

DESARROLLO DE BIOMATERIALES MIXTOS COMO AGENTES DE RECUBRIMIENTO PARA FERTILIZANTES DE LIBERACIÓN CONTROLADA

Schenfeld, Camila

Instituto de Agrobiotecnología del Litoral (UNL-CONICET) y Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (UNL)

Directora: Márquez, Vanina

Codirectora: Studdert, Claudia

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: Biopolímeros, Polihidroxitirato, Fertilizante.

INTRODUCCIÓN

Dada la problemática ambiental y la degradación de la calidad del suelo causadas por el uso inadecuado de fertilizantes en la agricultura intensiva, existe una oferta creciente de fertilizantes de liberación controlada en el mercado, basados en polímeros de recubrimiento (Azeem et al., 2014).

En el grupo de trabajo del proyecto de inserción, se aisló la bacteria *Halomonas titanicae* KHS3 a partir de muestras del Mar Argentino, que acumula hasta un 60-70% de su peso en polihidroxitirato (PHB). Este es un biopoliéster biodegradable y compostable, y por sus propiedades es un buen candidato a reemplazar a los polímeros derivados del petróleo en algunas de sus funciones (McAdam et al., 2020). Sin embargo, algunas de sus aplicaciones y oportunidades de mercado suelen verse obstaculizadas por deficiencias puntuales en las propiedades mecánicas y térmicas (de Carvalho Arjona et al., 2021), además de los costos asociados a su producción. Al respecto, se ha reportado que tanto la cepa como las condiciones de cultivo, entre otros, son factores que inciden sobre características del polímero que resultan determinantes de sus propiedades (McAdam et al., 2020). Por otra parte, el desarrollo de mezclas (*blends*) o materiales compuestos, con polímeros de origen natural (por ejemplo celulosa) o sintéticos, sean biodegradables (como por ejemplo el alcohol polivinílico-PVA) o no, es una de las estrategias actuales para modificar las propiedades físicas, mecánicas y térmicas (Angelini et al., 2016; Moreyra et al., 2022; Palmiero-Sanchez et al., 2022). Una opción poco explorada para mezclar con PHB es usar biomasa y polímeros de microalgas. Estos microorganismos fotosintéticos crecen rápidamente y no dependen de los nutrientes del suelo ni del agua dulce, a diferencia de las plantas.

Estos nuevos biomateriales, formulados con el PHB puro o en una mezcla con la biomasa de microalgas, por varias razones constituyen opciones interesantes como material para el recubrimiento o la encapsulación de fertilizantes, como por ejemplo urea, que contribuyan a mitigar el problema de la degradación ambiental y se ajusten a los estándares de una bioeconomía sustentable.

OBJETIVOS

- Obtener masa de polihidroxitirato (PHB) en cantidad suficiente y adecuadamente acondicionada para realizar pruebas de formulaciones de biomateriales.
- Poner a punto protocolos para la obtención de *blends*.
- Estudiar la cinética de liberación de urea a partir de las microcápsulas, en soluciones acuosas.

“Nuevos agentes biodegradables como recubrimientos para la liberación controlada de fertilizante” (CAI+D Orientado) - Convocatoria 2021. Organismo financiador: UNL. Directora: Claudia Studdert



METODOLOGÍA

Cultivo de *H. titanicae* KHS3, obtención del PHB

Se realizaron cultivos de *H. titanicae* KHS3 en un biorreactor de laboratorio (Satorius Stedim, Alemania), empleando un medio de cultivo compuesto por glicerol, NaCl, K₂HPO₄, KH₂PO₄, (NH₄)SO₄ y extracto de levadura. Se tomaron muestras periódicas del cultivo para determinar la DO a 660 nm y el contenido de PHB (Guzmán et al., 2017).

Para la extracción de PHB, se han adaptado protocolos previamente descriptos (Aramvash et al., 2017; Xu et al., 2010). La biomasa se digirió con HClO 1% (v/p) en caliente (37°C), se centrifugó, y los gránulos de PHB se lavaron con agua y etanol, luego se secaron a 60°C y se molieron antes de los ensayos.

Obtención de láminas de PHB y blends (PHB + biomasa microalgal)

Se evaluaron cloroformo y ácido acético glacial para preparar soluciones de PHB (3,5% p/v). La suspensión en ácido acético glacial se incubó a 90°C para disolver el polímero. Luego, las soluciones se dispensaron en cajas de Petri o moldes de silicona. Se usaron dos métodos de secado: evaporación rápida bajo campana y evaporación lenta con la placa parcialmente tapada.

Para preparar los blends, se utilizó biomasa de *Chlorella vulgaris* obtenida en fotobiorreactores en el marco del proyecto de inserción. Se evaluó la estabilidad de las suspensiones de la biomasa, tanto húmeda como secada a 60°C por 24 h, en los solventes mencionados. Se mezclaron alícuotas de soluciones en cada solvente con suspensiones de biomasa en proporciones del 5% al 20% respecto a la masa total del blend. Se probaron dos métodos de secado y se evaluaron visualmente la resistencia y flexibilidad de los blends. Se evaluaron visualmente las propiedades como la resistencia y flexibilidad.

Evaluación de la liberación de urea encapsulada en medios acuosos

Se desarrolló una metodología para cuantificar la liberación de urea encapsulada en medios acuosos. Se emplearon dos tipos de microcápsulas preparadas previamente en el marco del proyecto de inserción por investigadores del Instituto de Investigaciones en Ciencia y Tecnología de Materiales (INTEMA- CONICET-UNMdP), utilizando como material de encapsulación PHB o PHB+PVA.

Para medir la liberación instantánea, se suspendieron 50 mg de cada tipo de partícula en 5 mL de agua con agitación vigorosa, luego se centrifugaron a 9000 rpm durante 5 minutos y se analizó el sobrenadante para cuantificar la urea usando un kit comercial (Uremia, Wiener Lab).

También se optimizó un protocolo de cinética de liberación usando centrífugos para separar las partículas de la urea liberada. De esta solución se tomaron alícuotas a diferentes tiempos para determinar la concentración de urea como se describió anteriormente.

RESULTADOS/CONCLUSIONES

Cultivo de *H. titanicae* KHS3, obtención del PHB

Se realizó un cultivo de *H. titanicae* KHS3 a fin de obtener biomasa para extraer el PHB, y estudiar la evolución de la DO 660 nm y el contenido específico de PHB, para establecer el tiempo más adecuado para la cosecha de futuros cultivos.

Como se observa en la Fig. 1. las bacterias crecieron alcanzando la DO máx a las 94,75 h, mientras que el contenido porcentual de PHB alcanzó el máximo a las 122,17 h. Al tiempo de cosecha, se obtuvo una masa seca de 1,69 g/L.

Sobre esta y otros lotes de biomasa obtenidos de manera similar se aplicó el proceso extractivo. Se obtuvieron 3,38 g de PHB en la primera extracción, alcanzando un rendimiento de promedio de 53,02%.

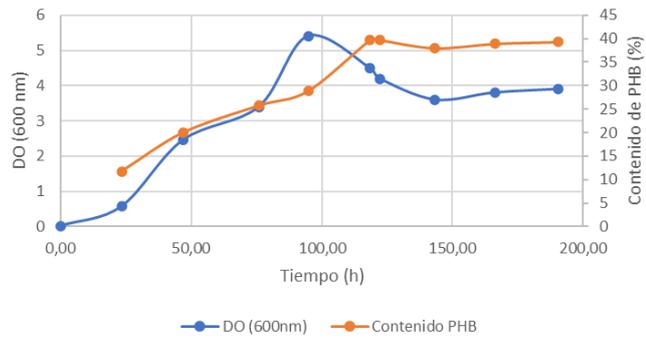


Fig. 1. Evolución de la DO (660nm) y el contenido porcentual de PHB en un cultivo de *H. titanicae* KHS3 en biorreactor.

Obtención de láminas de PHB y blends (PHB + biomasa microalgal)

Para evaluar el material de recubrimiento para el fertilizante, se prepararon láminas de PHB y blends de PHB con biomasa microalgal. Se probaron dos solventes para disolver el PHB: cloroformo y ácido acético. Se obtuvieron resultados satisfactorios con ambos solventes utilizados. La solución obtenida en cloroformo se mantuvo estable durante todo el procedimiento. En cambio, empleando ácido acético, se obtuvo una PHB suspensión que se mantuvo estable durante el procedimiento de preparación de la lámina. Al ser de base acuosa, el ácido acético es un solvente más promisorio desde una perspectiva de sustentabilidad. Por otra parte, sería más adecuado para solubilizar también los componentes de interés en la biomasa de microalgas. El secado lento resultó en láminas de PHB (en ácido acético glacial) completas y uniformes, indicando que la velocidad de secado es crucial. Las láminas de PHB en cloroformo también fueron uniformes y completas al secarse en moldes destapados (evaporación rápida).

En cuanto a la formulación de *blends*, se encontró una combinación de condiciones que permitió obtener láminas uniformes y homogéneas, empleando la biomasa húmeda en una proporción de 10% a la suspensión de este polímero en ácido acético glacial.

Evaluación de la liberación de urea encapsulada en medios acuosos

Se implementó y ajustó un protocolo para cuantificar la urea en un fertilizante con potencial para su liberación controlada, en este caso empleando microcápsulas previamente obtenidas en el marco del proyecto de inserción, formuladas con PHB y PHB-PVA (Tabla 1). Estos resultados permitieron conocer el contenido de urea de las microcápsulas y validar el método para su obtención.

Podemos concluir que las partículas de PHB-Urea y PHB-PVA-Urea tienen aproximadamente un 53,01% y 64,54% de urea respectivamente.

	Porcentaje urea (%) *
Control urea	100
PHB-Urea	53,01
PHB-PVA-Urea	64,54

Tabla 1. Porcentaje de urea en las partículas de PHB-Urea y PHB-PVA-Urea. (*) Calculado según la concentración teórica que es de 166 (mM).

Las microcápsulas conteniendo PHB-PVA-urea se sometieron al ensayo descrito en la sección de metodología para analizar la cinética de liberación de urea, los resultados se muestran en la Fig. 2. Si bien las concentraciones de urea determinadas en la fase acuosa son diferentes (Fig. 2.A), al comparar los porcentajes que estos valores representan respecto a la masa urea inicial (Fig. 2.B), se observa que dichos porcentajes son similares. De estos resultados se extrae que la liberación de urea desde las microcápsulas sigue un patrón similar al de la urea control, no encapsulada.

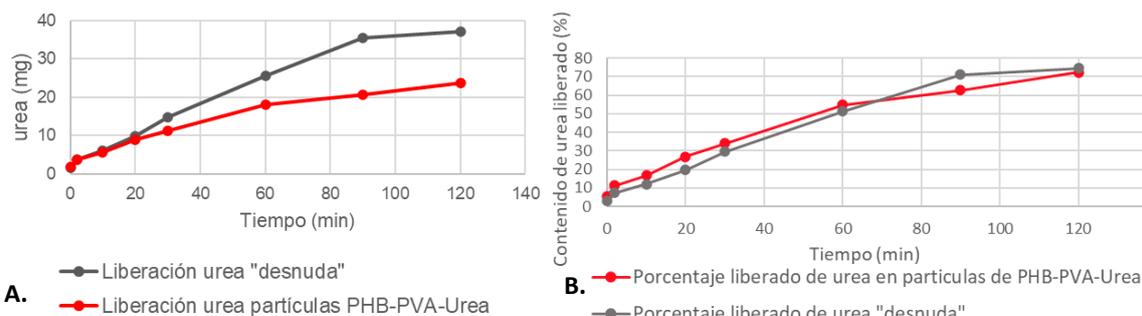


Figura 2. Cinética de liberación de urea desde las microcápsulas de PHB-PVA-urea. **A.** Comparación entre la masa de urea liberada en el ensayo usando microcápsulas y el ensayo control, usando urea no encapsulada. **B.** Comparación entre los porcentajes de urea liberados en el ensayo usando microcápsulas o control.

En este trabajo se presentó una alternativa para preparar muestras un biomaterial mixto (PHB+biomasa de microalgas) con características satisfactorias, que actualmente se está utilizando como agente de recubrimiento en un fertilizante de liberación controlada. En el proyecto de inserción, se ensayan diferentes protocolos para preparar tales fertilizantes. Entre ellos, uno que ha permitido obtener microcápsulas usando PHB y PHB+PVA. Si bien la cinética de liberación de urea desde tales microcápsulas ha mostrado que este modo de encapsulación no resultó en un producto con las características deseadas, fue posible consolidar una metodología para el estudio de dicha cinética. Esta metodología resultará útil para la caracterización de los productos de nuevos ensayos de formulación, que están siendo llevados a cabo actualmente en el marco del proyecto de inserción.

BIBLIOGRAFÍA

- Angelini, S., Cerruti, P., Immirzi, B., Scarinzi, G., Malinconico, M. 2016. Acid-insoluble lignin and holocellulose from a lignocellulosic biowaste: Bio-fillers in poly (3- hydroxybutyrate). *European Polymer Journal*, 76, 63-76.
- Aramvash, A., Moazzeni Zavareh, F., & Gholami Banadkuki, N. 2017. Comparison of different solvents for extraction of polyhydroxybutyrate from *Cupriavidus necator*. *Engineering in Life Sciences*, 18(1), 20–28.
- Azeem, B., KuShaari, K., Man, Z. B., Basit, A., Thanh, T. H. 2014. Review on materials & methods to produce controlled release coated urea fertilizer. *Journal of controlled release*, 181, 11-21.
- de Carvalho Arjona, J., das Graças Silva-Valenzuela, M., Wang, S. H., Valenzuela-Diaz, F. R. 2021. Biodegradable nanocomposite microcapsules for controlled release of urea. *Polymers*, 13(5), 722.
- Guzmán C., A. Hurtado, C. Carreño, I. Casos. 2017. Production of polyhydroxyalkanoates by native halophilic bacteria using *Solanum tuberosum* L. shell starch. *Sci agropecu.*8(2):109–18.
- McAdam, B., Brennan Fournet, M., McDonald, P., & Mojicevic, M. 2020. Production of Polyhydroxybutyrate (PHB) and Factors Impacting Its Chemical and Mechanical Characteristics. *Polímeros* 2020, 12, 2908.
- Moreira, J. B., Kuntzler, S. G., da Silva Vaz, B., da Silva, C. K., Costa, J. A. V., de Moraes, M. G. 2022. Polyhydroxybutyrate (PHB)-based blends and composites. (Eds. Mavinkere Rangappa, S., Parameswaranpillai, J., & Ramesh, M.) *Biodegradable Polymers, Blends and Composites* (pp. 389-413). Woodhead Publishing.
- Xu, A., Lao, Y., Zhang, Q., Li, J., & Xia, J. 2010. Extraction and Characterization of PHB from *Acidiphilium cryptum* DX1-1. *Journal of Wuhan University of Technology-Mater.* 25(6), 938-943.