both a stimulating and unavoidable challenge: adopting more sustainable practices, without the detriment of their yields. The development of encapsulation technologies based on calcium alginate (Alg-Ca (II)) is allowing to carry out more efficient and controlled crop fertilization schemes. Alginate is a biodegradable polysaccharide that can form hydrogels in the presence of di- or tri-valent cations, and its ease of use has contributed to its application in various biotechnological developments, mainly to immobilize bio-entities. During its synthesis by ionotropic gelation, two simultaneous processes take place: syneresis (water expulsion) and the movement of a gelation front from the cross-linking medium towards the center of the microsphere. This work proposes two methodologies with two different dyes (kaolinite and methylene blue) to study these dynamics by means of optical video-microscopy. The images obtained during the capsule synthesis process were automatically analyzed using macros run in the freely distributed image analysis software *Fiji* and signal analysis libraries in *Python*, under the hypothesis that the standardization of the image processing would present results in shorter times, and with less variability than similar manual methods. Simple mathematical fits were applied to the volume change and movement of the gelation front data, measured against time, extracted from images of the Alg synthesis at 2.0% and 3.0% concentrations, dripped in a CaCl_2 0.1 M crosslinking medium. These fits made it possible to find parameters that characterize the studied kinetics, and confirm the hypotheses raised, since it was possible to develop analysis tools that reduce the analysis time by up to 300% and reduce the noise of the determinations down to one order of magnitude. The tools developed here could be useful for the wide community of scientists and manufacturers who require easy and fast methods of analysis of their formulations, and to open a framework that allows the unraveling of the kinetics involved in the synthesis of alginate microspheres.

III. Introducción

A. Estado actual de la agricultura

Las prácticas agronómicas se encuentran hoy ante un desafío tanto estimulante como ineludible: adoptar prácticas más sustentables, sin perjuicio de sus rendimientos. La agricultura está teniendo un rol cada vez más importante en la economía global, principalmente por el aumento en la demanda alimenticia a medida que crece la población. La intensificación de la agricultura en las últimas décadas ha tenido impactos ambientales negativos, y la seguridad alimenticia ya está comprometida en ciertas regiones a causa de inundaciones y sequías promovidas por el cambio climático (Roberts *et al.*, 2021). El incremento de la productividad está siendo abordado desde muchos ángulos, de los cuales varios contemplan la necesidad de minimizar el impacto medioambiental.

Un ejemplo son los abordajes de ingeniería genética para el mejoramiento de los cultivos élite, con enfoques que van desde la sobreexpresión de proteínas que confieren resistencia a estreses bióticos y/o abióticos, hasta la modificación del metabolismo para lograr un uso más eficiente del agua y/o nutrientes, o resistencias a fitopatógenos que causan pérdidas económicas severas (Kuamar *et. al.*, 2020). Por otra parte, la mecanización de los procesos de siembra, irrigación, fertilización y cosecha también ha permitido incrementar los rendimientos sustancialmente, y se han desarrollado también tecnologías que permiten la pulverización selectiva de agroquímicos y/o fertilizantes; estas metodologías modernas arriban con el advenimiento de la *agricultura de precisión*, y de la mano del *Internet de las cosas* (WeedSeeker 2 de Trimble Inc.©, Jawad *et. al.* 2017).

El suministro eficaz de fertilizantes se está desplegando con diversas tecnologías que permiten cortar costos y optimizar el uso de nutrientes a la vez que baja el impacto ambiental. Las tecnologías de liberación controlada están optimizando las dosis efectivas de nutrientes percibidas por los cultivos. Hay técnicas de revestimiento de fertilizantes, y también de síntesis de cápsulas a base de biopolímeros (*e.g.* alginatos) con la capacidad de hidratarse con la llegada de la irrigación, y así liberar lentamente los fertilizantes en el suelo.

En nuestro laboratorio desarrollamos un proyecto tecnológico social (PDTs) enfocado en la optimización del manejo de agua y nutrientes en plantines de Eucalipto para su empleo en forestación. En ese marco, hemos desarrollado y descrito un gel de poli(acrilamida) superabsorbente biocompatible con la rizosfera, con la capacidad de mejorar la sobrevivencia de plantines durante su período crítico de implantación (Tubert *et al.* 2018). En la misma línea, estamos caracterizando cápsulas de liberación controlada de urea a base de alginato de calcio (Alg-Ca(II)), y los ensayos en invernáculo con plantines han mostrado los beneficios de suministrar esta fuente de nitrógeno vehiculizada en micropartículas de Alg-Ca(II).

B. Estructura y aplicaciones del alginato

El alginato o ácido algínico (Alg) es un término colectivo que refiere a una familia de exopolisacáridos producidos por algas pardas y numerosas bacterias. Alg es un copolímero lineal formado por residuos de β -D-manuronato (M) y α -L-guluronato (G) unidos en enlaces (1 \rightarrow 4) en distintas proporciones y variables arreglos secuenciales (Figura 1.A) (Donati *et al.*, 2005). Los alginatos son ampliamente empleados en la industria con diversas aplicaciones, dada su biodegradabilidad y su capacidad para retener agua formando geles. La gelación del Alg se puede lograr por varios métodos, entre ellos el entrecruzamiento iónico en presencia de cationes di- o trivalentes (Grant *et al.*, 1973; Sonogo *et al.*, 2016; Spedalieri *et al.*, 2015).

La gelación con Ca^{2+} es el método más extendido en aplicaciones biotecnológicas debido al bajo costo, alta biocompatibilidad y disponibilidad de sales de Ca^{2+} (Figura 1.A-B). La transición sol-gel rápida en presencia de concentraciones del orden milimolar de Ca^{2+} permite producir cápsulas esféricas goteando una solución del biopolímero en una solución de entrecruzamiento (Figura 1.C) (Spedalieri *et al.*, 2015). A pesar de la relativa simplicidad de su proceso de producción, los sistemas de Alg presentan arreglos moleculares de alta complejidad, que muestran grandes cambios ante pequeñas variaciones en las condiciones de síntesis (*i.e.* pH, calidad del agua, aditivos, temperatura, etc.).

C. Dinámicas presentes en la formación de la cápsula de alginato. Expulsión de líquido (sinéresis) y migración del frente de gelación

Comparado a otros polisacáridos como la gelatina o el agar, el Alg es capaz de formar hidrogeles independientemente de la temperatura, en presencia de cationes di- o trivalentes, o en condiciones ácidas (pHs inferiores a su pKa, cercano a 3,6) (Salvati *et al.*, 2021). El mezclado directo del alginato con cationes multivalentes raramente produce geles homogéneos, debido a que la unión es veloz e irreversible. Sin embargo, la introducción controlada de iones entrecruzantes es posible por el método de difusión, en el cual un ión entrecruzante (*e.g.* Ca^{2+}) difunde desde un reservorio grande hacia la solución de alginato. La gelación por difusión se caracteriza por tener cinéticas rápidas, y se utiliza con fines de inmovilización, visto que cada gota de solución algínica genera una única cápsula conteniendo el agente bioactivo atrapado (Smidsrød *et al.*, 1990). El ritmo de gelación es un factor crítico al momento de controlar la uniformidad y la fortaleza estructural del gel cuando se utilizan cationes divalentes, y una gelación lenta permite estructuras uniformes y de mayor integridad mecánica (Kuo *et al.*, 2001).

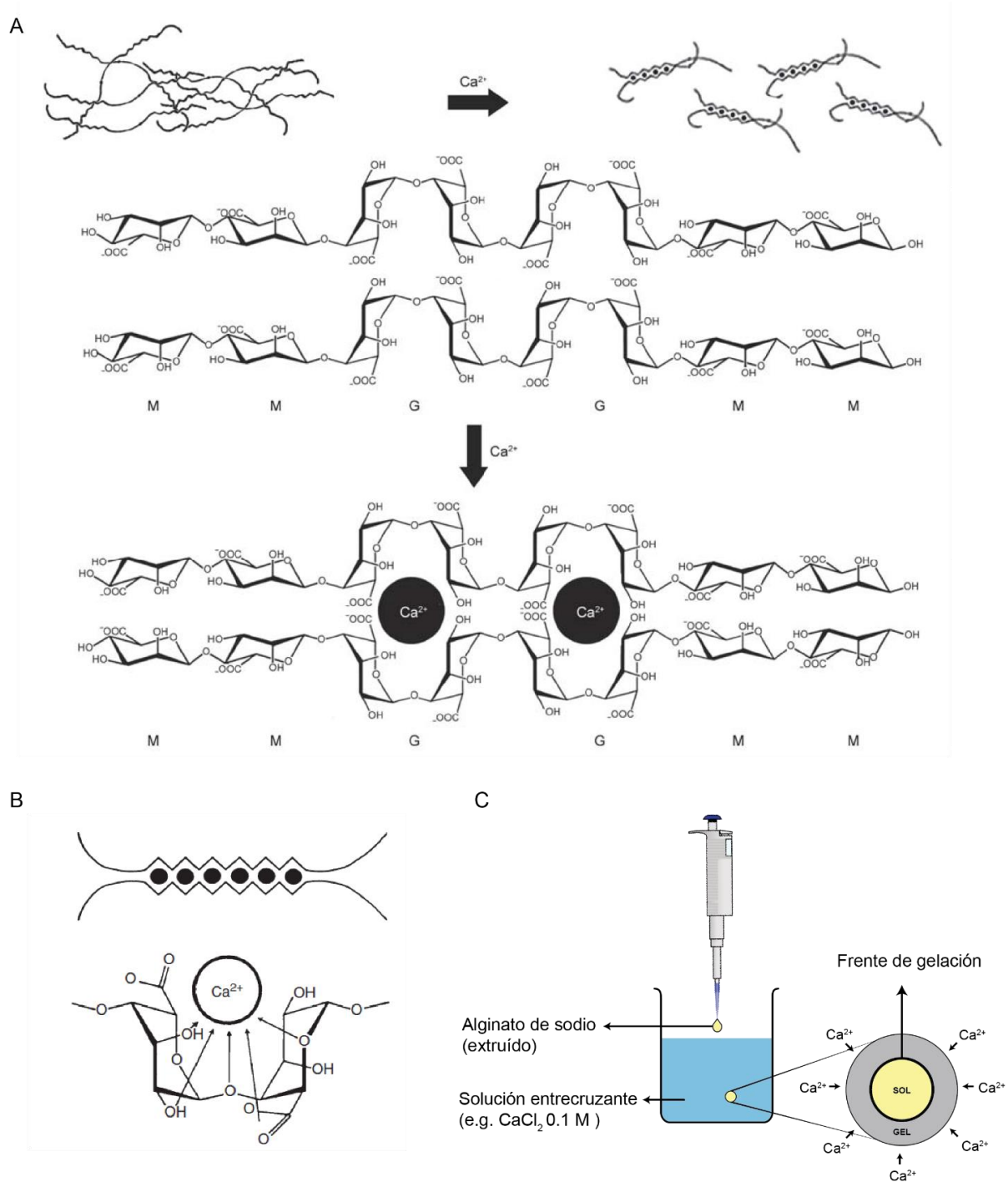


Figura 1: A) Esquema de la coordinación de Ca^{2+} con los grupos ácidos de subunidades G durante la gelación de alginato entrecruzado con iones de calcio; G: α -L-guluronato; M: β -D-manuronato. (Abdul Khalil *et al.*, 2017). B) Unión de cationes divalentes entre bloques homopoliméricos de residuos G (modelo de caja de huevo), y el sitio de unión sugerido en una secuencia GG (Skjåk-Bræk *et al.*, 2012). C) Esquema de la síntesis de cápsulas de Alg-Ca(II) por el método de goteo del extruido sobre una solución entrecruzante, y detalle de la formación del frente de gelación y difusión de calcio desde el medio.

Durante el proceso de formación de numerosos hidrogeles se ha observado que se da un proceso denominado **sinéresis**. La sinéresis se caracteriza macroscópicamente como un proceso lento de deshinchamiento del gel, que resulta en el exudado de un líquido. Se trata de un fenómeno comúnmente observado en varios sistemas que realizan la transición sol/gel, y generalmente representa un desafío para las industrias (e.g. manufactureras de alimentos). Numerosos trabajos describen las fuerzas impulsoras de este proceso en varios sistemas de hidrogeles biopoliméricos, pero los mecanismos moleculares que conducen a la sinéresis del alginato no están del todo esclarecidos, aunque se sabe que sobre ella influyen el peso molecular del alginato, y la proporción en la que se hallan los monómeros G y M (que varían según la especie de la cual derive el polisacárido), y de la concentración de los iones entrecruzantes (Draget *et al.*, 2001). El rearrreglo de las cadenas de alginato durante la polimerización del gel, y la consecuente reducción en volumen de las cápsulas es un probable causante de parte de la expulsión del agua, y en nuestra línea de investigación hemos visto que este cambio en volumen puede durar por lo menos seis horas para cápsulas de Alg-Ca(II).

Por otra parte, en los geles preparados por el método de gelación ionotrópica por difusión, suele suceder otro proceso en una escala temporal más acotada (~15 minutos, con variaciones): la migración de una zona de gelación. Durante la formación de la cápsula, comúnmente se presenta un **frente de gelación** nítidamente definido que avanza desde la superficie de la cápsula hacia su centro (Figura 1.C). Este frente de actividad separa la cápsula en una porción entrecruzada y una aún no-gelada, y la diferencia en los índices de refracción de estas regiones permite distinguirlas con la iluminación y tinciones apropiadas.

D. Sistema experimental para el estudio de las cinéticas de gelación por video-microscopía de campo claro y tinciones

Poder medir la dinámica de formación de una cápsula *in situ* sería de mucha utilidad para los investigadores, formuladores y personal que trabajan con ellas, ya que les otorgaría una herramienta nueva para evaluar el proceso de gelación en detalle, abriendo así las puertas para realizar controles de calidad y tomar decisiones efectivas en cuanto a la optimización de su sistema específico y su síntesis (*i.e.* reducir tiempos innecesariamente largos de entrecruzamiento, medir el efecto del agregado de un aditivo en el proceso de gelación, etc.).

Específicamente, la caracterización fina del proceso de migración del frente de gelación podría resultar beneficiosa para aquellos desarrollos que actualmente están inmovilizando bio-entidades como células bacterianas, fúngicas, vegetales, animales y hasta pequeños metazoos (Perullini *et al.*, 2014; Perullini *et al.*, 2015; Carabajal *et al.*, 2016). Analizar con precisión el espacio líquido interno de las cápsulas podría ayudar, por ejemplo, a optimizar la sobrevivencia de las especies biológicas encapsuladas.

Entre los métodos disponibles para realizar mediciones de estos dos procesos (migración del frente de gelación y sinéresis), existe la posibilidad económica y práctica de realizar video microscopía óptica (OVM). Algunos autores han descrito el uso de sistemas ópticos para hacer observaciones de cápsulas de matrices basadas en Alg, pero muchos de esos estudios sólo hacen una evaluación final de tamaño y forma (Liu *et al.*, 2016; Hajifathaliha *et al.*, 2020). Estudiar la progresión temporal de estos procesos podría introducir nueva información y reforzar el conocimiento actual sobre las dinámicas mencionadas.

Recientemente, nuestro grupo de trabajo comenzó a estudiar ambas cinéticas empleando técnicas de OVM; los resultados obtenidos demuestran que el uso de arcillas nano-particuladas y de tinciones hidrosolubles mejoran el contraste en imágenes de campo claro obtenidas para el proceso de sinéresis y avance del frente de gel, respectivamente. Hemos encontrado una configuración experimental y métodos de tinción que permiten adquirir imágenes de muy buena calidad para las dinámicas completas de estos dos procesos, sin alteraciones estadísticamente significativas respecto a las cinéticas en ausencia de tinción (Figura 2.A-B y Figura SI-1). Específicamente, vimos que se puede añadir a la solución de Alg la arcilla nano-particulada caolinita (K) en concentración final 0,05% (p/v), para lograr la tinción de la cápsula completa y un mejor contraste para el estudio del proceso de sinéresis, y la tinción hidrosoluble azul de metileno (MB) en concentración final 0,01% (p/v), para lograr una mejor visualización del frente de gelación.

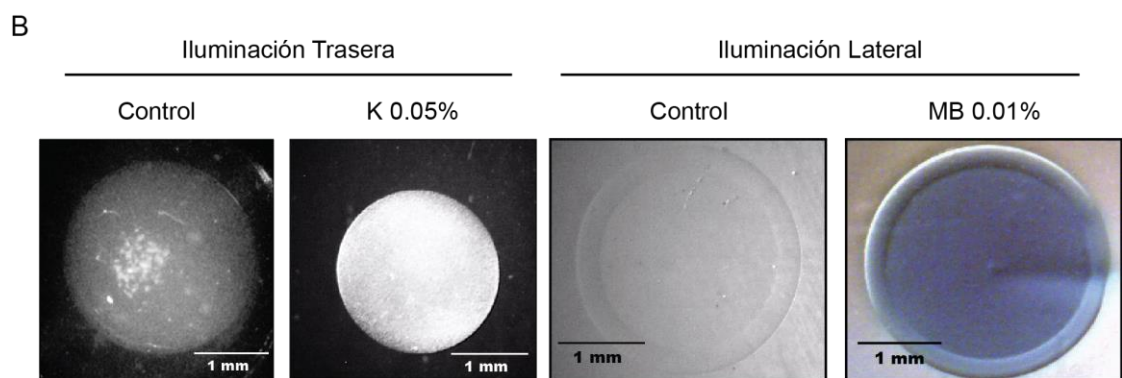
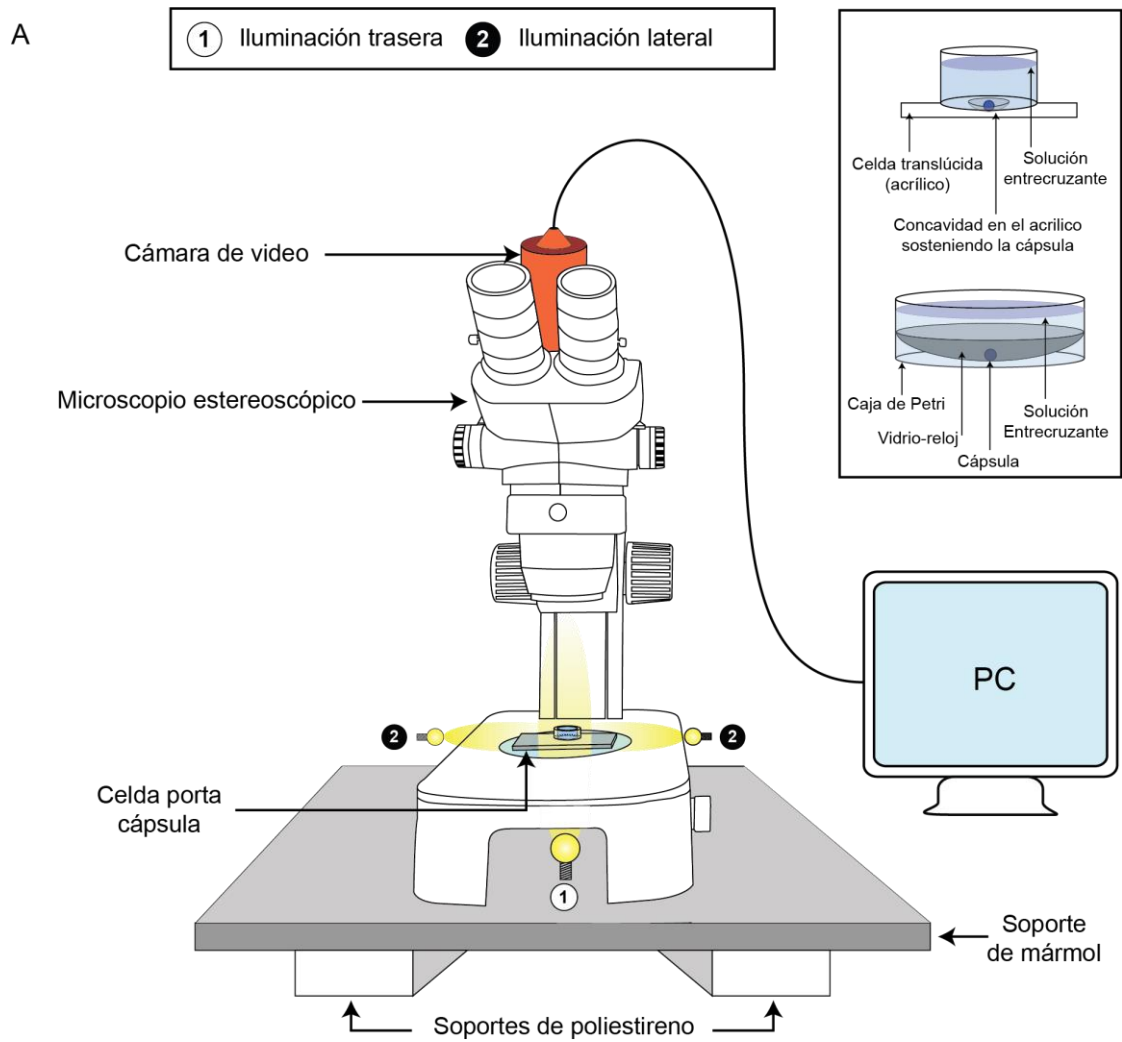


Figura 2: A) Esquema de la configuración experimental usada para medir los procesos de sinéresis y avance de frente de gelación a lo largo del tiempo. Recuadro: detalles de dos tipos de celdas que se pueden utilizar, una realizada en base a acrílico tallado, y la otra de vidrio. B) Imágenes obtenidas de Alg 2,0% (Control) con iluminación trasera o lateral, con o sin caolín 0,05% (K) o azul de metileno 0,01% (MB).

IV. Objetivos e Hipótesis

Muchos de los estudios que han descrito el uso de técnicas OVM para estudiar cápsulas a base de alginato se han limitado a realizar una evaluación final de tamaño y forma (Hajifathaliha *et al.*, 2020). Por ende, el objetivo principal de este trabajo es caracterizar la dinámica completa de la formación de cápsulas Alg-Ca(II), estudiando tanto la cinética de sinéresis como la migración del frente de gelación usando herramientas simples, convenientes y económicas. A través de ellas se buscará obtener mediciones valiosas que puedan complementar las mediciones complejas más tradicionales.

De este modo, se desarrollará una metodología automática de procesamiento de imágenes y posterior procesamiento de datos, que permita obtener resultados reproducibles y precisos de las cinéticas presentes durante la formación de la cápsula. Para ello, se programará un algoritmo capaz de procesar por lotes (*batch processing*) imágenes de OVM obtenidas durante una pasantía realizada previo al período de aislamiento social preventivo y obligatorio (ASPO) originado por la pandemia COVID-19.

Además, se buscará un ajuste matemático empírico sencillo a los datos, con el objetivo de estimar parámetros relevantes de las características físicas de los sistemas. Para validar los métodos automáticos, se contrastarán sus resultados contra valores de referencia, medidos manualmente por experimentadores entrenados. Se espera lograr una reducción tanto en la varianza de los parámetros estimados, como en el tiempo de análisis requerido, utilizando los métodos automáticos.

Finalmente, a fin de evaluar la resolución de las técnicas propuestas, se harán comparaciones entre las dinámicas de distintas formulaciones, y se compararán cápsulas de Alg-Ca(II) a diferentes concentraciones de alginato: 2,0 y 3,0%. Se espera que las metodologías aquí desarrolladas no sólo resulten de utilidad para la amplia comunidad de científicos y fabricantes que requieren métodos fáciles y rápidos de *screening* en diferentes condiciones de síntesis para evaluar y optimizar sus formulaciones, sino también para abrir un marco que permita desentrañar las características cinéticas de los procesos involucrados en la síntesis de microesferas de alginato.

V. Materiales y Métodos

A. Generación de microesferas de Alg-Ca(II)

Las cápsulas de alginato se prepararon goteando sobre una solución entrecruzante de CaCl_2 0,10 M, una solución de alginato de sodio 2,0 o 3,0% (p/p), teñida con la nano-arcilla caolín (K) en concentración final 0,05% (p/v) o con el colorante hidrosoluble azul de metileno (MB) en concentración final 0,01% (p/v), de acuerdo a su utilización en ensayos de sinéresis o de frente de gelación, respectivamente. En general, se pueden preparar microesferas de diámetro superior a 1,0 mm usando una jeringa con aguja, o una pipeta (Gombotz, 1998). En este trabajo se empleó una micropipeta de 200 μL (Gilson P200).

B. Análisis de imágenes en *Fiji*

En algunas secciones se mantiene en inglés el uso de algunos términos específicos; en particular, aquellos vinculados al empleo de librerías y módulos de *Python*, dado que las funciones originales están nombradas en inglés. Se desea facilitar de esta manera al lector el seguimiento de los pasos en los procedimientos empleados, así como de terminología descripta en la literatura, dado que se consideran parte esencial en el desarrollo de esta tesis. Estos términos se indican en letra cursiva.

Se programaron macros en el software de distribución gratuita para análisis de imágenes *Fiji* (*Fiji is just ImageJ*) (Schindelin *et al.*, 2012, disponible en <https://imagej.net/downloads>) para analizar los registros de ensayos de sinéresis y de avance del frente de gelación. Los algoritmos reciben las imágenes crudas para devolver series temporales acorde a la cinética estudiada: en los ensayos de sinéresis, los resultados son valores de V/V_0 (volumen instantáneo normalizado por un volumen inicial), mientras que en el caso de los ensayos de frente de gelificación, los resultados son valores de r/r_0 (posición relativa del frente de gelificación) a cada instante de tiempo. En ambos tipos de ensayo se trabajó con imágenes en escala de grises, ya que aquí el color no transmite información específica. De ser necesario, se eliminan artefactos y ruido de fondo aplicando algoritmos de desenfoque gaussiano y *despeckling*¹. La identificación de las regiones de interés (ROI) en las imágenes requirió la segmentación del primer plano del fondo (*foreground & background segmentation*). Para ello se combinaron técnicas de detección de bordes y *thresholding* (*i.e.* binarización de las imágenes con un umbral de tolerancia para ciertos valores de gris).

¹ Término referido a un proceso de eliminación de parches o puntos o manchas en la imagen *-speckles-*.

Se aplicó la Transformada Circular de Hough (HCT) para localizar las posiciones de la cápsula en el tiempo, y así corregir el efecto de la deriva (*drift*) de la cápsula en el campo del microscopio.

C. Procesamiento de datos

Los resultados obtenidos a partir de los macros fueron procesados en Python 3.0 utilizando las librerías Pandas, Seaborn, Matplotlib y Numpy.

D. Obtención de datos manuales

Se desarrolló un instructivo claro y conciso para la medición manual de las imágenes de ensayos de sinéresis, y de avance de frente de gelación, utilizando la interfaz de *Fiji*, y fue distribuido a los integrantes del proyecto de investigación para que realicen mediciones manuales e informen el tiempo que les toma hacerlas, posteriormente utilizadas para validar los métodos automáticos.

E. Ajustes estadísticos y comparación entre sistemas

Los ajustes a modelos matemáticos y la inferencia de parámetros se realizó con el software GraphPad Prism v.8, así como también los contrastes entre métodos (automáticos *versus* manuales) para cada cinética, y entre sistemas poliméricos (Alg 2,0% *versus* 3,0%).

VI. Resultados

A. Protocolo para la medición de la cinética de sinéresis. Descripción y validación

Se diseñó un protocolo para analizar de manera automática los cambios de volumen instantáneos en cápsulas de Alg-Ca(II) entrecruzando durante un período de aproximadamente 6 horas (ensayo de sinéresis). Para ello se desarrolló un código macro y se lo ejecutó desde el software de distribución gratuita *Fiji* (ver [anexo](#)).

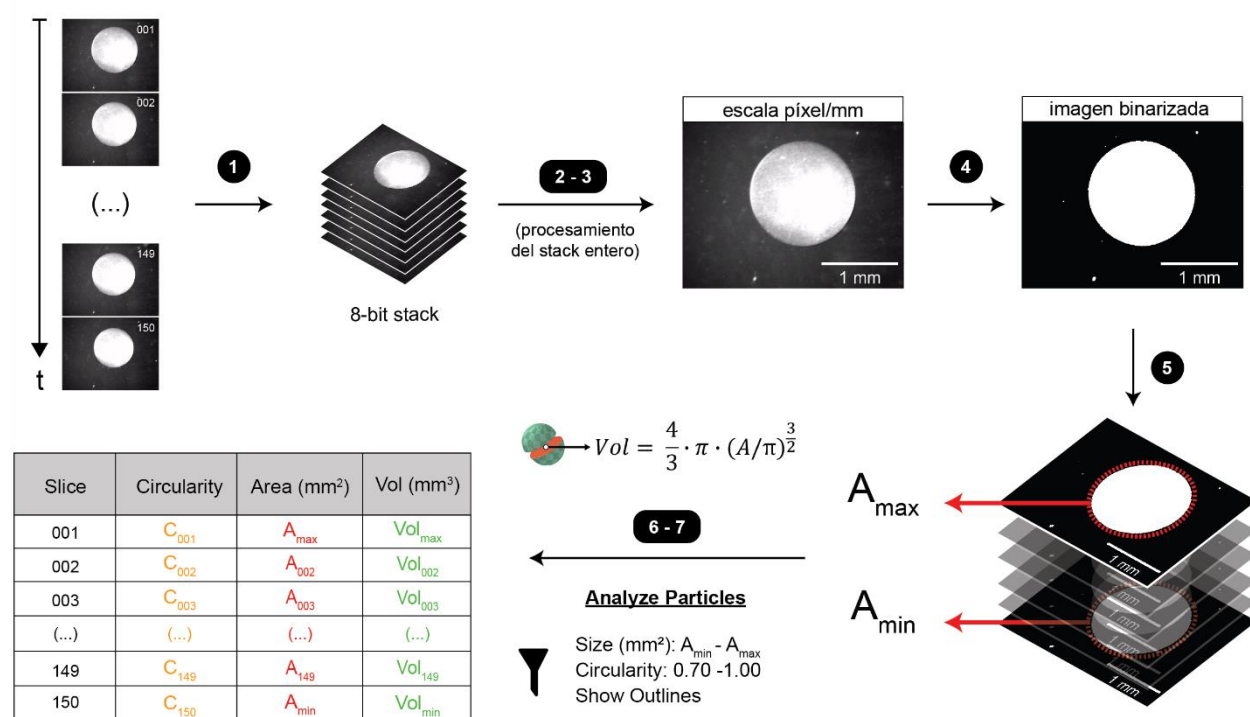


Figura 3: Esquematación del flujo de trabajo para el procesamiento automático de las imágenes provenientes de ensayos de sinéresis, con resultados parciales de cada paso, ejemplificando con una imagen del sistema Alg2-K entrecruzando en CaCl₂ 0,01 M.

En la [Figura 3](#) se puede observar un esquema del protocolo, que consta de los siguientes pasos: 1) Las imágenes sueltas se apilan (*stacking*) y se pasan a formato 8-bit; 2) Se calibra ingresando la escala mm/píxel; 3) Se aplica un filtro de desenfoque Gaussiano ($\sigma = 1,00$) para reducir el ruido de fondo; 4) Se aplica un filtrado por umbralización (*thresholding*), de forma de *binarizar* la imagen y discriminar claramente la cápsula completa en todas las posiciones temporales (cada *slice* del *stack*); 5) Se mide con la herramienta de óvalo de manera manual el área de la cápsula en 2 *slices*: aquellas que presenten la cápsula en su mayor y menor tamaño (estos límites servirán para definir los intervalos de tamaño que utilizará en el analizador de partículas en el paso siguiente); 6) Se corre el analizador de partículas, filtrando por tamaño y por circularidad, y este devuelve todos los valores de área calculados en cada *slice*, junto con descriptores de forma (*i.e.* circularidad, diámetro de Feret,

perímetro, etc.). Se guardan los contornos (*outlines*) de cada partícula detectada en cada *slice*, para llevar un control del análisis posteriormente, de ser requerido; 7) Finalmente se calculan los volúmenes en cada instancia de tiempo a partir de las áreas medidas. Si se toma como supuesto que las cápsulas son esferas perfectas, se puede medir en cada instante el área del gran círculo (*ortódromo*) de la cápsula. Estas mediciones pueden procesarse para obtener el volumen instantáneo de la cápsula para cada momento (Eq. 1), lo cual podría eventualmente convertirse en otras variables de interés como el flujo de agua (Sutka *et al.*, 2017).

$$\text{Volumen} = \frac{4}{3} \cdot \pi \cdot \left(\frac{\text{Area}}{\pi} \right)^{\frac{3}{2}} \quad (\text{Eq. 1})$$

Paralelamente, para validar los resultados obtenidos por el procesamiento automático, se llevó a cabo un protocolo de medición manual de las imágenes obtenidas en ensayos de sinéresis, a fin de contrastar los resultados de ambos métodos. Usando la herramienta “Oval Tool” del software *Fiji*, 4 operadores independientes ajustaron manualmente una elipse sobre el área de la cápsula en 20 puntos de tiempo (para 4 réplicas); se decidió medir en 20 imágenes de las 150 totales que registran la cinética en un plazo de aproximadamente 6 horas, de manera de cubrir uniformemente el proceso en una escala logarítmica de tiempo. Los valores de área medidos fueron convertidos a valores de volumen de la misma manera que se explicó anteriormente. El sistema medido fue alginato al 2,0%, caolín al 0,05% (p/v) (Alg2-K), entrecruzado en una solución CaCl₂ 0,1 M a 25°C.

Para poder unificar datos provenientes de ensayos independientes, se trabajó con la variable adimensional V/V_0 , que es el volumen estimado de la cápsula evaluado en un instante de tiempo, sobre el volumen inicial estimado. En cualquier ensayo dado, los primeros segundos suelen dar imágenes en movimiento y borrosas, debido a que la cápsula tarda unos 90 segundos aproximadamente en estabilizarse en el fondo de la celda. Por ende, se definió al tiempo inicial como aquél en el que había pasado la menor cantidad de tiempo desde el comienzo del entrecruzamiento, para el cual todas las réplicas de todas las condiciones brindaron una imagen enfocada de la cápsula, y, en consecuencia, todos los volúmenes en instantes subsiguientes fueron normalizados respecto al volumen de la réplica dada en ese instante inicial (t_0).

En la [Figura 4](#) se puede observar el resultado del estudio de la cinética de cambio de volumen medida sobre un mismo conjunto de datos por ambas metodologías, manual y automática. Como se puede apreciar en la figura, ambas técnicas reportan curvas cinéticas casi idénticas, con leves diferencias entre operadores. Algunos operadores informaron datos con mayor desvío que otros para un instante dado de tiempo.

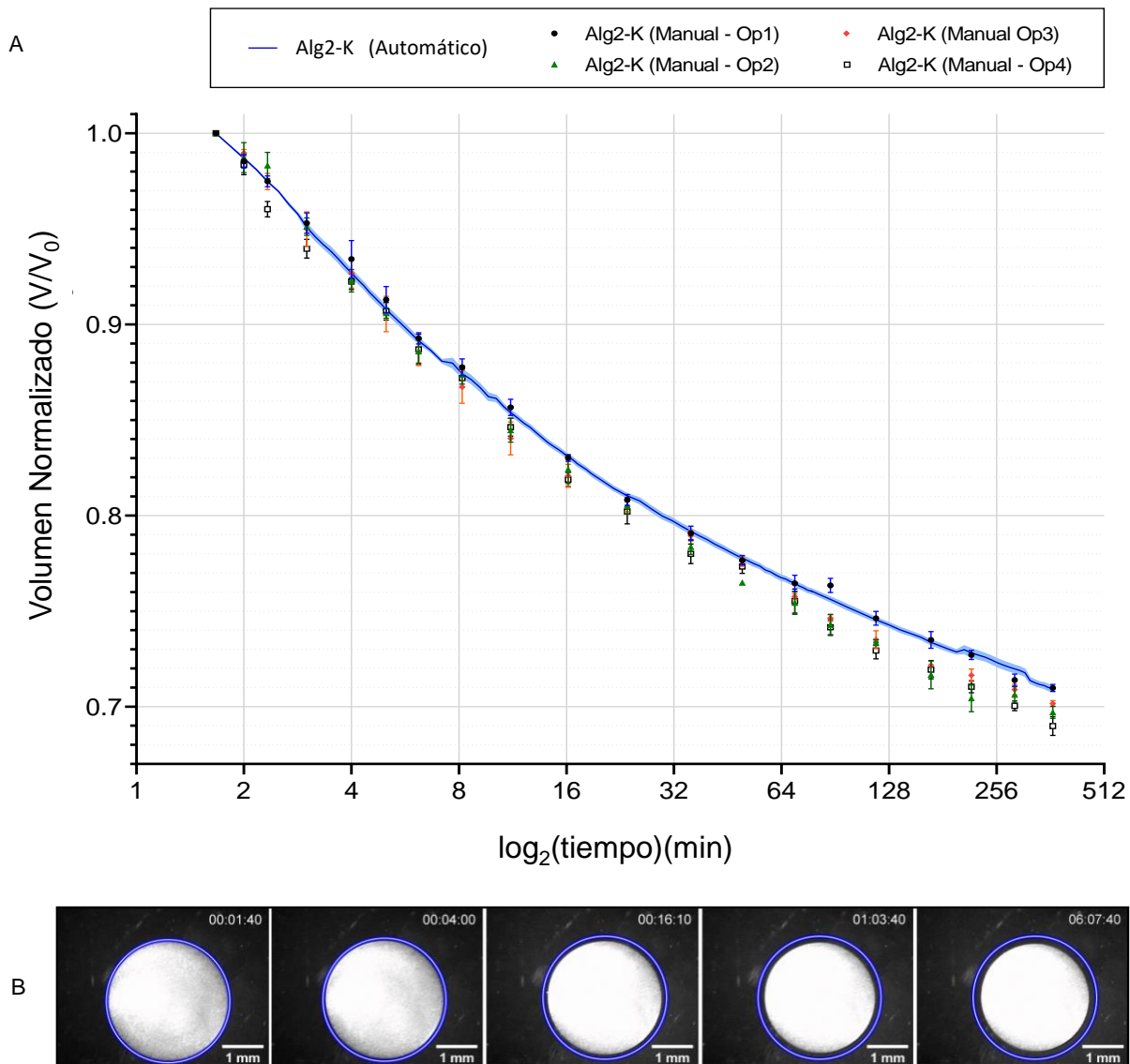


Figura 4: A) La cinética de cambio de volumen del sistema alginato 2,0%, caolín 0,05% (Alg2-K) fue registrada durante más de 6 horas usando la configuración experimental previamente descrita. Las imágenes obtenidas fueron procesadas tanto por un método manual como automático. El área sombreada en la curva Alg2-K (Automático) corresponde al Error Estándar de la Media (E.E.) ($n = 4$). Cuatro operadores distintos midieron el área de la cápsula en distintos puntos de tiempo en 4 experimentos independientes (las barras de error corresponden a E.E., $n = 4$). B) Se muestran imágenes crudas representativas del sistema Alg2-K en distintas instancias de la cinética. El área inicial de la cápsula está señalada en azul como referencia.

A simple vista se puede ver que el método manual presenta mayor variabilidad con respecto al automático. Cuando se toma en promedio el desvío de las mediciones agrupadas de todos los operadores para todas las instancias de tiempo, y se lo compara contra el desvío estándar de las mediciones automáticas tomadas para esos mismos tiempos, se ve que el método manual es 3 veces más ruidoso que el automático ($D.E._{\text{Automático}} = 0,003$; $D.E._{\text{Manual}} = 0,009$). El procesamiento automático de las imágenes de un experimento (con 4 réplicas) tomó aproximadamente 5 min, mientras que el análisis manual tomó entre 15 y 30 min (según el operador) para cada determinación.

B. Comparación de sinéresis entre sistemas empleando el método automático

Se empleó el método automático para procesar imágenes provenientes de dos sistemas de alginato a distintas concentraciones (2,0% y 3,0%), de los cuales se espera un comportamiento diferente respecto a su dinámica de cambio de volumen en el tiempo luego de la iniciación del entrecruzamiento.

La [Figura 5](#) muestra los valores experimentales obtenidos para muestras de sistemas Alg2-K y Alg3-K (alginato 3,0%, caolín 0,05%), junto con un ajuste a una exponencial de doble decaimiento, que se asocia a procesos que se dan en dos escalas temporales distintas durante la evolución de estos sistemas.

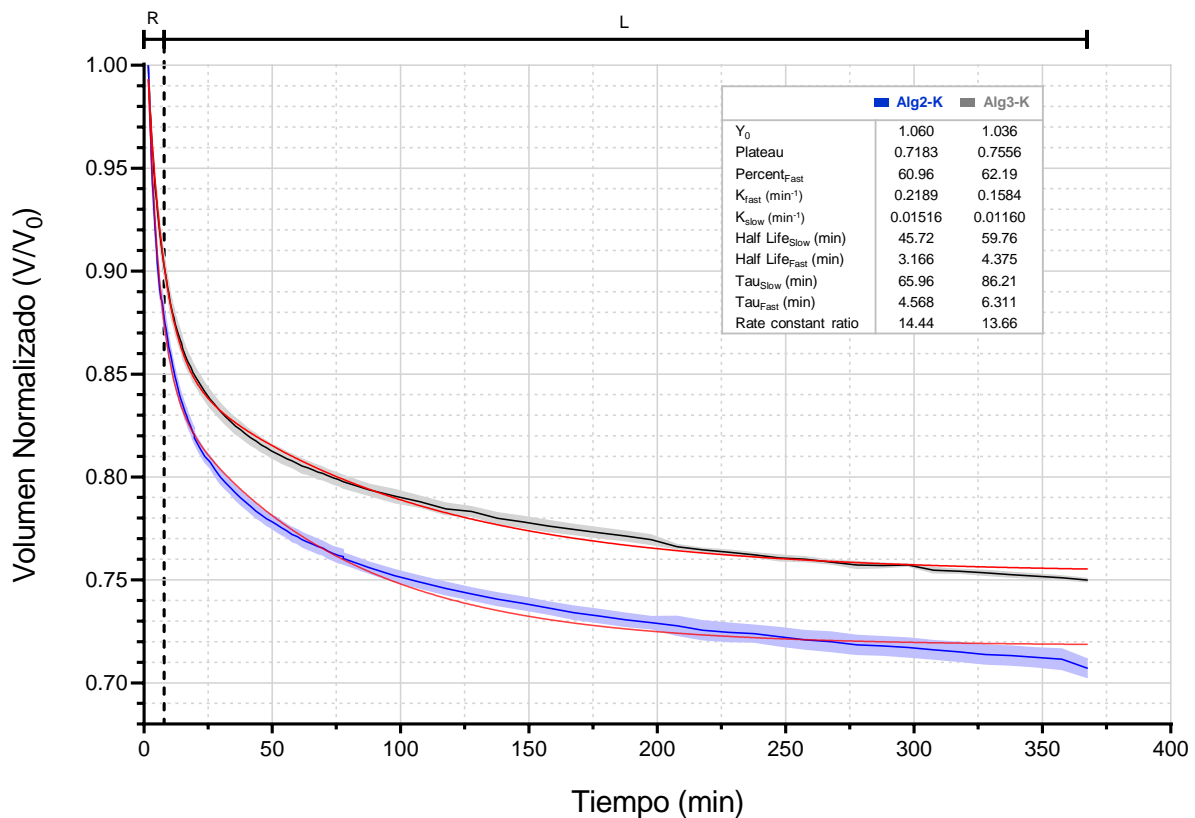


Figura 5: Cinéticas de cambio de volumen seguidas por video-microscopía de alginato 2,0% y 3,0%, ambos con la adición de caolín al 0,05% (sistemas Alg2-K y Alg3-K, respectivamente). Las áreas sombreadas corresponden al D.E., $n = 4$. La línea discontinua a los 7 minutos separa el proceso rápido (migración del frente de gelación) (R) del proceso lento (sinéresis a largo plazo) (L). Las curvas rojas corresponden a ajustes exponenciales de doble decaimiento para las muestras Alg2-K y Alg3-K ($R^2 = 0,9922$ Y $0,9917$ respectivamente), con los parámetros de ajuste presentados en el recuadro.

C. Descripción y validación del protocolo para la medición del frente de gel

(i) Análisis automático de imágenes con código Macro en *Fiji* y obtención de señal a partir de imagen

Se diseñó un protocolo para analizar de manera automática el avance del frente de gelación en cápsulas de Alg-Ca(II) entrecruzando durante un período de aproximadamente 10 minutos. Para ello se desarrolló un código macro ejecutable desde *Fiji* (ver [anexo](#)).

En la [Figura 6.A](#) se puede observar el avance del frente de gelación en el tiempo para los sistemas de alginato concentrado al 2,0% y 3,0%, con la tinción azul de metileno al 0,01% (p/v) (Alg2-MB y Alg3-MB, respectivamente). Se utilizó a modo de ejemplo una imagen de una cápsula del sistema Alg2-MB a 140 s de entrecruzamiento en una solución CaCl_2 0,01 M, y en la [Figura 6.B](#) se presentan resultados intermedios a lo largo del protocolo de determinación automática del avance del frente de gelación, que consta de los siguientes pasos: 1) Las imágenes son importadas en formato de *stack*, y convertidas a formato 8-bit, 2) Se aplica un filtro de desenfoque Gaussiano ($\sigma = 1,50$) al *stack* entero para reducir el ruido de fondo, se remueven *outliers* con la herramienta “*Remove Outliers*”, y se utiliza la herramienta “*Find Edges*” sobre el *stack*. 3) Se aplica un filtro de umbralización (*thresholding*) para el *stack* entero, de forma que permita la discriminación clara tanto del frente de gel como del borde de la cápsula para todos los instantes temporales, 4) Se selecciona manualmente una región de interés (ROI) que incluya a la cápsula en el *stack* entero, y se elimina todo lo que esté por fuera, para eliminar ruido y mejorar los resultados del algoritmo *Hough Circle Transform* (HCT) (*plugin* de UCB Vision Sciences suite), 5) Se miden manualmente un radio mínimo y máximo, que quedan configurados como límites para la búsqueda que realiza el HCT, 6) Se corre el algoritmo HCT, que encuentra en cada posición de tiempo un círculo correspondiente a la cápsula, y devuelve centroides y radios estimados para cada *slice* del *stack*, 7) Cada *slice* es transformado en una región cuadrada, con lados de longitud igual al radio máximo medido en el paso 5, y con centro en el centroide calculado por HCT. De este modo se obtiene un *stack* con todas las cápsulas alineadas por su centroide (siempre en el centro de la imagen), y se logra así resolver el problema ocasionado por la deriva de la cápsula (*drift*). 8) Se calcula el perfil radial de intensidad media del *stack* usando el *plugin* Radial Profile Extended de Philippe Carl, utilizando una combinación de ángulo inicial y ángulo de integración (θ) que permitan medir al frente de gelación y al límite de la cápsula, pero excluyan ruido ([Figura 7.A](#)), 9) Los perfiles radiales son exportados a un archivo .csv que será posteriormente procesado con la librería *Scipy* de Python.

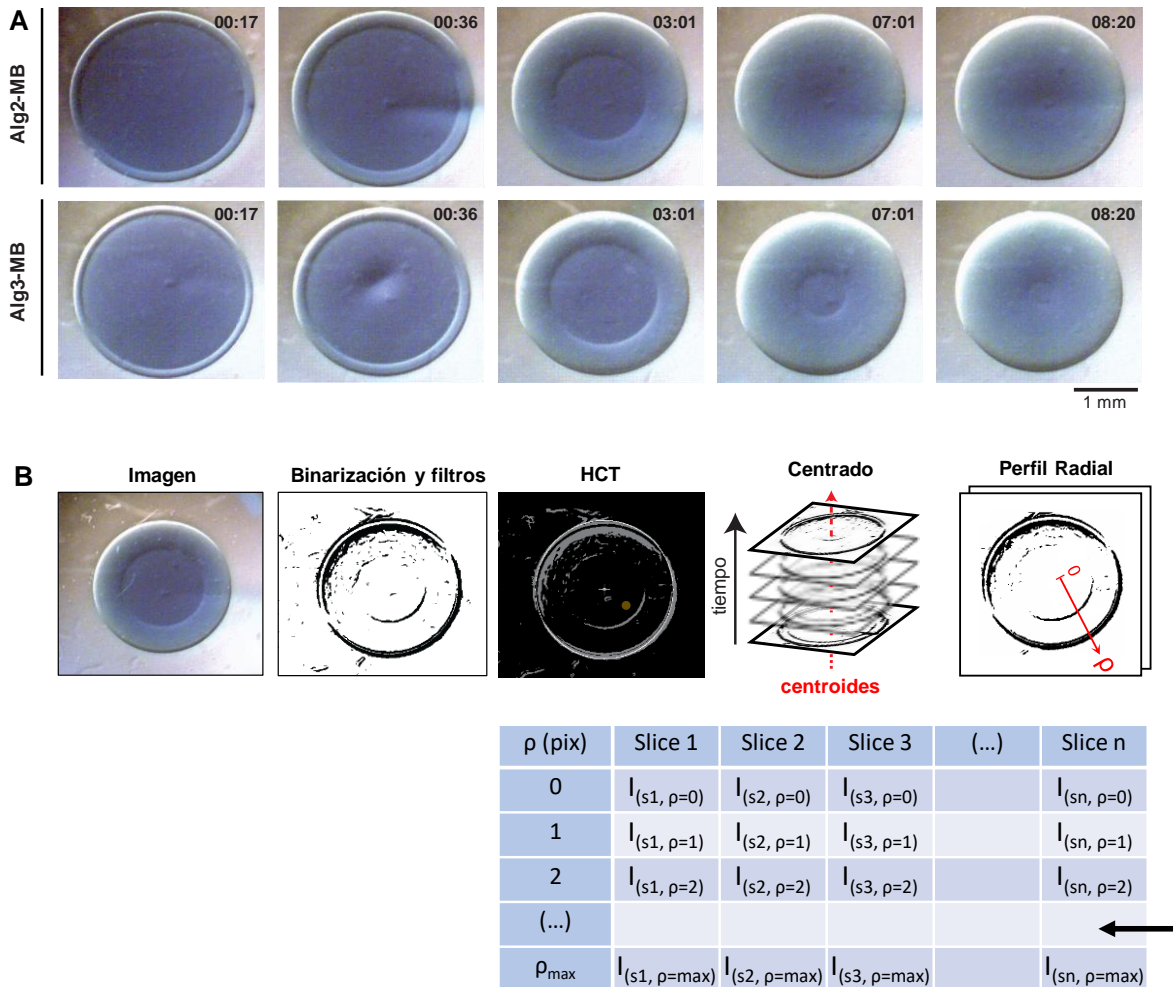


Figura 6: A) Imágenes de video-microscopía que muestran el avance del frente de gelación para alginato al 2,0% y 3,0%, ambas con azul de metileno en concentración 0,01% (p/v) (Alg2-MB y Alg3-MB, respectivamente), en diferentes momentos del proceso de gelación (17, 36, 181, 421 y 500 segundos). B) Esquematización del flujo de trabajo para el procesamiento automático de las imágenes provenientes de ensayos de frente de gelificación, con resultados parciales de cada paso, ejemplificando con una imagen del sistema Alg2-MB a 140 s de entrecruzamiento en CaCl_2 0,01 M. Primero las imágenes crudas son filtradas para reducir ruido y se aplica un umbral para *binarizar* la imagen. Luego el algoritmo *Hough Circle Transform* (HCT) encuentra la cápsula y devuelve su radio estimado y centroide, que son utilizados para alinear todos los *slices*, (eliminando así el problema ocasionado por la deriva de la cápsula (*drift*) y generar un *stack*). Finalmente, se calcula un perfil de intensidad radial media para cada *slice* y se exporta a un archivo .csv.

(ii) Procesamiento de señales usando librerías de Python 3 (*SciPy*, *Pandas* y *Seaborn*)

El archivo .csv obtenido luego del procesamiento de las imágenes de video-microscopía en *Fiji* (Sección C.i.) es abierto en *Python* y convertido a un *dataframe* usando la librería *Pandas* (v. 0.23.4) (para el código ver [anexo](#)). A continuación, se procede a buscar los picos correspondientes a la posición del frente de gelación (r) y el límite externo de la cápsula (r_0) en el perfil radial de cada instante temporal (Figura 7.A). Esto se logra usando la librería *SciPy* (v. 1.7.1), y en específico la función “*find peaks*” que está en su módulo “*signal*”. Esta función recibe una secuencia y parámetros opcionales definidos por el usuario como altura, umbral, distancia, prominencia, ancho, tamaño de *plateau*, entre otras, y devuelve los máximos de señal que coinciden con dichos parámetros en la secuencia ingresada. Para hallar los picos, el único parámetro que es necesario fijar es el de prominencia, que fue definido empíricamente con sus límites en 150 y 260.

En la Figura 7.B se puede observar cómo varía la posición de los dos picos de señal a lo largo del tiempo en una muestra del sistema Alg2-MB, en la medida que el alginato es entrecruzado con el Ca^{2+} . Mientras que la posición del frente de gelación se acerca cada vez más al núcleo de la cápsula, la posición del límite externo de la cápsula se mantiene casi invariable en el tiempo.

Una vez obtenidos los máximos de señal, son guardados en el *dataframe* y utilizados para computar la variable r/r_0 para cada instancia de tiempo, y el resultado se grafica usando la librería *Seaborn* (v. 0.11.2). En la Figura 7.C se puede observar el resultado de graficar esta variable para tres réplicas técnicas del sistema Alg2-MB. Como se puede ver, la tendencia del avance del frente de gelación parece ser lineal, y la variabilidad entre resultados provenientes de réplicas técnicas es muy baja (esto será discutido en mayor profundidad en la Sección C.iii.). Más allá de los 350 s, la intensidad de la señal proveniente del frente de gelación se vuelve imposible de medir, y es por esta razón que las observaciones en general no incluyen valores de $r/r_0 < 0,19$. Tampoco se observan datos para valores de $r/r_0 > 0,86$, y esto se debe a limitaciones del sistema de video-microscopía: la demora en la obtención de las primeras imágenes nítidas de la cápsula siempre es de unos segundos, tiempo durante el cual comienza su gelación y se separan r y r_0 .

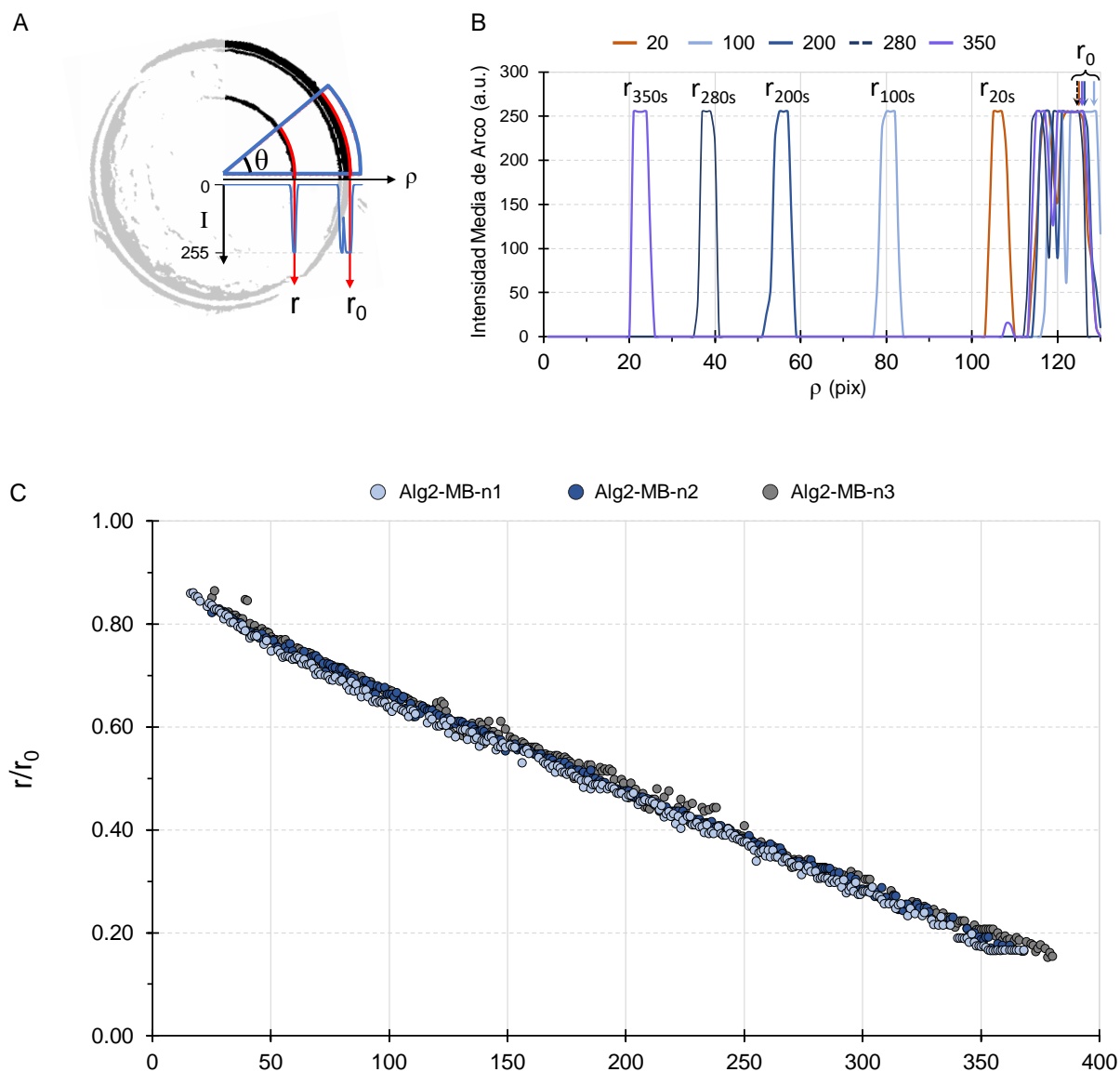


Figura 7: A) Determinación de intensidad media de arco para el sistema Alg2-MB a 140s, dentro de un ángulo de integración ($\theta = 20^\circ$). En rojo los arcos a radios $\rho = r$ y $\rho = r_0$. Se observa el perfil de intensidad de arco media versus radio (ρ), y la coincidencia de los máximos con r y r_0 . En el detalle, una esquematización de la cápsula con estas dos magnitudes rotuladas. B) Perfiles radiales a 5 instancias de tiempo: 20, 100, 200, 280 y 350s, con los picos correspondientes a r y r_0 . C) Cinética de avance del frente de gelación, medido como la variable adimensional r/r_0 para tres réplicas del sistema Alg2-MB. Las posiciones r y r_0 fueron obtenidas a cada instante de tiempo como se mostró en B.

(iii) Validación del método automático de medición de cinética de frente de gelación usando un método manual

Las imágenes obtenidas a partir de ensayos de migración del frente de gelación fueron analizadas manualmente, utilizando la herramienta "Oval Tool" de Fiji para medir dos áreas a distintos instantes de tiempo; un área interna (a) y un área externa (A), correspondientes a la porción total y no-gelada de la cápsula respectivamente (Figura 8). Estos valores de área fueron convertidos a radios, bajo el supuesto de que las cápsulas son esferas perfectas, obteniendo así valores de r y r_0 . Los instantes de tiempo elegidos para medir fueron los siguientes: 0,25; 0,37; 0,48; 0,60; 0,81; 1,05; 1,43; 1,68; 2,03; 2,33; 3,01; 3,50; 4,42; 5,48; 7,01; 7,90 y 8,33 minutos. Los últimos tres puntos temporales fueron solo medidos en el sistema Alg3-MB, porque este mostró movimiento del frente de gel aún a esos tiempos, a diferencia del sistema Alg2-MB donde el frente de gelación alcanzó el corazón de la cápsula a tiempos más tempranos.

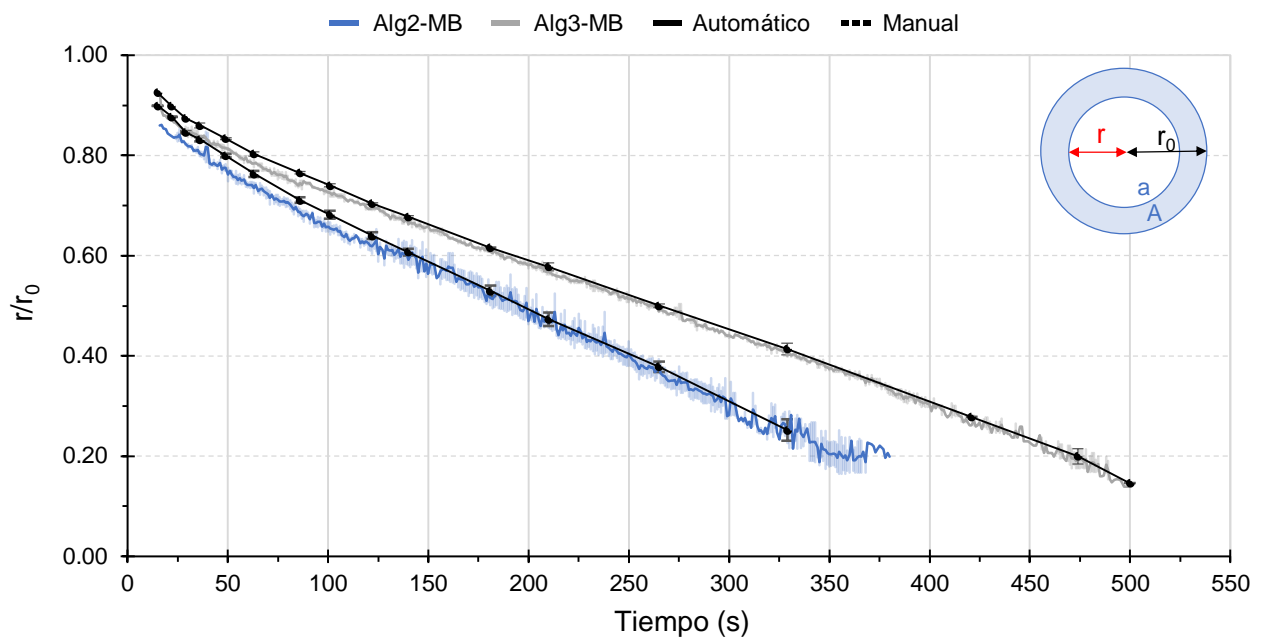


Figura 8: Avance del frente de gelación medido como la variable adimensional r/r_0 vs tiempo. Las barras de error y el sombreado corresponden al D.E. ($n = 3$). Ambos sistemas muestran una relación lineal con el tiempo para un rango extenso de r/r_0 . Detalle: diagrama mostrando los radios involucrados en la variable r/r_0 y las áreas A y a, correspondientes a la porción completa y no-gelada de la cápsula, respectivamente.

	Alg2-MB		Alg3-MB	
	Manual	Automático	Manual	Automático
m	$(-1,98 \pm 0,03) \text{ E-3 s}^{-1}$	$(-1,840 \pm 0,009) \text{ E-3 s}^{-1}$	$(-1,51 \pm 0,02) \text{ E-3 s}^{-1}$	$(-1,435 \pm 0,002) \text{ E-3 s}^{-1}$
b	$0,894 \pm 0,005$	$0,855 \pm 0,002$	$0,904 \pm 0,004$	$0,8743 \pm 0,0007$

Tabla 1: Parámetros estimados por regresión lineal para ensayos de frente de gelación de sistemas Alg2-MB y Alg3-MB mediante los métodos manual y automático (m: pendiente, y b: ordenada al origen). Se reporta el promedio \pm error estándar (E.E.) para los parámetros (n = 3).

En la [Figura 8](#) se pueden ver los resultados de las mediciones del movimiento del frente de gelación en los dos sistemas (Alg2-MB, Alg3-MB), medidos por el método manual (línea punteada) o automático (línea continua). Para comparar los métodos cuantitativamente, los datos provenientes de cada técnica fueron modelados mediante una regresión lineal, y los parámetros ajustados fueron comparados. Los resultados muestran que la estimación del ritmo de movimiento del frente de gel ($d(r/r_0) / dt$) es similar para ambos métodos, y que el error estándar es un orden de magnitud menor para la estimación de la pendiente para el método automático en comparación al manual para ambos sistemas ([Tabla 1](#)).

D. Comparación de la cinética de migración del frente de gelación entre sistemas distintos usando el método automático

El método de análisis automático aquí propuesto y validado mediante el método manual permite diferenciar estadísticamente la tasa de avance del frente de gelación de los sistemas estudiados. Las pendientes estimadas para los dos sistemas por regresión lineal a partir del método automático ([Tabla 1](#)) son significativamente diferentes ($p < 0,0001$).

VII. Discusión y Conclusiones

La motivación central de este trabajo es brindar herramientas que permitan automatizar y estandarizar en forma reproducible el análisis de las cinéticas que transcurren durante la síntesis de cápsulas de Alg-Ca(II): el proceso de sinéresis (expulsión de agua), y el fenómeno de avance de un frente de gelación. Se hizo particular hincapié en desarrollar herramientas simples, convenientes y económicas, así como también ajustes matemáticos empíricos sencillos a los datos, con el objetivo de estimar parámetros relevantes de las características físicas de los sistemas bajo la hipótesis de que se lograría reducir la varianza de estas estimaciones, en comparación con mediciones por métodos manuales.

De este modo, se trabajó con imágenes de cápsulas de Alg-Ca(II) teñidas con caolín y azul de metileno, y con imágenes obtenidas mediante microscopía de campo claro (Figura 2); tanto las tinciones empleadas como el uso de un microscopio de estas características son extremadamente económicos cuando se los compara con las otras metodologías estándar que suelen usarse para estudiar las propiedades físicas de estos sistemas, *i.e.* microscopías electrónicas de alta resolución (SEM, TEM), resonancia magnética nuclear (RMN), *small-angle X-ray scattering* (SAXS).

Adicionalmente, el procesamiento de las imágenes de ambos tipos de ensayo no fue en absoluto demandante, habiéndose podido realizar enteramente en una computadora portátil (procesador Intel® Core™ i5-6200U CPU, y 8,00 GB de memoria RAM, y un disco rígido de 885 GB), tomando como máximo 5 minutos de cómputo, y utilizando software de distribución libre como *Fiji* y códigos de librerías abiertas de *Python*, todo lo cual va en línea con el objetivo de desarrollar una solución accesible desde el punto de vista económico y sencillo con utilidad tanto para la investigación académica como para la industria.

En la automatización del procesamiento de las imágenes provenientes de la dinámica de sinéresis, se halló que la varianza promedio se redujo tres veces, comparando contra las mediciones manuales realizadas por cuatro operadores independientes. Una posible explicación para esto es que el método manual estima el volumen de la cápsula midiéndola con una elipse ajustada manualmente a su contorno, y esto está sujeto a la variabilidad inherente al manejo humano de esta tarea. Contrariamente a esto, el método automático utiliza un protocolo estandarizado que fija un umbral para la *binarización* de todas las imágenes provenientes de un ensayo dado, para que todas se midan del mismo modo, reduciendo así el ruido a lo largo de la curva (Figuras 3 y 4).

Por otra parte, el análisis automático de los datos provenientes de estos ensayos permitió obtener resultados a una velocidad entre un 300-600 % mayor respecto al análisis manual. Además, mientras que el método manual estuvo restringido a medir solamente 20 puntos temporales por réplica, el método automático fue suficientemente veloz como para permitir medir 150 imágenes por réplica (Figura 4). En suma, el método automático no solamente permite obtener datos más ágilmente y con menor variabilidad, sino que también provee mayor definición temporal de la cinética de sinéresis.

La elección de ajustar los datos de la cinética de sinéresis a un ajuste exponencial de doble decaimiento fue efectiva para los dos sistemas estudiados (Alg2-K y Alg3-K), que presentaron coeficientes de determinación muy cercanos a 1,00 ($R^2 = 0,9922$ y $0,9917$ respectivamente) (Figura 5). El hecho de que el cambio de volumen de la cápsula ajuste bien a un doble decaimiento, que da cuenta de dos procesos, uno rápido y otro más lento, es coherente ya que en los primeros ~10 minutos las cápsulas están realizando una transición sol a gel desde el exterior de la cápsula hasta su corazón, conforme difunden los iones Ca^{2+} desde el medio circundante, que finaliza luego de este período corto. Una vez finalizada la migración del frente de gelación, con la constante de decaimiento rápida asociada a la misma (K_{fast}) el proceso de sinéresis continúa en la medida en que las cadenas de alginato se reordenan y expulsan agua de la microesfera, generando un cambio en volumen con una constante de decaimiento mucho menor (K_{slow}), y que aquí medimos durante un plazo de ~6 horas, pero que sabemos por la bibliografía y modelado termodinámico, continúa más allá de este plazo (Perullini, 2009).

La metodología abordada y el procesamiento de los resultados de los ensayos de sinéresis brindó resultados con bajo ruido, que permiten discernir claramente el comportamiento de los dos sistemas ensayados, Alg2-K y Alg3-K. Esto es prometedor porque implica que la reproducibilidad de la técnica es alta, y su capacidad de resolución para discernir sistemas de distinta formulación también. Esto, aparejado con la simplicidad de la técnica, podría proveer una aplicación en control de calidad en las diversas industrias que hacen uso de la microencapsulación a base de alginatos: si se estudia la cinética de sinéresis de una formulación deseada, podrían hacerse controles en distintas tandas de producción para aseverar que estos parámetros determinados no varíen significativamente, indicando la integridad conservada en el proceso de producción. Por otra parte, conocer la cinética de sinéresis completa de un sistema también permitiría tomar decisiones informadas sobre cuánto tiempo es necesario permitir el entrecruzamiento de un sistema para lograr que alcance un volumen particular deseado, lo cual puede ser de interés para desarrollos tecnológicos que requieren microesferas en un rango de tamaños específicos.

Similarmente, los resultados obtenidos a partir del protocolo de análisis automático para las imágenes de ensayos de migración del frente de gelación presentaron una reducción del del error estándar por un orden de magnitud, respecto a las mediciones manuales, para la estimación de la tasa de migración del frente de gel (tanto para el sistema Alg2-MB como Alg3-MB) (Tabla 1). También se logró resolver mejor la cinética completa, pudiéndose medir con resolución de segundos el movimiento del frente de gel, en contraste con el método manual, para el cual hubo que reducir el análisis a 20 puntos temporales por cada réplica, por la gran demanda de tiempo que lleva medir manualmente dos áreas por cada imagen.

De la misma forma que el análisis para la dinámica de sinéresis pudo distinguir entre los dos sistemas estudiados, vimos que el estudio del frente de gelación también permite medir diferencias significativas entre sistemas con distinta concentración de Alg, para la tasa de avance del frente de gelación (Sección VI. D.). Como se dijo anteriormente, esto podría eventualmente ser aplicado para hacer un control de calidad, con la ventaja de tratarse de un proceso que se desarrolla en una escala temporal mucho más acotada que la dinámica de sinéresis, pero con la limitación de solo poder aplicarse a sistemas de encapsulación de sustancias translúcidas, ya que en los sistemas con cargas opacas la tinción de azul de metileno no serviría para distinguir el frente de gelación. Por otra parte, la precisión de esta técnica permite conocer la fracción no-gelada de la microesfera a cada instante de tiempo en el entrecruzante, lo cual puede ser de gran interés para aquellos que con fines académicos o industriales están trabajando con encapsulación de bioentidades. Tener esta información es relevante para definir las condiciones de síntesis óptimas (*i.e.* concentración de entrecruzantes, tiempo de entrecruzamiento) para lograr una cápsula con un volumen líquido determinado en el cual alojar células (bacterianas, vegetales, de metazoos o animales), por ejemplo, con posibles impactos sobre su probabilidad de supervivencia.

Una limitación de ambas metodologías automáticas aquí desarrolladas es que en rigor no son completamente automáticas, sino semi-automáticas, ya que dependen de un usuario en algunos de sus pasos. Esto seguramente podría resolverse en un futuro, diseñando protocolos más sofisticados que consigan suplementar autónomamente datos actualmente ingresados manualmente tales como límites de áreas máxima y mínima (en el protocolo para ensayos de sinéresis), o selección de ROI (en ensayos de frente de gelación).

En conclusión, los objetivos propuestos por este trabajo fueron alcanzados, visto que se logró desarrollar herramientas de análisis de las dinámicas presentes en la generación de cápsulas de Alg-Ca(II) mediante OVM asistida por tinciones, sin la necesidad de equipamientos o reactivos costosos y/o sofisticados, y el análisis posterior con ajustes

matemáticos sencillos y capaces de resolver diferencias en los parámetros estimados entre los sistemas estudiados.

VIII. Figuras Suplementarias

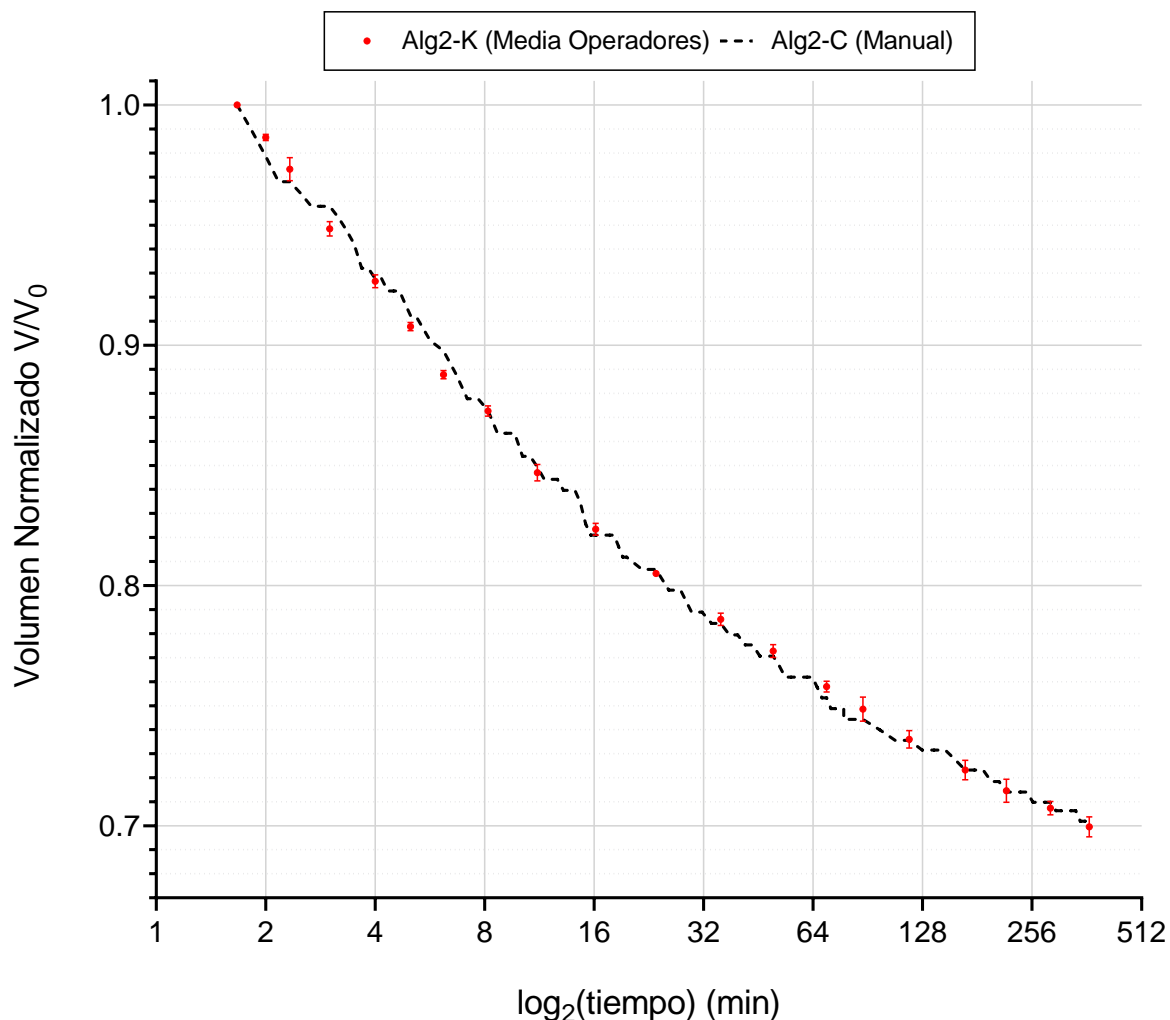


Figura SI-1: La cinética de cambio de volumen del sistema alginato 2,0 %, caolín 0,05 % (Alg2-K) fue registrada durante más de 6 horas usando la configuración experimental previamente descrita. Las imágenes obtenidas fueron procesadas por un método manual. Para la muestra Alg2-K, cuatro operadores distintos midieron el área de la cápsula en distintos puntos de tiempo en 4 experimentos independientes (las barras de error corresponden al desvío estándar (D.E.)). Como control, la cinética del sistema alginato 2,0 % sin la adición de la tinción mineral (Alg2-C) fue estudiada y procesada por el método manual (por un operador entrenado).

IX. Referencias Bibliográficas

Abdul Khalil H.P.S., Ying Ying T., Chaturbhuj Kumar S., *et al.* (2017), Biodegradable polymer films from seaweed polysaccharides: A review on cellulose as reinforcement material. *eXPRESS Polymer Letters* 11(4):244-265. doi: 10.3144/expresspolymlett.2017.26

Carabajal, M., Perullini, M., Jobbágy, M., Ullrich, R., Hofrichter, M. and Levin, L. (2016), Removal of Phenol by Immobilization of *Trametes versicolor* in Silica–Alginate–Fungus Biocomposites and Loofa Sponge. *Clean Soil Air Water*, 44: 180-188. <https://doi.org/10.1002/clen.201400366>

Draget, K. I., Gåserød, O., Aune, I., Andersen, P. O., Storbakken, B., Stokke, B. T., & Smidsrød, O. (2001), Effects of molecular weight and elastic segment flexibility on syneresis in Ca-alginate gels. *Food Hydrocolloids*, 15(4–6), 485–490.

Gombotz, Wayne R., SiowFong Wee (1998), Protein release from alginate matrices, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 31, 3, 267-285. doi: [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(97\)00124-5](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(97)00124-5)

Grant, Gregor T., Morris, Edwin R., Rees, David A., Smith, Peter J.C. and Thom, David (1973), Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: The egg-box model, *FEBS Letters*, 32, [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(73\)80770-7](https://doi.org/10.1016/0014-5793(73)80770-7)

Hajifathaliha, F., Mahboubiab, A., Nematollahic, L., Mohitd, E., Bolourchianb B. (2018), Comparison of different cationic polymers efficacy in fabrication of alginate multilayer microcapsules”, *Asian J Pharm. Sci.*, 15, 95-103.

Jawad HM, Nordin R, Gharghan SK, Jawad AM, Ismail M. (2017), Energy-Efficient Wireless Sensor Networks for Precision Agriculture: A Review. *Sensors (Basel)*; 17(8):1781. doi: 10.3390/s17081781. PMID: 28771214

Kumar K, Gambhir G, Dass A, Tripathi AK, Singh A, Jha AK, Yadava P, Choudhary M, Rakshit S (2020), Genetically modified crops: current status and future prospects. *Planta*; 251(4):91. doi: 10.1007/s00425-020-03372-8.

Kuo, C.K., Ma P.X. (2001), Ionically crosslinked alginate hydrogels as scaffolds for tissue engineering: part 1. structure, gelation rate and mechanical properties. *Biomaterials*. 22:511–521.

Liu, S., Li, H., Tang, B., Bi, S., Li, L., (2016), Scaling law and microstructure of alginate hydrogel, *Carbohydrate Polymers*, 135, 101–109.

Perullini, Ana Mercedes (2009), Síntesis de materiales inorgánicos con porosidad controlada para la inmovilización de células. Aplicaciones en biorreactores. Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

Perullini, M., Orias, F., Durrieu, C., Jobbágy, M., Bilmes S.A. (2014), Co-encapsulation of *Daphnia magna* and microalgae in silica matrices, a stepping stone toward a portable microcosm, *Biotechnol. Rep.*, 4, 147–150.

Perullini, M., Calcabrini, M., *et al.* (2015), Alginate/porous silica matrices for the encapsulation of living organisms: tunable properties for biosensors, modular bioreactors, and bioremediation devices, *Mesoporous Biomaterials*, 2, 3-12.

Roberts, D.P., Short, N.M., Sill, J. et al. (2021), Precision agriculture and geospatial techniques for sustainable disease control. *Indian Phytopathology* 74, 287–305. <https://doi.org/10.1007/s42360-021-00334-2>

Salvati, B., Santagapita, P., Perullini, M. (2021), Exploring the conditions to generate alginate nanogels, *Journal of Sol-Gel Science and Technology*.

Savary, S., Willocquet, L., Pethybridge, S.J. et al. (2019), The global burden of pathogens and pests on major food crops. *Nat Ecol Evol* 3, 430–439. <https://doi.org/10.1038/s41559-018-0793-y>

Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Cardona, A. (2012), Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 676–682.

Skjåk-Bræk, G., & Draget, K. I. (2012), 10.10 Alginates: Properties and Applications, *Polymer Science: A Comprehensive Reference*, 213–220. 10.1016/b978-0-444-53349-4.00261-2

Smidsrød, O.; Skjåk-Bræk, G. (1990), Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends Biotechnol.*, 8, 71–78.

Sonego J., Santagapita P. R., Perullini M., *et al.* (2016), Ca(ii) and Ce(iii) homogeneous alginate hydrogels from the parent alginic acid precursor: a structural study, *Dalton Trans.*, 45 (24), 10050-10057.

Spedalieri, C., Sicard, C., Perullini M., *et al.* (2015), Silica proton-alginate microreactors: a versatile platform for cell encapsulation, *Materials Chemistry B*, 3 (16), 3189-3194.

Sutka, M., Amodeo, G. & Ozu, M. Plant and animal aquaporins crosstalk: what can be revealed from distinct perspectives. *Biophys Rev* 9, 545–562 (2017). <https://doi.org/10.1007/s12551-017-0313-3>

Traffano-Schiffo, M.V., Perullini, M., *et al.* (2018), Gums induced microstructure stability in Ca(II)-alginate beads containing lactase analyzed by SAXS, *Carbohydrate polymers*, 179, 402-407.

Tubert, E., Vitali, V., Alvarez, M., Tubert, F., Baroli, I., Amodeo, G. (2017), Synthesis and evaluation of a superabsorbent-fertilizer composite for maximizing the nutrient and water use efficiency in forestry plantations, *J. Environ Manage.*, 210, 239-254.

X. ANEXO

[Repositorio Github](#) con código para macros en *Fiji* y análisis de señal del frente de gelación en *Python* (https://github.com/andyposbe/Tesis_Licenciatura).