

POLIHIDROXIBUTIRATO COMO AGENTE DE RECUBRIMIENTO PARA FERTILIZANTES DE LIBERACIÓN CONTROLADA.

Fabro, Martín^{1,2}

¹Laboratorio de Fermentaciones - Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral.

²Laboratorio de Microbiología Molecular - Instituto de Agrobiotecnología del Litoral.

Directora: Vanina Elizabet Marquez¹.

Co Directora: Claudia Alicia Studdert².

Área: Ciencias Biológicas.

Palabras clave: Polihidroxibutirato, fertilizante, liberación controlada.

INTRODUCCIÓN

Entre los principales desafíos del futuro, se encuentra el de asegurar alimentos para satisfacer el aumento en la demanda, para lo cual es necesario, entre otras cosas, aumentar la eficiencia de los cultivos, así como también disminuir las pérdidas producto de la falta de fertilidad en los suelos. Para enfrentar esta problemática se utilizan fertilizantes que compensen las carencias del suelo y satisfagan las necesidades nutricionales de las plantas. Los fertilizantes nitrogenados como la urea, presentan una utilización efectiva del nitrógeno de entre el 40-70% (Bilal Beig, 2020), esta baja efectividad es producto, entre otros factores, de una rápida liberación de la urea en el suelo, que puede provocar daños al cultivo, así como también contaminación en fuentes de agua subterránea debido a filtraciones y liberación de amoníaco a la atmósfera. Muchos autores sugieren realizar una cobertura polimérica sobre los fertilizantes ordinarios de urea, para disminuir la tasa de liberación en el suelo (Bilal Beig., 2020). Inicialmente se utilizaron materiales de cobertura sintéticos, no biodegradables, los cuales desencadenaron problemas, debido a su lenta o nula descomposición en el suelo. Es por este motivo, que últimamente el enfoque se centró en buscar coberturas para los fertilizantes basadas en polímeros naturales biodegradables o blends de polímeros. Entre estos materiales se encuentra el Poli-3-hidroxibutirato (PHB), derivado de fuentes naturales, que constituye un polímero biodegradable aceptable para esta finalidad (Costa M. , 2013).

Título del proyecto: NUEVOS AGENTES BIODEGRADABLES COMO RECUBRIMIENTOS PARA LA LIBERACIÓN CONTROLADA DE FERTILIZANTES.

Instrumento: Plan de excelencia en investigación científica (PEICID) y Curso de Acción para la Investigación y Desarrollo (CAI+D). Año convocatoria: 2021

Organismo financiador: Agencia Santafesina de Ciencia, Tecnología e Innovación

Directora: Studdert, Claudia Alicia.



OBJETIVOS

- * Utilizar el PHB producido por *Halomonas titanicae* KHS3 como material de encapsulación o recubrimiento de urea.
- * Evaluar diferentes protocolos para la encapsulación o recubrimiento de urea.
- * Analizar la cinética de liberación de urea a partir de los productos encapsulados o recubiertos.

METODOLOGÍA

Obtención del PHB.

A partir de biomasa liofilizada y seca (2 lotes de 5,84 g y 4,996 g respectivamente) se extrajo el PHB. Para esto, la biomasa liofilizada se resuspendió en 200 mL de una solución de HClO 1%, y se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. Posteriormente se llevó a un volumen final de 1 L con la solución de HClO y se incubó 1 h a 37°C en un agitador orbital a 200 RPM. En esta etapa se consigue la lisis de las bacterias y la liberación del PHB. Luego se procedió a colectar el PHB liberado por centrifugación a 15500 g durante 10 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en etanol, se volvió a centrifugar a 15500 g y se retiró el sobrenadante. Luego se dejó secando bajo campana para favorecer la evaporación del etanol. Finalmente se liofilizó el PHB resultante para su almacenamiento y posterior uso.

Obtención de las partículas.

Las partículas fueron preparadas por investigadores del Instituto de Investigaciones en Ciencia y Tecnología de Materiales (UNMdP-CONICET). Brevemente, se preparó una solución de PHB 3,5 % p/v en ácido acético glacial y una solución al 3 % p/v de Urea. Se colocó la solución de urea en un vaso de precipitado, y se agregó por goteo mediante velocidad de infusión controlada la solución de PHB, generando una dispersión de alto rendimiento mediante homogeneización con Ultraturrax. Para preparar las partículas de Urea-PHB-PVA, la suspensión de urea y PHB se agregó a la solución de PVA 1 % (p/v). Luego del procesamiento, se colocaron ambas suspensiones en agitación magnética (750 rpm) durante 1 h, para favorecer la evaporación del solvente. Posteriormente, se dejó en agitación durante 6 h, para garantizar la evaporación total del solvente residual.

Obtención de gránulos recubiertos y láminas de PHB-urea.

Se preparó una solución de PHB 5% (p/v) en cloroformo, incubando en baño maría a 40°C durante 10 min., para favorecer la disolución. Posteriormente se integró la solución de PHB con 1,8497 g de gránulos de urea en un vaso de precipitado y se agitó durante 5 minutos en agitador orbital. Se volcaron los gránulos recubiertos sobre la superficie de un colador plano, permitiendo drenar el exceso de solución de PHB a la vez que se evaporaba el solvente. Una vez secos, los gránulos se recuperaron y se pesaron para inferir la cantidad de PHB depositado sobre su superficie.

Se prepararon láminas de PHB conteniendo urea de diferentes dimensiones con algunas diferencias en los procedimientos. Una de ellas (lámina 1) se preparó agregando 250 mg de urea en polvo a una solución de PHB 5% (p/v) preparada como se indicó previamente. Se

volcó la mezcla sobre una de las mitades de una caja de petri, y se dejó evaporar el solvente en agitación mecánica suave. Por otra parte, se prepararon láminas más pequeñas (láminas 2 y 3) vertiendo la solución de PHB 5% (p/v) sobre una cantidad conocida de urea en polvo, dispuesta sobre una de las mitades de una caja de petri. Sin homogeneizar, se incubó de manera estática hasta la evaporación completa del solvente.

Cuantificación del contenido de PHB y urea en las partículas

Para determinar el contenido de polímero en las partículas preparadas tanto con PHB como con PHB-PVA, se prepararon por triplicado suspensiones de 50 mg de urea pura como control positivo y para cada tipo de partícula en 100 mL de agua. Estas se incubaron durante un lapso suficiente, previamente ensayado, para permitir la liberación de la totalidad de la urea. Se filtraron estas suspensiones utilizando filtros de fibra de vidrio previamente secados y pesados. Las partículas retenidas se lavaron con agua destilada. Los filtros con las partículas retenidas se secaron a 60°C durante 24 hs y fueron pesados. Por otro lado, el contenido de urea en el filtrado fue determinado empleando un kit enzimático colorimétrico comercial (Uremia, Wiener Lab, Argentina), siguiendo las instrucciones del proveedor.

Liberación de urea desde gránulos y láminas en medio acuoso

Una suspensión de 100 mg de gránulos de urea recubiertos con PHB en 10 mL de agua destilada, se incubó en agitación orbital (100 RPM) y se tomaron muestras de la fase líquida a los 0; 2,5; 5 y 10 min. Se realizó en paralelo un ensayo control en el que la suspensión contenía 100 mg de gránulos de urea sin recubrir.

Para evaluar la liberación desde las láminas, cada lámina se suspendió en 10 mL de agua, y se incubaron de manera estática, tomando muestras periódicamente de la fracción líquida, homogeneizando previamente.

La concentración de urea en las muestras de los distintos ensayos se determinó con el kit colorimétrico como se mencionó anteriormente.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Como se muestra en la **Fig. 1.A**, en el caso de las partículas de PHB-urea, la masa de PHB, retenida en los filtros luego de haber liberado toda la urea al medio acuoso, resultó ser un 59,5% en base a la masa de dichas partículas. En el caso de las de PHB-urea-PVA, la masa de PHB resultó ser un 22,3%. Se estima que un porcentaje de la masa de las partículas corresponde a PVA y este fue solubilizado por el agua. Por otra parte, la concentración de urea cuantificada en el filtrado fue de $(2,0 \pm 0,9)$ mM para las partículas preparadas con PHB y de $(3,9 \pm 0,7)$ mM para las de PHB-PVA. Si bien aquí se verifica que las partículas efectivamente contienen los respectivos polímeros, según pudo establecerse en ensayos preliminares, la liberación de la urea fue instantánea, no sufrió retraso cuantificable al ser encapsulada en estas partículas, tomando como control urea no encapsulada en polvo.

En el caso de los gránulos recubiertos, preparados acorde a lo descrito en el apartado de metodología, el porcentaje de PHB que forma parte del recubrimiento resultó ser un 1,2 % de la masa total de las partículas. En el ensayo de liberación de urea desde estos gránulos, se verificó que la máxima concentración de urea en la fracción líquida se alcanzó a los 2,5

min., como se observa en la **Fig. 1.B**. Este tiempo coincide con el requerido para alcanzar dicho máximo en el ensayo con los gránulos no recubiertos. Por lo tanto, este método tampoco permite retrasar la liberación de la urea empleando PHB como material de recubrimiento.

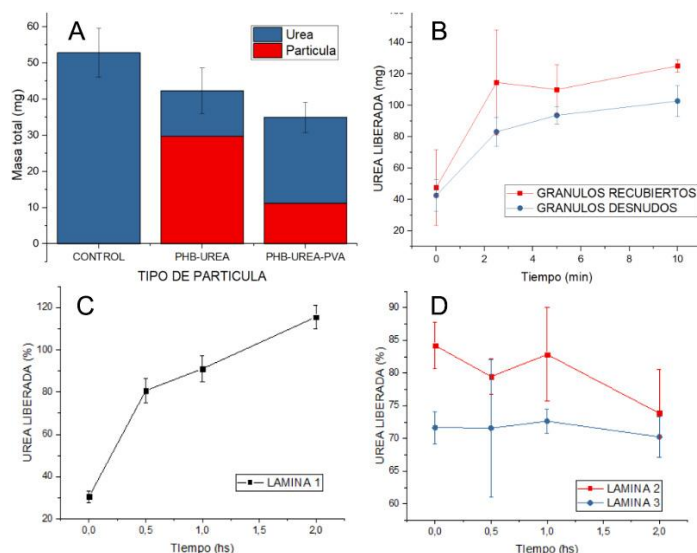


Figura 1: **A.** Gráfico de barras representativo del contenido de urea en partículas de urea (control), PHB-urea y PHB-urea-PVA (n=3). **B.** Curva de liberación de urea en el tiempo para gránulos recubiertos y gránulos desnudos (control). **C.** Curva de liberación de urea en el tiempo para lámina 1 (250 mg de urea). **D.** Curva de liberación de urea en el tiempo para lámina 2 (22,4 mg de urea) y lámina 3 (18,6 mg de urea).

Respecto a la liberación desde las láminas, como se puede observar en la **Fig. 1.C**, la nro. 1 (preparada con agitación constante durante el proceso de evaporación del solvente), permitió cierto grado de retraso en la liberación de la urea contenida en su interior, alcanzando la concentración máxima (288,86 mg) en la fase líquida a los 120 min. Por otra parte, las láminas 2 y 3, liberan la mayor parte de su contenido de urea de manera prácticamente instantánea, detectándose esa concentración máxima desde la primera muestra, inmediatamente luego de ponerlas en contacto con la fase acuosa.

Se puede concluir que se pudieron obtener productos con diferentes contenidos de urea y polímero, usando tanto urea granulada como urea polvo. Sin embargo, en las condiciones estudiadas la mayoría de los productos formulados no permitió alcanzar un grado deseable de retraso en la liberación.

BIBLIOGRAFÍA

Bilal Beig, Muhammad Bilal Khan Niazi, Zaib Jahan, Arshad Hussain, Munir Hussain Zia & Muhammad Taqi Mehran 2020. Coating materials for slow release of nitrogen from urea fertilizer: a review, Journal of Plant Nutrition.

Costa MM, Cabral-Albuquerque EC, Alves TL, Pinto JC, Fialho L. 2013. Use of polyhydroxybutyrate and ethyl cellulose for coating of urea granules. J Agric Food Chem.