



**Departamento de Ingeniería Química
Universidad de Sevilla**

**DESARROLLO DE MATRICES PROTEICAS DE SOJA CON
LA INCORPORACIÓN DE MICRONUTRIENTES PARA
SU USO EN HORTICULTURA**

*Development of soy protein-based matrices with micronutrient
incorporated for use in horticulture*

Mercedes Jiménez Rosado

Octubre 2022



Departamento de Ingeniería Química
Universidad de Sevilla

La tesis doctoral titulada “Desarrollo de matrices proteicas de soja con la incorporación de micronutrientes para su uso en horticultura” ha sido realizada por D^a. Mercedes Jiménez Rosado para optar al título de Doctora con Mención Internacional bajo el Programa de Doctorado *Instalaciones y Sistemas para la Industria* en su línea de investigación *Proyectos de Química Industrial y Ambiental*. Dicha tesis ha sido dirigida por los profesores Dr. Alberto Romero García y Dr. Antonio Guerrero Conejo en el Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Sevilla. Esta tesis doctoral se presenta con la aprobación de los directores y el director del Departamento de Ingeniería Química.

Agradecimientos

Ya llego el momento... es increíble estar aquí después de tanta lucha. Por fin llegó la jugada final, la cual no solo va a hablar de mi pasado, sino que va a definir mi futuro. Ahora frente al momento que decide el resultado del partido, es cuando recuerdas todo lo que te ha traído hasta aquí.

¿Cómo empezó todo? Lo primero que me viene a la mente al pensar en investigación es mi vecino y amigo Quique, con él todo era una aventura, un desafío. Y cómo no iba a serlo cuando nuestras familias nos alentaban siempre a ello. Aunque la distancia nos jugó una mala pasada, nunca me podré olvidar de esos dos magos cazadores de Pokemons.

Pero, ¿no siempre dicen que la forma de ser de una persona depende de los genes que le transmitan sus padres? Pues no podía ser este dicho más acertado, con un padre "maestro liendre" capaz de montarte cualquier teoría y acertarla con ese "eso es lo que yo quería decir, pero con mis palabras"; y una madre "doctora en economía familiar" sacando no solo ingenio, sino también magia, para que todos seamos felices y podamos tener lo que necesitamos. Es a ellos dos a los que más tengo que agradecer estar aquí hoy, por su gran ayuda, sobre todo en los momentos difíciles, y también por los viernes de cervecita (todo no va a ser currar). Además de involucrarse al punto de poder defender la tesis mejor que yo e incluso hacer los experimentos. Sois un gran ejemplo a seguir, no puedo estar más orgullosa de teneros como padres.

No obstante, aún tenía que entrenar mis habilidades para que fueran útiles (*in labore victoria*), y que mejor manera que con mis hermanas. Mi hermana Lidia y su "yo si no lo veo con mis ojos no me lo creo" o

"eso todo es teoría, luego la realidad es muy distinta" que me han hecho pensar en cómo demostrar todo lo que se me ocurría; y mi hermana Bárbara siempre deseando saber qué estoy haciendo, lo cual me ha hecho ver lo difícil que puede llegar a ser darle conocimiento a un niño ávido del mismo. Aunque tampoco me puedo olvidar de mi tía Esperanza y sus intrigantes "¿sabes por qué...?", que nos han tenido noches en vela buscando una razón lógica; y mis amigos de camping con sus "tú que eres ingeniera..." que me han hecho estar alerta en todo momento.

Sin embargo, esto no es suficiente, es necesario buscar en este mundo un lugar donde encajar, lo cual es difícil cuando te das cuenta de que todo es un puzzle, y no todas las piezas encajan en el mismo hueco. Yo, por suerte, encontré mi lugar rápido, aunque no hubiera sido tan fácil sin las piezas que me rodeaban. Entre ellas, cuatro fueron la clave. Antonio, el cual confió ciegamente en mí, ya que sin conocerme me acogió en su grupo y me dio los recursos suficientes para poder desarrollar mi capacidad investigadora con la ya lejana beca de iniciación y seguir haciéndolo durante todo el transcurso de la tesis. Alberto, mi Jürgen Klopp personal, el cual no solo se responsabilizó de mí cuando no era su obligación, sino que apostó por mí y me ha dado todo lo que tiene a su mano para que pueda prosperar. Aunque, más que jefe, él es un amigo, que me ha enseñado que partido a partido se consiguen las cosas y que la mejor estrategia de vida es jugar siempre en equipo, ya que, como decía Margaret Carty, "lo más hermoso del trabajo en equipo es que siempre tienes a otros de tu lado". Víctor, qué decir de él sin que lo cuestione... Con él, desde el principio solo había dos opciones (a) llevarnos siempre la contraria y estar discutiendo todo el día o (b) tratarnos bien y apoyarnos el uno al otro. No obstante, en este caso, a y b fueron correctas. No pude encontrar mejor compañero de laboratorio,

capaz de estar discutiendo horas y horas hipótesis estrambóticas, pero siempre desde un punto de vista científico (o ingenieril); y a la vez tan buen amigo, enseñándome con su honestidad y sensatez que la vida hay que disfrutarla día a día dando nuestra mejor versión y que para todo lo demás siempre hay un "yo del futuro" al que recurrir. Espero algún día poder devolverte al menos la décima parte de lo que me aportas. En este caso, ni el que seas sevillista ha sido tan malo. Por último, y no por ello menos importante, José Fernando. Nunca creí que pudiera haber persona más cabezona. Gracias, no solo por las charlas interminables tras una cerveza, sino también por la parte más "regulinchi" de hacerme cuestionar la veracidad de todo y animarme a continuar frente a todas las adversidades.

Por otro lado, en esta carrera también ha habido cesiones a otros equipos para mejorar las habilidades y aprender otras nuevas. En este sentido, todo esto también es gracias a Denis Lourdin (Nantes, Francia), Andrea Gómez-Zavaglia (La Plata, Argentina) y Adamo Domenico Rombolà (Bologna, Italia) que me acogieron en sus equipos con los brazos abiertos aportando como los que más. Además de la breve pero intensa Honduras que me enseñó con humildad a reírme de todo.

Y así, justo al final, en el momento de lanzar a portería y esperar marcar gol, te das cuenta de que todo lo que eres no es gracias a nada material, ni a ninguna cosa en especial, sino que se lo debes a todas esas personas que te han marcado en el camino, y que más que tú momento, este es el suyo, ya que como cantaban Los Millonarios del mítico Juan Carlos Aragón "lo más bello de este mundo, lo más puro y verdadero, no se compra con dinero, sino con to lo contrario". Muchas gracias por hacerme millonaria.

Índice

Resumen	1
Abstract.....	2
Capítulo 1: Antecedentes	3
1.1 Introducción.....	4
1.2 Hipótesis y objetivos principales	10
1.3 Materias primas	12
1.4 Técnicas de procesado	17
1.4.1 <i>Moldeo por compresión</i>	18
1.4.2 <i>Moldeo por extrusión</i>	19
1.4.3 <i>Moldeo por inyección</i>	21
1.4.4 <i>Etapas de procesado adicionales</i>	25
1.5 Marco político-social y científico.....	29
1.5.1 <i>Economía circular</i>	31
1.5.2 <i>Impactos económicos, sociales, medioambientales y científicos</i>	34
Agradecimientos.....	37
Publicaciones relacionadas.....	37
Referencias	38
Capítulo 2: Materiales y métodos	49
2.1 Materiales utilizados.....	50
2.1.1 <i>Subproducto proteico de soja</i>	50

2.1.2	<i>Glicerina</i>	51
2.1.3	<i>Sales de Zinc y otros micronutrientes</i>	51
2.1.4	<i>Nanopartículas</i>	52
2.2.	Caracterización del subproducto de soja	55
2.2.1	<i>Composición química</i>	55
2.2.2	<i>Composición aminoacídica</i>	58
2.2.3	<i>Grupos sulfhidrilos</i>	59
2.2.4	<i>Electroforesis</i>	60
2.2.5	<i>Solubilidad proteica</i>	60
2.2.6	<i>Potencial ζ</i>	61
2.2.7	<i>Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)</i>	62
2.2.8	<i>Comportamiento térmico</i>	63
2.3	Síntesis de nanopartículas.....	65
2.3.1	Extracción de polifenoles	67
2.4	Caracterización de nanopartículas y polifenoles	69
2.4.1	<i>Contenido total de polifenoles (TPC)</i>	69
2.4.2	<i>Actividad antioxidante</i>	69
2.4.3	<i>Difracción de rayos X (DRX)</i>	69
2.4.4	<i>Microscopía electrónica de transmisión (TEM)</i>	71
2.4.5	<i>Análisis dispersivo de energía de rayos X (EDAX)</i>	72
2.4.6	<i>Microscopía electrónica de barrido (SEM)</i>	72

2.4.7 <i>Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)</i>	73
2.5 Procesado de las matrices bioplásticas	74
2.5.1 <i>Extrusión</i>	74
2.5.2 <i>Moldeo por inyección</i>	75
2.5.3 <i>Reforzamiento físico de las matrices bioplásticas</i>	77
2.6 Caracterización de las matrices bioplásticas	80
2.6.1 <i>Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)</i>	80
2.6.2 <i>Grupos sulfhidrilos</i>	81
2.6.3 <i>Grado de entrecruzamiento</i>	81
2.6.4 <i>Propiedades mecánicas</i>	82
2.6.5 <i>Carga de micronutriente</i>	84
2.6.6 <i>Capacidad de absorción de agua</i>	85
2.6.7 <i>Microscopía electrónica de barrido (SEM)</i>	86
2.7 Procesado de matrices	87
2.7.1 <i>Método A: Incorporación del micronutriente en la etapa de mezclado</i>	89
2.7.2 <i>Método B: Incorporación del micronutriente por inmersión en una disolución salina</i>	90
2.7.3 <i>Método A+B: Incorporación del micronutriente en el mezclado y la inmersión en una disolución salina</i>	91
2.7.4 <i>Método C: Incorporación del micronutriente por inmersión en dos etapas</i>	91

2.8 Caracterización de matrices dosificadoras	93
2.8.1 <i>Propiedades fisicoquímicas</i>	93
2.8.2 <i>Propiedades mecánicas</i>	94
2.8.3 <i>Propiedades morfológicas</i>	95
2.8.4 <i>Propiedades funcionales</i>	96
2.8.5 <i>Biodegradabilidad</i>	98
2.8.6 <i>Evaluación en cultivos</i>	99
2.9 Análisis estadístico	101
Referencias	102

Capítulo 3: Evaluación del potencial de la proteína de soja como materia prima para elaborar matrices bioplásticas 108

3.1 Introducción	109
3.2 Materiales y métodos	114
3.3 Resultados	117
3.3.1 <i>Evaluación del subproducto de soja</i>	117
3.3.2 <i>Procesado de matrices bioplásticas por extrusión</i>	123
3.3.3 <i>Procesado de matrices bioplásticas por inyección</i>	133
3.3.4 <i>Comparación de los diferentes procesados</i>	142
3.3.5 <i>Evaluación del reforzamiento físico</i>	143
3.4 Conclusiones	151
3.5 Concluding remarks	153
Agradecimientos	155
Publicaciones relacionadas	155

Referencias	157
Capítulo 4: Incorporación de zinc como micronutriente a las matrices bioplásticas de soja.....	164
4.1 Introducción.....	165
4.2 Materiales y métodos.....	168
4.3 Resultados.....	171
4.3.1 <i>Optimización del procesado de matrices bioplásticas con sal incorporada</i>	171
4.3.2 <i>Evaluación de la cantidad de sal incorporada</i>	179
4.3.3 <i>Influencia del tipo de sal en las propiedades de las matrices bioplásticas</i>	186
4.3.4 <i>Optimización de las propiedades funcionales</i>	196
4.4 Conclusiones.....	204
4.5 Concluding remarks.....	207
Agradecimientos.....	210
Publicaciones relacionadas.....	210
Referencias	212
Capítulo 5: Eliminación del plastificante para conseguir una liberación controlada del micronutriente.....	218
5.1 Introducción.....	219
5.2 Materiales y métodos.....	222
5.3 Resultados y discusión	224
5.3.1 <i>Evaluación de diferentes métodos para la obtención de la matriz</i>	224

5.3.2 <i>Optimización de la retención de micronutriente</i>	234
5.3.3 <i>Evaluación funcional de las matrices seleccionadas</i>	245
5.4 Conclusiones.....	258
5.5 Concluding remarks.....	260
Agradecimientos.....	262
Publicaciones relacionadas.....	262
Referencias	263

Capítulo 6: Uso de matrices de liberación controlada para la incorporación de zinc a diferentes variedades de cebada..... 268

6.1 Introducción.....	269
6.2 Materiales y métodos.....	273
6.2.1 <i>Materiales</i>	273
6.2.2 <i>Caracterización de las semillas</i>	273
6.2.3 <i>Condiciones de crecimiento del cultivo</i>	275
6.2.4 <i>Caracterización de las plantas</i>	277
6.2.5 <i>Análisis estadístico</i>	277
6.3 Resultados y discusión	278
6.3.1 <i>Diferencias en las semillas de las diferentes variedades de cebada</i>	278
6.3.2 <i>Evaluación del efecto de las matrices sobre las plantas</i> ...	282
6.4 Conclusiones.....	288
6.5 Concluding remarks.....	289
Agradecimientos.....	290

Publicaciones relacionadas	290
Referencias	291
Capítulo 7: Fertilizantes a base de nanopartículas como un nuevo reto en horticultura	296
7.1 Introducción.....	297
7.2 Materiales y métodos.....	301
7.3 Resultados y discusión	303
7.3.1 <i>Optimización de la extracción de polifenoles del pimiento</i>	303
7.3.2 <i>Síntesis de nanopartículas de óxido de zinc: método químico vs. verde</i>	311
7.3.3 <i>Incorporación de nanopartículas de ZnO a matrices bioplásticas</i>	319
7.3.4 <i>Comparación de matrices con ZnSO₄·H₂O, nanopartículas químicas y nanopartículas verdes</i>	327
7.4 Conclusiones.....	335
7.5 Concluding remarks.....	336
Agradecimientos.....	337
Publicaciones relacionadas.....	337
Referencias	338
Capítulo 8: Incorporación de diferentes micronutrientes a las matrices de liberación controlada: micro vs. nanopartículas.....	346
8.1 Introducción.....	347
8.2 Materiales y métodos.....	350

8.3 Resultados y discusión	352
8.3.1 <i>Propiedades mecánicas</i>	352
8.3.2 <i>Capacidad de absorción de agua</i>	354
8.3.3 <i>Liberación del micronutriente</i>	356
8.3.4 <i>Biodegradabilidad</i>	359
8.3.5 <i>Evaluación en cultivos</i>	360
8.4 Conclusiones	367
8.5 Concluding remarks	368
Agradecimientos	369
Publicaciones relacionadas	369
Referencias	370
Reflexiones finales	374
Concluding thoughts	377
Glosario de abreviaciones	379
Anexo I: Relación de publicaciones de la tesis doctoral	

Resumen

El incremento de la producción hortícola, provocado por la nueva tendencia hacia una alimentación más sana, ha generado la necesidad de crear sistemas de horticultura intensiva. Estos sistemas subsisten gracias al uso de fertilizantes, ya que el suelo no es capaz de regenerar sus nutrientes tan rápidamente como requiere este tipo de horticultura. Sin embargo, el método de fertilización convencional es ineficaz y genera problemas de contaminación por exceso de nutrientes. Por este motivo, actualmente se están probando nuevas tecnologías, siendo los sistemas de liberación controlada los que generan un mayor interés. En este sentido, el objetivo principal de la presente tesis doctoral es el desarrollo de un sistema de liberación controlada (matriz) biodegradable y sostenible para suministrar micronutrientes a cultivos hortícolas. Para ello, se revalorizó un subproducto de soja rico en proteínas como materia prima para el desarrollo de la matriz. Además, se estudiaron las diferentes etapas de fabricación con la finalidad de conseguir el sistema más óptimo, en cuanto a sus propiedades funcionales, para suministrar los nutrientes al cultivo. Este trabajo ha abierto una nueva posibilidad de crear fertilizantes más eficientes, mejorando los beneficios de la fertilización convencional. Así, se espera que estas matrices revolucionen el mercado, haciendo que el método de fertilizar cambie en los próximos años hacia una fertilización más sostenible.

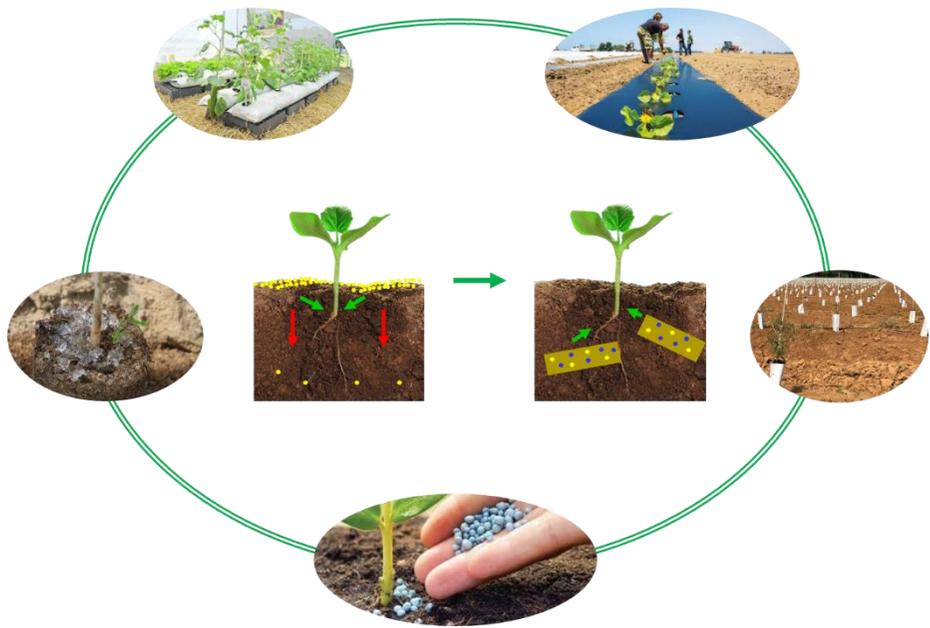
Palabras clave: Biodegradabilidad; Fertilizantes; Horticultura; Liberación controlada; Matrices; Micronutrientes; Revalorización.

Abstract

The increase in horticultural production, caused by the new trend towards a healthier diet, has generated the need to create intensive horticultural systems. These systems subsist thanks to the use of fertilizers since the soil is not capable of regenerating its nutrients as quickly as this type of horticulture requires. However, the conventional fertilization method is ineffective and generates contamination problems due to excess nutrients. For this reason, new technologies are currently being tested, with controlled release systems generating the greatest interest. In this sense, the main objective of this Doctoral Thesis is the development of a biodegradable and sustainable controlled release system (matrix) to supply micronutrients to horticultural crops. To this end, a protein-rich soy by-product was revalued as raw material for the development of the matrix. In addition, the different processing stages were studied in order to achieve the most optimal system, in terms of its functional properties, to supply the nutrients to the crop. This work has opened a new possibility of creating more efficient fertilizers, improving the benefits of conventional fertilization. Thus, these matrices are expected to revolutionize the market, causing the method of fertilizing to change in the next years towards a more sustainable fertilization.

Keywords: Biodegradability; Controlled release; Fertilizers; Horticulture; Matrices; Micronutrients; Revaluation.

Capítulo 1: Antecedentes



1.1 Introducción

La presente tesis se basa en el desarrollo y caracterización de matrices bioplásticas proteicas para su uso en horticultura como materiales para la liberación controlada de micronutrientes y agua. Para ello, durante el desarrollo de la misma se ha ido paso a paso resolviendo diversos aspectos sobre su fabricación y optimización hasta llegar a un producto industrialmente competitivo. No obstante, la primera cuestión a resolver es ¿serían estas matrices acogidas en el mercado hortícola actual?

La agricultura es el conjunto de técnicas y actividades económicas relacionadas con el tratamiento del suelo y el cultivo de tierras para el consumo humano (Keeney, 1990). Dentro de sus vertientes, la horticultura es la encargada del cultivo de hortalizas, frutas y plantas herbáceas (Relf, 1992). Aunque en su inicio la horticultura no se consideraba una práctica habitual, ya que se relacionaba con un estatus social bajo, su interés ha ido aumentando a lo largo de la historia. Así, sus productos son cada vez más demandados, visualizándose como productos imprescindibles para una dieta sana y saludable (Maroto, 2008). De esta forma, se ha convertido en la vertiente de la agricultura más importante en los últimos tiempos. Un ejemplo de este aumento se puede observar en la producción de patatas (Figura 1.1A), que es el producto hortícola más demandado. En este sentido, la producción de patatas ha aumentado un 24% en los últimos 20 años. En cuanto a dónde se produce, se puede observar que Asia ocupa el primer lugar, siendo el continente más productor, seguido por Europa (Figura 1.1B). Esto se debe a la mayor superficie de cultivo disponible en estos continentes, lo que se combina con las condiciones climáticas ideales para la producción (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2021).

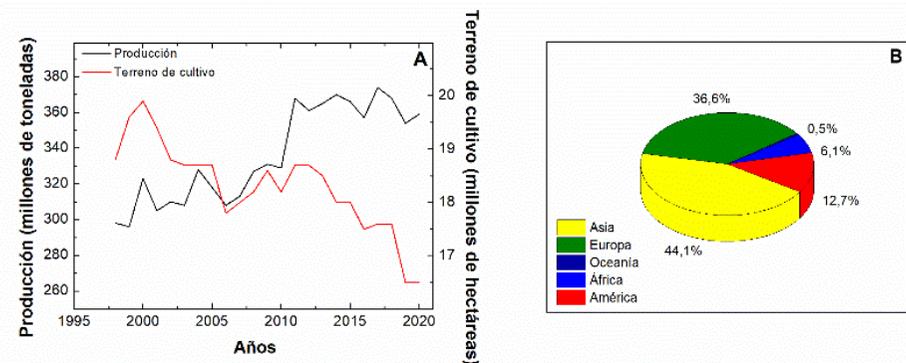


Figura 1.1. Producción global de patata y terreno de cultivo (A) y producción por continentes (B) desde 1998 a 2020. Datos obtenidos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAOSTAT, 2021).

Este incremento en la producción, sumado a que no se destina una mayor cantidad de terreno a cultivos, ha generado una nueva forma de percibir la agricultura, optando por el cultivo intensivo para satisfacer la demanda producida (Hazell y Wood, 2008). Esta agricultura intensiva, junto con la mayor presencia de plagas y cambios en las condiciones climáticas (debido al calentamiento global), ha provocado un aumento en el uso de dispositivos plásticos en este sector, incluyendo dispositivos para suministrar agua o fertilizantes y para proteger el cultivo de interacciones con la maleza o insectos. No obstante, el uso de estos plásticos tiene un coste extra en los productos, ya que no solo es necesario pagar para comprarlos, sino que también necesitan ser retirados, una vez finalizada su labor, para evitar la contaminación del suelo por los mismos, teniendo esta retirada también un coste asociado (Karan *et al.*, 2019). En este sentido, el uso de bioplásticos puede resolver esos problemas debido a su biodegradabilidad, sin la necesidad de retirarlos tras su uso.

La definición de bioplásticos tiene dos connotaciones; se puede referir a (i) plásticos generados de fuentes renovables o (ii) plásticos

biodegradables (Klein *et al.*, 2019). De esta forma, se consideran bioplásticos aquellos procedentes de fuentes renovables, aunque no sean biodegradables (Andreeßen y Steinbüchel, 2019), o los derivados del petróleo que si lo sean (Ahmed *et al.*, 2018). No obstante, los bioplásticos más interesantes son aquellos que presentan ambas connotaciones, es decir, que procedan de fuentes naturales y renovables, no teniendo limitada su existencia y disminuyendo la huella de carbono generada, y, que además, sean biodegradables, reduciendo la contaminación generada por los plásticos (Dhillon *et al.*, 2016). Asimismo, los bioplásticos pueden tener propiedades mecánicas y funcionales similares a la de los plásticos convencionales (plásticos no biodegradables derivados del petróleo), siendo potenciales candidatos para reemplazarlos en sectores como la horticultura, estando mejor acogidos que las otras alternativas propuestas (madera, vidrio, etc.). Además, sus materias primas pueden obtenerse de fuentes más económicas, lo que hace que el coste de los bioplásticos finales sea menor que el de los plásticos convencionales (Palani y Karthikeyan, 2020). Todo esto hace que los bioplásticos se vean como potenciales candidatos para reemplazar a los plásticos usados en horticultura. De hecho, en el sector hortícola se observa una tendencia creciente en la investigación sobre bioplásticos, mientras que las investigaciones sobre plásticos están experimentando un claro estancamiento (Figura 1.2).

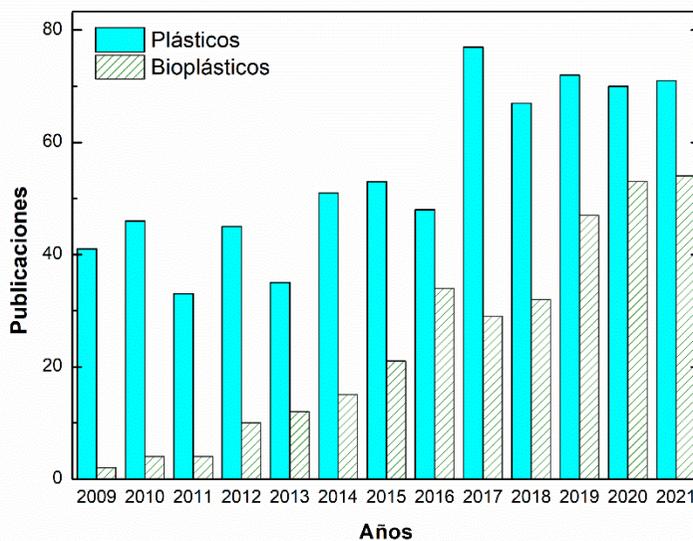


Figura 1.2. Evolución del número de publicaciones sobre plásticos y bioplásticos en horticultura. Datos obtenidos de la Web of Science.

Así, los bioplásticos son cada vez más utilizados en aplicaciones como el acolchado, para proteger los suelos de la evaporación excesiva y la competición de plantas, mejorando el rendimiento de los cultivos al generar menores pérdidas de nitratos, aumentando la eficiencia en el uso del agua y la permeabilidad frente al vapor de agua (Elbasiouny *et al.*, 2020). Además, los bioplásticos pueden ser usados como semilleros o guías para plantas, evitando problemas de daños en raíces y tallos durante su retirada (Mosnáčková *et al.*, 2019). Por otro lado, se abren también nuevas posibilidades como su uso como matrices que retienen diferentes sustancias para su liberación controlada en el cultivo, como agua, fertilizantes o pesticidas.

En cuanto a su aplicación como fuente de agua suplementaria, algunos bioplásticos pueden ser considerados superabsorbentes, es decir, pueden retener hasta un 1000% de su peso en agua sin desintegrarse (Cuadri *et al.*, 2017). De esta forma, pueden absorber grandes cantidades de agua

durante los periodos de lluvia o riego, suministrándola de forma gradual a las plantas, según sus necesidades, a través de la biodegradación de la matriz. Así, son más beneficiosos que los materiales plásticos comercializados hasta el momento, como los productos Creasorb de Evonic o Luquasorb de BASF, ya que no necesitan ser retirados del suelo una vez han cumplido su función, reduciendo los costes del uso de estos dispositivos. Diferentes matrices bioplásticas están siendo investigadas en este sentido, con las que se pretende maximizar la capacidad absorbente de las mismas, sin dañar sus propiedades mecánicas o biodegradabilidad. Su objetivo consistiría en poder suministrar agua durante todo el periodo de crecimiento del cultivo, usando materias primas completamente biodegradables como el gluten de trigo (Gómez-Martínez *et al.*, 2009), el aislado proteico de soja (Cuadri *et al.*, 2016; Fernández-Espada *et al.*, 2019), el almidón de patata (Olad *et al.*, 2020) y la proteína de plasma porcino (Álvarez-Castillo *et al.*, 2020a).

Por otro lado, la liberación controlada de fertilizantes es una aplicación más novedosa de estos materiales. Su interés proviene de la reciente concienciación de los daños provocados en el subsuelo y las aguas subterráneas por el exceso de fertilizantes usados en los cultivos (Kondraju y Rajan, 2019) debido a su baja eficiencia de asimilación. En este contexto, se están comenzando a comercializar dispositivos plásticos para la liberación controlada de fertilizantes (por ejemplo, Nutricote de Projar y Multicote de Haifa), que mejoran la eficiencia de asimilación de los mismos. No obstante, estos dispositivos presentan problemas derivados de la baja biodegradabilidad de los plásticos utilizados, que permanecen en el suelo y son difíciles de eliminar. Por este motivo, las matrices bioplásticas están atrayendo la atención en esta aplicación. Estas matrices bioplásticas pueden soportar los fertilizantes

como material de relleno. Posteriormente, los fertilizantes pueden liberarse de forma controlada a través del agua de riego o mediante la biodegradación de la matriz bioplástica (Mortain *et al.*, 2004). Así, se puede mejorar la eficiencia de los fertilizantes y se eliminan los problemas derivados del uso de plásticos no biodegradables (Karan *et al.*, 2019). Con este propósito, diferentes estudios están evaluando la incorporación de diversos nutrientes en las matrices bioplásticas, como sodio (Souza *et al.*, 2018; Merino *et al.*, 2019), nitrógeno, fósforo y potasio (Souza *et al.*, 2018; Mesias *et al.*, 2019; Kartini *et al.*, 2020) o urea (Pereira *et al.*, 2015). Además, últimamente las investigaciones van dirigidas a cómo ajustar la cinética de liberación de nutrientes a la necesidad de cada cultivo, con el objetivo de obtener una fertilización más especializada y “a la carta”, mejorando el rendimiento integral del cultivo.

De este modo, los bioplásticos han abierto un nuevo campo en el sector hortícola, generando una nueva reestructuración del sector, aumentando la eficiencia de los cultivos y reduciendo la cantidad de plásticos convencionales utilizados. Sin embargo, todavía se necesita mucha investigación antes de que realmente puedan competir con los plásticos convencionales e incluso reemplazarlos. En este contexto, el proceso de fabricación debe optimizarse, ya sea para conseguir una liberación específica o para intentar aunar diferentes aplicaciones en un mismo dispositivo. Por otro lado, es importante generar un marco normativo que regule la fabricación de estos bioplásticos con el fin de homogeneizar su mercado.

1.2 Hipótesis y objetivos principales

El gran interés que está generando el uso de bioplásticos en el sector de la horticultura ha servido como punto de partida para plantear la hipótesis inicial de esta tesis. Así, la hipótesis consiste en el desarrollo de matrices bioplásticas proteicas con las características adecuadas para la liberación controlada de micronutrientes y agua en cultivos. Esta propuesta implica contemplar diversos aspectos (Figura 1.3), como el uso de subproductos proteicos de la industria agroalimentaria como materias primas; y el empleo de técnicas comúnmente utilizadas en la industria del plástico, como el procesado termomecánico (extrusión, moldeo por compresión, por inyección, etc.), para crear un producto industrialmente viable y competitivo.

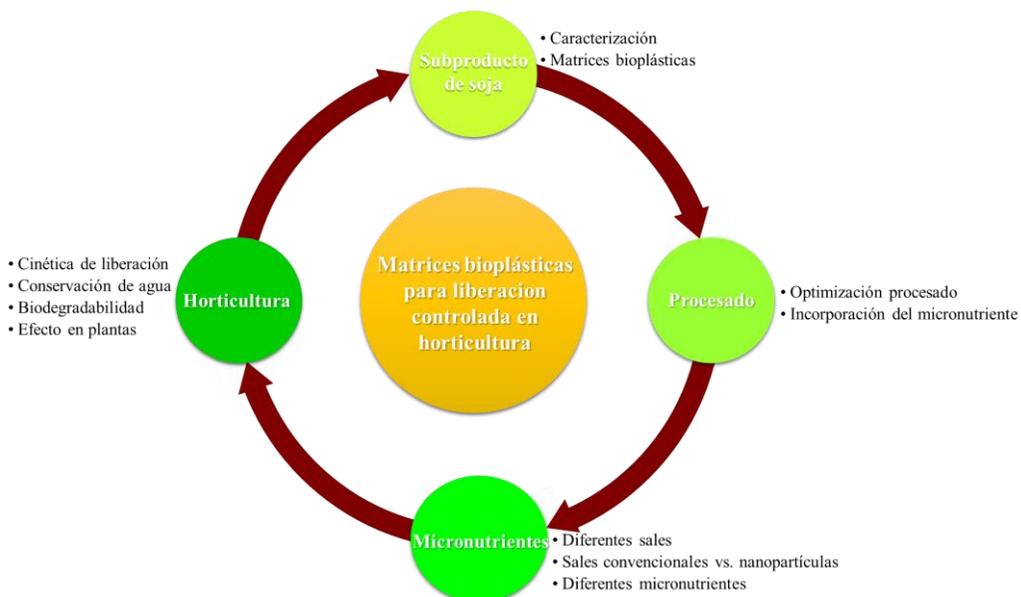


Figura 1.3. Esquema de los aspectos considerados en la presente tesis doctoral.

Teniendo en cuenta esta hipótesis como objetivo general, se propusieron los siguientes objetivos específicos:

- Evaluación del subproducto de soja conseguido tras el proceso de obtención de aceite de soja para su uso como materia prima para elaborar bioplásticos con propiedades adecuadas.
- Evaluación de los bioplásticos elaborados con aislado proteico de soja (SPI) para su uso como matriz bioplástica.
- Estudio de la incorporación de un micronutriente (zinc) en las matrices, usando diferentes sales (micro y nanopartículas) y protocolos de incorporación.
- Caracterización de las propiedades mecánicas, morfológicas y funcionales de las matrices con micronutriente incorporado, según la sal y el protocolo usado.
- Selección y optimización del protocolo de fabricación con mayor potencial para su aplicación en horticultura.
- Evaluación de la funcionalidad del protocolo de incorporación y fabricación con otros micronutrientes (manganeso, hierro, cobre y mezclas).
- Estudio de la lixiviación al subsuelo y la incorporación de micronutrientes en las plantas, controlando la cinética de liberación y captación de micronutrientes y agua.

1.3 Materias primas

Generalmente, los bioplásticos de origen biológico están compuestos por un biopolímero, un plastificante y, algunas veces, por aditivos (Saenghirunwattana *et al.*, 2014). El biopolímero forma una matriz que aporta el carácter plástico al material. Usualmente, se compone por proteínas y/o polisacáridos por la semejanza de sus cadenas con las de los plásticos convencionales (Zárate-Ramírez *et al.*, 2014), siendo las proteínas las más estudiadas (Kratsch *et al.*, 2015). En su mayoría, estas materias primas proceden de subproductos y/o residuos de la industria agroalimentaria (Xu y Yang, 2012). Se estima que estas industrias generan cada año 1,3 billones de efluentes desaprovechados (subproductos y residuos) que son ricos en proteínas y polisacáridos (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2020). Por lo que una valorización de los mismos como materias primas para la elaboración de bioplásticos les confiere un valor añadido, estando, además, en consonancia con los conceptos de economía circular y residuos cero (Payne *et al.*, 2019). De esta forma, se puede conseguir una materia prima barata y renovable para la elaboración de los bioplásticos, permitiendo que estos tengan un precio final competitivo con respecto a los plásticos convencionales. Además, la gran presencia de nitrógeno y carbono en estas materias primas puede llegar a considerarse una fuente de nutrientes que beneficiaría el desarrollo del cultivo.

La elección del material para la matriz bioplástica dependerá de su aplicación final. Por tanto, si la matriz bioplástica está destinada a retener grandes cantidades de agua, la materia prima debe tener grupos hidrófilos que puedan interactuar con las moléculas de agua. En este contexto, el alto contenido en ácidos glutámico y aspártico en algunas

proteínas, como la soja, favorece la absorción de agua (Fernández-Espada *et al.*, 2016b). Entre los polisacáridos, a menudo se eligen los monómeros acrílicos, siendo los poliacrilatos los más utilizados para desarrollar materiales superabsorbentes de alto rendimiento (Liu *et al.*, 2019). Por otro lado, si la matriz bioplástica está destinada a retener fertilizantes, la materia prima debe tener buenas interacciones entre las cadenas biopoliméricas y los fertilizantes añadidos, de modo que las matrices bioplásticas tengan buenas propiedades mecánicas y liberen las sustancias de forma adecuada y controlada, pudiendo compaginarse con su biodegradación (Jiménez-Rosado *et al.*, 2020). Estas interacciones son cruciales, ya que, si son muy fuertes, por ejemplo, con enlaces covalentes, los fertilizantes se liberarán más lentamente; mientras que, si no hay interacciones, la matriz bioplástica no será capaz de retener los micronutrientes liberándose rápidamente. En este sentido, las interacciones que se buscan entre la matriz y los fertilizantes son electrostáticas, con el fin de poder controlar adecuadamente la liberación, las cuales se logran desplazando el pH de la matriz bioplástica para que no esté en su punto isoeléctrico o cambiando las sales usadas para incorporar los nutrientes para generar diferentes cargas.

Los plastificantes se requieren para mejorar la procesabilidad de las matrices bioplásticas (ASTM D883-00, 2000). Un plastificante es una sustancia que se incorpora a un material para aumentar su flexibilidad y facilitar su procesado. Así, se usa para formar mezclas con el biopolímero (masas), reduciendo su consistencia reológica (viscosidad, módulo elástico, etc.) y disminuyendo la temperatura de transición vítrea. Se debe considerar que para la aplicación en horticultura los plastificantes usados tienen que ser naturales y no nocivos para el medio ambiente. El agua es el plastificante que mejor cumple esta condición.

En este sentido, tiene la capacidad de reducir la temperatura de transición vítrea y aumentar el volumen libre de los biopolímeros, además de ser abundante y barata. Sin embargo, su uso como plastificante en bioplásticos empeora sus propiedades mecánicas, siendo más conveniente el uso de otras sustancias (Matveev *et al.*, 2000). En este contexto, los plastificantes más comúnmente utilizados son los polioles y oligosacáridos, como la glicerina, el etilenglicol, el dietilenglicol y el manitol (Aguilar *et al.*, 2020).

Por último, los aditivos son incorporados cuando la matriz bioplástica no puede conseguir por sí misma las características deseadas. Normalmente, los aditivos se utilizan para mejorar las propiedades mecánicas de las matrices bioplásticas (Felix *et al.*, 2017). No obstante, es difícil encontrar un aditivo natural y no tóxico para los cultivos, que tenga una biodegradabilidad similar a la de las matrices para no dejar residuos que puedan acumularse en los suelos de cultivo. Por este motivo, normalmente se opta por reforzamientos físicos para modificar las propiedades mecánicas de la matriz, como un tratamiento térmico (Álvarez-Castillo *et al.*, 2018) o ultrasonidos (Jayasooriya *et al.*, 2004). Sin embargo, los aditivos no sólo son necesarios para mejorar las propiedades mecánicas de las matrices bioplásticas, sino que también son necesarios para aplicaciones como la liberación de fertilizantes. En este sentido, las sales usadas en la fertilización convencional son las más comúnmente usadas, ya que tienen los nutrientes necesarios para las plantas (Mesias *et al.*, 2019). A parte, hay que tener en cuenta que la biodegradación de las matrices bioplásticas también aporta nutrientes a los cultivos, como nitrógeno y carbón, que se tienen que sumar a los ya incorporados por las sales sin exceder los límites asimilables.

Los fertilizantes son cualquier material orgánico o inorgánico que se añaden al suelo de cultivo para suministrar los nutrientes necesarios para el crecimiento de las plantas (Silva y Uchida, 2000). Estos se clasifican en diferentes grupos dependiendo de la cantidad que se requiera de cada uno de ellos. Así podemos distinguirlos en tres grupos diferentes:

- Elementos primarios: nutrientes principales que necesita una planta para su desarrollo. Además, son los que necesita en mayor cantidad. Este grupo lo componen el fósforo, potasio y nitrógeno, añadiendo además al carbono e hidrógeno del aire y agua. Normalmente, hay fertilizantes generales conocidos como NPK que suministran todos los nutrientes primarios en las cantidades adecuadas (Starast *et al.*, 2008; Siles *et al.*, 2020). No obstante, para que estos nutrientes sean captados por las plantas, consiguiendo así una alta eficiencia, es necesario el aporte de otros nutrientes llamados elementos secundarios y micronutrientes.
- Elementos secundarios: no se necesitan en grandes cantidades, pero son necesarios para captar los nutrientes primarios. Dentro de ellos, cabe destacar el azufre, calcio y magnesio. No suele haber problemas de carencias de estos elementos en el suelo, pero en el caso de haberlas se suele subsanar con el abonado, que se realiza normalmente con sulfatos o carbonatos (Shannon *et al.*, 1992; St. John *et al.*, 2015). Un exceso de estos elementos puede provocar el bloqueo de nutrientes principales no pudiendo ser absorbidos por las plantas, lo que supondría un gran problema. Por lo tanto, hay que prestar gran interés en el control de las cantidades de elementos secundarios en las plantas.

- Elementos traza o micronutrientes: estos elementos se necesitan en muy poca cantidad en las plantas, pero son sustancias necesarias para el desarrollo de las mismas. Hay ocho micronutrientes esenciales en la horticultura: boro, cobre, hierro, zinc, manganeso, molibdeno, níquel y cloro. Es muy importante cubrir las necesidades de estos micronutrientes en los cultivos para tener una producción satisfactoria y unos productos de calidad aceptable (Alloway, 2008). La deficiencia de estos micronutrientes depende de la zona de cultivo, pero las más frecuentes son de zinc, cobre, hierro y manganeso. Normalmente, para cubrir estas necesidades se incorporan los micronutrientes en los sustratos en forma de sales de quelato o sulfato, siendo las últimas las más usadas (López-Rayó *et al.*, 2016). Se pueden producir bloqueos entre los micronutrientes si existe exceso de alguno, por lo que es necesario, también en este caso, un control exhaustivo de las cantidades de estos en las zonas de cultivo para evitar problemas de déficit o exceso que pueden provocar un bajo rendimiento del cultivo. Por otro lado, el pH del suelo, así como su textura y materia orgánica afectan a la forma en la que la planta pueda absorber los micronutrientes siendo necesario un estudio previo del suelo de cultivo para poder prever los posibles problemas que puedan surgir y así subsanarlos (St. John *et al.*, 2015).

1.4 Técnicas de procesado

Uno de los puntos positivos de la elaboración de los bioplásticos a partir de biopolímeros es la fácil adaptación de los métodos de procesado usados para la elaboración de plásticos convencionales para la producción de bioplásticos (Czigány *et al.*, 2007; Chantapet *et al.*, 2013). Esto reduce la inversión realizada para el desarrollo de estos sistemas, provocando que muchos productores se adhieran a subsidios gubernamentales para adecuar sus fábricas a la producción de bioplásticos (Pirzada *et al.*, 2020). Los métodos de procesado más utilizados son el moldeo por compresión, extrusión e inyección, aunque en la mayoría de los casos, es necesario incorporar pasos adicionales para mejorar el proceso (Pereira *et al.*, 2015; Cuadri *et al.*, 2016; Bourny *et al.*, 2017; Gamero *et al.*, 2019). Todos coinciden en las etapas fundamentales: la ruptura de enlaces intermoleculares que estabilizan los biopolímeros para darles movilidad; reordenamiento y orientación de las cadenas móviles del polímero en la forma deseada; y, finalmente, la formación de nuevos enlaces e interacciones intermoleculares que permitan la estabilización de la matriz tridimensional originada. Aunque existen también otros métodos de fabricación muy estudiados como la fermentación, el electrohilado o el casting, su peor asimilación a los procesos ya utilizados industrialmente los hace económicamente poco rentables para aplicaciones hortícolas, siendo utilizados en sectores más exclusivos donde el coste del producto final es menos importante, como cosméticos o biomateriales (Guilbert y Gontard, 2005; Tsang *et al.*, 2019).

1.4.1 Moldeo por compresión

El moldeo por compresión utiliza una combinación de presión y temperatura para procesar los sistemas. El calentamiento de los biopolímeros por encima de la temperatura de transición vítrea hace que el material sea fácilmente moldeable, aunque la polimerización también puede ocurrir debido a la desnaturalización del biopolímero, dependiendo de las condiciones de procesado y la naturaleza del plastificante (Jerez *et al.*, 2007).

En esta técnica el material se coloca en un molde donde se aplica calor y presión para que se acomode en toda la superficie del molde, adaptándose a su forma. Estas condiciones se mantienen hasta que el material haya curado, o simplemente se mantiene la presión mientras el material se enfría y endurece (Figura 1.4) (Engel *et al.*, 2020).

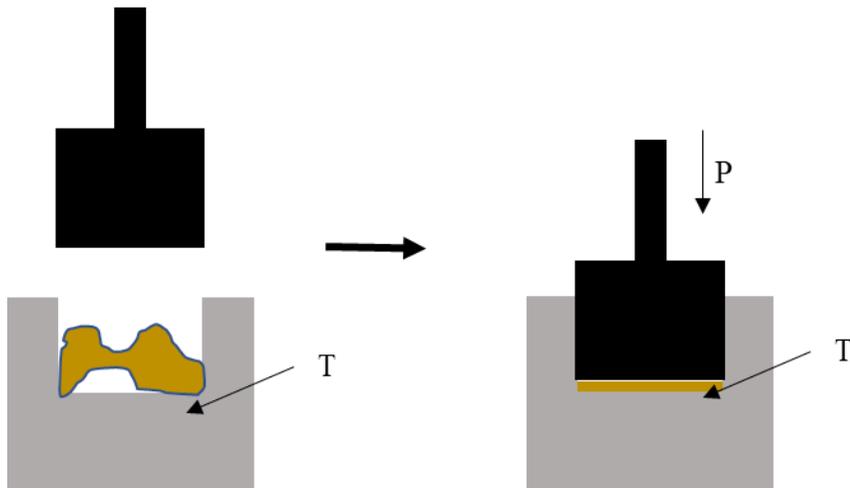


Figura 1.4. Esquema del método de procesado mediante moldeo por compresión.

Normalmente, es recomendable utilizar una compresión isostática para que las propiedades del bioplástico sean homogéneas en todo el sistema (Greene, 2014). Sin embargo, esto aumenta el coste del método de procesado, por lo que no es rentable en muchos casos.

1.4.2 Moldeo por extrusión

Este método de procesado se basa en el mezclado de una matriz bioplástica (proteína y/o polisacárido) y un plastificante para obtener una masa homogénea. La extrusión obliga al material termoplástico, a una temperatura adecuada, a fluir a través de una boquilla de forma más o menos compleja y sección fija, mediante la aplicación de presión (Ebrahimi *et al.*, 2019).

El equipo de extrusión está compuesto principalmente por los elementos que se muestran en la Figura 1.5. Así, consta de una tolva a través de la cual se introduce la materia prima, un motor que suministra la energía mecánica necesaria para transportar el material, un tornillo sin fin que impulsa el material a través de la boquilla y un cilindro extrusor que aloja el tornillo sin fin y al que se fija la boquilla. El cilindro está provisto de diferentes elementos calefactores (resistencias eléctricas o camisas calefactoras) que mantienen el perfil térmico adecuado para la extrusión (Hernandez-Izquierdo y Krochta, 2008).

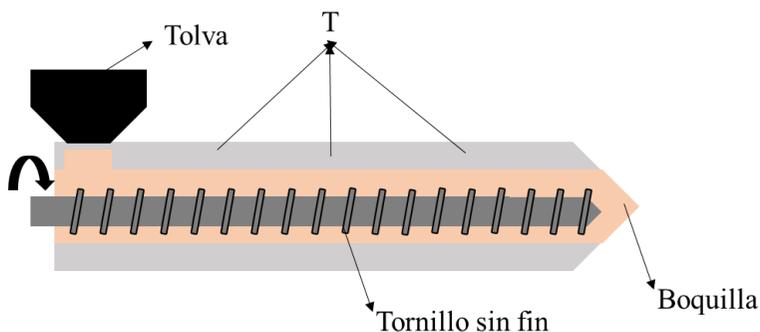


Figura 1.5. Esquema del equipo de moldeo por extrusión.

El incremento de la presión se consigue empleando un tornillo con una zona central en forma troncocónica creciente en el sentido de avance del material (zona de compresión). La zona previa, que comienza desde

la tolva, es la zona de alimentación y en la última zona (de dosificación) el tornillo vuelve a tener forma cilíndrica.

Entre las principales ventajas de esta técnica de procesado se encuentran su alta productividad, ya que opera en condiciones continuas estacionarias; su sencillez de operación (no necesita una etapa previa de homogenización de las materias primas); y un coste moderado. Sin embargo, el uso de esta técnica está restringido a productos de sección transversal constante y, generalmente, requiere la aplicación de procesos de post-extrusión (Graiver *et al.*, 2004).

Por otro lado, la extrusión de biopolímeros puede resultar más compleja que la de los polímeros termoplásticos, especialmente si se usan proteínas. En la Figura 1.6 se aprecian la diferente dependencia térmica de un polímero termoplástico y una proteína. La temperatura de la cámara debe alcanzar la temperatura de transición vítrea de la mezcla para que fluya correctamente. Por lo tanto, se debe definir un perfil de temperatura adecuado en toda la cámara. Este es un punto clave en el proceso de extrusión, teniendo en cuenta que un cierto grado de reticulación entre las cadenas proteicas puede contribuir a mantener la forma y mejorar las propiedades mecánicas del bioplástico extruido. En contrapartida, es fundamental evitar un entrecruzamiento excesivo de la mezcla biopolimérica para asegurar su correcto flujo a través de la boquilla (Emin y Schuchmann, 2017).

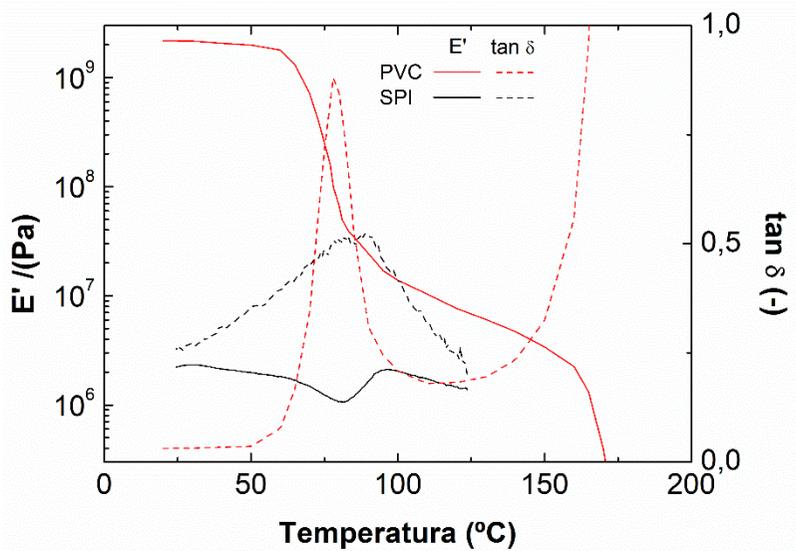


Figura 1.6. Comparación entre el efecto de la temperatura para un polímero termoplástico como el PVC (Shi et al., 2018) o para un biopolímero como el aislado proteico de soja plastificado con glicerina, SPI (Jiménez-Rosado et al., 2020).

1.4.3 Moldeo por inyección

Al igual que el moldeo por compresión, el moldeo por inyección se basa en la aplicación combinada de presión y temperatura para formar el bioplástico. El moldeo por inyección es una técnica de procesamiento discontinuo que implica la aplicación de presión para llenar un molde y el posterior enfriamiento y desmolde de la muestra (Adamy y Verbeek, 2013). En polímeros termoplásticos, el control de la temperatura de fusión se considera el factor más crítico en este tipo de moldeo, ya que afecta directamente a la viscosidad del biopolímero fundido, afectando así a la velocidad de inyección, la velocidad de descenso del pistón, la velocidad de enfriamiento del molde y el perfil presión-tiempo (Zárate-Ramírez et al., 2014).

Sin embargo, las proteínas no experimentan fusión, sino que comienzan a reticular a temperatura elevada, como puede apreciarse en

la Figura 1.6. Por ello, la temperatura del cilindro no debe exceder excesivamente la temperatura de transición vítrea para evitar la reticulación en el cilindro. En cambio, el molde sí que se puede mantener a una temperatura superior para favorecer la reticulación.

El equipo más simple utilizado para el moldeo por inyección (tipo émbolo) se muestra en la Figura 1.7. Este equipo consta de varios dispositivos: el cilindro (o cámara de preinyección), equipada con elementos calefactores, donde se plastifica la mezcla; el sistema inyector (con el émbolo), que es el encargado de inyectar la mezcla; el molde con la cavidad que le da forma a las piezas, la unidad de cierre, que contiene el molde y el sistema de expulsión de piezas; y el sistema de control, que controla los parámetros del proceso (tiempo, temperatura, presión y velocidad). Las operaciones industriales de moldeo por inyección a gran escala se realizan generalmente utilizando máquinas de tipo tornillo horizontal, donde el tornillo tiene una doble función: en primer lugar, plastificar la mezcla dentro del cilindro, y, en segundo lugar, inyectar el material polimérico en el molde.

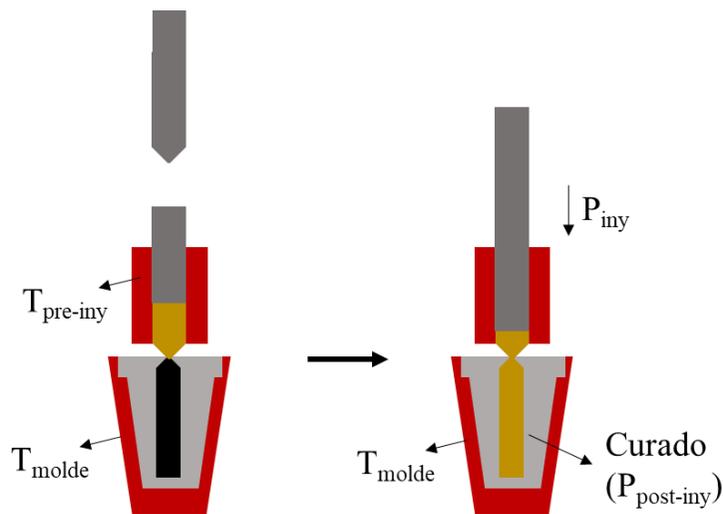


Figura 1.7. Esquema de un equipo de moldeo por inyección vertical tipo tapón.

La principal ventaja del moldeo por inyección es que se pueden obtener piezas de tamaños y formas bastante diversos, incluso con geometrías complejas, en un solo paso. Además, es el método de procesado más común y más desarrollando en términos de procesado de polímeros, ya que es la técnica más rentable económicamente, siempre que la escala de producción sea lo suficientemente grande. No obstante, es un proceso complejo que debe optimizarse para evitar defectos en el producto final. En algunos casos, se requiere de un pretratamiento para homogenizar las materias primas (Khosravani y Nasiri, 2020).

Todos los métodos de procesado mencionados son adecuados para la fabricación de bioplásticos, y ninguno de ellos ha demostrado ser más predominante que los demás en la literatura (Figura 1.8). Sin embargo, el moldeo por inyección es particularmente adecuado, ya que los biopolímeros pueden presentar características tanto termoplásticas como termoendurecibles (dependiendo de las condiciones de procesado), por lo que una selección adecuada de los parámetros de procesado puede llevar a obtener bioplásticos con las propiedades deseadas (Félix *et al.*, 2014; Perez-Puyana *et al.*, 2016). Además, se encuentra entre las técnicas más utilizadas para el procesado de polímeros sintéticos, lo que abre la disponibilidad de muchos tamaños y tipos de máquinas industriales diferentes. Sin embargo, este proceso confiere cambios estructurales irreversibles a los biopolímeros, no pudiendo ser reprocesados (Félix *et al.*, 2014).

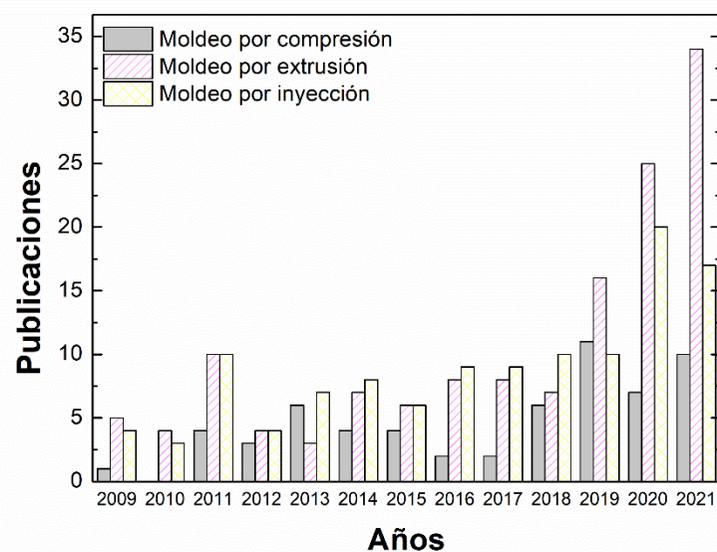


Figura 1.8. Evolución del número de publicaciones sobre moldeo por compresión, extrusión o inyección de bioplásticos. Datos obtenidos de Scopus.

Los parámetros que se pueden controlar durante el moldeo por inyección son la temperatura del cilindro y del molde y los tiempos y presiones de inyección y curado. Como se ha mencionado anteriormente, los sistemas bioplásticos basados en proteínas requieren una temperatura del cilindro ligeramente superior a la temperatura de transición vítrea de la mezcla. Esta temperatura se elige para que la viscosidad de la mezcla sea mínima, asegurando el llenado completo del molde (Perez-Puyana *et al.*, 2016). La viscosidad que se consigue con el calentamiento de la mezcla define la presión y el tiempo de inyección, ya que de estos depende la velocidad a la que pasa la mezcla desde el cilindro al molde. En cuanto a la temperatura del molde, se puede modular (junto con el tiempo de moldeo) para controlar la reticulación de las cadenas biopoliméricas generando así el bioplástico con las características deseadas. De esta forma, si el objetivo es obtener una buena capacidad de absorción de agua, la temperatura empleada será suficiente para que el bioplástico tenga propiedades mecánicas que le permitan mantener su

integridad física al absorber agua, pero suficientemente moderada para mantener la estructura porosa que le permite la captación de agua (Fernández-Espada *et al.*, 2016b). Por otro lado, si se deben priorizar las propiedades mecánicas, la temperatura del molde elegida será la máxima permitida antes de la descomposición térmica de la matriz del biopolímero. En este caso, la morfología de la matriz bioplástica tendrá poros más pequeños, pero la estructuración conseguida mejorará las propiedades finales del sistema. Finalmente, la presión y el tiempo de curado no suelen causar cambios significativos en los bioplásticos, pero pueden reducir o aumentar la velocidad de reticulación del bioplástico, haciendo que el tiempo de procesado sea más largo o más corto.

1.4.4 *Etapas de procesado adicionales*

Como se mencionó anteriormente, la fabricación de bioplásticos implica el uso de al menos dos componentes (la matriz biopolimérica y el plastificante). Por tanto, es fundamental conseguir un buen grado de mezcla para obtener una correcta homogenización de las materias primas y, así, conseguir un bioplástico lo más regular posible (Fernández-Espada *et al.*, 2016a; Carvajal-Piñero *et al.*, 2019). En el proceso de extrusión, esta mezcla se realiza gracias a la acción del tornillo sin fin. Sin embargo, en los otros dos métodos de procesado (moldeo por compresión o inyección) se requiere una etapa previa de mezclado para obtener una mezcla bien homogeneizada. En esta etapa, la proporción de materias primas utilizadas es muy importante. En este sentido, si se usa una proporción de plastificante muy alta, la mezcla será muy fluida, lo que puede dificultar su manipulación durante el procesado, además el bioplástico exudará el exceso de plastificante. Por el contrario, si la proporción de plastificante es muy baja, la mezcla será arenosa,

presentando gran resistencia a fluir, y tendiendo a formar defectos debido a la dificultad para rellenar las cavidades del molde (Fernández-Espada *et al.*, 2016a). En el caso de que se incorporen aditivos, también se debe controlar el porcentaje agregado de estos. Así, se ha encontrado que al aumentar el porcentaje de aditivos generalmente se produce una mejora inicial de las propiedades de los bioplásticos. Sin embargo, el porcentaje alcanza un máximo a partir del cual estas propiedades empeoran debido a que la interacción entre las cadenas poliméricas puede verse afectada por el aditivo (Gamero *et al.*, 2019). Otro factor a considerar en esta etapa de mezclado es la temperatura de la mezcla. La mayoría de los sistemas se pueden homogeneizar a temperatura ambiente, utilizando condiciones adiabáticas, aunque hay algunos sistemas que necesitan aumentar su temperatura para alcanzar un nivel óptimo de homogenización. En estos casos, es necesario estudiar a fondo las transiciones térmicas de las mezclas, ya que un calentamiento excesivo puede generar una estructuración prematura, lo que imposibilita su procesado, llegando incluso a la degradación del sistema biopolimérico (Felix *et al.*, 2016).

También se pueden encontrar tratamientos adicionales para mejorar las propiedades finales de los bioplásticos. En este sentido, algunos autores han evaluado la funcionalización de la matriz polimérica para mejorar la capacidad de absorción de agua de los materiales (Cuadri *et al.*, 2018; Capezza *et al.*, 2019). Esta funcionalización consiste en incrementar los grupos captadores de agua presentes en los biopolímeros. En este contexto, una de las modificaciones químicas más comunes es la acilación de los residuos aminoacídicos no terminales (ej. de lisina) con ácidos anhídridos, aumentando el número de aniones carboxilatos (COO^-) presentes en la matriz bioplástica. Estos grupos son grandes recolectores de agua, lo que incrementa el carácter hidrofílico de

las matrices bioplásticas. Otra modificación que se puede hacer con el mismo objetivo es aumentar el pH del biopolímero por encima de su punto isoeléctrico. El inducir un medio básico en los biopolímeros causa un mayor número de cargas negativas en sus cadenas, que pueden generar puentes de hidrógeno con las moléculas de agua (Álvarez-Castillo *et al.*, 2020b).

En cuanto a las propiedades mecánicas, se pueden realizar modificaciones físicas, enzimáticas o químicas para mejorar la resistencia mecánica de las matrices bioplásticas. No obstante, los cambios enzimáticos o químicos se evitan normalmente en las matrices usadas en horticultura, para evitar contaminaciones y acumulaciones en el terreno que puedan transmitirse a la cadena alimentaria y causar intoxicación en el consumidor. Entre los métodos de refuerzo físico a los que pueden ser sometidas las matrices bioplásticas, el tratamiento térmico a una temperatura alrededor de 50 °C (también conocido como tratamiento dehidrotérmico, DHT) es el más estudiado. Este tratamiento se realiza a una temperatura moderada con el objetivo de realizar un reforzamiento moderado de la matriz biopolimérica (Álvarez-Castillo *et al.*, 2018). Otras técnicas están siendo probadas para conseguir reforzar las matrices en un periodo de tiempo más corto que el tratamiento dehidrotérmico. En este sentido, se pueden encontrar grandes avances con tratamientos con ultrasonidos o microondas (Karki, 2009; Ghasri *et al.*, 2019). Estas técnicas reducen el tiempo de procesado desde algunas horas a pocos segundos. A nivel industrial, esta reducción confiere un incremento en la producción de matrices al reducir el tiempo de fabricación. No obstante, la implementación de estos tratamientos requiere una mayor inversión inicial que el uso de un tratamiento

dehidrotérmico, por lo que lo que es conveniente atenuar la relación tiempo/coste para optimizar el proceso.

1.5 Marco político-social y científico

El estrecho vínculo entre la población y la tierra ha causado el desarrollo de diversas normativas que regulan la producción y otros aspectos medioambientales. De esta forma, una parte destacable de las medidas contra el cambio climático es la recuperación de la biodiversidad de los ecosistemas, en los que el suelo juega un papel fundamental. Por tanto, la reducción de los impactos negativos sobre el suelo contribuirá a la transición ecológica. Así, se llega a la conclusión de que es necesario conservar y promover la salud del suelo para lograr la seguridad alimentaria mundial. Además de aumentar el rendimiento de los cultivos y la producción de alimentos. Aunque esto último se consigue con la aplicación de fertilizantes, estos perjudican la calidad del suelo debido a su poca asimilación, afectando a su salud. Por lo tanto, parece evidente la necesidad de explorar y utilizar nuevos fertilizantes más eficientes que aporten los nutrientes necesarios al suelo y a las plantas, sin afectar a la salud del suelo. Esto se podría conseguir con las matrices biodegradables y de liberación controlada que se pretenden desarrollar en este trabajo.

Por otro lado, la escasez y encarecimiento del petróleo, junto con un aumento de las regulaciones medioambientales, promueven el desarrollo de nuevos materiales y productos compatibles con el medioambiente e independientes de los combustibles fósiles. En este sentido, la biomasa parece ser una materia prima potencial para la sustitución de los polímeros sintetizados a partir del petróleo en aplicaciones como los sistemas de liberación controlada. Hasta ahora, la extracción y el procesado de recursos producen la mitad de las emisiones totales de gases de efecto invernadero y más del 90% de la pérdida de biodiversidad

y estrés hídrico. Además, el consumo mundial de biomasa, combustibles fósiles, metales y minerales es extremadamente alto, produciendo una gran cantidad de desechos (OECD, 2019). Todo esto es insostenible por lo que se están desarrollando y promocionando nuevas tecnologías y productos limpios e innovadores. En este sentido, el nuevo Pacto Verde de la Unión Europea (2019-2023) enfatiza la necesidad de una acción inmediata para hacer de Europa una región climáticamente neutra en 2050. En este sentido ha creado nuevas áreas de políticas a favor del consumo responsable como Biodiversidad, De la granja a la mesa, Agricultura sostenible, Industria sostenible. Conjuntamente, el nuevo Programa de Investigación e Innovación de la UE: Horizonte Europa (2021-2027) aborda el cambio climático, ayuda a alcanzar los Objetivos de Desarrollo Sostenible de la ONU e impulsa la competitividad y el crecimiento de la UE. El Programa Horizonte Europa también se centra en el nexo entre la biodiversidad, el agua, los alimentos y la salud y las interrelaciones entre los Objetivos de Desarrollo Sostenible de las Naciones Unidas relacionados con la seguridad alimentaria y del agua, la salud para todos, la protección de la biodiversidad en la tierra y en los océanos y la lucha contra el cambio climático. En este contexto, la Comisión Europea adoptó el nuevo Plan de Acción de Economía Circular (CEAP) en 2021 como uno de los principales pilares del Pacto Verde Europeo, la nueva agenda de Europa para el crecimiento sostenible y el empleo presentada en 2019. Una economía circular es una condición previa para lograr la neutralidad climática buscada y detener la pérdida de biodiversidad. En este sentido, la Comisión Europea tiene como objetivo la transición del modelo clásico de economía lineal a un modelo circular que garantice que los recursos utilizados se mantienen en la economía de la UE (European Commission, 2019).

En línea con el Pacto Verde Europeo y la estrategia de bioeconomía de la UE; y para cumplir con los desafíos en las agendas europeas del Plan de Acción de Economía Circular, y El Plan de Acción de Contaminación Cero para el Aire, el Agua y el Suelo, se han creado estrategias y tecnologías alternativas que valorizan los productos iniciales categorizados como "residuos" o "subproductos" y vinculan la caracterización de la biomasa con el desarrollo de bioproductos sostenibles. Por ello, existe un interés creciente hacia la máxima recuperación y valorización de los recursos que ofrece la industria alimentaria. En los procesos agroalimentarios y forestales se generan globalmente miles de millones de toneladas de residuos a lo largo de toda la cadena de producción, que se espera aumenten en los próximos años debido a la globalización y las políticas de libre comercio. Sin embargo, el valor potencial de estos residuos es alto, por lo que la utilización de este material desechado en aplicaciones de base biológica podría ser económicamente viable y favorable para el medio ambiente, ya que este tipo de residuos se considera material no deseado y su eliminación en vertederos o incineradores resulta costosa y genera efectos negativos sobre el medio ambiente.

1.5.1 *Economía circular*

En el actual modelo económico predomina la denominada como economía lineal. Este modelo se apoya en la producción de bienes bajo las pautas de comprar, consumir y desechar (Figura 1.9). Este modelo genera una gran cantidad de residuos de diferente tipología que dificulta una adecuada gestión y tratamiento, contaminando y estresando la capacidad del planeta para renovar o producir nuevos recursos (Konstantinos-Georgios y Dimitrios, 2019). Esta economía lineal se basa

en la falsa suposición de que los recursos naturales estarán siempre disponibles, abundantes, fáciles de obtener y es barato deshacerse de ellos, normalmente enterrándolos o quemándolos. La grave problemática ambiental ha demostrado que este modelo es del todo insostenible, teniendo un gran impacto sobre los recursos y ecosistemas (Magazzino *et al.*, 2021). Además, este impacto es agravado por los hábitos de consumo actuales, cada vez más asociados a la “moda rápida”: renovar los bienes antes de agotar su ciclo de vida útil (Niinimäki *et al.*, 2020).



Figura 1.8. Ciclo seguido en la economía lineal.

En este contexto, se estima que en una ciudad europea de un millón de habitantes se consumen, en un día, 11,5 kt de combustible sólido, 320 kt de agua y 2 kt de alimentos. A su vez, se generan 25 kt de CO₂, 1,5 kt de residuos y 300 kt de aguas residuales. Esto equivale a un consumo anual mundial de 1,75 veces la capacidad del planeta (WWF, 2021). En otras palabras, La Tierra no tiene capacidad suficiente para seguir con el ritmo de consumo habitual, agravándose el problema debido a la contaminación generada. Por este motivo, es necesario replantearse el sistema de economía lineal.

Una alternativa emergente es la conocida como economía circular. Esta estrategia, que pretende transformar la economía y productividad, tiene como finalidad que el valor de los productos, materiales y recursos se mantengan en la economía durante el mayor tiempo posible, mientras

que se reduce al mínimo la generación de residuos (Camacho-Otero *et al.*, 2018). De esta forma, tiene tres principios claves: preservar y mejorar el capital natural, optimizar el uso de los recursos y fomentar la eficiencia del sistema (Michelini *et al.*, 2017). Así, está basada en el principio de cerrar el ciclo (Figura 1.10).



Figura 1.10. Ciclo seguido en la economía circular.

Esta economía circular permitirá mejorar los resultados económicos a la vez que se reduce el uso de los recursos, identificar y crear nuevas oportunidades de crecimiento económico, impulsar la innovación y la competitividad, garantizar la seguridad del suministro de recursos esenciales, y luchar contra el cambio climático, minimizando los impactos medioambientales del uso de los recursos (Neves y Marques, 2022).

La transición desde la actual economía lineal hacia una circular se ve cada vez más alentadora. Así, diferentes administraciones y empresas están realizando diversas acciones para promover la economía circular, viéndose reflejado en diferentes iniciativas y planes. Entre ellos, la

consecución de una economía circular está vinculada con el Acuerdo de París sobre el cambio climático, la Agenda 2030 para el desarrollo sostenible, la Declaración ministerial de la Asamblea de las Naciones Unidas sobre el medio ambiente “Hacia un planeta sin contaminación”, el Pacto Verde Europeo y el Plan de Acción para la Economía Circular “Cerrar el círculo: un plan de acción de la UE para la Economía circular”.

1.5.2 Impactos económicos, sociales, medioambientales y científicos

La presente tesis se enmarca en la convergencia hacia una economía circular en el sector hortícola. Así, se pretende revalorizar un subproducto agroalimentario, obtenido de la producción de aceite de soja, para su uso como materia prima en el desarrollo de un producto innovador, sostenible y biodegradable que mejore la eficiencia de los fertilizantes y el ciclo del agua. En este sentido, está acorde a algunos de los objetivos planteados en la Estrategia Europea para la Economía Circular:

- Reducir la generación de residuos un 15% respecto a lo generado en 2010. Esto se consigue al sustituir productos plásticos por productos bioplásticos biodegradables.
- Reducir la generación de residuos alimentarios un 20% en las cadenas de producción y suministro. Se busca utilizando un subproducto alimentario como materia prima.
- Mejorar un 10% la eficiencia en el uso del agua. Se pretende que las matrices obtenidas mejoren la eficiencia del ciclo del agua en el riego de los cultivos.

Por otro lado, esta tesis está claramente identificada con varios de los Objetivos de Desarrollo Sostenible propuestos por la Agenda 2030:

- El objetivo 2 de hambre cero, asegurando la sostenibilidad de los sistemas de producción de alimentos y aplicando prácticas agrícolas resilientes que aumentan la productividad y la producción, contribuyan al mantenimiento de los ecosistemas, fortalezcan la capacidad de adaptación al cambio climático, los fenómenos meteorológicos extremos, las sequías, las inundaciones y otros desastres, y mejoren progresivamente la calidad del suelo y la tierra.
- El objetivo 8 de trabajo decente y crecimiento económico, generando un producto nuevo que permite el crecimiento económico al revalorizar su materia prima y creando una nueva línea de producción.
- El objetivo 12 de producción y consumos responsables, consiguiendo una producción hortícola más sostenible.
- El objetivo 13 de acción por el clima, al ayudar a combatir los problemas climáticos generados en los cultivos por falta de agua y nutrientes.
- El objetivo 15 sobre vida de ecosistemas terrestres, al ser un producto totalmente biodegradable, volviendo al ciclo productivo sin generar sustancias tóxicas ni alteraciones al ecosistema.

Económicamente se revalorizará un subproducto minusvalorado, dándole un nuevo potencial económico que beneficiará no solo a la industria productora de aceite de soja, la cual venderá el subproducto como nueva materia prima, sino también a la industria del plástico que podrá utilizar su misma línea de producción para crear nuevos productos más sostenibles y especializados. Estos nuevos productos permiten la reducción de residuos alimentarios, ya que pueden usarse como materia

prima para la elaboración de la matriz. Además, permite el uso eficiente de los fertilizantes, evitando la contaminación de los suelos y aguas subterráneas por exceso de fertilizantes, y una reducción de la necesidad de riego, reduciendo la cantidad de agua necesaria durante el cultivo. Todo esto hace que el procesado de estas matrices genere un beneficio medioambiental. Por otro lado, las matrices pueden permitir una asimilación de micronutrientes más eficiente por parte de las plantas, pudiendo obtenerse cultivos enriquecidos. También facilita la dosificación de micronutrientes en función de las necesidades específicas de cada suelo hortícola (dosificación de micronutrientes a la carta). Todo esto genera un impacto social sobre la comunidad al tener alimentos con más nutrientes que permiten una mejor alimentación. Finalmente, el desarrollo de esta tesis supondrá un avance científico al permitir optimizar la fabricación de sistemas de liberación controlada biodegradables y sostenibles, suponiendo nuevos protocolos de procesado eficientes e industrialmente escalables. Además, supondrá un aporte en el conocimiento sobre el uso de residuos o subproductos proteicos como materias primas para materiales que sustituyan a los plásticos convencionales.

Agradecimientos

Se quiere agradecer al *Ministerio de Economía y Competitividad* y al *Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades* por el soporte económico dado para los proyectos en los que se engloba esta tesis doctoral (Ref. CTQ2015-71164-P y RTI2018-097100-B-C21, respectivamente). Además, se agradece al *Ministerio de Educación y Formación Profesional* por la ayuda contractual para la realización de la tesis (Ref. FPU17/01718).

Publicaciones relacionadas

Jiménez-Rosado, M., Pérez-Puyana, V., Guerrero, A. y Romero, A. (2021). Bioplastic matrices for sustainable agricultural and horticultural applications. *Bioplastics for Sustainable Development*. Singapoure: Springer.

Referencias

Adamy, M. y Verbeek, C. J. R. (2013) "Injection-Molding Performance and Mechanical Properties of Blood Meal-Based Thermoplastics", *Advances in Polymer Technology*. Wiley, 32(3), pp. 1–9.

Aguilar, J. M., Bengoechea, C., Pérez, E. y Guerrero, A. (2020) "Effect of different polyols as plasticizers in soy based bioplastics", *Industrial Crops and Products*, 153, p. 112522.

Ahmed, T., Shahid, M., Azeem, F., Rasul, I., Shah, A. A., Noman, M., Hameed, A., Manzoor, N., Manzoor, I. y Muhammad, S. (2018) "Biodegradation of plastics: current scenario and future prospects for environmental safety", *Environmental Science and Pollution Research*, 25(8), pp. 7287–7298.

Alloway, B. J. (2008) *Micronutrient deficiencies in global crop production*, *Micronutrient Deficiencies in Global Crop Production*. Berlin: Springer.

Álvarez-Castillo, E., Bengoechea, C. y Guerrero, A. (2020a) "Composites from by-products of the food industry for the development of superabsorbent biomaterials", *Food and Bioproducts Processing*, 119, pp. 296–305.

Álvarez-Castillo, E., Bengoechea, C. y Guerrero, A. (2020b) "Effect of pH on the properties of porcine plasma-based superabsorbent materials", *Polymer Testing*, 85, p. 106453.

Álvarez-Castillo, E., Del Toro, A., Aguilar, J. M., Guerrero, A. y Bengoechea, C. (2018) "Optimization of a thermal process for the production of superabsorbent materials based on a soy protein isolate", *Industrial Crops and Products*, 125(1), pp. 573–581.

Andreeßen, C. y Steinbüchel, A. (2019) "Recent developments in non-biodegradable biopolymers: Precursors, production processes, and future perspectives", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(1), pp. 143–157.

ASTM D883-00 (2000) "Standard Terminology Relating to Plastics". West Conshohocken: ASTM international.

Bourny, V., Perez-Puyana, V., Felix, M., Romero, A. y Guerrero, A. (2017) "Evaluation of the injection moulding conditions in soy/nanoclay based composites", *European Polymer Journal*. Elsevier, 95, pp. 539–546.

Camacho-Otero, J., Boks, C. y Pettersen, I. (2018) "Consumption in the Circular Economy: A Literature Review", *Sustainability*, 10(8), p. 2758.

Capezza, A. J., Newson, W. R., Olsson, R. T., Hedenqvist, M. S. y Johansson, E. (2019) "Advances in the Use of Protein-Based Materials: Toward Sustainable Naturally Sourced Absorbent Materials", *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 7(5), pp. 4532–4547.

Carvajal-Piñero, J. M., Ramos, M., Jiménez-Rosado, M., Perez-Puyana, V. y Romero, A. (2019) "Development of Pea Protein Bioplastics by a Thermomoulding Process: Effect of the Mixing Stage", *Journal of Polymers and the Environment*, 27(5), pp. 968–978.

Chantapet, P., Kunanopparat, T., Menut, P. y Siriwattanayotin, S. (2013) "Extrusion Processing of Wheat Gluten Bioplastic: Effect of the Addition of Kraft Lignin", *Journal of Polymers and the Environment*, 21(3), pp. 864–873.

Cuadri, A. A., Bengoechea, C., Romero, A. y Guerrero, A. (2016) "A natural-based polymeric hydrogel based on functionalized soy protein", *European Polymer Journal*, 85, pp. 164–174.

Cuadri, A. A., Romero, A., Bengoechea, C. y Guerrero, A. (2017) "Natural superabsorbent plastic materials based on a functionalized soy protein", *Polymer Testing*, 58, pp. 126–134.

Cuadri, A. A., Romero, A., Bengoechea, C. y Guerrero, A. (2018) "The Effect of Carboxyl Group Content on Water Uptake Capacity and Tensile Properties of Functionalized Soy Protein-Based Superabsorbent Plastics",

Journal of Polymers and the Environment., 26, pp. 2934-2944.

Czigány, T., Romhány, G. y Kovács, J. G. (2007) "Starch for Injection Molding Purposes", en *Handbook of Engineering Biopolymers*. Munich, Alemania: Hanser, pp. 79-108.

Dhillon, G. S., Kaur, S., Oberoi, H. S., Spier, M. R. y Brar, S. K. (2016) "Agricultural-Based Protein By-Products: Characterization and Applications", en *Protein Byproducts*. Edmonton, Canada: Elsevier, pp. 21–36.

Ebrahimi, G. R., Barghamadi, A., Ezatpour, H. R. y Amiri, A. (2019) "A novel single pass severe plastic deformation method using combination of planar twist extrusion and conventional extrusion", *Journal of Manufacturing Processes*, 47, pp. 427–436.

Elbasiouny, H., Elbanna, B. A., Al-Najoli, E., Alsherief, A., Negm, S., Abou El-Nour, E., Nofal, A. y Sharabash, S. (2020) "Agricultural Waste Management for Climate Change Mitigation: Some Implications to Egypt", in *Waste Manafement in MENA Regions*, pp. 149–169.

Emin, M. A. y Schuchmann, H. P. (2017) "A mechanistic approach to analyze extrusion processing of biopolymers by numerical, rheological, and optical methods", *Trends in Food Science & Technology*, 60, pp. 88–95.

Engel, J. B., Ginity, M. Mac, Luchese, C. L., Tessaro, I. C. y Spada, J. C. (2020) "Reuse of Different Agroindustrial Wastes: Pinhão and Pecan Nutshells Incorporated into Biocomposites Using Thermocompression", *Journal of Polymers and the Environment*, 28(5), pp. 1431–1440.

Felix, M., Carpintero, V., Romero, A. y Guerrero, A. (2016) "Influence of sorbitol on mechanical and physico-chemical properties of soy protein-based bioplastics processed by injection molding", *Polímeros*, 26(4), pp. 277–281.

Félix, M., Martín-Alfonso, J. E., Romero, A. y Guerrero, A. (2014) "Development of albumen/soy biobased plastic materials processed by

injection molding", *Journal of Food Engineering*, 125, pp. 7–16.

Felix, M., Perez-Puyana, V., Romero, A. y Guerrero, A. (2017) "Development of protein-based bioplastics modified with different additives", *Journal of Applied Polymer Science*, 143(42), p. 45430.

Fernández-Espada, L., Bengoechea, C., Cordobés, F. y Guerrero, A. (2016a) "Protein/glycerol blends and injection-molded bioplastic matrices: Soybean versus egg albumen", *Journal of Applied Polymer Science*, 133(6), p. 42980.

Fernández-Espada, L., Bengoechea, C., Cordobés, F. y Guerrero, A. (2016b) "Thermomechanical properties and water uptake capacity of soy protein-based bioplastics processed by injection molding", *Journal of Applied Polymer Science*, 133(24), p. 43524.

Fernández-Espada, L., Bengoechea, C., Sandía, J. A., Cordobés, F. y Guerrero, A. (2019) "Development of novel soy-protein-based superabsorbent matrixes through the addition of salts", *Journal of Applied Polymer Science*, 136(5), p. 47012.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (2020) *Food loss and waste database*. Disponible en: <http://www.fao.org/platform-food-loss-waste/flw-data/es/> (Accedido: Octubre 7, 2020).

Food and Agriculture Organization of the United Nations (2021) *Presupuesto de nutrientes del suelo*. Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC/visualize> (Accedido: Abril 27, 2020).

Gamero, S., Jiménez-Rosado, M., Romero, A., Bengoechea, C. y Guerrero, A. (2019) "Reinforcement of Soy Protein-Based Bioplastics Through Addition of Lignocellulose and Injection Molding Processing Conditions", *Journal of Polymers and the Environment*, 27(6), pp. 1285–1293.

Ghasri, M., Bouhendi, H., Kabiri, K., Zohuriaan-Mehr, M. J., Karami, Z. y Omidian, H. (2019) "Superabsorbent polymers achieved by surface cross

linking of poly(sodium acrylate) using microwave method", *Iranian Polymer Journal*, 28(7), pp. 539–548.

Gómez-Martínez, D., Partal, P., Martínez, I. y Gallegos, C. (2009) "Rheological behaviour and physical properties of controlled-release gluten-based bioplastics", *Bioresource Technology*. Elsevier Ltd, 100(5), pp. 1828–1832.

Graiver, D., Waikul, L. H., Berger, C. y Narayan, R. (2004) "Biodegradable soy protein-polyester blends by reactive extrusion process", *Journal of Applied Polymer Science*, 92(5), pp. 3231–3239.

Greene, J. P. (2014) *Sustainable Plastics: Environmental Assessments of Biobased, Biodegradable, and Recycled Plastics*. Michigan: Wiley.

Guilbert, S. y Gontard, N. (2005) "Agro-polymers for edible and biodegradable films: Review of agricultural polymeric materials, physical and mechanical characteristics", en Han, J. H. B. T.-I. in F. P. (ed.) *Food Science and Technology*. Londres: Academic Press, pp. 263–276.

Hazell, P. y Wood, S. (2008) "Drivers of change in global agriculture", *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 363, pp. 495-515.

Hernandez-Izquierdo, V. y Krochta, J. (2008) "Thermoplastic Processing of Proteins for Film Formation - A Review", *Journal of Food Science*, 73(2), pp. 30–39.

Jayasooriya, S. D., Bhandari, B. R., Torley, P. y D'Arcy, B. R. (2004) "Effect of High Power Ultrasound Waves on Properties of Meat: A Review", *International Journal of Food Properties*, 7(2), pp. 301–319.

Jerez, A., Partal, P., Martínez, I., Gallegos, C. y Guerrero, A. (2007) "Protein-based bioplastics: effect of thermo-mechanical processing", *Rheologica Acta*, 46(5), pp. 711–720.

Jiménez-Rosado, M., Perez-Puyana, V., Rubio-Valle, J. F., Guerrero, A. y Romero, A. (2020) "Evaluation of Superabsorbent Capacity of Soy Protein-Based Bioplastic Matrices with Incorporated Fertilizer for Crops", *Journal of Polymers and the Environment*, 28, pp. 2661-2668.

Jiménez-Rosado, M., Perez-Puyana, V., Rubio-Valle, J. F., Guerrero, A. y Romero, A. (2020) "Processing of biodegradable and multifunctional protein-based polymer materials for the potential controlled release of zinc and water in horticulture", *Journal of Applied Polymer Science*, p. 49419.

St. John, R. A., Christians, N. E., Liu, H. y Menchyk, N. A. (2015) "Secondary Nutrients and Micronutrient Fertilization", en *Turfgrass: Biology, Use, and Management*. Madison, WI, EE.UU.: American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, pp. 521–541.

Karan, H., Funk, C., Grabert, M., Oey, M. y Hankamer, B. (2019) "Green Bioplastics as Part of a Circular Bioeconomy", *Trends in Plant Science*, 24(3), pp. 237–249.

Karki, B. (2009) *Use of high-power ultrasound during soy protein production and study of its effect on functional properties of soy protein isolate*. Iowa State University, Digital Repository. doi:10.31274/etd-180810-3395.

Kartini, I., Lumbantobing, E. T., Suyanta, S., Sutarno, S. y Adnan, R. (2020) "Bioplastic Composite of Carboxymethyl Cellulose/N-P-K Fertilizer", *Key Engineering Materials*, 840, pp. 156–161.

Keeney, D. (1990) "Sustainable agriculture: definition and concepts", *Journal of Production Agriculture*, 3(3), pp. 281–285.

Khosravani, M. R. y Nasiri, S. (2020) "Injection molding manufacturing process: review of case-based reasoning applications", *Journal of Intelligent Manufacturing*, 31(4), pp. 847–864.

Klein, F., Emberger-Klein, A., Menrad, K., Möhring, W. y Blesin, J.-M. (2019) "Influencing factors for the purchase intention of consumers choosing bioplastic products in Germany", *Sustainable Production and Consumption*, 19, pp. 33–43.

Kondraju, T. T. y Rajan, K. S. (2019) "Excessive fertilizer usage drives agriculture growth but depletes water quality", *ISPRS Annals of Photogrammetry, Remote Sensing and Spatial Information Sciences*, IV-3/W1, pp. 17–23.

Konstantinos-Georgios, N. y Dimitrios, K. (2019) "Influence of four socioeconomic indices and the impact of economic crisis on solid waste generation in Europe", *Waste Management*, 89, pp. 190–200.

Kratsch, H. A., Schrader, J. A., McCabe, K. G., Srinivasan, G., Grewell, D. y Graves, W. R. (2015) "Performance and Biodegradation in Soil of Novel Horticulture Containers Made from Bioplastics and Biocomposites", *HortTechnology*, 25(1), pp. 119–131.

Liu, M., Yang, L. y Min, Q. (2019) "Water-saving irrigation subsidy could increase regional water consumption", *Journal of Cleaner Production*, 213, pp. 283–288.

López-Rayó, S., Nadal, P. y Lucena, J. J. (2016) "Novel chelating agents for iron, manganese, zinc, and copper mixed fertilisation in high pH soil-less cultures", *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(4), pp. 1111–1120.

Magazzino, C., Mele, M., Schneider, N. y Sarkodie, S. A. (2021) "Waste generation, wealth and GHG emissions from the waste sector: Is Denmark on the path towards circular economy?", *Science of The Total Environment*, 755, p. 142510.

Maroto, J. V (2008) *Elementos de horticultura general*. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa.

Matveev, Y. I., Grinberg, V. Y. y Tolstoguzov, V. B. (2000) "The plasticizing effect of water on proteins, polysaccharides and their mixtures. Glassy state of biopolymers, food and seeds", *Food Hydrocolloids*, 14(5), pp. 425–437.

Merino, D., Gutiérrez, T. J. y Alvarez, V. A. (2019) "Potential Agricultural Mulch Films Based on Native and Phosphorylated Corn Starch With and Without Surface Functionalization with Chitosan", *Journal of Polymers and the Environment*, 27(1), pp. 97–105.

Mesias, V. S., Agu, A. B., Benablo, P. J., Chen, C.-H. y Penaloza, D. J. (2019) "Coated NPK Fertilizer Based on Citric Acid-Crosslinked Chitosan/Alginate Encapsulant", *Journal of Ecological Engineering*, 20(11), pp. 1–12.

Michelini, G., Moraes, R. N., Cunha, R. N., Costa, J. M. H. y Ometto, A. R. (2017) "From Linear to Circular Economy: PSS Conducting the Transition", *Procedia CIRP*, 64, pp. 2–6.

Mortain, L., Dez, I. y Madec, P. J. (2004) "Development of new composites materials, carriers of active agents, from biodegradable polymers and wood", *Comptes Rendus Chimie*, 7(6–7), pp. 635–640.

Mosnáčková, K., Šlosár, M., Kollár, J., Janigová, I., Šišková, A., Chmela, Š., Sikorska, W., Perďochová, D., Gálisová, I., Alexy, P., Chodák, I. y Mosnáček, J. (2019) "Ageing of plasticized poly(lactic acid)/poly(3-hydroxybutyrate)/carbon black mulching films during one season of sweet pepper production", *European Polymer Journal*, 114, pp. 81–89.

Neves, S. A. y Marques, A. C. (2022) "Drivers and barriers in the transition from a linear economy to a circular economy", *Journal of Cleaner Production*, 341, p. 130865.

Niinimäki, K., Peters, G., Dahlbo, H., Perry, P., Rissanen, T. y Gwilt, A. (2020) "The environmental price of fast fashion", *Nature Reviews Earth &*

Environment, 1(4), pp. 189–200.

OECD (2019) *Global Material Resources Outlook to 2060*. Paris: OECD.

Olad, A., Doustdar, F. y Gharekhani, H. (2020) "Fabrication and characterization of a starch-based superabsorbent hydrogel composite reinforced with cellulose nanocrystals from potato peel waste", *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 601, p. 124962.

Palani, R. y Karthikeyan, M. (2020) "Bioplastics from Agricultural Wastes", *SSRN Electronic Journal*.

Payne, J., McKeown, P. y Jones, M. (2019) "A circular economy approach to plastic waste", *Polymer Degradation and Stability*, 165, pp. 170–181.

Pereira, E. I., da Cruz, C. C. T., Solomon, A., Le, A., Cavigelli, M. A. y Ribeiro, C. (2015) "Novel Slow-Release Nanocomposite Nitrogen Fertilizers: The Impact of Polymers on Nanocomposite Properties and Function", *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 54(14), pp. 3717–3725.

Perez-Puyana, V., Felix, M., Romero, A. y Guerrero, A. (2016) "Effect of the injection moulding processing conditions on the development of pea protein-based bioplastics", *Journal of Applied Polymer Science*, 133(20), p. 43306.

Pirzada, T., de Farias, B., Mathew, R., Guenther, R., Byrd, M., Sit, T., Pal, L., Opperman, C. y Khan, S. (2020) "Recent advances in biodegradable matrices for active ingredient release in crop protection: Towards attaining sustainability in agriculture", *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 48, pp. 121–136.

Relf, D. (1992) "Human Issues in Horticulture", *Hort Technology*, 2(2), pp. 159–171.

Saenghirunwattana, P., Noomhorm, A. y Rungsardthong, V. (2014) "Mechanical properties of soy protein based "green" composites reinforced

with surface modified cornhusk fiber", *Industrial Crops and Products*, 60, pp. 144–150.

Shannon, D. A., Kueneman, E. A., Wright, M. J. y Wood, C. W. (1992) "Fertilization effects on soybean growth and yield in the southern guinea savanna of nigeria 1", *Journal of Plant Nutrition*, 15(5), pp. 639–658.

Shi, Y., Zhao, Y., Li, X., Yan, D., Cao, D. y Fu, Z. (2018) "Enhancement of the mechanical properties and thermostability of poly(vinyl alcohol) nanofibers by the incorporation of sodium chloride", *Journal of Applied Polymer Science*, 135(13), p. 45981.

Siles, P., Tellez, O., Peng, Y.-C. y Zeledón, Y. (2020) "Impact of NPK fertilization on upland rice yield, Nicaragua", en: *A Repository of Agricultural Research Outputs*. Nicaragua: Harvard Dataverse.

Silva, J. y Uchida, R. (2000) "Essential Nutrients for Plant Growth", en *Plant Nutrition Management in Hawaii's soils, approaches and application to tropical and subtropical agriculture*. Hawaii: CTAHR editorial.

Souza, J. de L., Chiaregato, C. G. y Faez, R. (2018) "Green Composite Based on PHB and Montmorillonite for KNO₃ and NPK Delivery System", *Journal of Polymers and the Environment*, 26(2), pp. 670–679.

Starast, M., Karp, K. y Vool, E. (2008) "Effect of NPK fertilization and elemental sulphur on growth and yield of lowbush blueberry", *Agricultural and Food Science*, 16(1), p. 34.

Tsang, Y. F., Kumar, V., Samadar, P., Yang, Y., Lee, J., Ok, Y. S., Song, H., Kim, K. H., Kwon, E. E. y Jeon, Y. J. (2019) "Production of bioplastic through food waste valorization", *Environment International*. Elsevier, 127(January), pp. 625–644.

WWF (2021) *Día de la sobrecapacidad de La Tierra: El planeta en números rojos*. Disponible en:

https://www.wwf.es/nuestro_trabajo/informe_planeta_vivo_ipv/huella_ecologica/dia_de_la_sobrecapacidad_de_la_tierra/ (Accedido: Abril 4, 2022).

Xu, H. y Yang, Y. (2012) "Bioplastics from waste materials and low-value byproducts", in *Degradable Polymers and Materials: Principles and Practice*. 2nd ed. American Chemical Society (ACS Symposium Series), pp. 113–140.

Zárate-Ramírez, L. S., Romero, A., Bengoechea, C., Partal, P. y Guerrero, A. (2014) "Thermo-mechanical and hydrophilic properties of polysaccharide/gluten-based bioplastics", *Carbohydrate Polymers*, 112, pp. 24–31.

Capítulo 2: Materiales y métodos



Este capítulo recoge una descripción de todas las materias primas, métodos de procesado y técnicas de caracterización empleadas durante el desarrollo de esta tesis con la finalidad de obtener una matriz para la liberación controlada de micronutrientes en horticultura.

2.1 Materiales utilizados

2.1.1 Subproducto proteico de soja

La soja forma parte de la familia de las leguminosas y es la proteína vegetal más similar a las proteínas lácteas, por lo que se suele usar como alternativa, sobre todo en el caso de alergia a lácteos. El grano de soja se compone de un 36,5% de proteínas, siendo una gran fuente de proteínas de alta calidad (Ridner, 2006).

Su uso deriva de Asia, hace más de 5000 años, donde se usaba en la alimentación, por su alto nivel nutricional, y en medicina, debido a su efecto sedante y antipirético. En Europa no aparece hasta el siglo XX de mano de Estados Unidos al conocerse sus beneficiosos efectos nutricionales y su potencial en aplicaciones tecnológicas (Ridner, 2006). Hoy en día es muy usada en alimentación, considerándose uno de los cinco granos esenciales junto al arroz, trigo, cebada y maíz (Jia-Chen, 2022). Además, desempeña un papel primordial en una nutrición saludable. En los últimos años también está jugando un papel importante en otros sectores como la fertilización, jabones o pinturas.

La producción mundial de soja del año 2020 fue de 353 millones de toneladas de las cuales más del 60% se destinó a la elaboración de aceite de soja. El país que más soja produce a nivel mundial es Estados Unidos, seguido muy de cerca por Brasil (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, 2022).

En este estudio se utilizó un subproducto de soja rico en proteínas que deriva de la producción industrial del aceite de soja (Figura 2.1). Este subproducto fue suministrado por *Protein Technologies International* (SUPRO 500E, Bélgica) en forma de polvo amarillento con un tamaño de grano entre 120-240 μm .



Figura 2.1. Subproducto de soja rico en proteínas usado en este estudio.

2.1.2 Glicerina

La glicerina (Gly) se utiliza como plastificante, permitiendo que se alineen las cadenas de proteína, lo que favorece la movilidad de las mismas y, por consiguiente, su entrecruzamiento, favoreciendo así su procesado. La glicerina es un alcohol compuesto por tres grupos hidroxilos unidos a la cadena de carbono principal (Figura 2.2). La usada en este estudio es suministrada por Panreac Química Ltd. (España).

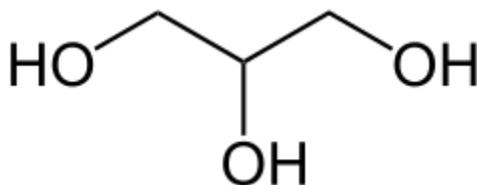


Figura 2.2. Estructura química de la glicerina.

2.1.3 Sales de Zinc y otros micronutrientes

Para adicionar zinc (micronutriente) se utilizaron diferentes sales inorgánicas: sulfato de zinc monohidratado ($\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), carbonato de

zinc (ZnCO_3) y perclorato de zinc ($\text{Zn}(\text{ClO}_4)_2$) suministradas por Panreac Química S.A. (España); cloruro de zinc (ZnCl_2) suministrado por LABKEM (España); y zinc quelatado por ácido 2,2',2'',2'''-(eten-1,2-diildinitrilo)tetraacético (Zn-EDTA) suministrado por Trade Corporation International SAU (España).

Estas sales se seleccionaron por sus diferentes propiedades. De esta forma, $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ se seleccionó al ser la sal más utilizada para suplir deficiencias de zinc en suelos (Cakmak y Kutman, 2018). El ZnCl_2 y $\text{Zn}(\text{ClO}_4)_2$ fueron elegidos debido a la deslocalización de cargas que presentan y el ZnCO_3 debido a su insolubilidad. Finalmente, el Zn-EDTA es una sal compleja muy soluble que suele usarse en fertilización foliar (Doolette *et al.*, 2018). Cabe mencionar que todas las sales seleccionadas pueden utilizarse como fertilizantes para remediar la deficiencia de zinc a excepción del ZnCO_3 ya que su poca solubilidad no permite su captación por parte de la planta. No obstante, esta sal se utilizó con el fin de conocer los efectos que las diferentes sales causan sobre las matrices bioplásticas.

Por otro lado, diferentes micronutrientes fueron seleccionados para ser incluidos en las matrices (hierro, manganeso y cobre). Todos ellos se incorporaron en forma de sulfatos ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) suministrados por Panreac S.A. (España). Estos fueron escogidos por ser los más utilizados para suplir las deficiencias de los micronutrientes en horticultura.

2.1.4 Nanopartículas

Óxidos de todos los micronutrientes utilizados en este estudio (zinc, hierro, manganeso y cobre) han sido sintetizados como nanopartículas

en el laboratorio mediante un método de precipitación coloidal (explicado en la sección 2.3). Las nanopartículas tienen un tamaño de 35 ± 2 nm, que es el tamaño óptimo para su incorporación en plantas (Eichert *et al.*, 2008).

Para la síntesis química de las nanopartículas se utilizaron cloruros de todos los micronutrientes (ZnCl_2 , FeCl_2 , MnCl_2 y CuCl_2) como precursores. Asimismo, el hidróxido sódico (NaOH) fue utilizado como reductor. Todos ellos fueron suministrados por Panreac Química S.A. (España).

Además, las nanopartículas de óxido de zinc también se sintetizaron de forma verde utilizando como reductor un extracto rico en polifenoles. Este extracto fue obtenido a partir de pimientos verdes italianos (*Capsicum annuum*) que fueron comprados en el mercado local (Sevilla, España). Cabe destacar que se evaluó el uso de extractos obtenidos a partir del pimiento entero, así como de sus desechos.

El pimiento se escogió porque tiene un gran contenido en polifenoles con una alta actividad antioxidante (Marín *et al.*, 2004; Niamke *et al.*, 2021). Así, el pimiento (1,4 g/kg) presenta un mayor contenido en polifenoles que los espárragos (1,2 g/kg) y los garbanzos (0,10 g/kg), igualándose a la alubia negra y la berenjena (Almonacid, 2016). La producción mundial de pimiento fue de aproximadamente 42 millones de toneladas en 2019 (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, 2022) de los cuales el 12% se desperdician por mala calidad (deformaciones del pimiento o manchas en los mismos, causados por las altas temperaturas, tormentas o falta de nutrientes durante el cultivo) y parte no comestibles (semillas, pedúnculos, etc.) (INTA y Ministerio de Agricultura de Chile, 2018).

Estos descartes reducen el rendimiento económico de la producción y los costos ya que tienen que ser eliminados. Además, la composición orgánica del pimiento implica un impacto ambiental significativo, teniendo una gran huella de carbono (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2013). Por tanto, el uso de residuos de pimiento como fuente de polifenoles en la síntesis de nanopartículas podría ser una alternativa inteligente para añadirles valor, fomentando además su economía circular y reduciendo la contaminación ambiental. Así, la menor huella de carbono y precio que genera la síntesis verde se justifica cambiando el uso de reductores químicos por reductores naturales que son residuos, tal y como se refleja en diferentes trabajos previos (Debnath y Gupta, 2018; Feijoo *et al.*, 2018; Abomuti *et al.*, 2021).

2.2. Caracterización del subproducto de soja

2.2.1 Composición química

El contenido proteico del subproducto de soja se determinó mediante análisis elemental. Para ello, se utilizó un microanalizador CHNS-932 (Leco Corporation, EE.UU.) (Figura 2.3) que permite determinar el contenido en nitrógeno de la muestra. Este equipo combustiona la muestra a una temperatura de 950-1100 °C en una atmósfera de oxígeno puro para convertir el nitrógeno que contiene en un gas que analiza para cuantificarlo. El contenido de nitrógeno obtenido a través de esta técnica se multiplica por un factor de corrección (6,25) para obtener el porcentaje proteico de la muestra (Krul, 2019).



Figura 2.3. Microanalizador Leco CHNS 932.

El resto de la composición química (lípidos, humedad y cecinas) fue determinada siguiendo los métodos de análisis de la Asociación Oficial de Químicos Analistas (AOAC, 2005). De esta forma, los lípidos se cuantificaron a través del método Soxhlet. Este método consiste en disolver los lípidos presentes en la muestra a través de un disolvente, usando para ello el equipo mostrado en la Figura 2.4.

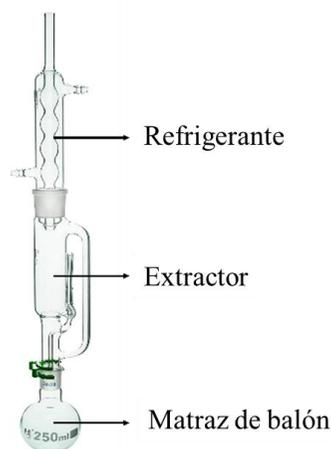


Figura 2.4. Equipo para extracción Soxhlet.

En este sentido, una cantidad conocida de muestra (5 g aproximadamente) se introdujo en un cartucho de papel de filtro y este, a su vez en el extractor. El matraz redondo se rellenó con hexano (solvente) que se calentó a 80 °C para producir su evaporación. Este vapor pasa por la parte externa del extractor hasta el condensador donde se condensa y precipita sobre la muestra extrayendo sus lípidos. Este proceso se realizó durante 4 h para asegurar la disolución de todos los lípidos en el disolvente. El contenido de lípidos de la muestra se calculó a través de la ecuación 1.

$$\% \text{ Lípidos} = \frac{\text{Peso inicial de la muestra} - \text{Peso final de la muestra seca}}{\text{Peso inicial de la muestra}} \cdot 100 \quad (1)$$

La humedad presente en la muestra se determinó tratando una cantidad conocida (3-5 g) de muestra en un horno convencional (Memmert, Alemania) (Figura 2.5) a 105 °C durante 24 h.



Figura 2.5. Horno convencional de la marca Memmert B216.1126.

El porcentaje de humedad de la muestra se calculó a través de la ecuación 2. Cabe destacar que la muestra se atemperó en un desecador hasta que alcanzó la temperatura ambiente antes de pesarla para evitar errores en la medida.

$$\% \text{ Humedad} = \frac{\text{Peso inicial de la muestra} - \text{Peso final de la muestra}}{\text{Peso inicial de la muestra}} \cdot 100 \quad (2)$$

Finalmente, las cenizas contenidas en la muestra se evaluaron calcinando 3-5 g de la muestra a 550 °C en un horno mufla (Hobersal HS-230, España) (Figura 2.6) durante 5 h.



Figura 2.6. Horno mufla Hobersal HS-230.

El contenido en cenizas de la muestra se calculó a través de la ecuación 3. Cabe destacar que la muestra se atemperó en un desecador hasta que alcanzó la temperatura ambiente antes de pesarla para evitar errores en la medida.

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{\text{Peso inicial de la muestra} - \text{Peso final de la muestra}}{\text{Peso inicial de la muestra}} \cdot 100 \quad (3)$$

2.2.2 Composición aminoacídica

La composición aminoacídica de la proteína de soja se determinó a través de un método descrito por Felix et al. (2017). Para ello, la muestra se disolvió en ácido clorhídrico 6 M y se incubó durante 24 h a una temperatura de 110 °C para producir su hidrólisis (esta etapa se realizó en un horno convencional). Tras esto, el pH de la muestra se ajustó a un valor de 7 usando para ello hidróxido sódico 6 M. La muestra se filtró mediante filtros de microfibra de vidrio Whatman n°1. Finalmente, la muestra se diluyó con agua bidestilada en una proporción 1:500. Esta muestra tratada se analizó mediante cromatografía líquida (HPLC) de fase inversa mediante derivatización de fluorescencia precolumna con o-ftaldialdehído. Para ello, se utilizó un cromatógrafo de líquidos LC-9A (Figura 2.7) con monitor de HPLC de fluorescencia RF-530 e inyector automático SIL-9A (Shimadzu Corporation, Japón), analizando la muestra por el método descrito por Lindroth y Mopper (1979). Para identificar los aminoácidos se utilizó un patrón estándar (Bio30Plus, China) donde los picos de los aminoácidos determinados se presentan de forma clara y conocida.



Figura 2.7. Cromatógrafo de líquidos LC-9A.

2.2.3 Grupos sulfhidrilos

Los sulfhidrilos libres se cuantificaron a través del protocolo desarrollado por Beveridge et al. (1974). Para ello, 100 mg del subproducto de soja se mezclaron en 10 mL de buffer de urea (compuesto por 86 mmol/L de Tris-HCl, 90 mmol/L de glicina, 4 mmol/L de EDTA y 8 mol/L de urea) durante 10 min a 500 rpm. Seguidamente, a 1 mL de muestra se le adiciona 40 μ L de reactivo de Ellman para formar NTB, el cual colorea la muestra en función de los grupos sulfhidrilos libres que contenga. Este color se analiza mediante espectrofotometría usando un espectrofotómetro Genesys-20 (Thermo Scientific, EE.UU.) (Figura 2.8) a una longitud de onda de 412 nm tras 1 h de la reacción.



Figura 2.8. Espectrofotómetro Genesys-20.

Los sulfhidrilos totales se determinaron a través del protocolo desarrollado por Thannhauser et al. (1984). Para ello, se prepara una muestra con 10 mg del subproducto de soja en 1 mL de buffer de tiocianato (consistente en 0,2 mol/L de Tris base, 0,1 mol/L de Na_2SO_3 , 10 mmol/L de EDTA y 3 mol/L de tiocianato de guanidinio a pH 9,5). Seguidamente, 70 μ L de esta disolución se mezclaron con 1 mL de 2-nitro-5-tiosulfobenzato (NTBS) recién preparado. Esta mezcla se incubaba en oscuridad durante 20 min, tras los cuales se mide su

absorbancia a 412 nm mediante espectrofotometría (Espectrofotómetro Genesys-20, Thermo Scientific, EE.UU).

Finalmente, los enlaces disulfuro (S-S) se calcularon como la mitad de la diferencia entre los grupos sulfhidrilos totales y libres.

2.2.4 *Electroforesis*

Esta técnica consiste en separar las fracciones proteicas de una muestra en función de su movilidad electroforética, es decir, a partir de la longitud de su cadena polipeptídica y masa molecular (Hames, 1998). En este estudio, los ensayos de electroforesis se llevaron a cabo siguiendo el método de Laemmli (1970) usando un equipo MiniProtein IV (Bio-Rad, EE.UU.) (Figura 2.9). De esta forma, el ensayo se realizó con la técnica de SDS-PAGE, utilizando geles de poliacrilamida (PAGE) en presencia de un tensioactivo aniónico dodecilsulfato sódico (SDS). Un patrón analítico “Protein Plus Protein Standard” (Bio-Rad, EE.UU.) se utilizó para evaluar el peso molecular de cada fracción proteica.



Figura 2.9. Equipo MiniProtein IV utilizado durante la electroforesis.

2.2.5 *Solubilidad proteica*

La solubilidad de la fracción proteica del subproducto de soja se determinó mediante el método de Markwell (1978) a diferentes valores de pH (2-12). Para ello, 1 g de muestra se dispersó en 40 mL de buffer a

diferentes valores de pH. Estas dispersiones se mantuvieron en agitación durante 30 min a 500 rpm para favorecer la solubilidad de las proteínas. Luego, las dispersiones se centrifugaron durante 20 min a 15000 rpm y 10 °C. Los sobrenadantes se analizaron para determinar la cantidad proteica disuelta a cada valor de pH. De esta forma, a 1 mL de muestra se le añadió 3 mL de reactivo C. Este reactivo se preparó mezclando el reactivo A (consistente en 30 g de Na₂CO₃, 4 g de NaOH, 1,6 g de tartrato sodio-potasio y 10 g SDS disueltos en 1 L de agua MiliQ) y B (consistente en 2 g de CuSO₄ disueltos en 50 mL de agua destilada) en una proporción 100:1. Esta mezcla se dejó incubar durante 20 min a temperatura ambiente. A continuación, se le añadieron 0,3 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu previamente diluido 1:1 con agua destilada. La mezcla se deja incubar nuevamente durante 45 min en oscuridad, donde se teñirá de azul debido a la formación de un complejo entre la proteína soluble y el reactivo de Folin-Ciocalteu. Este color azul se mide mediante un espectrofotómetro Genesys-20 (Thermo Scientific, EE.UU.) a una longitud de onda de 660 nm. Cabe mencionar que se realiza una curva de calibración con seroalbúmina bovina (SAB), proteína 100% soluble, para evaluar la cantidad de proteína solubilizada en cada caso.

2.2.6 Potencial ζ

El potencial ζ del subproducto de soja se evaluó en un analizador Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Reino Unido) (Figura 2.10) para obtener el punto isoeléctrico de la proteína de soja. El punto isoeléctrico se conoce como el valor de pH donde la fuerza eléctrica neta de la muestra es cero.



Figura 2.10. Analizador Zetasizer Nano ZS.

Para evaluar el potencial ζ se prepararon muestras de 1% en peso del subproducto de soja en disoluciones amortiguadoras a diferentes valores de pH. De esta forma, se calculó su movilidad electroforética usando la ecuación de Henry y la aproximación de Smoluchowski (Tan *et al.*, 2008). El punto isoeléctrico corresponde con el valor nulo de potencial ζ , ya que todas las cargas de las partículas son neutralizadas (Perez *et al.*, 2016).

2.2.7 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

La estructura del subproducto de soja y sus diferentes enlaces químicos fue determinada mediante un espectrómetro FTIR Nicolet iS50 (ThermoFisher Scientific, EE.UU.) (Figura 2.11) con un detector de reflectancia total atenuada (ATR). Esta técnica consiste en incidir con un haz a diferentes longitudes de onda a una muestra para medir la absorción de radiación infrarroja ocasionada por la vibración de los diferentes enlaces químicos que la componen. Cada enlace produce la absorción en un rango de longitud de onda diferente, pudiendo identificarse los enlaces presentes en la muestra. En este caso, el espectro infrarrojo se obtuvo como una media de 100 escáneres a una longitud de onda entre $4000\text{-}650\text{ cm}^{-1}$ con un paso de 4 cm^{-1} .



Figura 2.11. Espectrómetro FTIR Nicolet iS50.

2.2.8 Comportamiento térmico

El comportamiento térmico del subproducto de soja se evaluó a través de dos técnicas diferentes: calorimetría diferencial de barrido y análisis termogravimétrico.

La calorimetría diferencial de barrido se realizó en un equipo Q100 (TA Instruments, EE.UU.) (Figura 2.12) usando crisoles de aluminio con tapa hermética. Para llevar a cabo esta medida se introdujeron 7 mg de muestra en un crisol de aluminio, sellándolo herméticamente. Este crisol se introdujo en el equipo donde se aplicó una rampa de temperatura entre -20 y 150 °C a una velocidad de calentamiento de 5 °C/min. Este calentamiento se realizó mediante un flujo de nitrógeno de 50 mL/min. El equipo es capaz de evaluar las transiciones térmicas de la muestra, mostrando el perfil de flujo de calor en la muestra durante el calentamiento.



Figura 2.12. Calorímetro Q100.

El análisis termogravimétrico se realizó en un equipo Q600 (TA Instruments, EE.UU.) (Figura 2.13). Para esto, una cantidad conocida de muestra (3-8 mg) se introdujo en el equipo donde se aplicó una rampa de temperatura entre 25 y 600 °C en una atmósfera de nitrógeno a una velocidad de 10 °C/min. Este ensayo usa la variación de peso de la muestra con la temperatura para evaluar la estabilidad térmica de la misma.



Figura 2.13. Analizador Q600.

2.3 Síntesis de nanopartículas

Las nanopartículas se sintetizaron mediante precipitación coloidal (Chen *et al.*, 2008). Este método se escogió por su facilidad de procesado, así como para controlar la formación de las nanopartículas (Talam *et al.*, 2012). Sus etapas se pueden esquematizar fácilmente como se observa en la Figura 2.14.

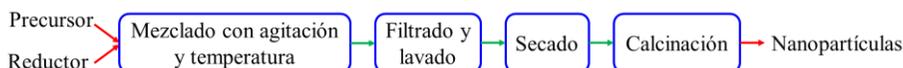


Figura 2.14. Secuencia de pasos seguidos en el método coloidal para la obtención de nanopartículas.

De este modo, se realizaron en primer lugar las disoluciones del agente precursor (cloruros de los diferentes micronutrientes) a diferentes concentraciones (0,2, 0,5 y 1,0 M) y el agente reductor (NaOH: 0,1, 0,2, 0,25, 0,4, 0,5, 1,0 y 2,0 M) de forma independiente. Una vez obtenidas todas las disoluciones, se mezclaron 20 mL de disolución de agente precursor con 20 mL de disolución de agente reductor, realizando las combinaciones mostradas en la Tabla 2.1. Cabe mencionar que la disolución de agente precursor se debe verter lentamente y con agitación sobre la disolución de agente reductor para conseguir que el producto no se aglomere, consiguiendo tamaños de partículas menores (Talam *et al.*, 2012).

Tabla 2.1. Combinaciones realizadas en la síntesis de nanopartículas

Relación precursor:reductor	Concentración de precursor (M)	Concentración de reductor (M)
1:1	0,2	0,2
	0,5	0,5
	1,0	1,0
2:1	0,2	0,1
	0,5	0,25
	1,0	0,5
1:2	0,2	0,4
	0,5	1,0
	1,0	2,0

Una vez realizada la mezcla, esta se mantiene durante 2 h en agitación magnética a una temperatura de 50 °C. De esta forma, se obtuvo un precipitado blanco que se filtró mediante gravedad. En este precipitado pueden aparecer productos intermedios indeseados que no han llegado a transformarse completamente. Estos productos no deseados son la razón por la mezcla se debe mantener durante 2 h para alcanzar el equilibrio. Otra forma de contrarrestarlos es utilizar disoluciones de concentraciones bajas (Sharma *et al.*, 2009). Estos productos hacen necesario un lavado de la muestra tras su filtrado. Este se realiza en dos ciclos con 20 mL de agua destilada.

Seguidamente, el precipitado una vez filtrado se secó a 100 °C en una estufa (Mettler, Alemania, Figura 2.5) durante 8 h y, después, se calcinó a 500 °C durante 4 h en un horno mufla (Hobersal HS-230, España, Figura 2.6). De esta forma, se obtienen las nanopartículas.

En el caso de la síntesis verde de nanopartículas, el protocolo seguido fue similar al químico con la única diferencia del agente reductor utilizado. En este caso, el agente reductor fue un extracto de pimientos, ya sea pimiento entero, pulpa o descartes, ricos en polifenoles que fue extraído como se explica a continuación.

2.3.1 Extracción de polifenoles

En primer lugar, los pimientos se molieron con un robot de cocina Ironmix (Cecotec, España). Esta molienda mejora la posterior interacción de los componentes del pimiento con el disolvente durante la extracción. La extracción se realizó mediante agitación magnética (1000 rpm). Así, el pimiento molido (<1 mm) se mezcló y agitó con un disolvente (metanol, etanol o agua destilada) por un tiempo determinado (15, 30 o 45 min) a una temperatura seleccionada (20, 35 o 50 °C). También se evaluaron diferentes proporciones de pimiento:disolvente (1/1, 2/1, 1/2, 4/1, 1/4). Finalmente, el extracto crudo se centrifugó en una centrífuga Sigma 3–18K (Alemania) a 15.000 rpm y 10 °C durante 10 min para eliminar las impurezas insolubles y obtener el extracto refinado rico en polifenoles (sobrenadantes). Se analizaron por separado el pimiento entero y las partes de pulpa y de desecho del pimiento. Para el sistema entero, se utilizó todo el pimiento tal como se compró. En el caso de la pulpa se utilizó la parte carnosa del pimiento y para el desecho se tomó el pedúnculo, tallo y partes descartables por manchas marrones (sobremaduración).

Se utilizó un diseño Box-Behnken (BBD) para optimizar las condiciones de extracción. Brevemente, las variables independientes (X) se evaluaron por pares (temperatura-tiempo y cantidad de pimiento-volumen de disolvente), según su afinidad, para determinar su influencia individual y conjunta sobre las variables dependientes (Y). El contenido total de polifenoles y la actividad antioxidante actúan como respuestas en el experimento BBD. Los modelos fueron elegidos utilizando el software Design-Expert (versión 11, Science Plus, Países Bajos). Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) donde se tuvo en cuenta el

valor F (factor que indica la precisión del test) y un nivel de confianza del 95% (valor $p < 0,05$) para analizar los datos y los coeficientes. Así, el modelo se determinó solo con los parámetros significativos que generaron una falta de ajuste sin significación ($p > 0,05$) y un valor de F superior a 4.

2.4 Caracterización de nanopartículas y polifenoles

2.4.1 Contenido total de polifenoles (TPC)

El contenido de polifenoles totales se determinó por el método de Folin-Ciocalteu (Noreen *et al.*, 2017). En primer lugar, se mezclaron 50 μL de cada extracto con 2 mL de agua destilada y 250 μL del reactivo de Folin-Ciocalteu 1N durante 8 min. Posteriormente, se agregaron 750 μL de carbonato de sodio (Na_2CO_3) al 20% en peso y 950 μL de agua destilada. La absorbancia de las soluciones obtenidas se midió a 765 nm en un espectrofotómetro (Genesys-20, Thermo Scientific, EE.UU., Figura 2.8) después de 30 min de maduración en oscuridad. El ácido gálico se utilizó como referencia. Los resultados se expresaron como g equivalentes de ácido gálico (GAE) por mL de extracto.

2.4.2 Actividad antioxidante

La actividad antioxidante se evaluó mediante el método de fosfomolibdato (PPM) (Abdullah *et al.*, 2020). En este sentido, un volumen de 2 mL de extracto se mezcló con 2 mL de reactivo PPM (Na_2HPO_4 28 mM, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ mM y H_2SO_4 0,6 mM) durante 90 min en un baño de agua a 95 °C. La absorbancia de cada muestra se midió en un espectrofotómetro (Genesys-20, Thermo Scientific, EE.UU., Figura 2.8) a 699 nm, usando ácido gálico como referencia. Los resultados se expresaron como g equivalentes de ácido gálico (GAE) por mL de extracto.

2.4.3 Difracción de rayos X (DRX)

La técnica de difracción de rayos X (DRX) tiene como principio la Ley de Bragg, que dice que la incidencia de un haz de rayos X sobre un

crystal produce una difracción del mismo, pudiendo predecir los ángulos a los que se difractan los haces sobre cada uno de los cristales (Warren, 1990).

De esta forma, esta técnica consiste en irradiar una muestra compuesta por diferentes cristales con rayos X monocromáticos. La muestra difracta los haces proyectados, desviándolos un ángulo 2θ (siguiendo la Ley de Bragg). Así, se registran cuántos haces se difractan a cada ángulo, obteniendo un diagrama de difracción. Este diagrama da diferente información acerca de las nanopartículas. En primer lugar, la posición de los picos permite determinar la composición de la muestra, gracias a la ayuda de bases de datos. Una vez obtenida la composición, la intensidad de los picos permite el análisis cuantitativo de los diferentes componentes. Además, con el fondo presente en el diagrama se obtiene una relación entre la cantidad de material cristalino y amorfo. Por último, la forma y anchura de los picos permite obtener el tamaño de las partículas.

En este caso, los ensayos de DRX se realizaron en un difractómetro de polvo D81 90 (D8 Advance A23, Bruker, EE.UU.) como el observado en la Figura 2.15. Para ello, parte de cada muestra de nanopartículas obtenidas se colocó sobre un portamuestras y se introdujo en el equipo. El equipo irradió rayos X a 40 kV y 30 mA, utilizando un paso de ángulo de $0,015^\circ$ con un tiempo por paso de 0,1 s. El diagrama se obtuvo entre un rango de ángulos entre 3 y 70° , girando la muestra a 30 rpm. Por último, los diagramas obtenidos se analizaron mediante el programa DIFFRAC.EVA, el cual tiene una base de datos para la correcta identificación y evaluación de los picos.

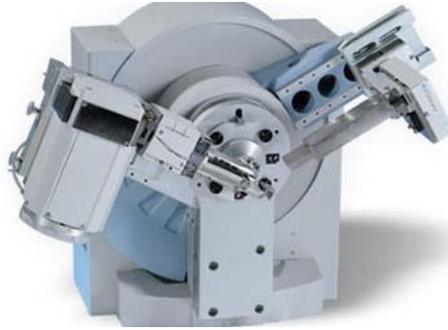


Figura 2.15. Difractómetro de polvo D81 90.

2.4.4 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

La nanoestructura y la distribución de tamaños de las nanopartículas obtenidas se midieron mediante TEM utilizando un microscopio Talos S200 (FEI, EE.UU.) como el mostrado en la Figura 2.16. Para ello, las muestras se colocaron sobre una rejilla de cobre recubierta de carbono y se introdujeron en el microscopio. En este equipo, la muestra se irradia con un haz de electrones con un voltaje de aceleración de 200 kV y se recogen los electrones secundarios desprendidos para formar una imagen de la nanoestructura de las nanopartículas. Se utilizó el programa Image-J de análisis de imagen para obtener el tamaño medio de partícula. Para ello, se realizaron 100 medidas de las partículas obtenidas en las micrografías, obteniendo su valor medio.



Figura 2.16. Microscopio electrónico de transmisión Talos S200.

2.4.5 *Análisis dispersivo de energía de rayos X (EDAX)*

La composición química de las nanopartículas se determinó conjuntamente con las medidas de TEM. Las muestras se analizaron usando el mismo microscopio Talos S200 (FEI, EE.UU.) (Figura 2.16) que tiene acoplado un complemento para realizar este tipo de análisis. Los análisis se llevaron a cabo por duplicado en diferentes nanopartículas.

Este ensayo consiste en irradiar la muestra objeto de estudio con rayos X. El haz de electrones llega a la muestra teniendo que atravesarla, en este momento, los electrones acelerados interactúan con los átomos de los diferentes elementos que tenga la muestra. Mientras mayor sea el radio de estos átomos, más energía pierde el haz de electrones. Debido a que el radio atómico es característico de cada elemento, se puede obtener el porcentaje en peso que se tiene de cada elemento en la región estudiada, a partir del cálculo de la pérdida de energía del haz de electrones en cada punto (Warren, 1990).

2.4.6 *Microscopía electrónica de barrido (SEM)*

La nanoestructura y distribución de tamaño de las nanopartículas, así como su aglomeración, se evaluaron mediante microscopía electrónica de barrido. Para ello, las nanopartículas fueron primero recubiertas con una fina capa paladio/oro (< 2 nm) y se montaron en una pieza de bronce para mejorar su conductividad eléctrica y, así, mejorar la calidad de las imágenes obtenidas. Inmediatamente después, la muestra se observó mediante un microscopio electrónico de barrido Zeiss EVO (EE.UU.) como el mostrado en la Figura 2.17. Este equipo incide a la muestra con un haz de electrones con un voltaje de aceleración de 10 kV y detecta los

electrones secundarios que la muestra desprende para generar una imagen de la misma. Por último, se utilizó el programa Image-J para obtener el tamaño medio de partícula. Para ello, se realizaron 100 medidas de las partículas obtenidas en las micrografías, obteniendo su valor medio.



Figura 2.17. Microscopio electrónico de barrido Zeiss EVO.

2.4.7 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

La estructura química e interacciones de las nanopartículas sintetizadas fueron determinadas mediante un espectrómetro FTIR Nicolet iS50 (ThermoFisher Scientific, EE.UU.) (Figura 2.11) con un detector de reflectancia total atenuada (ATR). En este caso, el espectro infrarrojo se obtuvo como una media de 100 escáneres a una longitud de onda entre $4000\text{-}650\text{ cm}^{-1}$ con un paso de 4 cm^{-1} .

2.5 Procesado de las matrices bioplásticas

El procesado de las matrices bioplásticas se llevó a cabo mediante dos métodos termomecánicos diferentes: extrusión y moldeo por inyección (Figura 2.18). Estas dos técnicas se seleccionaron debido a su alto uso en la elaboración de plásticos convencionales (Vlachopoulos y Strutt, 2003), lo que podría facilitar el escalado de estas matrices bioplásticas a nivel industrial. En ambos casos se utilizó como materias primas el subproducto de soja y la glicerina, mezclándolos en una relación 1:1. Esta relación fue seleccionada como la mejor relación para obtener una masa fácilmente moldeable (Fernández-Espada *et al.*, 2016).

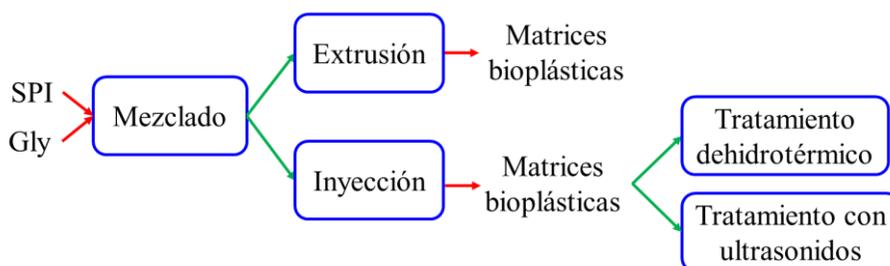


Figura 2.18. Esquema seguido durante el procesado de las matrices bioplásticas

2.5.1 Extrusión

En este caso, las materias primas fueron previamente homogenizadas en un mezclador Kenwood (Reino Unido) durante 10 min a 50 rpm en lotes de 100 g de mezcla. Esta mezcla fue procesada posteriormente en una extrusora de tornillos paralelos Process 11 (ThermoFisher Scientific, EE.UU.) (Figura 2.19A) que tiene un diámetro de tornillo de 11 mm y una matriz cilíndrica (4 mm de diámetro). Para ello, la velocidad de alimentación se mantuvo constante en 2,8 g/min. Tanto la velocidad del tornillo, como el perfil de temperatura fueron seleccionados como los parámetros a evaluar en los diferentes capítulos para obtener las matrices

bioplásticas cilíndricas de 4 mm de diámetro. Este equipo cuenta con 8 zonas de temperatura diferentes (Figura 2.19B), aunque en este estudio solo se utilizaron las 5 últimas. Así, la mezcla se sometió a un perfil térmico ascendente hasta llegar a la boquilla, para formar gradualmente las matrices bioplásticas. Las matrices bioplásticas se obtuvieron usando diferentes temperaturas de boquilla y velocidades de tornillo que se definirán en cada capítulo. Sin embargo, cabe mencionar que a 80 °C no se podrían obtener bioplásticos a una velocidad de tornillo mayor a 50 rpm.

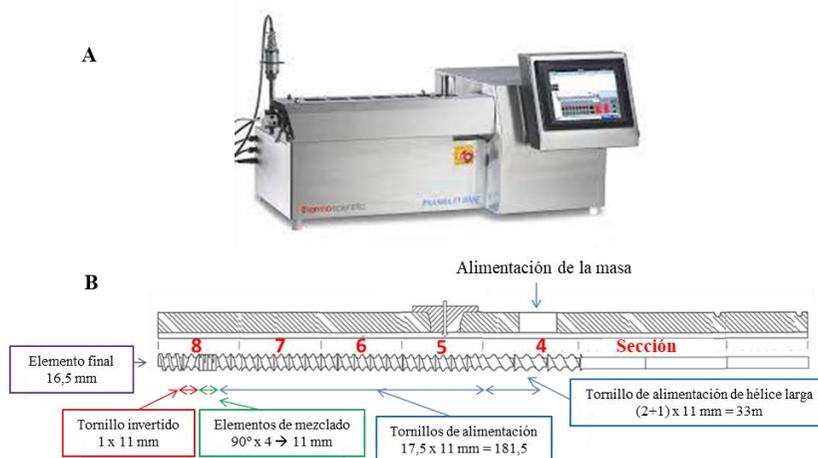


Figura 2.19. A: Extrusora Process 11. B: Configuración de la extrusora4

2.5.2 Moldeo por inyección

En este proceso también hay que distinguir dos subetapas consistentes en un mezclado previo de las materias primas seguido de su procesamiento mediante moldeo por inyección. El proceso de mezclado se llevó a cabo en un mezclador Haake PolyLab QC (Thermo Scientific, Alemania) como el que se observa en la Figura 2.20A. Este mezclador está provisto de dos rodillos de tipo delta (Figura 2.20B) que giran en sentido inverso dentro de una cámara doblemente cilíndrica. La cámara de mezclado no

se llena más de un 90% de su capacidad para asegurar el buen funcionamiento del equipo, introduciendo las sustancias sólidas primero y luego las líquidas para conseguir la homogenización de la mezcla.

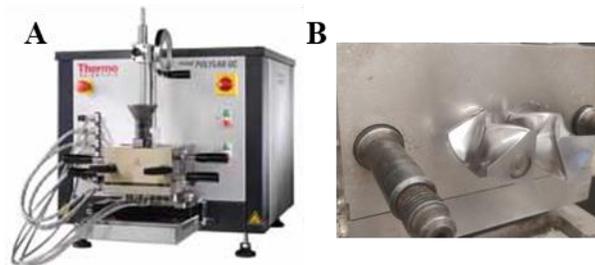


Figura 2.20. A: Mezcladora Haake PolyLab QC. B: Rodillos tipo delta.

El mezclado se realizó durante 10 min a una velocidad de 50 rpm en lotes de 60 g de mezcla, siendo estas las condiciones óptimas para esta etapa de mezclado (Fernández-Espada *et al.*, 2016). Se utilizaron condiciones próximas a las adiabáticas (evitando las transferencias de energía durante el mezclado). Durante el mezclado, se recogieron datos tanto del par de torsión (M), que se produce debido a la resistencia que ofrece la muestra al movimiento de mezclado; como de la temperatura del mezclador (T), observando que en estas condiciones la temperatura de las mezclas va subiendo moderadamente sin alcanzar los 35 °C, mientras que el par de torsión se mantiene prácticamente constante, presentando solamente un leve aumento. Este comportamiento asegura que la mezcla no se estructura en la mezcladora.

La inyectora es el equipo que permite la formación de las matrices bioplásticas a través del moldeo por inyección. La máquina inyectora utilizada para este estudio es un equipo a escala de laboratorio, que difiere en algunas partes con la máquina usada a escala industrial. Se trata de una inyectora MiniJet Piston Molding System II (ThermoHaake, Alemania) como se muestra en la Figura 2.21A.

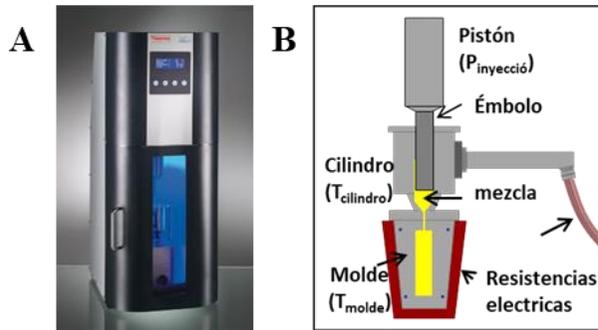


Figura 2.21. A: Inyectora MiniJet Piston Molding System II. B: Configuración de la inyectora.

En este equipo, la mezcla es introducida en un cilindro termostático (a T_{cilindro}) y empujada a presión ($P_{\text{inyección}}$) por un émbolo accionado por un pistón a través de una boquilla conectada al molde previamente calentado (T_{molde}) (Figura 2.21B). La temperatura tanto del cilindro como del molde se controlan mediante resistencias eléctricas. Se obtuvieron matrices bioplásticas de geometría rectangular ($55 \times 10 \times 1 \text{ mm}^3$) y pajarita (tipo IV) ambas definida en la norma ISO 527-2:2012 (AENOR, 2012). Después la mezcla inyectada en el molde se somete durante un tiempo a una presión de compactación determinada, que suele ser inferior a la presión de inyección, hasta que se produce el curado formándose así la matriz bioplástica. En este sentido, se tendrán que definir las temperaturas de cilindro y molde utilizadas, así como las presiones y tiempos de inyección y post-inyección. Estos parámetros serán concretados en cada capítulo.

2.5.3 Reforzamiento físico de las matrices bioplásticas

Para mejorar las propiedades mecánicas de las matrices bioplásticas se llevaron a cabo dos reforzamientos físicos diferentes tras su procesado.

2.5.3.1 Tratamiento dehidrotérmico (DHT)

El primer reforzamiento consistió en la adición de un tratamiento térmico. Así, las matrices bioplásticas fueron sometidas a un paso térmico a 50 °C en un horno convencional (Memmert, Alemania) (Figura 2.5). La aplicación de este paso, denominado tratamiento dehidrotérmico (DHT), durante un tiempo prolongado (12-14 h) puede favorecer la formación de interacciones en la misma (Álvarez-Castillo *et al.*, 2018). Para estudiar el efecto de este paso con el tiempo de tratamiento en las propiedades de la matriz bioplástica, se evaluaron diferentes tiempos (4 y 24 h).

2.5.3.2 Tratamiento con ultrasonido (US)

El segundo reforzamiento consistió en un tratamiento con ultrasonido (US). El tratamiento con US produce cavitación localizada, lo que facilita la desintegración de las partículas (Karki, 2009), permitiendo el reordenamiento de la estructura y, en consecuencia, mejorando las propiedades mecánicas de las matrices bioplásticas. Para llevar a cabo este experimento, las matrices bioplásticas, después de la etapa de moldeo por inyección, se insertaron en bolsas de vacío. Luego, estas bolsas con las matrices bioplásticas se sumergieron en un baño de ultrasonidos (JP Selecta) (Figura 2.22) a 50 kHz con 100 W (potencia) y 0,4 A (intensidad), utilizando agua como medio. En este caso también se evaluó el tiempo de tratamiento a los 5 y 45 min.



Figura 2.22. Baño de ultrasonidos JP Selecta.

Los tiempos seleccionados en ambos tratamientos (DHT y US) se eligieron para lograr un cambio máximo en las propiedades de la matriz bioplástica (tiempos largos) y un cambio menos radical (tiempos cortos) para evaluar si todas las propiedades de las matrices bioplásticas cambian uniformemente con la aplicación del tratamiento.

2.6 Caracterización de las matrices bioplásticas

Todas las matrices bioplásticas procesadas fueron caracterizadas para evaluar las diferencias en sus propiedades. Antes de analizarlas, todas ellas fueron sujetas a una etapa de estabilización a 25 °C y 53% de humedad relativa por al menos 24 h para alcanzar el equilibrio de los sistemas. Cabe destacar que las matrices bioplásticas obtenidas mediante extrusión fueron troqueladas antes de su estudio mecánico para normalizarlas.

2.6.1 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Los espectros infrarrojos de las diferentes matrices bioplásticas se obtuvieron con la finalidad de evaluar los diferentes enlaces químicos presenten en las mismas. Para ello, se utilizó un espectrómetro FTIR Nicolet iS50 (ThermoFisher Scientific, EE.UU.) con detector de ATR (Figura 2.11). Las medidas se obtuvieron en un rango de longitud de onda comprendido entre los 4000 y 650 cm^{-1} con un paso de 4 cm^{-1} y realizando 100 escáneres de cada muestra. La agregación de los bioplásticos se calculó a partir de la intensidad de los picos de las amidas I y II (1600 y 1500 cm^{-1} , respectivamente), utilizando como referencia los picos del subproducto de soja usado como materia prima (al que se le asignó un 0% de agregación). La agregación se refiere al enlace entre dos grupos tioles para formar un grupo disulfuro. De esta forma, se estabiliza la estructura secundaria de la matriz bioplástica (Hammann y Schmid, 2014).

2.6.2 Grupos sulfhidrilos

Las cadenas de proteínas forman enlaces disulfuro (S-S) para formar los bioplásticos (Hamman y Schmid, 2014). De esta manera, medir los enlaces S-S es una forma indirecta de predecir el grado de entrecruzamiento de las matrices bioplásticas. Para medirlas, una porción de cada matriz bioplástica (6-7 mg) se introdujo en una disolución desnaturante (consistente en 0,086 mol/L de Tris base, 0,045 mmol/L de glicina, 10 g/L de SDS y 10 % p/v de 2-mercaptoetanol). Posteriormente, se determinaron los grupos sulfhidrilos libres y totales encontrados en las disoluciones, siguiendo los protocolos propuestos por Beveridge et al. (1974) y Thannhauser et al. (1984), respectivamente. Los enlaces S-S se obtuvieron indirectamente como la mitad de la diferencia entre los grupos sulfhidrilos totales y libres.

2.6.3 Grado de entrecruzamiento

También se determinó el grado de entrecruzamiento de las diferentes matrices bioplásticas para evaluar la modificación provocada por cada método de procesado. Para ello, se determinó la extractabilidad de proteínas de cada sistema (Zárate-Ramírez *et al.*, 2014). La concentración de proteínas extraídas corresponde con aquellas no entrecruzadas en la formación del bioplástico o entrecruzadas físicamente, por lo que puede usarse para evaluar el grado de entrecruzamiento de los sistemas. Para evaluarlo, se preparó una disolución desnaturante fresca consistente en una mezcla de 0,086 mol/L de tris base, 0,045 mmol/L de glicina, 2 mmol/L EDTA, 10 g/L de dodecilsulfato de sodio (SDS) a pH 6. Una porción de cada matriz bioplástica (6-7 mg) se sumergió en 10 mL de esta disolución desnaturante durante 2 h en agitación magnética a 500 rpm. Tras estas

2 h la matriz bioplástica se retiró y se procedió a evaluar la proteína disuelta en la disolución, la cual corresponde con la proteína no entrecruzada químicamente. Esta fracción de proteínas se determina a través del método de Lowry modificado (Markwell *et al.*, 1978).

Cabe recalcar que todo este procedimiento se realiza también con el subproducto de soja (control) y con la disolución desnaturizante sin ninguna matriz bioplástica (blanco). El grado de entrecruzamiento de cada matriz bioplástica, corresponde con el porcentaje de proteína que no se ha extraído tras la desnaturalización en la disolución. De esta forma, se estima en relación con el control (0% entrecruzado) y el blanco (100% entrecruzado) a través de una recta de regresión (ecuación 4).

$$\text{Grado de entrecruzamiento (\%)} = \frac{100(\text{Absorbancia muestra} - \text{Absorbancia control})}{\text{Absorbancia blanco} - \text{Absorbancia control}} \quad (4)$$

2.6.4 Propiedades mecánicas

Ensayos dinámicos de flexión: estos ensayos se realizaron con la finalidad de evaluar la estabilidad de las matrices bioplásticas a lo largo del tiempo. Para ello, se utilizó un analizador dinámico-mecánico RSA3 (TA Instruments, EE. UU.), como el mostrado en la Figura 2.23A, con una geometría dual cantilever Figura 2.23B. Esta geometría permite realizar análisis dinamo-mecánicos a materiales que no son rígidos. De esta forma, la matriz bioplástica es sujeta por los extremos aplicándole esfuerzos de flexión dinámica en el centro de la misma. En primer lugar, se realizaron barridos de deformación entre 0,002 y 2% a una frecuencia constante de 1 Hz y 22 °C para obtener la deformación crítica (ϵ_{crit}) de las diferentes matrices bioplásticas. La deformación crítica es la última deformación en el intervalo viscoelástico lineal. Este intervalo corresponde a aquel rango de deformación que, al aplicarse, no

ocasionan cambios irreversibles en el sistema. Luego, se realizaron barridos de frecuencia entre 0,02 y 20 Hz a una deformación constante de 0,01% (por debajo de la deformación crítica) y 22 °C. En estos ensayos se evalúa el tiempo de recuperación de las matrices bioplásticas tras aplicarle un esfuerzo (o deformación) constante. De esta forma, se estudiaron los módulos elástico (E') y viscoso (E'') en el intervalo de frecuencia. Además, se evaluaron el módulo elástico y la tangente de pérdidas ($\tan \delta = E''/E'$) a 1 Hz (E'_1 y $\tan \delta_1$, respectivamente) para facilitar la comparación entre los sistemas.



Figura 2.23. A: Analizador dinámico-mecánico RSA3. B: Geometría dual cantilever.

Ensayos estáticos de tracción hasta la rotura: estos ensayos se realizaron para evaluar la resistencia a la rotura de las diferentes matrices bioplásticas siguiendo la norma ISO 570-2:2021 (AENOR, 2012). Para ello, se utilizó una máquina universal de ensayo MTS Insight 10 kN (Eden Prairie, EE.UU.) (Figura 2.24). De esta forma, los diferentes sistemas se sometieron a una fuerza axial creciente con una tasa de extensión de 5 mm/min. Además de los perfiles de deformación-tensión, en estas pruebas también se evaluaron la tensión máxima (σ_{\max}), el módulo de Young (E) y la deformación a la rotura (ϵ_{\max}).



Figura 2.24. Máquina universal de ensayo MTS Insight 10 kN.

2.6.5 Carga de micronutriente

La cantidad de sal que contiene el micronutriente retenida en la matriz bioplástica tras someterse durante 1 h a una inmersión en 300 mL de agua destilada se midió con la finalidad de evaluar la liberación controlada de micronutriente. Para ello, la matriz bioplástica fue analizada mediante espectrometría de emisión atómica plasmática acoplada inductivamente (ICP-AES). En este sentido, las matrices fueron sometidas a un pretratamiento de digestión ácida con ácido nítrico y peróxido de hidrógeno (relación 7:1) con la finalidad de obtener una muestra líquida que se pueda medir mediante ICP-AES. Una vez pretratadas, las muestras pasaron a un espectrómetro óptico de emisión SpectroBlue-TI (Spectro, Alemania) como el mostrado en la Figura 2.25. En este equipo las muestras se aspiran mediante un nebulizador donde la disolución se dispersa en pequeñas gotas convirtiéndose en un aerosol. Una corriente de argón transporta este aerosol hasta una antorcha de plasma con una geometría axial-radial y una energía de 1350 W, donde se somete a una temperatura cercana a los 6000 K, disociándose en átomos libres e iones que emiten a diferentes longitudes de onda (características de cada elemento) que son medidas y registradas por el

equipo, pudiendo así determinar cuantitativamente los elementos que componen la muestra.



Figura 2.25. Espectrómetro óptico de emisión SpectroBlue TI.

2.6.6 Capacidad de absorción de agua

La capacidad de absorción de agua se estimó de acuerdo al protocolo marcado por la norma ASTM D570 ("ASTM D570-98: Standard Test Method for Water Absorption Of Plastics", 2005). De esta forma, las matrices bioplásticas se introdujeron en un recipiente cerrado con 300 mL de agua destilada durante 24 h. La matriz bioplástica no debe tocar las paredes del recipiente durante el ensayo para evitar que capte menos agua por la zona de contacto con la pared. La capacidad de absorción de agua (CAA) se calculó mediante la ecuación 5.

$$CAA (\%) = \frac{m_2 - m_3}{m_3} \cdot 100 \quad (5)$$

Donde m_2 es el peso de la matriz bioplástica después de la inversión en agua durante 24 h y m_3 es el peso del sistema seco tras pasar por un tratamiento térmico a 105 °C durante 2 h.

Análogamente, se obtuvo la pérdida de material soluble (PMS) durante el ensayo a través de la ecuación 6.

$$PMS (\%) = \frac{m_1 - m_3}{m_1} \cdot 100 \quad (6)$$

Donde m_1 es el peso de la matriz bioplástica antes del ensayo.

En la Figura 2.26 se puede observar un esquema del ensayo donde se especifican cuáles son cada uno de los pesos utilizados para los cálculos.



Figura 2.26. Esquema del ensayo de absorción de agua.

2.6.7 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La microestructura de las matrices bioplásticas seleccionadas se determinó según el método descrito por Orawan et al. (Orawan *et al.*, 2006). Previamente, las muestras se recubrieron con una fina capa de paladio/oro (Pd/Au) y se montaron en una pieza de bronce para mejorar su conductividad eléctrica y, así, mejorar la calidad de las imágenes obtenidas. Inmediatamente después, las muestras se observaron usando un microscopio electrónico de barrido Zeiss EVO (Alemania) como el mostrado en la Figura 2.17. Este equipo incide a la muestra con un haz de electrones con un voltaje de aceleración de 10 kV y detecta los electrones secundarios que la muestra desprende para generar una imagen de la misma. Así, tiene una resolución superior a la microscopía óptica. En este trabajo se utilizaron magnificaciones entre 50 y 200.

2.7 Procesado de matrices

Las matrices bioplásticas tienen una baja retención del micronutriente debido a que la glicerina, que se libera rápidamente, arrastra a la sal fuera del sistema (Jiménez-Rosado *et al.*, 2018). De esta forma, es necesario eliminar la glicerina del sistema. Para ello, se han estudiado diferentes métodos para la incorporación del micronutriente y liberación de la glicerina que aseguren la máxima retención del micronutriente en la matriz final para su posterior dosificación. Los métodos estudiados se resumen en la Figura 2.27 y se explican a continuación.

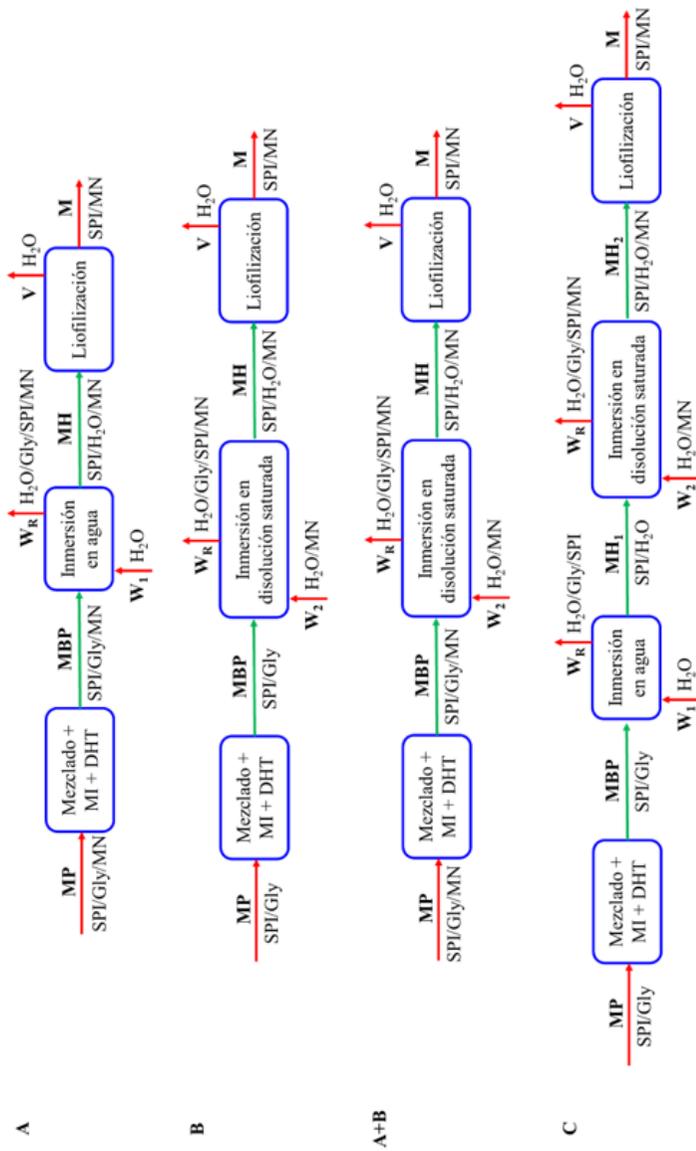


Figura 2.27. Diagrama de flujo de los diferentes protocolos utilizados en la elaboración de matrices dosificadoras. MP: Materia prima. MI: Moldeado por inyección. DHT: Tratamiento dehidrotérmico. MBP: Matriz bioplástica. W₁, W₂: medio incorporado. W_R: medio desechado. MH: matriz hinchada. V: agua sublimada. M: matriz. MN: sal que incorpora el micronutriente.

2.7.1 Método A: Incorporación del micronutriente en la etapa de mezclado

En este procedimiento, es necesario obtener, en primer lugar, las matrices bioplásticas, utilizando el mismo protocolo seleccionado anteriormente. En este sentido, SPI y Gly (relación 1:1) se mezclaron con un 10% en peso de sal que contiene el micronutriente durante 10 min a 50 rpm en el mezclador rotatorio PolyLab QC (ThermoHaake, Alemania) (Figura 2.20) en condiciones adiabáticas. Después de esta etapa de homogenización, las mezclas se sometieron a un moldeo por inyección en una inyectora MiniJet Piston Injection Molding System II (ThermoHaake, Alemania) (Figura 2.21). En esta etapa, la mezcla se introdujo en un cilindro a 40 °C y se sometió a una presión de inyección de 600 bar durante 20 s, pasando a un molde a 90 °C. Posteriormente, la muestra permaneció en el molde durante 300 s a una presión de postinyección de 600 bar, obteniendo, así, matrices bioplásticas. Una explicación más detallada de este proceso se explica en la sección 2.5.2.

Estas matrices bioplásticas fueron sometidas a un proceso de reforzamiento físico conocido como tratamiento dehidrotérmico. De esta forma, los sistemas se sometieron a una temperatura de 50 °C en un horno convencional (Memmert, Alemania) (Figura 2.5) durante 24 h. Esta etapa fortalece las redes biopoliméricas ayudando a mantener la estructura del sistema en las siguientes etapas.

El siguiente paso consistió en la eliminación de la glicerina. Para ello, los sistemas se sumergieron en 300 mL de agua destilada en un recipiente cerrado durante 24 h. De esta forma, toda la glicerina se libera en el agua debido a su carácter hidrofílico. Finalmente, las matrices húmedas tras la inmersión se sometieron a una etapa de congelación a baja temperatura

(-40 °C) durante 2 h para, posteriormente, colocarlas en un equipo de liofilización (LyoQuest, Testlar, España) (Figura 2.28) a -80 °C y vacío durante 24 h. Esta etapa final tiene el objetivo de eliminar toda el agua captada durante la inmersión mediante sublimación de la misma. De esta forma, se obtiene la matriz sin perder su integridad física. Cabe mencionar que esta última etapa se desarrolló también mediante tratamiento térmico a 50 °C (resultados no mostrados). Sin embargo, la no presencia de glicerina en los sistemas hizo que esta perdiera su integridad debido a la temperatura.



Figura 2.28. Equipo de liofilización LyoQuest.

2.7.2 Método B: Incorporación del micronutriente por inmersión en una disolución salina

En este caso, solo se mezclaron SPI y Gly (relación 1:1) para obtener las mezclas. El procedimiento para obtener las matrices bioplásticas es similar al utilizado en el método A hasta el tratamiento dehidrotérmico, pero sin la adición de la sal que contiene el micronutriente. En este caso, la inmersión se realizó en una disolución saturada de la sal que contiene el micronutriente durante 2 horas donde la matriz eliminó la glicerina debido a su afinidad con el agua y captó el micronutriente a la vez. Debe mencionarse que, en este caso, un tiempo de inmersión más largo no

produjo ninguna incorporación significativa de micronutriente adicional. Finalmente, las matrices se secaron mediante liofilización como en el método anterior.

2.7.3 Método A+B: Incorporación del micronutriente en el mezclado y la inmersión en una disolución salina

Este método es una combinación del método A y B que se ha utilizado como estrategia para aprovechar los beneficios de ambos. En este sentido, SPI y Gly se mezclaron con un 10% en peso de sal que contiene el micronutriente, siguiendo el mismo protocolo que en el método A. Sin embargo, la etapa de inmersión se realizó en una disolución saturada de la sal que contiene el micronutriente como en la etapa B. Finalmente, las matrices se secaron mediante liofilización como en los casos anteriores.

2.7.4 Método C: Incorporación del micronutriente por inmersión en dos etapas

Este proceso supone la inmersión del sistema en dos etapas secuenciales. Para ello, SPI y Gly (en una relación 1:1) se mezclaron, inyectaron y sometieron a un tratamiento dehidrotérmico para obtener matrices bioplásticas como se explica en los métodos anteriores. Posteriormente, los sistemas se sometieron a una primera etapa de inmersión durante 24 h en 300 mL de agua destilada, donde toda la glicerina se liberó al agua y una gran cantidad de agua fue absorbida por la matriz. Luego, la matriz hinchada (con agua, pero sin glicerina) fue sometida a una segunda etapa de inmersión, pero en este caso en una solución saturada de la sal que contiene el micronutriente, durante 2 h. En esta etapa el micronutriente fue absorbido por la matriz. Finalmente,

las matrices se secaron mediante liofilización como en los casos anteriores.

2.8 Caracterización de matrices dosificadoras

2.8.1 Propiedades fisicoquímicas

Finalmente, todas las matrices dosificadoras procesadas mediante los protocolos del apartado anterior fueron caracterizadas para evaluar las diferencias en sus propiedades.

2.8.1.1 Cinética de eliminación del plastificante

Para determinar el tiempo de inmersión necesario para eliminar todo el plastificante, se midió la pérdida de material soluble (ecuación 6) de los sistemas con el tiempo. Para ello, se sumergieron los diferentes sistemas en el medio de eliminación del plastificante y se pesaron a diferentes tiempos de inmersión.

Este parámetro define la cantidad de materia que pasa del sistema al medio, que puede ser una suma entre la parte soluble de la proteína, la glicerina y parte de la sal que contiene el micronutriente. Este parámetro no se puede utilizar con precisión para determinar cuánto de este se ha perdido de cada componente, aunque se puede estimar el tiempo necesario para perder la totalidad de la cantidad soluble, que corresponderá al tiempo necesario para la estabilización del peso del sistema.

Para facilitar la estimación del tiempo de inmersión necesario, se realizó un procedimiento de ajuste de los parámetros obtenidos en función del tiempo, utilizando la aplicación de Matlab.

2.8.1.2 Análisis termogravimétrico (TGA)

El análisis termogravimétrico se llevó a cabo colocando las muestras en un analizador termogravimétrico Q600 (TA Instruments, EE.UU.)

(Figura 2.13) a 25 °C. La variación de peso se midió mientras la temperatura subía hasta 600 °C en una atmósfera de nitrógeno. La velocidad de calentamiento fue de 10 °C/min. Una explicación más detallada de este ensayo puede leerse en la sección 2.2.8.

2.8.2 *Propiedades mecánicas*

Casa sistema se sometió a pruebas de compresión oscilatoria. Estos ensayos se realizaron con la finalidad de evaluar la estabilidad de las matrices a lo largo del tiempo. Para ello, se utilizó un analizador dinámico-mecánico RSA3 (TA Instruments, EE. UU.), como el mostrado en la Figura 2.23A, con una geometría de platos paralelos (diámetro: 8 mm) (Figura 2.29). De esta forma, la matriz es introducida entre los platos aplicándole esfuerzos de compresión en toda su superficie. En primer lugar, se realizaron barridos de deformación entre 0,002 y 2% a una frecuencia constante de 1 Hz y 22 °C para obtener la deformación crítica (ϵ_{crit}) de las diferentes matrices. La deformación crítica es la última deformación en el intervalo viscoelástico lineal. Este intervalo corresponde a aquel rango de deformación que, al aplicarse, no ocasionan cambios irreversibles en el sistema. Luego, se realizaron barridos de frecuencia entre 0,02 y 20 Hz a una deformación constante de 0,01% (por debajo de la deformación crítica) y 22 °C. En estos ensayos se evalúa el tiempo de recuperación de las matrices tras aplicarle un esfuerzo (o deformación) constante. De esta forma, se obtuvieron los valores del módulo elástico (E') y viscoso (E'') en el intervalo de frecuencia. Para facilitar la comparación entre los sistemas se evaluó el módulo elástico y la tangente de pérdidas ($\tan \delta = E''/E'$) a 1 Hz para cada uno de ellos (E'_1 y $\tan \delta_1$, respectivamente).



Figura 2.29. Geometría de platos paralelos de 8 mm de diámetro.

2.8.3 Propiedades morfológicas

Por otro lado, se evaluó la microestructura y distribución del micronutriente de las distintas matrices.

2.8.3.1 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La microestructura de las matrices se determinó según el método descrito en la sección 2.6.7. Brevemente, las muestras fueron recubiertas con una fina capa de paladio/oro y se observaron en un microscopio electrónico de barrido Zeiss EVO (Alemania) (Figura 2.17) con un voltaje de aceleración de 20 kV. Se tomaron imágenes tanto en la superficie de las matrices como en el interior de las mismas (cortándolas y observándolas de canto).

2.8.3.2 Análisis dispersivo de energía de rayos X (EDAX)

La distribución de la concentración de elementos para las matrices estudiadas se analizó junto con los análisis de SEM. Las muestras se analizaron usando el mismo microscopio electrónico Zeiss EVO (Alemania) (Figura 2.17) que tiene acoplado un complemento para realizar este tipo de análisis. Estas medidas se realizan con la finalidad de detectar la cantidad de micronutriente depositado en la superficie e interior de las matrices. Los análisis se llevaron a cabo por duplicado en

diferentes zonas de las matrices, tanto en el interior como en la superficie exterior. Una explicación más exhaustiva de este ensayo se encuentra en la sección 2.4.3.

2.8.4 *Propiedades funcionales*

2.8.4.1 Micronutriente incorporado

La cantidad de micronutriente incorporado en la matriz se midió mediante ICP-AES, siguiendo el mismo protocolo explicado en la sección 2.6.5. De esta forma, las muestras fueron digeridas con ácidos y, posteriormente, analizadas mediante un espectroscopio ICP SpectroBlue IT (Spectro, Alemania) (Figura 2.20).

2.8.4.2 Liberación del micronutriente

La liberación de micronutrientes de forma controlada es el principal objetivo de estos sistemas. Se determinó utilizando dos protocolos diferentes. En primer lugar, se evaluó en agua siguiendo el protocolo propuesto por Essawy et al. (2016). Para ello, los sistemas se sumergieron en 300 mL de agua destilada. La liberación de micronutrientes se determinó a través de la conductividad electrolítica que provoca en el medio en diferentes momentos, utilizando un equipo EC-Metro BASIC 30 (Crison, España) (Figura 2.30).



Figura 2.30. Equipo EC-Metro BASIC 30.

Por otro lado, también se evaluó la liberación en suelo siguiendo el protocolo propuesto por González et al. (2015). De esta forma, los sistemas fueron enterrados en suelo en tubos de vidrio (altura: 40 cm, diámetro: 20 mm), como se muestra en la Figura 2.31, y se regaron con 20 mL de agua cada 24 h (simulando un riego hortícola intensivo de 20 L agua/m² de suelo). Se evaluó la conductividad de los lixiviados recogidos en cada riego, como en el caso anterior, en diferentes momentos.

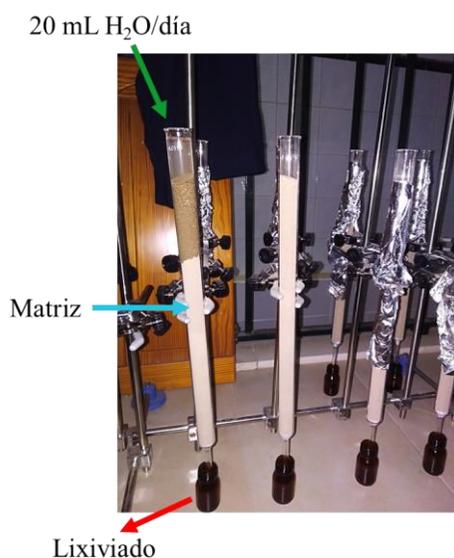


Figura 2.31. Configuración experimental utilizada para las mediciones de liberación en suelo.

La conductividad está directamente relacionada con la liberación de sal. De esta forma, cuando se mantiene constante, es porque toda la sal se ha liberado por completo. Cabe mencionar que también se midió una matriz de referencia (sin sal añadida) y se usó como línea base en los diferentes sistemas, restando su conductividad para evaluar únicamente la liberación de la sal. De esta forma, se calculó el porcentaje de

liberación de sal, considerando 100% de liberación como valor máximo de conductividad, y se representó en el tiempo (Ecuación 7).

$$\text{Porcentaje de liberación (\%)} = \frac{\text{conductividad tiempo } x}{\text{conductividad máxima}} \cdot 100 \quad (7)$$

2.8.4.3 Capacidad de absorción de agua

El método empleado para evaluar la capacidad de absorción agua de las diferentes matrices fue el mismo utilizado para las matrices bioplásticas (sección 2.6.6). Brevemente, se sumergieron las matrices en 300 mL de agua destilada durante 24 h, calculando la capacidad de absorción de agua y pérdida de material soluble a partir de las ecuaciones 5 y 6, respectivamente.

2.8.5 *Biodegradabilidad*

La biodegradabilidad de los sistemas se midió enterrando las matrices a temperatura ambiente en un medio de compostaje con una saturación en agua del 80% (2:1 tierras de cultivo: compost, la misma proporción de materiales inertes/orgánicos especificada por ISO 20200 ("ISO 20200:2004. Plastics — Determination of the degree of disintegration of plastic materials under simulated composting conditions in a laboratory-scale test", 2004). De esta forma, las muestras son degradadas por los microorganismos del suelo. Cada sistema se desenterró para ser visualmente evaluados en diferentes días, tomándose fotografías de todos los sistemas para este fin. El ensayo finalizó cuando ninguna porción mayor a 1 mm pudo ser desenterrada (tiempo total de biodegradación).

2.8.6 Evaluación en cultivos

Finalmente, se evaluó la capacidad de estos sistemas para incorporar micronutrientes en los cultivos. En este sentido, se utilizaron cultivos de lechuga (*Lactuca sativa*) y pimiento dulce italiano (*Capsicum annuum*). En primer lugar, las semillas se germinaron durante 3 semanas para seleccionar especímenes similares para la prueba. Las plantas germinadas se trasplantaron a macetas de 2 litros, utilizando una proporción 6:2:1 de tierra comercial, arena y vermiculita, respectivamente. Cada planta se sometió a un tratamiento diferente, teniendo 4 repeticiones de cada tratamiento. Para los tratamientos con las diferentes matrices, una matriz fue enterrada a 2 cm a la derecha de las raíces de la planta, utilizando una sola matriz por planta. Además, también se incluyeron como referencias un control positivo (con fertilización convencional de cada micronutriente que consiste en verter cada sal directamente al suelo a una concentración de 5 g/m² cada 14 días) y un control negativo (sin ninguna fertilización) con el fin de comparar el efecto de las matrices con cultivos fertilizados convencionalmente y sin fertilizar. Todas las plantas se regaron hasta saturación cada dos días, anotando el volumen de agua necesario. Finalmente, se evaluaron los diferentes cultivos a los 40 días (lechuga) o a los 70 días (pimiento dulce italiano). En primer lugar, se tomaron fotografías de las plantas para su comparación visual. A continuación, las plantas fueron desenterradas y posteriormente analizadas para medir su peso fresco, tamaño (alto x ancho, alto x ancho), follaje (número de hojas) y color (medido con un espectrocolorímetro Konika Minolta CM-700D, obteniendo croma, tono y claridad, Figura 2.32). Además, los micronutrientes asimilados por cada planta se determinaron mediante espectroscopía de emisión atómica de plasma acoplado inductivamente

(ICP-AES), siguiendo el mismo protocolo que para las matrices bioplásticas (sección 2.6.5). Para ello, las plantas fueron primero digeridas en medio ácido y, posteriormente, analizadas en un espectrómetro ICP SpectroBlue TI (Spectro, Alemania) (Figura 2.25).



Figura 2.32. Espectrocolorímetro Konika Minolta CM-700D.

Cabe mencionar que se realizó también un estudio más intensivo y en profundidad del uso de matrices dosificadoras en cultivos de cebada. No obstante, debido a la particularidad de los métodos utilizados en este estudio, estos serán detallados en el mismo capítulo (Capítulo 6).

2.9 Análisis estadístico

Se realizaron al menos tres replicados de cada muestra. El análisis estadístico se obtuvo mediante un test de comparación de medias (test de t de Student) y realizando un análisis de varianza (ANOVA) asignando un nivel de confianza del 95% ($p < 0,05$). Este análisis se realizó mediante el paquete estadístico SPSS18 de Excel (Microsoft, EE.UU.).

Referencias

"ASTM D570-98: Standard Test Method for Water Absorption Of Plastics" (2005). West Conshohocken: ASTM international.

"ISO 20200:2004. Plastics — Determination of the degree of disintegration of plastic materials under simulated composting conditions in a laboratory-scale test" (2004).

Abdullah, J. A. A., Salah Eddine, L., Abderrhmane, B., Alonso-González, M., Guerrero, A. y Romero, A. (2020) "Green synthesis and characterization of iron oxide nanoparticles by pheonix dactylifera leaf extract and evaluation of their antioxidant activity", *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 17, p. 100280.

Abomuti, M. A., Danish, E. Y., Firoz, A., Hasan, N. y Malik, M. A. (2021) "Green Synthesis of Zinc Oxide Nanoparticles Using Salvia officinalis Leaf Extract and Their Photocatalytic and Antifungal Activities", *Biology*, 10(11), p. 1075.

AENOR (2012) "ISO 527-2:2012. Plastics—Determination of tensile properties-Part 2: Test Conditions for Moulding and Extrusion Plastics". Madrid: Aenor.

Almonacid, G. F. (2016) *Evaluación de la variación del contenido de polifenoles en alimentos vegetales, en función del método de conservación empleado*. Mendoza: Universidad Nacional de Cuyo.

Álvarez-Castillo, E., J. del Toro, A., Aguilar, J. M. J. M., Bengoechea, C. y Guerrero, A. (2018) "Optimization of a thermal process for the production of superabsorbent materials based on a soy protein isolate", *Industrial Crops and Products*, 125, pp. 573–581.

AOAC (2005) "Official Methods of Analysis of AOAC", in *Official Methods of Analysis of AOAC iInternational*.

Beveridge, T., Toma, S. J. y Nakai, S. (1974) "Determination of SH- and SS- groups in some food proteins using Ellman's reagent.", *Journal of Food Science*, 39(1), pp. 49–51.

Cakmak, I. y Kutman, U. B. (2018) "Agronomic biofortification of cereals with zinc: a review", *European Journal of Soil Science*, 69(1), pp. 172–180.

Chen, C. C., Liu, P. y Lu, C. H. (2008) "Synthesis and characterization of nano-sized ZnO powders by direct precipitation method", *Chemical Engineering Journal*, 144(3), pp. 509–513.

Debnath, D. y Gupta, A. K. (2018) "Optimizing the fabrication of nanoplasmonic silver-nitrogen co-doped zinc oxide ($\text{Ag}_x\text{Zn}_{(1-x)}\text{N}_y\text{O}_{(1-y)}$) mediated by ammonia template: Insight into its enhanced physiochemical and photocatalytic behavior", *Journal of Molecular Liquids*, 249, pp. 334–345.

Doolette, C. L., Read, T. L., Li, C., Scheckel, K. G., Donner, E., Kopittke, P. M., Schjoerring, J. K. y Lombi, E. (2018) "Foliar application of zinc sulphate and zinc EDTA to wheat leaves: differences in mobility, distribution, and speciation", *Journal of Experimental Botany*, 69(18), pp. 4469–4481.

Eichert, T., Kurtz, A., Steiner, U. y Goldbach, H. E. (2008) "Size exclusion limits and lateral heterogeneity of the stomatal foliar uptake pathway for aqueous solutes and water-suspended nanoparticles", *Physiologia Plantarum*, 134(1), pp. 151–160.

Essawy, H. A., Ghazy, M. B. M., El-Hai, F. A. y Mohamed, M. F. (2016) "Superabsorbent hydrogels via graft polymerization of acrylic acid from chitosan-cellulose hybrid and their potential in controlled release of soil nutrients", *International Journal of Biological Macromolecules*, 89, pp. 144–151.

Feijoo, S., González-García, S., Moldes-Diz, Y., Vázquez-Vázquez, C., Feijoo, G. y Moreira, M. T. (2018) "The Environmental Impact of Magnetic Nanoparticles Under the Perspective of Carbon Footprint", en: *Environmental*

Carbon Footprints, Singapore: Elsevier, pp. 45–77.

Felix, M., Perez-Puyana, V., Romero, A. y Guerrero, A. (2017) "Development of thermally processed bioactive pea protein gels: Evaluation of mechanical and antioxidant properties", *Food and Bioproducts Processing*, 101, pp. 74–83.

Fernández-Espada, L., Bengoechea, C., Cordobés, F. y Guerrero, A. (2016) "Thermomechanical properties and water uptake capacity of soy protein-based bioplastics processed by injection molding", *Journal of Applied Polymer Science*, 133(24), p. 43524.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (2013) *Food wastage footprint. Impacts on natural resources*. Washington D.C.: FAO.

González, M. E., Cea, M., Medina, J., González, A., Diez, M. C., Cartes, P., Monreal, C. y Navia, R. (2015) "Evaluation of biodegradable polymers as encapsulating agents for the development of a urea controlled-release fertilizer using biochar as support material", *Science of The Total Environment*, 505, pp. 446–453.

Hames, B. D. (1998) *Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach*. Leeds: OUP Oxford (Practical Approach Series).

Hammann, F. y Schmid, M. (2014) "Determination and Quantification of Molecular Interactions in Protein Films: A Review", *Materials*, 7(12), pp. 7975–7996.

INTA and Ministerio de Agricultura de Chile (2018) *Manual de pérdidas y desperdicios de alimentos*. Santiago de Chile: Al día Chile - INTA Universidad de Chile - Ministerio de Agricultura.

Jia-Chen, F. (2022) "The world of soy", *East Asian Science, Technology, and Medicine*, 35, pp. 161–165.

Jiménez-Rosado, M., Perez-Puyana, V., Cordobés, F., Romero, A. y

Guerrero, A. (2018) "Development of soy protein-based matrices containing zinc as micronutrient for horticulture", *Industrial Crops and Products*, 121, pp. 345–351.

Krul, E. S. (2019) "Calculation of Nitrogen-to-Protein Conversion Factors: A Review with a Focus on Soy Protein", *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 96(4), pp. 339–364.

Laemmli, U. K. (1970) "Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4", *Nature*, 227(5259), pp. 680–685.

Lindroth, P. y Mopper, K. (1979) "High Performance Liquid Chromatographic Determination of Subpicomole Amounts of Amino Acids by Precolumn Fluorescence Derivatization with o-Phthaldialdehyde", 51(11), pp. 1667–1674.

Marín, A., Ferreres, F., Tomás-Barberán, F. A. y Gil, M. I. (2004) "Characterization and Quantitation of Antioxidant Constituents of Sweet Pepper (*Capsicum annuum* L.)", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(12), pp. 3861–3869.

Markwell, M. A. K., Haas, S. M., Bieber, L. L. y Tolbert, N. E. (1978) "A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples", *Analytical Biochemistry*, 87(1), pp. 206–210.

Niamke, M. A., Soro, S., Sea, B. T., Atchowo, J. E. y Djaman, J. A. (2021) "Characterization of the physicochemical properties of sweet pepper (*Capsicum annuum*) cultivated in Korhogo in the North of Côte d'Ivoire", *GSC Advanced Research and Reviews*, 8(3), pp. 130–138.

Noreen, H., Semmar, N., Farman, M. y McCullagh, J. S. O. (2017) "Measurement of total phenolic content and antioxidant activity of aerial parts of medicinal plant *Coronopus didymus*", *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 10(8), pp. 792–801.

Orawan, J., Scoottawat, B. y Wonnup, V. (2006) "Effect to phosphate compounds on gel-forming ability of surimi from bigeye snapper (*Priacanthus tayanus*)", *Food Hydrocolloids*, 20(8), pp. 1153–1163.

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (2022) *Datos de alimentación y agricultura*. Disponible en: <http://www.fao.org/> (Accedido: Marzo 28, 2022).

Perez, V., Felix, M., Romero, A. y Guerrero, A. (2016) "Characterization of pea protein-based bioplastics processed by injection moulding", *Food and Bioproducts Processing*. Institution of Chemical Engineers, 97, pp. 100–108.

Ridner, E. (2006) *Soja: Propiedades nutricionales y su impacto en la salud*. Buenos Aires: Sociedad Argentina de Nutrición.

Sharma, P. K., Dutta, R. K., Pandey, A. C., Layek, S. y Verma, H. C. (2009) "Effect of iron doping concentration on magnetic properties of ZnO nanoparticles", *Journal of Magnetism and MAgnetic Materials*, 321, pp. 2587–2591.

Talam, S., Karummuri, S. R. y Gunnam, N. (2012) "Synthesis, characterization and spectroscopic properties of ZnO nanoparticles", *International Scholarity Research Network*, 2012, p. 372505.

Tan, W. F., Koopal, L. K., Weng, L. P., van Riemsdijk, W. H. y Norde, W. (2008) "Humic acid protein complexation", *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 72(8), pp. 2090–2099.

Thannhauser, T. W., Konishi, Y. y Scheraga, H. A. (1984) "Sensitive quantitative analysis of disulfide bonds in polypeptides and proteins", *Analytical Biochemistry*, 138(1), pp. 181–188.

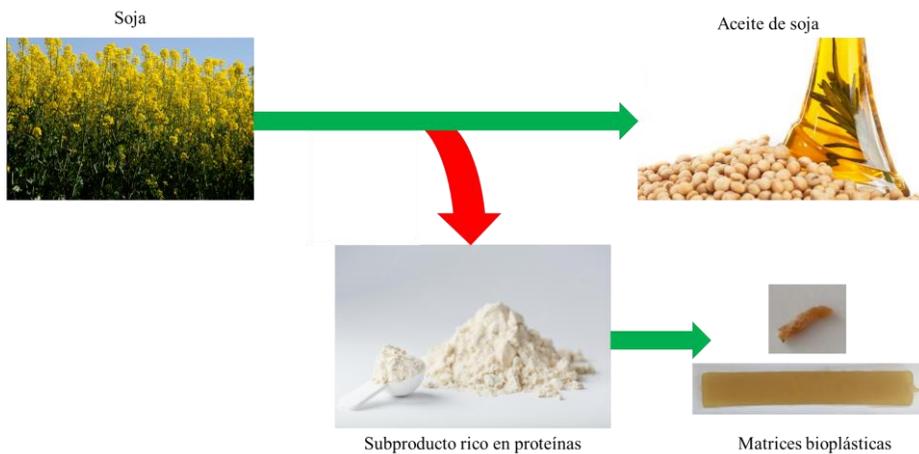
Vlachopoulos, J. y Strutt, D. (2003) "Polymer processing", *Materials Science and Technology*, 19(9), pp. 1161–1169.

Warren, B. E. (1990) *X-ray Diffraction*. Nueva York: Dover Publications

(Addison-Wesley series in metallurgy and materials engineering).

Zárate-Ramírez, L. S., Romero, A., Martínez, I., Bengoechea, C., Partal, P. y Guerrero, A. (2014) "Effect of aldehydes on thermomechanical properties of gluten-based bioplastics", *Food and Bioproducts Processing*, 92(1), pp. 20–29.

Capítulo 3: Evaluación del potencial de la proteína de soja como materia prima para elaborar matrices bioplásticas



3.1 Introducción

Las matrices bioplásticas son sistemas compuestos por biopolímeros naturales y/o biodegradables que se utilizan en horticultura para la liberación controlada de fertilizantes o agua. Hoy en día la mayoría de las matrices bioplásticas utilizadas en horticultura son de ácido poliláctico (PLA) y bio-polietileno (Bio-PE) (Siracusa y Blanco, 2020). No obstante, el precio de estos bioplásticos es muy elevado comparado con el de los plásticos comerciales que se pueden encontrar en el mercado, pasando de los 0,57-1,59 €/kg de los plásticos convencionales a los 1,14-21,50 €/kg de los bioplásticos actuales. Estos precios hacen que los bioplásticos no sean competitivos en el mercado actual, limitando su uso. Una alternativa para reducir este coste es el uso de subproductos o residuos de la industria agroalimentaria, que son infravalorados y ocasionan un importante impacto ambiental (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, 2022). Esos subproductos y residuos, que son ricos en proteínas, polisacáridos o almidones, tienen un precio bajo, siendo candidatos potenciales para producir matrices bioplásticas competitivas (Giroto *et al.*, 2015).

La correcta elección del subproducto o residuo que componga la matriz bioplástica usada como base en los sistemas de liberación controlada es un punto determinante para el procesado. De esta elección dependen las características que las matrices posean para poder albergar los fertilizantes y suministrarlos de forma apropiada durante todo el tiempo de crecimiento del cultivo. En primer lugar, es importante que estos subproductos o residuos tengan un alto porcentaje de biopolímeros, por ejemplo, proteínas o polisacáridos. Las proteínas se componen de aminoácidos unidos mediante enlaces peptídicos. Esta estructura se

puede asimilar a un entramado polimérico donde las unidades repetitivas son los mismos aminoácidos (Numata, 2020). Los polisacáridos se componen de monosacáridos unidos repetitivamente mediante enlaces glucosídicos, asimilándose también al entramado polimérico (Crini, 2005). De esta forma, mientras mayor sea el porcentaje de biopolímero más se asimilará a un plástico convencional. Por este motivo, de manera general el uso de aislados aporta mejores propiedades plásticas que los concentrados (Felix *et al.*, 2017). No obstante, aunque se persigue conseguir la mayor cantidad de biopolímero posible, los concentrados y aislados usados también contienen otros componentes en porcentajes minoritarios, como son la materia mineral (mayoritariamente fibra), los lípidos y la humedad. Estos componentes también tienen una función en los bioplásticos. En este sentido, los minerales actúan como material de relleno; y los lípidos y la humedad presentan cierto carácter plastificante, haciendo que las propiedades de los bioplásticos no solo dependan de la cantidad de proteína presente, sino de la relación entre todos estos componentes (Felix *et al.*, 2017).

Muchos subproductos y residuos han sido investigados para la realización de bioplásticos, como el maíz, el arroz, el gluten o el guisante (Perez *et al.*, 2016; M. Jiménez-Rosado *et al.*, 2019; Marichelvam *et al.*, 2019; Alonso-González, Felix y Romero, 2021). Entre todos, el aislado proteico de soja (SPI) es una materia prima alentadora para la fabricación de matrices para el sector hortícola. En primer lugar, el SPI ha sido enormemente investigado debido a su gran contenido en ácidos aspártico y glutámico (Fernández-Espada *et al.*, 2019; Yamada *et al.*, 2020), lo que conjuntamente con su estructura globular, compuesta principalmente de globulinas 7S y 11S (Schwenke, 1988), mejora la capacidad de absorción de agua de los bioplásticos, teniendo así un gran potencial en

aplicaciones hortícolas para el mejor aprovechamiento del agua. Además, las proteínas tienen un alto porcentaje en nitrógeno, nutriente primario para los cultivos. Por lo que su uso como materia prima para el desarrollo de matrices bioplásticas genera un aporte extra de nutrientes (Abedi *et al.*, 2010). Finalmente, las proteínas se consideran bioestimulantes vegetales por su capacidad para reducir el estrés abiótico generado por las condiciones ambientales o la deficiencia de nutrientes en el suelo (Colla *et al.*, 2017).

Otro factor a tener en cuenta en esta materia prima es su comportamiento térmico. La fabricación de bioplásticos basados en proteína comienza con un proceso de desnaturalización (Verbeek y Van Den Berg, 2010). En este sentido, es necesario alcanzar esta temperatura para que se pueda procesar la matriz bioplástica pero no sobrepasarla en exceso para no degradar la proteína. Además, es importante que su temperatura de transición vítrea sea moderada para poder moldearlas sin tener que usar condiciones extremas de presión y temperatura (Hernandez-Izquierdo y Krochta, 2008). La temperatura de transición vítrea (T_g) se define como la temperatura a la que el polímero (o biopolímero) disminuye su densidad, dureza y rigidez, comportándose como un fluido (Michels *et al.*, 2015). De esta forma, el biopolímero es fácilmente moldeable cuando se encuentra cerca de su T_g . Por tanto, resulta aconsejable moldear el bioplástico a una temperatura cercana a la transición vítrea para luego conformarlo a la temperatura de desnaturalización. En este contexto, el SPI empieza a formar entrecruzamientos en sus cadenas proteicas debido a enlaces covalentes entre 60 y 110 °C cuando se mezcla en una relación 1:1 con glicerina (plastificante) (Fernández-Espada *et al.*, 2016a), por lo que su procesado

puede llevarse a cabo a temperaturas moderadas facilitando su escalabilidad al nivel industrial.

Por otro lado, la competitividad de las matrices bioplásticas se ve afectada por su método de procesado. En este sentido, la tecnología usada para procesar plásticos convencionales es de especial interés para elaborar bioplásticos. Entre ellos se pueden encontrar estudios sobre extrusión (Ottenhof y Farhat, 2004; Emin y Schuchmann, 2017; Mercedes Jiménez-Rosado *et al.*, 2019) o moldeo por inyección (Mohanty *et al.*, 2005; Adamy y Verbeek, 2013; Félix *et al.*, 2016; Felix *et al.*, 2017). No obstante, el uso de técnicas convencionales conlleva la incorporación de etapas extras al procesado. Para que una matriz bioplástica sea procesada mediante moldeo (termomoldeo o moldeo por compresión) es necesario conseguir una masa moldeable. Esto se consigue a través de la adición de un plastificante. Así, los bioplásticos están compuestos principalmente por un biopolímero y un plastificante (Carvajal-Piñero *et al.*, 2019). Para conseguir la homogenización de ambos componentes y conseguir la masa es necesaria una etapa de mezclado previa. En esta etapa también se pueden incorporar aditivos para modificar las propiedades de las matrices (nanoarcillas, fibras, etc.) (Bourny *et al.*, 2017; Gamero *et al.*, 2019). Por otro lado, los bioplásticos también tienden a necesitar etapas de reforzamiento de la estructura para conseguir las cualidades deseadas. En este contexto, el uso de técnicas físicas industrialmente adaptadas, como el uso de un tratamiento térmico o con ultrasonidos está ganando especial interés en el procesado de estos productos (Álvarez-Castillo *et al.*, 2018).

El objetivo global de este capítulo fue evaluar el potencial de un subproducto rico en proteínas obtenido en la elaboración de aceite de

soja como materia prima para la elaboración de matrices bioplásticas. Para ello, se caracterizó el subproducto para conocer sus propiedades fisicoquímicas. También se estudiaron las condiciones de procesado óptimas para su procesado mediante moldeo por inyección y extrusión. Además, se evaluó el uso del tratamiento térmico y de ultrasonidos como posibles etapas de entrecruzamiento.

3.2 Materiales y métodos

En este capítulo se utilizaron como materias primas el subproducto proteico de soja y la glicerina, manteniéndolos siempre en una proporción 1:1. Una descripción más detallada de estos productos está incluida en la sección 2.1.1 y 2.1.2 del Capítulo 2 (Materiales y métodos), respectivamente.

La Tabla 3.1 presenta un resumen de los ensayos llevados a cabo.

Tabla 3.1. Estudios realizados durante el desarrollo de matrices bioplásticas (Capítulo 3).

Estudio (sección)	Técnica de procesado (sección)	Técnica de caracterización (sección)
Evaluación del subproducto de soja (3.3.1)	-	Composición química (2.2.1)
		Composición aminoacídica (2.2.2)
		Grupos sulfhidrilos (2.2.3)
		Electroforesis (2.2.4)
		Solubilidad proteica (2.2.5)
		Potencial- ζ (2.2.6)
		FTIR (2.2.7)
		Comportamiento térmico (2.2.8)
Procesado de matrices bioplásticas por extrusión (3.3.2)	Extrusión (2.5.1)	FTIR (2.6.1)
		Grupos sulfhidrilos (2.6.2)
		Grado de entrecruzamiento (2.6.3)
		Propiedades mecánicas (2.6.4)
		Capacidad de absorción de agua (2.6.6)
Procesado de matrices bioplásticas por inyección (3.3.3)	Inyección (2.5.2)	Grado de entrecruzamiento (2.6.3)
		Propiedades mecánicas (2.6.4)
		Capacidad de absorción de agua (2.6.6)
Evaluación del reforzamiento físico (3.3.5)	Inyección (2.5.2) + DHT (2.5.3.1) o US (2.5.3.2)	Grado de entrecruzamiento (2.6.3)
		Propiedades mecánicas (2.6.4)
		Capacidad de absorción de agua (2.6.6)
		SEM (2.6.7)

Durante la evaluación de los diferentes procesados para desarrollar matrices bioplásticas se utilizaron diferentes parámetros. En el caso de la extrusión, se seleccionó una velocidad de alimentación constante de 2,8 g/min. En la Tabla 3.2 se muestran los parámetros seleccionados para evaluar el efecto de la velocidad del tornillo y la temperatura de boquilla en el procesado de matrices bioplásticas mediante extrusión.

Tabla 3.2. Parámetros de extrusión usados.

Sistemas	Perfil de temperatura (°C)					T _f (°C)	Velocidad tornillo (rpm)
	4	5	6	7	8		
80 °C	40	70	70	80	80	80	50
95 °C	100 rpm						100
	150 rpm	40	70	80	95	95	150
	300 rpm						300
115 °C	40	70	80	95	115	115	300
125 °C	40	70	80	85	125	125	300
135 °C	40	70	80	115	135	135	300

Por otro lado, en la Tabla 3.3 se muestran los parámetros seleccionados para conseguir las matrices bioplásticas mediante inyección. En este caso, las matrices bioplásticas se obtuvieron usando diferentes temperaturas en el molde (de 70 a 130 °C) y tiempos de compactación o post-inyección (de 150 a 450 s). Los demás parámetros se mantuvieron constantes: temperatura del cilindro 40 °C, presión de inyección de 600 bar durante 20 s y presión de compactación de 200 bar.

Tabla 3.3. Parámetros de inyección usados.

Sistemas		Temperatura del molde (°C)	Tiempo de compactación (s)
70 °C	150 s	70	150
	300 s		300
	450 s		450
90 °C		90	300
130 °C		130	300

3.3 Resultados

3.3.1 Evaluación del subproducto de soja

En primer lugar, se evaluó si el subproducto de soja era un buen candidato para la formación de matrices proteicas. Para ello, se llevó a cabo una caracterización fisicoquímica del mismo.

3.3.1.1 Composición química

La Tabla 3.4 muestra la composición química del subproducto de soja, que contiene un 91% en peso de proteínas. Este alto porcentaje permite clasificar al subproducto como un aislado proteico, de acuerdo a la clasificación de Pearson (Pearson, 1983). Este elevado porcentaje en proteínas favorece la formación de la matriz bioplástica y contribuye a mejorar sus propiedades mecánicas.

Tabla 3.4. Composición del subproducto de soja.

Proteínas (% peso)	$91,0 \pm 1,0^a$
Lípidos (% peso)	$1,0 \pm 0,5^b$
Humedad (% peso)	$5,0 \pm 1,2^c$
Cenizas (% peso)	$2,1 \pm 0,6^b$
Otros (% peso)	$0,9 \pm 4,7^{bc}$

Asimismo, este subproducto presentó otros componentes minoritarios (lípidos, humedad, cenizas, etc.). Muchos autores afirman que estos componentes también pueden facilitar el procesamiento de las matrices bioplásticas (Felix *et al.*, 2017). En este sentido, los lípidos y el agua actúan como plastificantes, mejorando su procesabilidad. Las sales contenidas en las cenizas pueden generar interacciones electrostáticas entre las cadenas biopoliméricas. Finalmente, el aislado contiene también una pequeña fracción sin identificar que puede corresponder a

fibras o polisacáridos, los cuales pueden también reforzar las matrices bioplásticas como materiales de relleno (Mariana *et al.*, 2021).

2.3.1.2 Composición aminoacídica

Las propiedades de las matrices bioplásticas procesadas a partir de las proteínas dependerán, en gran medida, de la estructura primaria de la proteína, es decir, de los aminoácidos que presentan y su orden e interacciones. La composición aminoacídica del aislado proteico de soja se observa en la Tabla 3.5.

Tabla 3.5. Composición aminoacídica del aislado proteico de soja.

Aminoácido (Iniciales)	Concentración (μmol/l)	
	μmol/L	%
Ácido aspártico (Asp)	361,4	8,2
Treonina (Thr)	109,6	2,5
Serina (Ser)	46,2	1,0
Ácido glutámico (Glu)	958,8	21,7
Glicina (Gly)	326,3	7,4
Alanina (Ala)	460,5	10,4
Cisteína (Cys)	73,7	1,7
Valina (Val)	261,3	5,9
Metionina (Met)	38,2	0,9
Isoleucina (Ile)	193,6	4,4
Leucina (Leu)	379,2	8,6
Triptófano (Trp)	1,0	<0,1
Tirosina (Tyr)	131,3	3,0
Fenilalamina (Phe)	186,5	4,2
Histidina (His)	59,8	1,4
Lisina (Lys)	248,1	5,6
Prolina (Pro)	343,5	7,8
Arginina (Arg)	234,3	5,3

Es importante que las proteínas usadas para la elaboración de matrices bioplásticas tengan cisteína en su composición para que puedan formar puentes de disulfuro (S-S) que refuercen la estructura de los sistemas, ya que asocian intermolecularmente las cadenas proteicas (Verbeek y van den Berg, 2009). Por otro lado, la lisina es el segundo aminoácido más

reactivo en las proteínas. Estas forman enlaces covalentes con la dehidroalanina que son altamente estables a altas temperaturas, permitiendo utilizar condiciones más severas en el procesado de las proteínas sin desnaturalizarlas (Baslé *et al.*, 2010). Finalmente, cabe recalcar el alto contenido en ácido aspártico y glutámico que se obtuvo en el análisis de esta materia prima, los cuales son grandes absorbentes de agua y le pueden conferir un gran carácter hidrofílico a las matrices de bioplásticos (Cuadri *et al.*, 2017).

3.3.1.3 Grupos sulfhidrilos

Los grupos sulfhidrilos también se muestran en la Tabla 3.6. El aislado proteico de soja (subproducto de soja) presentó un alto contenido de grupos sulfhidrilos totales (6422 mmol/g de proteína), lo cual se debe a la presencia de aminoácidos como la cisteína y metionina. La mayoría de estos grupos se mostraron como enlaces disulfuro (enlaces S-S), generando unidades de proteína largas. Sin embargo, mostró una cantidad importante de grupos sulfhidrilos libres, que podrían formar nuevos enlaces S-S durante la fabricación del bioplástico, mejorando su conformación. Esta cantidad de grupos sulfhidrilos totales y libres es muy superior a la que se encuentra en otros aislados proteicos como el guisante (Perez *et al.*, 2016) o la albúmina (Félix *et al.*, 2014), lo que podría mejorar la resistencia mecánica de las matrices bioplásticas debido a que pueden crear nuevos enlaces S-S que refuercen la estructura.

Tabla 3.6. Grupos sulfhidrilos libres y totales y enlaces disulfuro (S-S) (mmol/g proteína) presente en el aislado proteico de soja.

Libres	919 ± 147 ^A
Totales	6422 ± 942 ^B
Enlaces S-S	2751 ± 562 ^C

3.3.1.4 Electroforesis

La electroforesis permite determinar las cadenas proteicas de una muestra mediante su división en función de sus pesos moleculares. La electroforesis del aislado proteico de soja (Figura 3.1) mostró 12 zonas distintas de pesos moleculares. No obstante, todas ellas fueron debidas a las dos glicoproteínas que conforman la proteína de soja: la globulina 7S o β -conglucina y la globulina 11S.

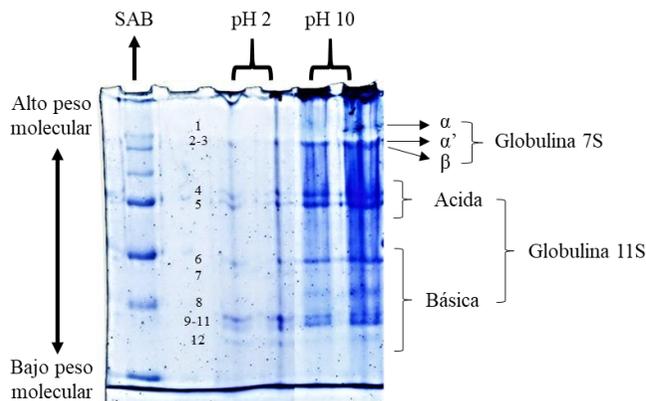


Figura 3.1. Electroforesis del aislado proteico de soja. El patrón analítico "Protein Plus Protein Standards" (SAB) se utilizó como referencia.

La globulina 7S está formada por tres subunidades: α (75 kDa, 1), α' (68 kDa, 2) y β (52 kDa, 3), que se pueden combinar en 7 conformaciones diferentes ($\alpha'\beta\beta$, $\alpha\beta\beta$, $\alpha\alpha'\beta$, $\alpha\alpha\beta$, $\alpha\alpha\alpha'$, $\alpha\alpha\alpha$ y $\beta\beta\beta$). En este caso, parece que la combinación preferida es $\alpha'\beta\beta$, ya que las líneas de sus pesos moleculares no se distinguieron entre sí. Según la literatura, estas unidades no tienen enlaces disulfuro y tienen un contenido menor de aminoácidos azufrados y triptófano que la globulina 11S (Maruyama *et al.*, 2001). Por otra parte, la globulina 11S se organiza en hexámeros, que se subdividen en polipéptidos ácidos (30 kDa, 4-5) y básicos (20 kDa, 6-12). Todas las subunidades se pudieron distinguir tanto a pH ácido como básico, observándose que esta conformación es estable a los

cambios de pH. Esta distribución de pesos moleculares también se obtuvo en otros estudios sobre aislados de proteína de soja (Lu *et al.*, 2020).

3.3.1.5 Solubilidad proteica y potencial ζ

Los valores solubilidad y potencial ζ en función del pH para el aislado proteico de soja se muestran en la Figura 3.2. La solubilidad presenta un perfil en forma de U donde la solubilidad es mayor a valores de pH extremos. Sin embargo, los valores de pH básicos generan mayor solubilidad que los ácidos. Así, la máxima solubilidad se alcanzó a pH 10 aproximadamente (cerca al 100% de solubilidad). Por otro lado, la solubilidad mínima se alcanzó a un pH entre 4 y 5, siendo un 10% aproximadamente.

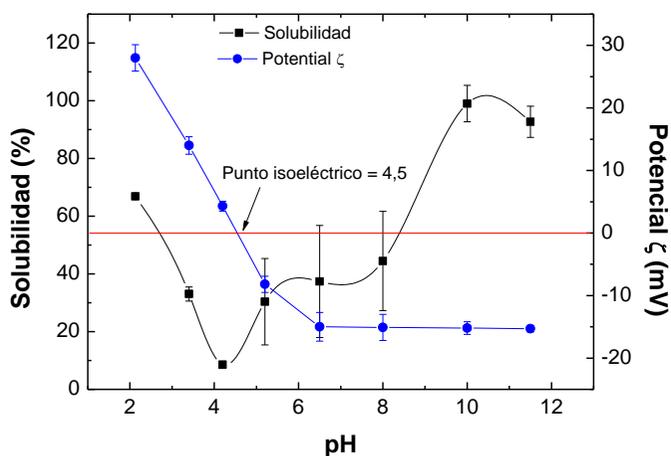


Figura 3.2. Solubilidad proteica y potencial ζ del aislado proteico de soja a diferentes valores de pH.

Las mediciones de potencial ζ para los diferentes valores de pH proporcionan información sobre el punto isoeléctrico. De esta manera, el potencial eléctrico pasó de valores positivos a negativos con el aumento de los valores de pH, anulándose para un valor de 4,5 (punto isoeléctrico), que corresponde al valor donde la solubilidad del aislado

proteico de soja es mínima. Estos valores de solubilidad y potencial ζ con el pH son similares a los obtenidos por otros autores, prediciendo su comportamiento similar (Malhotra y Coupland, 2004; Gedde y Hedenqvist, 2019).

3.3.1.6 FTIR

La estructura secundaria del aislado proteico de soja se muestra en su perfil de FTIR (Figura 3.3). Los grupos amida son los de mayor intensidad en el perfil infrarrojo, ya que son los picos más característicos en las proteínas. De esta forma, se observa una banda a 3500-3000 cm^{-1} correspondiente a las amidas A y B y amida II y dos picos a 1600 y 1500 cm^{-1} correspondientes a las amidas I y II, respectivamente.

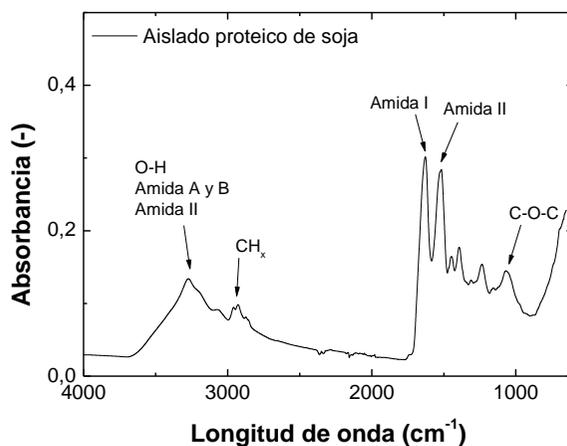


Figura 3.3. Perfil de FTIR del aislado proteico de soja.

Por otro lado, también se pueden observar picos característicos de los enlaces C-H_x (3000-2800 cm^{-1}), C-O-C (1100-990 cm^{-1}) y O-H (3500-3000 cm^{-1}), los cuales están presentes en las ramas de la cadena principal (Türker-Kaya y Huck, 2017). Este perfil es similar al obtenido en estudios previos, no mostrando picos atípicos, lo que significa que este subproducto tiene las mismas características que otros aislados de proteína de soja utilizados hasta el momento (Wang *et al.*, 2011).

3.3.1.7 Comportamiento térmico

La Figura 3.4 muestra el comportamiento térmico del aislado proteico de soja. La calorimetría diferencial de barrido (Figura 3.22A) muestra una única transición térmica, correspondiente a la temperatura de transición vítrea (T_g) del aislado, que se encuentra alrededor de 97 °C ($\delta C_p = 0,12 \text{ J}/(\text{g}\cdot^\circ\text{C})$). Con respecto al análisis termogravimétrico (Figura 3.22B), se observaron dos pérdidas de peso características: una a 25-120 °C correspondiente a la pérdida de humedad (5% en peso), y otra mayor a 200-600 °C, correspondiente a la máxima tasa de degradación de la proteína.

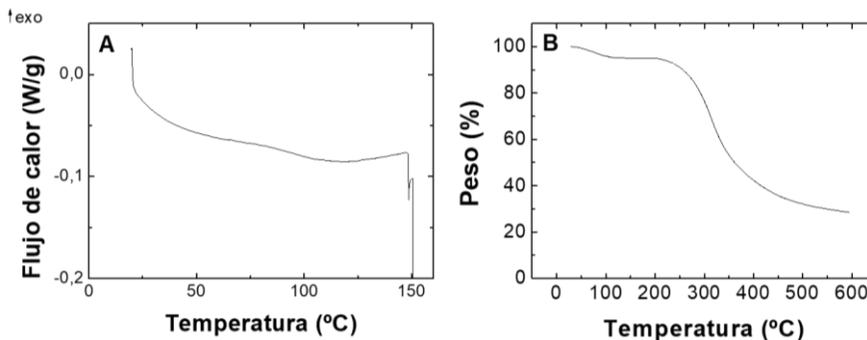


Figura 3.4. Calorimetría diferencial de barrido (A) y análisis termogravimétrico (B) del aislado proteico de soja desarrollados de menor a mayor temperatura.

3.3.2 Procesado de matrices bioplásticas por extrusión

3.3.2.1 FTIR

La Figura 3.5 muestra los perfiles de FTIR de cada matriz bioplástica procesada. En todos los casos, el procesado de la matriz bioplástica genera una disminución de la intensidad de los picos de amida I y II, (1600 y 1500 cm^{-1} , respectivamente), lo que corresponde a un aumento de la agregación entre las cadenas proteicas.

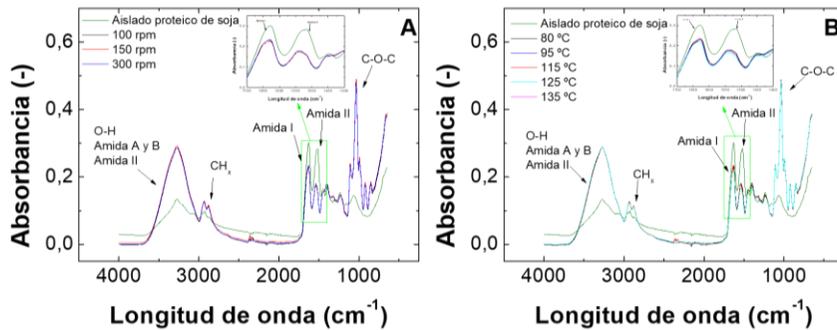


Figura 3.5. *Perfiles de FTIR de las matrices bioplásticas procesadas a diferentes velocidades de tornillo (A) y temperatura (B).*

Estas diferencias en el grado de agregación se pueden evaluar mejor en la Tabla 3.7. Así, el cambio en la velocidad del tornillo (Figura 3.5A) y la temperatura de la boquilla (Figura 3.5B) genera diferentes grados de agregación. Respecto a la velocidad del tornillo, 150 rpm (95 °C) genera un aumento moderado de la agregación sin diferencias significativas, por lo que parece que esta velocidad mejora la procesabilidad de la mezcla para obtener la matriz bioplástica. Sin embargo, la matriz bioplástica procesada a 80 °C y 50 rpm presenta el menor porcentaje de agregación. Esto podría deberse a que la matriz bioplástica se conformó solo parcialmente. Además, cuanto mayor es la temperatura, mayor es la agregación de la matriz bioplástica. Sin embargo, a 125 °C parece alcanzarse una máxima agregación, que no puede mejorarse a 135 °C, probablemente como consecuencia de que a esta temperatura se alcanza la máxima estructuración, por lo que un aumento de temperatura no genera más cambios estructurales en la matriz bioplástica.

Tabla 3.7. Agregación provocada en las diferentes matrices bioplásticas con los diferentes parámetros usados en extrusión. Las diferentes letras usadas como superíndice evidencian diferencias significativas ($p < 0,05$).

Sistemas		Agregación (%)
Temperatura (°C)	Velocidad del tornillo (rpm)	
80	50	22 ^a
	100	25 ^{bc}
95	150	26 ^b
	300	24 ^c
115	300	25 ^{bc}
125	300	29 ^d
135	300	29 ^d

3.3.2.2 Enlaces disulfuro

Los enlaces disulfuro de las diferentes matrices bioplásticas procesadas se presentan en la Tabla 3.8. Estos enlaces presentan un compartimiento similar a la agregación de FTIR. En otras palabras, una mayor agregación significa que hay más enlaces disulfuro en el sistema. Por tanto, la velocidad del tornillo no genera diferencias significativas, mientras que un aumento de la temperatura favorece la formación de enlaces S-S. No obstante, cabe recalcar que todos los parámetros estudiados consiguieron aumentar la cantidad de enlaces disulfuro encontrados en la materia prima.

Tabla 3.8. Enlaces disulfuro (S-S) provocada en las diferentes matrices bioplásticas con los diferentes parámetros usados en extrusión. Los valores obtenidos para la materia prima (SPI) han sido incluidos a efectos comparativos. Las diferentes letras usadas como superíndice evidencian diferencias significativas ($p < 0,05$).

Sistemas		Enlaces S-S (mmol/g proteína)
Temperatura (°C)	Velocidad del tornillo (rpm)	
80	50	3805 ^a
	100	3808 ^a
95	150	3848 ^b
	300	3841 ^b
115	300	3878 ^c
125	300	3908 ^d
135	300	3972 ^e
SPI		2751 ^f

3.3.2.3 Grado de entrecruzamiento

El grado de entrecruzamiento de las diferentes matrices bioplásticas se puede observar en la Tabla 3.9. Nuevamente se observa un comportamiento similar al de la agregación observada por FTIR y la formación de enlaces S-S. De esta forma, la velocidad del tornillo no presenta diferencias significativas entre los sistemas. Por otro lado, un aumento de la temperatura conlleva un aumento del grado de entrecruzamiento generado, aunque se mantiene a partir de 115 °C, posiblemente debido a la estructuración de todos los grupos solubles de la proteína. Sin embargo, existe una excepción para el sistema procesado a 80 °C y 50 rpm, que mostró la menor agregación, pero un alto grado de entrecruzamiento. Este comportamiento podría deberse a la temperatura utilizada (80 °C) en el procesamiento de este sistema. En este caso, la temperatura no permite una alta agregación física, teniendo baja intensidad en los grupos amida de FTIR, pero el mayor tiempo de residencia de la masa en la extrusora (debido a la menor velocidad del

tornillo, 50 rpm) genera una alta estructuración química de los enlaces formados.

Tabla 3.9. Grado de entrecruzamiento de las diferentes matrices bioplásticas con los diferentes parámetros usados en extrusión. Las diferentes letras usadas como superíndice evidencian diferencias significativas ($p < 0,05$).

Sistemas		Grado de entrecruzamiento (%)
Temperatura (°C)	Velocidad del tornillo (rpm)	
80	50	77 ^a
	100	72 ^b
95	150	73 ^b
	300	72 ^b
115	300	78 ^a
125	300	78 ^a
135	300	78 ^a

3.3.2.4 Propiedades mecánicas

Ensayos dinámicos de flexión

La Figura 3.24 muestra los módulos elástico (E') y viscoso (E'') frente a la frecuencia aplicada para las matrices bioplásticas procesadas mediante extrusión con diferentes velocidades de tornillo (Figura 3.6A) y temperaturas (Figura 3.6B). Cabe recordar que la matriz bioplástica procesada a 80 °C se procesó con una velocidad de tornillo inferior (50 rpm). Todos los sistemas presentan una marcada dependencia con la frecuencia. Este comportamiento, ya observado en trabajos anteriores, está relacionado con una extensión elástica de las cadenas proteicas, que se recuperan instantáneamente, por lo que no se alcanza la zona plástica (Martínez *et al.*, 2013; Jiménez-Rosado *et al.*, 2021).

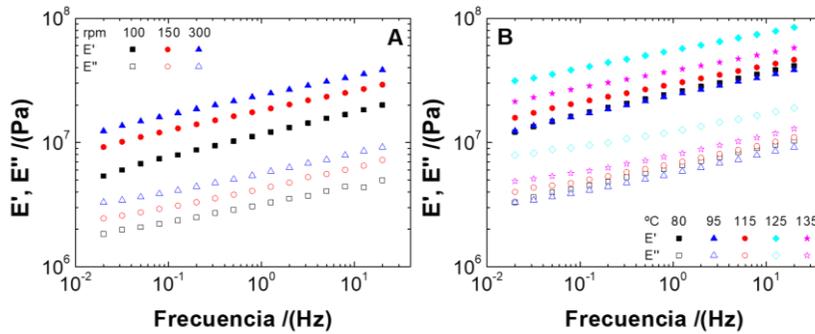


Figura 3.6. Ensayos dinámicos de flexión de las matrices bioplásticas procesadas a diferentes velocidades de tornillo y 95 °C (A) y diferentes temperaturas con 300 rpm (B). Nota: El sistema procesado a 80 °C se procesó con una velocidad de tornillo de 50 rpm.

Las diferencias entre los sistemas se pueden evaluar mejor con la comparación de la deformación crítica (ϵ_{crit}), el módulo elástico y la tangente de pérdidas a 1 Hz (E'_1 y $\tan \delta_1$, respectivamente) que se muestra en la Tabla 3.10. Con respecto a ϵ_{crit} , el aumento de la velocidad del tornillo o la temperatura reduce moderadamente los valores obtenidos. Esto podría deberse al mayor grado de entrecruzamiento, que dificulta la movilidad de la matriz bioplástica. Sin embargo, la matriz bioplástica procesada a 80 °C y 50 rpm no sigue esta tendencia, siendo el sistema con menor agregación, aunque mayor ϵ_{crit} . Este comportamiento permite concluir que es necesaria una mínima reticulación para que la matriz bioplástica soporte alguna deformación, aunque un determinado grado de reticulación también endurece las matrices bioplásticas. En cuanto a E'_1 , un incremento de 100 a 150 o 300 rpm genera un ligero incremento en el valor de E'_1 . El aumento de temperatura también genera un incremento significativo de los valores de E'_1 de 80 a 125 °C, el cual decrece a 135 °C. Sin embargo, la relación entre los módulos elástico y viscoso ($\tan \delta_1$) no mostró diferencias significativas entre los sistemas, siendo todos estables (entre 0,2 y 0,3).

Tabla 3.10. Parámetros de flexión de las diferentes matrices bioplásticas procesadas por extrusión. Las diferentes letras usadas como superíndice en las distintas columnas evidencian diferencias significativas ($p < 0,05$).

Temperatura (°C)	Sistemas		ϵ_{crit} (%)	E'_1 (MPa)	$\tan \delta_1$ (-)
	Temperatura (°C)	Velocidad del tornillo (rpm)			
80	50		$0,19 \pm 0,03^a$	26 ± 7^A	$0,25 \pm 0,05^I$
	100		$0,30 \pm 0,02^b$	12 ± 8^B	$0,27 \pm 0,05^I$
95	150		$0,19 \pm 0,03^a$	19 ± 4^{AB}	$0,23 \pm 0,04^I$
	300		$0,19 \pm 0,04^a$	25 ± 3^A	$0,23 \pm 0,04^I$
115	300		$0,19 \pm 0,03^a$	31 ± 2^C	$0,23 \pm 0,03^I$
125	300		$0,12 \pm 0,02^c$	57 ± 3^D	$0,22 \pm 0,03^I$
135	300		$0,12 \pm 0,02^c$	39 ± 2^E	$0,21 \pm 0,02^I$

Ensayos estáticos de tracción hasta la rotura

Los perfiles de esfuerzo/deformación de las diferentes matrices bioplásticas se muestran en la Figura 3.7. La velocidad del tornillo genera un cambio en este perfil (Figura 3.7A). Así, todas las matrices bioplásticas presentan una zona elástica, donde la tensión muestra un comportamiento lineal con el aumento de la deformación. A esta primera zona le sigue una zona plástica hasta el punto de rotura, en el que se observan dos efectos diferentes: (i) Las matrices bioplásticas procesadas a 100 y 150 rpm presentan una zona de formación de hilos (*necking*) previa a la rotura. Esta zona soporta una deformación prolongada (con una respuesta constante del esfuerzo) antes de romperse; (ii) Las matrices bioplásticas procesadas a 300 rpm sufren una rotura inmediata tras el valor máximo del esfuerzo (sin formación de hilos). Este último comportamiento es el seguido por todas las matrices bioplásticas procesadas a diferentes temperaturas (Figura 3.7B). Estos resultados podrían deberse al reforzamiento de la microestructura de la matriz bioplástica al aumentar la temperatura (aumento de la agregación, puentes disulfuros y grado de entrecruzamiento), lo que genera un

aumento de las propiedades viscoelásticas lineales y un desplazamiento de la curva esfuerzo-deformación hacia mayores valores de las pendientes y del esfuerzo máximo. De esta forma, las muestras soportan mayores deformaciones lo que conduce a sistemas con mayor tenacidad.

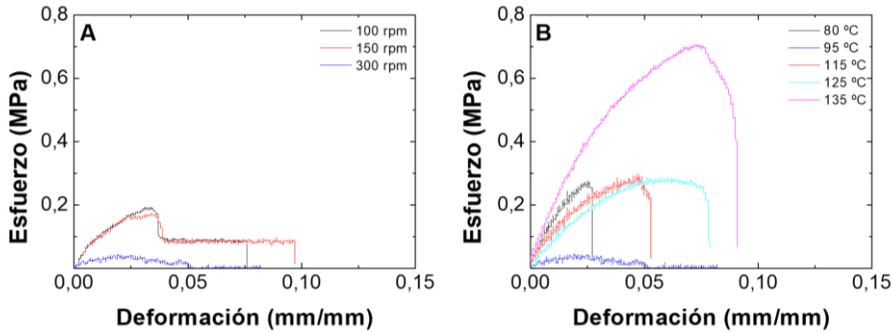


Figura 3.7. Ensayos de tracción hasta la rotura de las matrices bioplásticas procesadas a diferentes velocidades de tornillo y 95 °C (A) y diferentes temperaturas con 300 rpm (B). Nota: El sistema procesado a 80 °C se procesó con una velocidad de tornillo de 50 rpm.

Respecto a los diferentes parámetros obtenidos durante la tracción (Tabla 3.11), el cambio de la velocidad del tornillo no produjo diferencias significativas en la deformación a rotura (ϵ_{crit}), pero un aumento en esta velocidad genera una reducción del módulo de Young (E), que es más significativo a 300 rpm y sobre todo de la tensión máxima (σ_{max}), lo que vuelve a ser un reflejo del cambio de comportamiento en la rotura de la muestra. Sin embargo, el cambio de temperatura generó mayores modificaciones, al igual que en los ensayos de flexión. En este caso, σ_{max} y E mostraron un aumento con la temperatura, mientras que ϵ_{crit} aumenta de 80 a 95 °C, pero disminuye a 115 °C recuperando valores similares a 95 °C a temperaturas más altas (125-135 °C). Estos resultados podrían ser generados por el grado de entrecruzamiento de cada sistema como se reporta en trabajos anteriores (Jansens *et al.*, 2013; Zárate-Ramírez *et al.*, 2014). Como la velocidad del tornillo no modificó el grado de entrecruzamiento de las matrices bioplásticas, no generó un

aumento significativo en su resistencia mecánica. Sin embargo, la temperatura aumentó dicho grado, provocando una mejora en la resistencia mecánica de las matrices bioplásticas. Esto también es consistente con los resultados obtenidos en la caracterización dinamo-mecánica de las matrices bioplásticas, donde mayores temperaturas condujeron a mayores módulos elásticos. Este efecto con la temperatura ya ha sido demostrado en trabajos previos, donde las matrices bioplásticas basadas en proteínas fueron procesadas por extrusión (Pommet *et al.*, 2003; Mohanty *et al.*, 2005; Verbeek y Van Den Berg, 2010) y otras técnicas (Zárate-Ramírez *et al.*, 2011; Fernández-Espada *et al.*, 2016b; Carvajal-Piñero *et al.*, 2019) siendo un parámetro clave para modelar las características finales de la matriz bioplástica.

Tabla 3.11. Parámetros de tracción de las diferentes matrices bioplásticas procesadas por extrusión. Las diferentes letras usadas como superíndice en las distintas columnas evidencian diferencias significativas ($p < 0,05$).

Sistemas		σ_{\max} (MPa)	E (MPa)	ϵ_{\max} (mm/mm)
Temperatura (°C)	Velocidad del tornillo (rpm)			
80	50	$0,26 \pm 0,02^a$	30 ± 4^a	$0,02 \pm 0,01^a$
	100	$0,18 \pm 0,03^b$	11 ± 1^b	$0,08 \pm 0,02^b$
95	150	$0,16 \pm 0,03^b$	10 ± 2^b	$0,10 \pm 0,02^b$
	300	$0,04 \pm 0,01^c$	5 ± 2^c	$0,10 \pm 0,02^b$
115	300	$0,28 \pm 0,02^a$	23 ± 4^d	$0,05 \pm 0,01^c$
125	300	$0,28 \pm 0,02^a$	21 ± 2^d	$0,08 \pm 0,01^b$
135	300	$0,70 \pm 0,01^d$	32 ± 2^c	$0,09 \pm 0,01^b$

3.3.2.5 Capacidad de absorción de agua

La Figura 3.8 muestra la capacidad de absorción de agua y la pérdida de material soluble de las diferentes matrices bioplásticas procesadas. Un incremento en la velocidad del tornillo (Figura 3.8A) solo generó un leve aumento en la capacidad de absorción de agua entre 100 y 150 rpm. Por otro lado, un aumento de la temperatura (Figura 3.8B) produjo una

disminución significativa de esta capacidad. Así, las matrices bioplásticas pierden su capacidad superabsorbente (absorción > 1000%) a temperaturas superiores a 80 °C. De esta forma, una mejora en las propiedades mecánicas (por ejemplo, un cambio en la tensión máxima de 0,26 a 0,70 MPa) se acompaña de una disminución de la capacidad de absorción de agua (hasta un 70%), reflejándose también en el índice de hinchamiento evaluado visualmente (Figura 3.9). Así, una mayor capacidad de absorción de agua produjo un mayor incremento en el volumen de la matriz bioplástica húmeda. Este comportamiento también se observa en otras matrices bioplásticas, como el guisante (un cambio de 0,5 a 1,5 MPa en el esfuerzo máximo es simultáneo a una disminución del 64% en la capacidad de absorción de agua) (Giosafatto *et al.*, 2018), gluten de trigo (la capacidad de absorción de agua se redujo del 125 al 94% cuando la temperatura aumenta de 50 a 120 °C) (Jerez *et al.*, 2007) y salvado de arroz (la absorción de agua cambia del 250 al 120% cuando la temperatura aumenta de 100 a 150 °C) (Alonso-González, Felix, Guerrero, *et al.*, 2021).

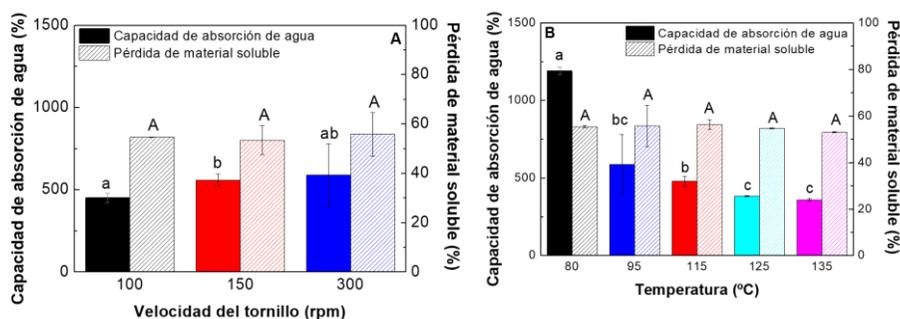


Figura 3.8. Capacidad de absorción de agua y pérdida de material soluble de las matrices bioplásticas procesadas a diferentes velocidades de tornillo y 95 °C (A) y diferentes temperaturas con 300 rpm (B). Nota: El sistema procesado a 80 °C se procesó con una velocidad de tornillo de 50 rpm. Las diferentes letras usadas evidencian diferencias significativas ($p < 0,05$).

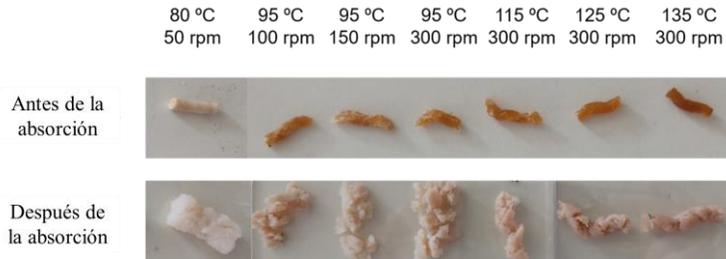


Figura 3.9. *Aspecto visual de las matrices bioplásticas procesadas con diferentes condiciones de procesado antes y después de la absorción con agua.*

En cuanto a la pérdida de material soluble, todos los sistemas presentaron un valor cercano al 55%, que corresponde a la glicerina y una pequeña cantidad de proteína que se solubiliza. Estos resultados muestran que todos los sistemas se mantuvieron estables después de absorber agua, pudiendo absorberla sin desintegrarse.

3.3.3 *Procesado de matrices bioplásticas por inyección*

3.3.3.1 FTIR

Las matrices bioplásticas procesadas mediante moldeo por inyección usando las condiciones descritas en la Tabla 3.3 pueden observarse en la Figura 3.10.

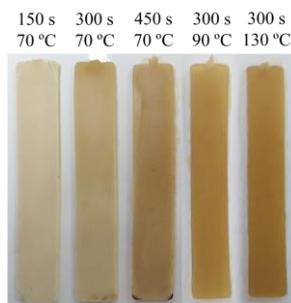


Figura 3.10. *Aspecto visual de las matrices bioplásticas procesadas por inyección con diferentes tiempos de compactación y temperatura del molde.*

La Figura 3.11 muestra los perfiles de FTIR de cada matriz bioplástica procesada. En todos los casos, el procesamiento de la matriz bioplástica

genera una disminución de la intensidad de los picos de amida I y II, (1600 y 1500 cm^{-1} , respectivamente), lo que corresponde a un aumento de la agregación entre las cadenas proteicas.

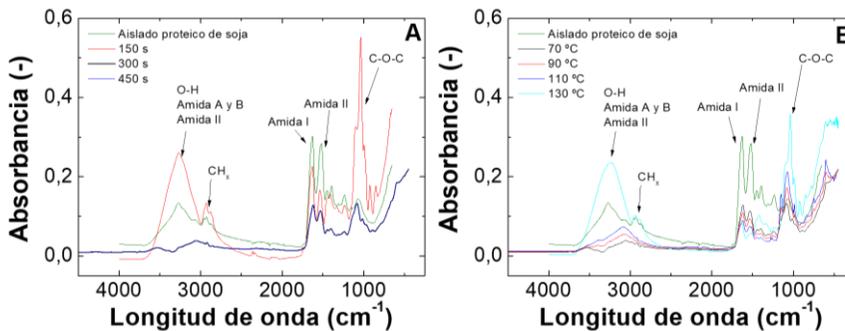


Figura 3.11. Perfiles de FTIR de las matrices bioplásticas procesadas a diferentes tiempos de compactación y 70 °C (A) y diferentes temperaturas de molde con 300 s (B).

Estas diferencias en el grado de agregación se pueden evaluar mejor en la Tabla 3.12. Así, el cambio en el tiempo de compactación (Figura 3.11A) y la temperatura del molde (Figura 3.11B) genera diferentes grados de agregación. Respecto al tiempo de compactación, 300 s genera un aumento moderado de la agregación que no mejora al aumentar el tiempo de compactación hacia 450 s. En este sentido, parece que el tiempo de compactación ayuda a mejorar la agregación de la matriz bioplástica (ya que mejora de 150 s a 300 s), pero llega a un máximo a partir del cual no provoca una mejor agregación. En cuanto a la temperatura del molde, un incremento en la temperatura provoca una mayor agregación en el sistema. En este sentido, la temperatura provoca un efecto similar al ya observado mediante extrusión.

Tabla 3.12. Agregación provocada en las diferentes matrices bioplásticas con los diferentes parámetros usados en inyección. Las diferentes letras usadas como superíndice evidencian diferencias significativas ($p < 0,05$).

Temperatura molde (°C)	Sistemas		Agregación (%)
		Tiempo de compactación (s)	
		150	15 ^a
70		300	20 ^b
		450	20 ^b
		300	24 ^c
90		300	27 ^d
110		300	29 ^e
130		300	

3.3.3.2 Enlaces disulfuro

Los enlaces disulfuro de las diferentes matrices bioplásticas procesadas se presentan en la Tabla 3.13. Estos enlaces presentan un compartimiento similar a la agregación de FTIR. En otras palabras, una mayor agregación significa que hay más enlaces disulfuro en el sistema. Por tanto, un aumento en el tiempo de compactación como en la temperatura del molde favorece la formación de enlaces S-S, mejorando la cantidad encontrada en la materia prima. De esta forma, sigue un comportamiento similar a las matrices bioplásticas extruidas, consiguiendo valores similares a los obtenidos con los sistemas extruidos.

Tabla 3.13. Enlaces disulfuro (S-S) provocada en las diferentes matrices bioplásticas con los diferentes parámetros usados en inyección. Los valores obtenidos para la materia prima (SPI) han sido incluidos a efectos comparativos. Las diferentes letras usadas como superíndice evidencian diferencias significativas ($p < 0,05$).

Temperatura molde (°C)	Sistemas		Enlaces S-S (mmol/g proteína)
		Tiempo de compactación (s)	
70		150	3052 ^a
		300	3689 ^b
		450	3702 ^b
90		300	3778 ^c
110		300	3908 ^d
130		300	3947 ^d
	SPI		2751 ^f

3.3.3.3 Grado de entrecruzamiento

El grado de entrecruzamiento de las diferentes matrices bioplásticas procesadas mediante inyección se muestra en la Tabla 3.14. Como se puede observar, el tiempo de compactación parece crear una notable subida del grado de entrecruzamiento cuando se pasa de aplicar 150 a 300 s. Sin embargo, no se producen mejorías al aplicar más tiempo. Este comportamiento puede deberse a que es necesario un tiempo mínimo para permitir el completo entrecruzamiento físico de las cadenas proteicas. No obstante, al alcanzar el grado de entrecruzamiento máximo, este no mejora, aunque la etapa de compactación se prolongue. Por otra parte, una mayor temperatura del molde si aumenta este grado de entrecruzamiento proporcionalmente, como ocurría en extrusión. Esto puede deberse a que la temperatura mejora el movimiento de las cadenas proteicas (T_g de SPI 97 °C) favoreciendo su entrecruzamiento. Así, el moldeo por inyección puede conseguir un mayor grado de entrecruzamiento que la extrusión a temperaturas menores.

Tabla 3.14. Grado de entrecruzamiento de las diferentes matrices bioplásticas con los diferentes parámetros usados en inyección. Las diferentes letras usadas como superíndice evidencian diferencias significativas ($p < 0,05$).

Sistemas		Grado de entrecruzamiento (%)
Temperatura molde (°C)	Tiempo de compactación (s)	
70	150	56 ^a
	300	70 ^b
	450	70 ^b
90	300	74 ^c
110	300	76 ^d
130	300	78 ^e

3.3.3.4 Propiedades mecánicas

Ensayos dinámicos de flexión

La Figura 3.12 muestra los resultados de los ensayos de flexión de las matrices bioplásticas procesadas usando los diferentes tiempos de compactación (Figura 3.12A) y temperaturas de molde (Figura 3.12B). Al igual que ocurría con las matrices bioplásticas procesadas por extrusión, todos los sistemas tienen dependencia de los módulos elástico (E') y viscoso (E'') con la frecuencia. De esta forma, los valores de los módulos se incrementan a frecuencias más altas. Esto demuestra la baja resistencia de estos sistemas a los esfuerzos de flexión.

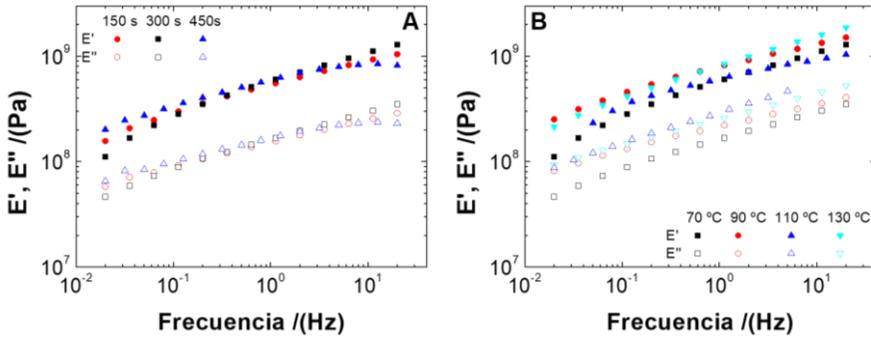


Figura 3.12. Ensayos dinámicos de flexión de las matrices bioplásticas procesadas a diferentes tiempos de compactación y 70 °C (A) y diferentes temperaturas de molde con 300 s (B).

En la Tabla 3.15 se encuentran recogidos los parámetros de flexión de los diferentes sistemas para mejorar su evaluación. En primer lugar, se puede observar que todos los sistemas tienen una tangente de pérdidas ($\tan \delta_1$) inferior a 0,3, lo que destaca su fuerte carácter sólido. En cuanto a la variación del tiempo de compactación, este es fundamental para obtener una adecuada estabilidad conformacional, lo que se observa claramente en el incremento de la deformación crítica (ϵ_{crit}) y módulo elástico (E'_1) de los sistemas al aumentar de 150 a 300 s. Sin embargo, un mayor tiempo no mostró diferencias significativas en los parámetros, aunque si se observa una tendencia creciente de los mismos. Por otro lado, el cambio en la temperatura del molde genera un aumento de los valores E'_1 , y ϵ_{crit} . Esto puede deberse al mayor entrecruzamiento de los sistemas con la temperatura, que reduce la movilidad de los sistemas.

Tabla 3.15. Parámetros de flexión de las diferentes matrices bioplásticas procesadas. Las diferentes letras usadas como superíndice en las distintas columnas evidencian diferencias significativas ($p < 0,05$).

Temperatura molde (°C)	Sistemas		ϵ_{crit} (%)	E'_1 (MPa)	$\tan \delta_1$
	Temperatura molde (°C)	Tiempo de compactación (s)			
70		150	$0,12 \pm 0,03^a$	554 ± 10^A	$0,28 \pm 0,01^I$
		300	$0,30 \pm 0,02^b$	601 ± 1^B	$0,28 \pm 0,01^I$
		450	$0,28 \pm 0,04^b$	625 ± 5^C	$0,28 \pm 0,01^I$
90		300	$0,32 \pm 0,04^{bc}$	820 ± 10^D	$0,27 \pm 0,02^I$
110		300	$0,32 \pm 0,01^{bc}$	660 ± 40^C	$0,27 \pm 0,02^I$
130		300	$0,34 \pm 0,02^c$	797 ± 25^D	$0,29 \pm 0,03^I$

Ensayos estáticos de tracción hasta la rotura

En los perfiles esfuerzo/deformación, todos los sistemas presentan un perfil similar donde se pueden observar dos zonas distinguidas: una primera zona donde el esfuerzo tiene un comportamiento lineal frente a la deformación haciendo que el estado inicial del sistema se recupere si se deja de aplicar dicha deformación (zona elástica) y otra donde la pendiente de la recta esfuerzo/deformación disminuye imposibilitando la recuperación del estado inicial del sistema (zona plástica). La comparación entre los sistemas puede realizarse a través de los arámetros característicos del ensayo (Tabla 3.16). Como puede verse, entre 150 s y 300 s se observa un incremento del esfuerzo máximo (σ_{max}), de la deformación en la rotura (ϵ_{max}) y del módulo de Young (E), aunque este último no resulta significativo. Este comportamiento está relacionado con el menor grado de estructuración de la matriz bioplástica para un tiempo de compactación de 150 s. De hecho, el grado de entrecruzamiento físico entre las cadenas proteicas es inferior al resto. Sin embargo, un aumento del tiempo de compactación hasta 450 s no se traduce en un mayor grado de entrecruzamiento como se comentó

anteriormente (Tabla 3.14). Así, el único parámetro que se modifica significativamente entre 300 y 450 s es ϵ_{\max} que se reduce, indicando la ineficacia de prolongar el tiempo de compactación más allá de 300 s para mejorar las propiedades mecánicas, lo que hace que 300 s sea un tiempo óptimo.

Tabla 3.16. Parámetros de tracción de las diferentes matrices bioplásticas procesadas por inyección. Las diferentes letras usadas como superíndice en las distintas columnas evidencian diferencias significativas ($p < 0,05$).

Sistemas		σ_{\max} (MPa)	E (MPa)	ϵ_{\max} (mm/mm)
Temperatura molde (°C)	Tiempo de compactación (s)			
70	150	$0,18 \pm 0,15^a$	5 ± 3^a	$0,07 \pm 0,03^a$
	300	$0,82 \pm 0,20^b$	7 ± 1^a	$0,38 \pm 0,01^b$
	450	$0,74 \pm 0,16^b$	8 ± 4^{ac}	$0,15 \pm 0,05^a$
90	300	$1,37 \pm 0,21^c$	27 ± 4^b	$1,00 \pm 0,32^c$
110	300	$1,42 \pm 0,15^c$	4 ± 2^a	$1,13 \pm 0,21^c$
130	300	$2,73 \pm 0,30^d$	17 ± 7^c	$1,47 \pm 0,30^c$

Por otro lado, el aumento del grado de entrecruzamiento físico con la temperatura del molde supuso un aumento en σ_{\max} y ϵ_{\max} aunque en este último caso las diferencias no son significativas entre 90 y 130 °C. El efecto sobre el módulo de Young es el mismo entre 70 y 90 °C pero un aumento posterior produce un efecto contrario, similar al o que sucede con el módulo elástico E'_1 (Figura 3.30B). Este comportamiento parece indicar que las temperaturas de moldeo más altas que se mantienen durante el periodo de compactación pueden ejercer cierto efecto negativo sobre la matriz, contrapuesto al de aumento en el grado de entrecruzamiento físico encontrado.

3.3.3.5 Capacidad de absorción de agua

La Figura 3.13 muestra los resultados de las pruebas de capacidad de absorción de agua de los diferentes bioplásticos. Como se puede observar

en la Figura 3.13A, las matrices bioplásticas procesadas a tiempos de compactación más cortos que 300 s no soportaron las pruebas de absorción de agua, ya que se desintegraron cuando se introdujeron en agua. Estos resultados podrían esperarse debido a las bajas propiedades mecánicas obtenidas a las 150 s de compactación, las cuales no fueron suficientes para soportar el hinchamiento del sistema. Esto indica que las matrices bioplásticas necesitan un tiempo mínimo de formación (curado) después de su inyección para cumplir con las especificaciones solicitadas. Entre 300 y 450 s de compactación, no hubo diferencias significativas en la capacidad de absorción de agua y pérdida de material soluble de los sistemas, aunque si hubo diferencias en las propiedades mecánicas. Lo que hace intuir que es necesario cierta estructuración para conseguir que el sistema absorba agua sin desintegrarse, aunque la variación creada entre 300 y 450 s no es suficiente para modificar esta capacidad de absorción.

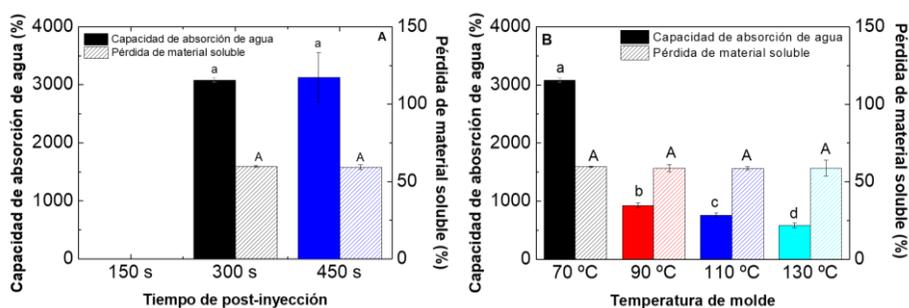


Figura 3.13. Capacidad de absorción de agua y pérdida de material soluble de las matrices bioplásticas procesadas a diferentes tiempos de compactación y 70 °C (A) y diferentes temperaturas de molde con 300 s (B). Las diferentes letras usadas como superíndice en las distintas columnas evidencian diferencias significativas ($p < 0,05$).

Por otro lado, un aumento en la temperatura de molde (Figura 3.13B), implica un descenso en la capacidad de absorción de agua de los sistemas, pasando de tener una capacidad superabsorbente (>1000%) a

70 °C a perderla a más de 90 °C. Esto puede deberse al mayor entrecruzamiento provocado por la temperatura del molde que condiciona el hinchamiento de la matriz bioplástica. De esta forma, las matrices bioplásticas con un mayor entrecruzamiento conducen a sistemas con mejores propiedades mecánicas que son menos susceptibles al hinchamiento, por lo que su capacidad de absorción de agua es menor. Sin embargo, su pérdida de material soluble se mantiene constante y cercana al 60%, la cual corresponde a la glicerina que es liberada en el agua, junto con una pequeña parte de la proteína soluble.

3.3.4 Comparación de los diferentes procesados

Una comparación de las matrices bioplásticas procesadas por extrusión e inyección puede observarse en la Tabla 3.17. Ambos procesados pueden provocar un grado de entrecruzamiento similar sobre el aislado proteico de soja para formar las matrices bioplásticas.

Tabla 3.17. Parámetros de las matrices bioplásticas procesadas por extrusión e inyección.

Parámetros		Extrusión	Inyección
Grado de entrecruzamiento (%)		72 – 78	56 – 78
Flexión	ϵ_{crit} (%)	0,12 – 0,30	0,12 – 0,34
	E'_1 (MPa)	12 – 57	554 – 820
	$\tan \delta_1$ (-)	0,21 – 0,27	0,27 – 0,29
Tracción	σ_{max} (MPa)	0,16 – 0,70	0,18 – 2,73
	E (MPa)	5 – 32	4 – 27
	ϵ_{max} (mm/mm)	0,02 – 0,10	0,07 – 1,47
Capacidad de absorción de agua (%)		470 – 1200	580 – 3000
Pérdida de material soluble (%)		55 – 60	55 – 60

Sin embargo, el moldeo por inyección permite obtener matrices bioplásticas con mejores propiedades mecánicas (mayores ϵ_{crit} y E'_1 a flexión y mayores σ_{max} y ϵ_{max} a tracción) y una capacidad de absorción de agua superior. De esta forma, aunque ambos procesados permiten

obtener unas matrices bioplásticas con las propiedades adecuadas para ser usadas como soporte para la liberación controlada de fertilizante, el moldeo por inyección podría presentar mayor versatilidad a estos sistemas.

3.3.5 *Evaluación del reforzamiento físico*

Finalmente, se evaluó la posibilidad de añadir una etapa posterior de reforzamiento tras el procesado de la matriz bioplástica. Esta etapa tiene el objetivo de mejorar las propiedades mecánicas de las matrices bioplásticas procesadas a temperaturas más moderadas sin empeorar de manera drástica su capacidad de absorción de agua. De esta forma, se utilizó como matriz bioplástica de referencia aquella procesada por inyección con una temperatura de molde de 70 °C y con 300 s de tiempo de compactación. Esta matriz bioplástica se sometió a un tratamiento dehidrotérmico (DHT) a 50 °C o un tratamiento con ultrasonidos (US, 100 W) usando diferentes tiempos de aplicación.

3.3.5.1 Grado de entrecruzamiento relativo

El grado de entrecruzamiento inducido por cada una de las etapas de reforzamiento se muestra en la Tabla 3.18. Es importante mencionar que en este caso se utilizó la matriz bioplástica de referencia (aquella procesada con una temperatura de molde de 70 °C y un tiempo de compactación de 300 s sin etapa de reforzamiento) como control (0% de entrecruzamiento). Así, el grado de entrecruzamiento relativo es aquel que se debe únicamente a la etapa de reforzamiento y no al moldeo por inyección de la materia prima.

Tabla 3.18. Grado de entrecruzamiento relativo de las diferentes matrices bioplásticas sometidas a los diferentes tratamientos de reforzamiento: tratamiento dehidrotérmico (DHT) y ultrasonidos (US). Las diferentes letras usadas como superíndice evidencian diferencias significativas ($p < 0,05$).

Sistemas		Grado de entrecruzamiento relativo (%)
DHT	4 h	1 ^a
	24 h	22 ^b
US	5 min	2 ^a
	45 min	19 ^b

Como se puede observar, el uso de un postratamiento prolongado (24 h de DHT o 45 min de US) provocó un mayor grado de entrecruzamiento, aunque sin diferencias significativas entre ambos tratamientos. Por otro lado, a tiempos cortos, ninguno de los dos tratamientos indujo un alto grado de entrecruzamiento. En este sentido, cabe señalar que el tratamiento de US necesita mucho menos tiempo para provocar el mismo entrecruzamiento que el DHT (varios minutos en lugar de varias horas). Este hecho podría ser determinante en su fabricación a gran escala ya que un menor tiempo de procesamiento puede reducir los costos del producto haciéndolo más competitivo en el mercado (Fowler *et al.*, 2006), siempre que este menor tiempo de procesamiento no genere costos adicionales al proceso. Por lo tanto, las dos alternativas parecen producir algún grado de entrecruzamiento, siendo un método más ecológico que la adición de otras sustancias químicas (como el glutaraldehído) que pueden producir contaminación ambiental o toxicidad a las plantas. Sin embargo, sería importante evaluar la huella de carbono que causan los diferentes métodos de fortalecimiento físico, ya que un exceso en su uso puede causar problemas de calentamiento global.

3.3.5.2 Propiedades mecánicas

Ensayos dinámicos de flexión

La Figura 3.14 muestra la evolución del módulo elástico (E') y viscoso (E'') en el rango de frecuencia estudiado en los ensayos de flexión. Todas las matrices bioplásticas mostraron una dependencia de los módulos con la frecuencia. Esta dependencia es mayor en las matrices bioplásticas tratadas con US, ya que su pendiente es más pronunciada que en aquellas tratadas térmicamente, además de presentar valores de E' y E'' menores.

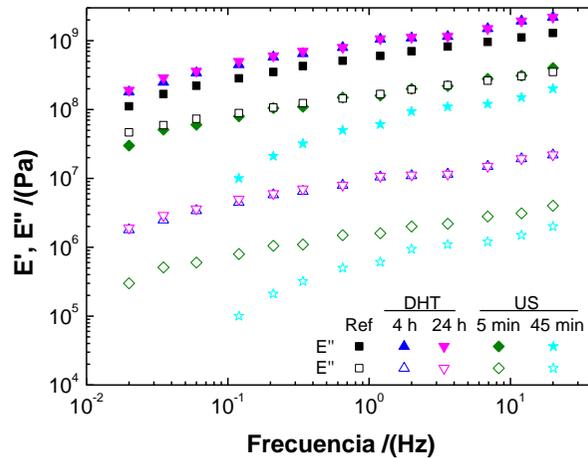


Figura 3.14. Ensayos dinámicos de flexión de las matrices bioplásticas procesadas por inyección (90 °C, 300 s) sometidas a los diferentes tratamientos de reforzamiento: tratamiento dehidrotérmico (DHT) y ultrasonidos (US).

La Tabla 3.19 muestra los parámetros característicos de este ensayo. Como se puede observar, el tratamiento dehidrotérmico mejora la deformación crítica (ϵ_{crit}) y el módulo elástico (E'_1) de los sistemas, mientras que un tratamiento con ultrasonidos los empeora. Estos resultados incitan a pensar que un tratamiento prolongado con temperatura genera un fortalecimiento de la matriz bioplástica (Fernández-Espada *et al.*, 2016b; Álvarez-Castillo *et al.*, 2018). Sin

embargo, el tratamiento de ultrasonidos, aunque induce un mayor grado de entrecruzamiento que el sistema de referencia, parece producir destrucción estructural del entramado, dando lugar a una estructura con agregados mayores pero con menor interacción y, por tanto, más débil. En cuanto a la tangente de pérdidas ($\tan \delta_1$), se mantuvo invariante y por debajo de 0,3 en todos los sistemas analizados. Esto refleja el alto carácter sólido de los sistemas, que no se vio alterado por la inclusión de una etapa adicional de reforzamiento. Este carácter sólido también se observó en estudios previos (Bourny *et al.*, 2017; Perez-Puyana *et al.*, 2022)..

Tabla 3.19. Parámetros de flexión de las diferentes matrices bioplásticas sometidas a los diferentes tratamientos de reforzamiento: tratamiento dehidrotérmico (DHT) y ultrasonidos (US). Las diferentes letras usadas como superíndice en las distintas columnas evidencian diferencias significativas ($p < 0,05$).

Sistemas		ϵ_{crit} (%)	E'_1 (MPa)	$\tan \delta_1$
Referencia		$0,30 \pm 0,02^a$	601 ± 1^A	$0,28 \pm 0,01^I$
DHT	4 h	$0,42 \pm 0,03^b$	1050 ± 200^B	$0,29 \pm 0,01^I$
	24 h	$0,50 \pm 0,02^c$	1070 ± 200^B	$0,28 \pm 0,01^I$
US	5 min	$0,22 \pm 0,05^d$	160 ± 40^C	$0,26 \pm 0,07^I$
	45 min	$0,20 \pm 0,07^d$	61 ± 1^D	$0,27 \pm 0,10^I$

Ensayos estáticos de tracción hasta la rotura

Nuevamente, los perfiles esfuerzo/deformación de las matrices bioplásticas estudiadas tuvieron un perfil con dos zonas: una elástica y otra plástica, como los observados anteriormente. La Tabla 3.20 muestra el esfuerzo máximo (σ_{max}), el módulo de Young (E) y la deformación a

la rotura (ϵ_{\max}) de las diferentes matrices bioplásticas. El tratamiento dehidrotérmico provocó una mejora en los tres parámetros (σ_{\max} , E y ϵ_{\max}), aunque sin diferencias significativas entre los diferentes tiempos de tratamiento. Sin embargo, el tratamiento con ultrasonidos no mejoró significativamente ninguno de los parámetros de tracción de la matriz bioplástica, ni en tiempos cortos ni largos. Estos resultados sugieren que un tratamiento con temperatura mejora las propiedades mecánicas a tracción de las matrices bioplásticas, siendo consistentes con los resultados obtenidos en los ensayos de flexión. Así, un tratamiento térmico provoca un fortalecimiento de las uniones biopoliméricas, mientras que un tratamiento con ultrasonidos las debilitó (flexión) o no modificó su comportamiento (tracción).

Tabla 3.20. Parámetros de tracción de las diferentes matrices bioplásticas sometidas a los diferentes tratamientos de reforzamiento: tratamiento dehidrotérmico (DHT) y ultrasonidos (US). Las diferentes letras usadas como superíndice en las distintas columnas evidencian diferencias significativas ($p < 0,05$).

Sistemas		σ_{\max} (MPa)	E (MPa)	ϵ_{\max} (mm/mm)
Referencia		$0,82 \pm 0,20^a$	7 ± 1^a	$0,38 \pm 0,01^a$
DHT	4 h	$3,00 \pm 0,75^b$	18 ± 1^b	$1,60 \pm 0,25^b$
	24 h	$3,50 \pm 1,50^b$	27 ± 7^b	$1,15 \pm 0,20^b$
US	5 min	$0,75 \pm 0,20^a$	8 ± 1^a	$0,45 \pm 0,20^a$
	45 min	$1,5 \pm 0,25^a$	6 ± 1^a	$0,52 \pm 0,15^a$

3.3.5.3 Capacidad de absorción de agua

Las medidas de la capacidad de absorción de agua y la pérdida de material soluble se muestran en la Figura 3.15. Considerando la pérdida de material soluble, no hubo diferencias significativas entre los sistemas,

donde en todos los casos se pierde toda la glicerina, por su carácter hidrofílico, y la parte soluble de la proteína (alrededor del 10% en peso).

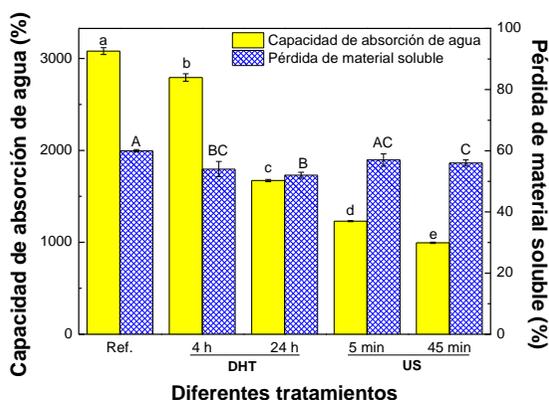


Figura 3.15. Capacidad de absorción de agua y pérdida de material soluble de las matrices bioplásticas sometidas a los diferentes tratamientos de reforzamiento: tratamiento dehidrotérmico (DHT) y ultrasonidos (US). Las diferentes letras usadas como superíndice en las distintas columnas evidencian diferencias significativas ($p < 0,05$).

Por otro lado, hubo grandes diferencias entre la capacidad de absorción de agua de las diferentes matrices bioplásticas. El tratamiento dehidrotérmico provocó una disminución de la capacidad de absorción de agua de las matrices bioplásticas, que es más significativa conforme se aumenta el tiempo de este tratamiento. Sin embargo, no se pierde la funcionalidad superabsorbente del bioplástico. Estos resultados muestran que, si bien existe un fortalecimiento del sistema, mejorando sus propiedades mecánicas, este no se consolidó lo suficiente. En consecuencia, las matrices bioplásticas podrían hincharse para retener una mayor cantidad de agua cuando se aumenta la temperatura del molde en el estudio anterior.

El tratamiento de ultrasonidos también empeoró la capacidad de absorción de agua de las matrices bioplásticas, que quedaron al límite de ser considerados superabsorbentes. Estos resultados no son consistentes

con los obtenidos en estudios previos (Álvarez-Castillo *et al.*, 2018), ya que estos predijeron que las propiedades mecánicas de las matrices bioplásticas estaban íntimamente ligadas con su capacidad de absorción de agua, la cual empeora cuando mejores propiedades mecánicas presentan los sistemas. En este caso, esta predicción no se cumple, lo que puede deberse a la modificación estructural producida por el tratamiento US que se comentó anteriormente. Así, la proteína pierde su capacidad de crear puentes de hidrógeno con el agua, lo que empeora su capacidad de retención.

3.3.5.4 SEM

Se realizaron imágenes de SEM de los diferentes sistemas antes y después de los ensayos de la capacidad de absorción de agua. Las imágenes de las matrices bioplásticas antes (A, B y C) y después (A', B' y C') de la inmersión en agua se pueden ver en la Figura 3.16. Antes de la absorción de agua, los diferentes tratamientos realizados sobre los bioplásticos repercutían en la microestructura de los sistemas. El sistema de referencia (A) fue el que presentó un mayor número de poros, los cuales también fueron más grandes que en el resto de los sistemas. Esto se debe a la menor estructuración de las matrices bioplásticas. Esta menor estructuración indujo una mayor capacidad de absorción de agua, con el consiguiente hinchamiento y apertura de la estructura reflejado en el aumento en el número y tamaño de los poros en la microestructura (A').

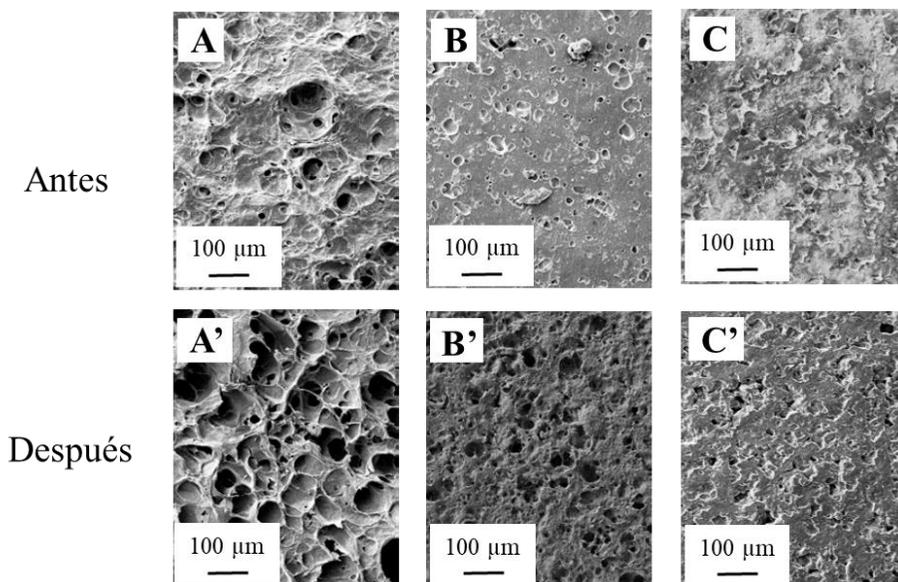


Figura 3.16. Imágenes de SEM de las matrices bioplásticas sometidas a los diferentes tratamientos de reforzamiento. *A, A'*: Matriz bioplástica de referencia. *B, B'*: tratamiento dehidrotérmico (DHT). *C, C'*: tratamiento con ultrasonidos (US).

Por otro lado, cualquier adición de una etapa de reforzamiento condujo a una estructura menos porosa (B y C), probablemente debido al refuerzo producido por el entrecruzamiento logrado. Así, la aplicación de un tratamiento dehidrotérmico provocó una reducción en el tamaño de los poros de la matriz bioplástica (B), con el consiguiente menor hinchamiento durante la absorción (B'). Por este motivo, se reduce la capacidad de absorción de agua en estos sistemas. En cuanto a la matriz bioplástica sometida al tratamiento con ultrasonidos (C), se puede observar que el US provocó una modificación de la microestructura respecto al sistema de referencia, presentando un gran número de pequeños poros que no variaron tras la inmersión en agua (C'). Esta modificación, provocada por el tratamiento US conduce a una estructura más fraccionada que la obtenida con el DHT, antes de la etapa de absorción. Esto viene a refrendar la disminución de interconectividad entre los agregados mencionada anteriormente.

3.4 Conclusiones

El subproducto de soja demostró su potencial para producir bioplásticos. De esta forma, su componente mayoritario es la proteína, por lo que puede ser considerado como un aislado proteico. Además, es un biopolímero de especial interés para el procesado de matrices bioplásticas con uso en horticultura. Conjuntamente, esta materia prima no presenta grandes impurezas ni desnaturalizaciones que dificulten su uso como materia prima para la elaboración de matrices bioplásticas.

Respecto al procesado de matrices bioplásticas, tanto la extrusión como la inyección permitieron la obtención de sistemas con buenas propiedades. La extrusión permite obtener matrices bioplásticas con diversas propiedades mecánicas y capacidad de absorción de agua a través del perfil de temperatura y cizalla utilizados. De esta forma, un incremento en la temperatura permite producir matrices bioplásticas con mejor resistencia mecánica, aunque con peor capacidad de absorción de agua.

Análogamente, la inyección permite obtener matrices bioplásticas con mejor resistencia mecánica y capacidad absorción de agua que la extrusión. En este caso, es necesario un tiempo de compactación mínimo para que se procese la matriz bioplástica (>150 s) con unas propiedades mínimas para poder absorber agua sin desintegrarse. Además, como en el caso de la extrusión, el aumento de la temperatura (en este caso en el molde) permite mejorar las propiedades mecánicas de las matrices bioplásticas, aunque reduce la capacidad de absorción de agua.

Por otra parte, una etapa adicional de reforzamiento físico puede permitir mejorar las propiedades finales de las matrices bioplásticas. En

este sentido, el tratamiento dehidrotérmico genera un entrecruzamiento físico de las cadenas proteicas lo que mejora las propiedades mecánicas de los bioplásticos sin alterar en gran medida su capacidad de absorción de agua, permitiendo que mantengan su capacidad superabsorbente. Por otro lado, el tratamiento con ultrasonidos provoca una agregación de las proteínas que genera un cambio en la estructura de la matriz bioplástica con una disminución en la capacidad de absorción de agua y un empeoramiento de las propiedades mecánicas. Por lo que no es un tratamiento adecuado para reforzar estos materiales a base de proteína de soja.

Finalmente, este capítulo abre la posibilidad de crear matrices bioplásticas biodegradables, sostenibles y competitivas a partir de un subproducto agroalimentario como es el aislado proteico de soja, haciendo que el consumo de plásticos sea más limpio sin crear problemas de contaminación.

3.5 Concluding remarks

The soybean by-product demonstrated its potential to produce bioplastics. In this way, its main component is protein, so it can be considered a protein isolate. In addition, it is a biopolymer of particular interest for the processing of bioplastic matrices that can be used in horticulture. Furthermore, this raw material does not have large impurities or denaturation that hinder its use as raw material for the production of bioplastic matrices.

Regarding the processing of bioplastic matrices, both extrusion and injection allow for obtaining systems with good properties. Extrusion permits the obtention of bioplastic matrices with different mechanical properties and water absorption capacity through the temperature used. In this way, an increase in temperature allows the production of bioplastic matrices with better mechanical resistance, although with poorer water absorption capacity.

Similarly, injection allows obtaining bioplastic matrices with better mechanical resistance and water absorption capacity than extrusion. In this case, a minimum post-injection time is necessary for the bioplastic matrix to be processed (>150 s) with minimum properties to be able to absorb water without disintegrating. In addition, as in the case of extrusion, the increase in temperature (in this case in the mold) improves the mechanical properties of bioplastic matrices, although it reduces their water absorption capacity.

On the other hand, an additional stage of physical strengthening can improve the final properties of the bioplastic matrices. In this sense, dehydrothermal treatment generates a protein crosslinking that improves

the mechanical properties of bioplastics without significantly altering their water absorption capacity, allowing them to maintain their superabsorbent capacity. On the other hand, the ultrasound treatment causes a protein aggregation which produces a change in the structure of the bioplastic matrix with a decrease in the water absorption capacity and a worsening of the mechanical properties. Therefore, it is not a suitable treatment to reinforce these materials based on soy protein.

Finally, this chapter opens the possibility of creating sustainable and competitive bioplastic matrices from an agri-food by-product such as soy protein isolate, making the consumption of plastics cleaner without creating pollution problems.

Agradecimientos

Este capítulo ha sido posible gracias a la estancia de investigación realizada en el Instituto Nacional para la Investigación Agronómica (INRAE) de Nantes (Francia) financiada por la Universidad de Sevilla a través de sus ayudas a estancias del VI Plan Propio de Investigación. Especialmente, se agradece al Profesor Dennis Lourdin por tutorizar dicha estancia y a Jean-Eudes Maigret por su ayuda en el laboratorio. Además, se agradece a los servicios de Microanálisis, Microscopía y Caracterización Funcional del Centro de Investigación, Tecnología e Innovación de la Universidad de Sevilla (CITIUS) por su asesoramiento durante los ensayos realizados en sus instalaciones.

Publicaciones relacionadas

Jiménez-Rosado, M., Bouroudian, E., Perez-Puyana, V., Guerrero, A. y Romero, A. (2020). Evaluation of different strengthening methods in the mechanical and functional properties of soy protein-based bioplastics. *Journal of Cleaner Production*, 262, 121517.

Jiménez-Rosado, M., Rubio-Valle, J. F., Perez-Puyana, V., Guerrero, A. y Romero, A. (2020). Use of heat treatment for the development of protein-based bioplastics. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 18, 100341.

Jiménez-Rosado, M., Rubio-Valle, J. F., Pérez-Puyana, V., Guerrero, A. y Romero, A. (2021). Comparison between pea and soy protein-based bioplastics obtained by injection molding. *Journal of Applied Polymer Science*, 138, 50412.

Jiménez-Rosado, M., Maigret, J.-E., Pérez-Puyana, V., Romero, A. y Lourdin, D. (2022). Revaluation of a soy protein by-product in eco-friendly bioplastics by extrusion. *Journal of Polymers and the Environment*, 30, 1587-1599.

Referencias

Abedi, T., Alemzadeh, A. y Kazemeini, S. A. (2010) "Effect of organic and inorganic fertilizers on grain yield and protein banding pattern of wheat", *Australian Journal of Crop Science*, 4(6), pp. 384–389.

Adamy, M. y Verbeek, C. J. R. (2013) "Injection-Molding Performance and Mechanical Properties of Blood Meal-Based Thermoplastics", *Advances in Polymer Technology*. Wiley, 32(3), pp. 1–9.

Alonso-González, M., Felix, M., Guerrero, A. y Romero, A. (2021) "Effects of Mould Temperature on Rice Bran-Based Bioplastics Obtained by Injection Moulding", *Polymers*, 13(3), p. 398.

Alonso-González, M., Felix, M. y Romero, A. (2021) "Development of malt sprout-based bioplastics via injection-moulding", *Industrial Crops and Products*, 162, p. 113267.

Álvarez-Castillo, E., J. del Toro, A., Aguilar, J. M. J. M., Bengoechea, C. y Guerrero, A. (2018) "Optimization of a thermal process for the production of superabsorbent materials based on a soy protein isolate", *Industrial Crops and Products*, 125, pp. 573–581.

Baslé, E., Joubert, N. y Pucheault, M. (2010) "Protein Chemical Modification on Endogenous Amino Acids", *Chemistry & Biology*, 17(3), pp. 213–227.

Bourny, V., Perez-Puyana, V., Felix, M., Romero, A. y Guerrero, A. (2017) "Evaluation of the injection moulding conditions in soy/nanoclay based composites", *European Polymer Journal*, 95, pp. 539–546.

Carvajal-Piñero, Juan María, Ramos, M., Jiménez-Rosado, M., Perez-Puyana, V. y Romero, A. (2019) "Development of Pea Protein Bioplastics by a Thermomoulding Process: Effect of the Mixing Stage", *Journal of Polymers and the Environment*, 27, pp. 968-978.

Chidambarampadmavathy, K., Karthikeyan, O. P. y Heimann, K. (2017) "Sustainable bio-plastic production through landfill methane recycling", *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 71, pp. 555–562.

Colla, G., Hoagland, L., Ruzzi, M., Cardarelli, M., Bonini, P., Canaguier, R. y Roupheal, Y. (2017) "Biostimulant Action of Protein Hydrolysates: Unraveling Their Effects on Plant Physiology and Microbiome", *Frontiers in Plant Science*, 8, pp. 1–14.

Crini, G. (2005) "Recent developments in polysaccharide-based materials used as adsorbents in wastewater treatment", *Progress in Polymer Science*, 30(1), pp. 38–70.

Cuadri, A. A., Romero, A., Bengoechea, C. y Guerrero, A. (2017) "Natural superabsorbent plastic materials based on a functionalized soy protein", *Polymer Testing*, 58, pp. 126–134.

Cuadri, A. A., Romero, A., Bengoechea, C. y Guerrero, A. (2018) "The Effect of Carboxyl Group Content on Water Uptake Capacity and Tensile Properties of Functionalized Soy Protein-Based Superabsorbent Plastics", *Journal of Polymers and the Environment*, 26, pp. 2934–2944.

Emin, M. A. y Schuchmann, H. P. (2017) "A mechanistic approach to analyze extrusion processing of biopolymers by numerical, rheological, and optical methods", *Trends in Food Science & Technology*, 60, pp. 88–95.

Félix, M., Lucio-Villegas, A., Romero, A. y Guerrero, A. (2016) "Development of rice protein bio-based plastic materials processed by injection molding", *Industrial Crops & Products*, 79, pp. 152–159.

Félix, M., Martín-Alfonso, J. E., Romero, A. y Guerrero, A. (2014) "Development of albumen/soy biobased plastic materials processed by injection molding", *Journal of Food Engineering*, 125(1), pp. 7–16.

Felix, Manuel, Perez-Puyana, V., Romero, A. y Guerrero, A. (2017)

"Production and Characterization of Bioplastics Obtained by Injection Moulding of Various Protein Systems.", *Journal of Polymers & the Environment*, 25(1), pp. 91–100.

Felix, M., Perez-Puyana, V., Romero, A. y Guerrero, A. (2017) "Production and Characterization of Bioplastics Obtained by Injection Moulding of Various Protein Systems", *Journal of Polymers and the Environment*, 25(1), pp. 91–100.

Fernández-Espada, L., Bengoechea, C., Cordobés, F. y Guerrero, A. (2016a) "Protein/glycerol blends and injection-molded bioplastic matrices: Soybean versus egg albumen", *Journal of Applied Polymer Science*, 133(6), p. 42980.

Fernández-Espada, L., Bengoechea, C., Cordobés, F. y Guerrero, A. (2016b) "Thermomechanical properties and water uptake capacity of soy protein-based bioplastics processed by injection molding", *Journal of Applied Polymer Science*, 133(24), p. 43524.

Fernández-Espada, L., Bengoechea, C., Sandía, J. A., Cordobés, F. y Guerrero, A. (2019) "Development of novel soy-protein-based superabsorbent matrixes through the addition of salts", *Journal of Applied Polymer Science*, 136(5), p. 47012.

Fowler, P. A., Hughes, J. M. y Elias, R. M. (2006) "Biocomposites: Technology, environmental credentials and market forces", *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, pp. 1781-1789.

Gamero, S., Jiménez-Rosado, M., Romero, A., Bengoechea, C. y Guerrero, A. (2019) "Reinforcement of Soy Protein-Based Bioplastics Through Addition of Lignocellulose and Injection Molding Processing Conditions", *Journal of Polymers and the Environment*, 27(6), pp. 1285–1293.

Gedde, U. W. y Hedenqvist, M. S. (2019) *Fundamental Polymer Science*. Cham: Springer International Publishing (Graduate Texts in Physics).

Giosafatto, C., Al-Asmar, A., D'Angelo, A., Roviello, V., Esposito, M. y Mariniello, L. (2018) "Preparation and Characterization of Bioplastics from Grass Pea Flour Cast in the Presence of Microbial Transglutaminase", *Coatings*, 8(12), p. 435.

Giroto, F., Alibardi, L. y Cossu, R. (2015) "Food waste generation and industrial uses: A review", *Waste Management*, 45, pp. 32–41.

Hernandez-Izquierdo, V. y Krochta, J. (2008) "Thermoplastic processing of proteins for film formation--a review.", *Journal of food science*, 73(2), pp. R30-9.

Jansens, K. J. A., Vo Hong, N., Telen, L., Brijs, K., Lagrain, B., Van Vuure, A. W., Van Acker, K., Verpoest, I., Van Puyvelde, P., Goderis, B., Smet, M. y Delcour, J. A. (2013) "Effect of molding conditions and moisture content on the mechanical properties of compression molded glassy, wheat gluten bioplastics", *Industrial Crops and Products*, 44, pp. 480–487.

Jerez, A., Partal, P., Martínez, I., Gallegos, C. y Guerrero, A. (2007) "Protein-based bioplastics: effect of thermo-mechanical processing", *Rheologica Acta*, 46(5), pp. 711–720.

Jiménez-Rosado, M., Perez-Puyana, V., Sánchez-Cid, P., Guerrero, A. y Romero, A. (2021) "Incorporation of zno nanoparticles into soy protein-based bioplastics to improve their functional properties", *Polymers*, 13(4), 486.

Jiménez-Rosado, M., Zarate-Ramírez, L. S., Romero, A., Bengoechea, C., Partal, P. y Guerrero, A. (2019) "Bioplastics based on wheat gluten processed by extrusion", *Journal of Cleaner Production*, 239, p. 117994.

Lu, X., Cui, Y., Guan, J., Liu, X., Zhu, H., Ji, X., Zheng, J., Cheng, Y. y Fu, X. (2020) "Establishment of two-dimensional gel electrophoresis for soybean protein isolate and its application", *Grain & Oil Science and Technology*, 3(3), pp. 100–109.

Malhotra, A. y Coupland, J. N. (2004) "The effect of surfactants on the solubility, zeta potential, and viscosity of soy protein isolates", *Food Hydrocolloids*, 18(1), pp. 101–108.

Mariana, M., Alfatah, T., H.P.S., A. K., Yahya, E. B., Olaiya, N. G., Nuryawan, A., Mistar, E. M., Abdullah, C. K., Abdulmadjid, S. N. y Ismail, H. (2021) "A current advancement on the role of lignin as sustainable reinforcement material in biopolymeric blends", *Journal of Materials Research and Technology*, 15, pp. 2287–2316.

Marichelvam, Jawaid y Asim (2019) "Corn and Rice Starch-Based Bio-Plastics as Alternative Packaging Materials", *Fibers*, 7(4), p. 32.

Martínez, I., Partal, P., García-Morales, M., Guerrero, A. y Gallegos, C. (2013) "Development of protein-based bioplastics with antimicrobial activity by thermo-mechanical processing", *Journal of Food Engineering*, 117, pp. 247-254.

Maruyama, N., Adachi, M., Takahashi, K., Yagasaki, K., Kohno, M., Takenaka, Y., Okuda, E., Nakagawa, S., Mikami, B. y Utsumi, S. (2001) "Crystal structures of recombinant and native soybean β -conglycinin β homotrimers", *European Journal of Biochemistry*, 268(12), pp. 3595–3604.

Michels, J., Widmann, R., Czaderski, C., Allahvirdizadeh, R. y Motavalli, M. (2015) "Glass transition evaluation of commercially available epoxy resins used for civil engineering applications", *Composites Part B: Engineering*, 77, pp. 484–493.

Mohanty, A. K., Tummala, P., Liu, W., Misra, M., Mulukutla, P. V y Drzal, L. T. (2005) "Injection Molded Biocomposites from Soy Protein Based Bioplastic and Short Industrial Hemp Fiber", *Journal of Polymers and the Environment*, 13(3), pp. 279–285.

Numata, K. (2020) "How to define and study structural proteins as biopolymer materials", *Polymer Journal*, 52(9), pp. 1043–1056.

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (2022) *Datos de alimentación y agricultura*. Disponible en: <http://www.fao.org/> (Accedido: Marzo 28, 2022).

Ottenhof, M.-A. y Farhat, I. A. (2004) "The effect of gluten on the retrogradation of wheat starch", *Journal of Cereal Science*, 40(3), pp. 269–274.

Park, K., Shalaby, W. S. W. y Park, H. (1993) *Biodegradable hydrogels for drug delivery*. Boca Raton: CRC Press.

Pearson, A. (1983) "Developments in food proteins", en *Soy proteins*. Londres: Applied Science Publishers Ltd., pp. 67–108.

Perez-Puyana, V., Cuartero, P., Jiménez-Rosado, M., Martínez, I. y Romero, A. (2022) "Physical crosslinking of pea protein-based bioplastics: Effect of heat and UV treatments", *Food Packaging and Shelf Life*, 32, p. 100836.

Perez, V., Felix, M., Romero, A. y Guerrero, A. (2016) "Characterization of pea protein-based bioplastics processed by injection moulding", *Food and Bioproducts Processing*. Institution of Chemical Engineers, 97, pp. 100–108.

Pommet, M., Redl, A., Morel, M.-H., Domenek, S. y Guilbert, S. (2003) "Thermoplastic processing of protein-based bioplastics: chemical engineering aspects of mixing, extrusion and hot molding", *Macromolecular Symposia*, 197(1), pp. 207–218.

Schwenke, K. D. (1988) "Improving of functional properties of oilseed and legume proteins by structural changes", *Acta Alimentaria Polonica*, 14, pp. 15–23.

Siracusa, V. y Blanco, I. (2020) "Bio-Polyethylene (Bio-PE), Bio-Polypropylene (Bio-PP) and Bio-Poly(ethylene terephthalate) (Bio-PET): Recent Developments in Bio-Based Polymers Analogous to Petroleum-Derived Ones for Packaging and Engineering Applications", *Polymers*, 12(8), p. 1641.

Türker-Kaya, S. y Huck, C. (2017) "A Review of Mid-Infrared and Near-

Infrared Imaging: Principles, Concepts and Applications in Plant Tissue Analysis", *Molecules*, 22(1), p. 168.

Verbeek, C. y Van Den Berg, L. (2010) "Extrusion processing and properties of protein-based thermoplastics", *Macromolecular Materials and Engineering*, 295, pp. 10-21.

Verbeek, C. J. R. y Van Den Berg, L. E. (2009) "Recent Developments in Thermo-Mechanical Processing of Proteinous Bioplastics", *Recent Patents on Materials Science*, 2(3), pp. 171–189.

Wang, C., Jiang, L., Wei, D., Li, Y., Sui, X., Wang, Z. y Li, D. (2011) "Effect of Secondary Structure determined by FTIR Spectra on Surface Hydrophobicity of Soybean Protein Isolate", *Procedia Engineering*, 15, pp. 4819–4827.

Yamada, M., Morimitsu, S., Hosono, E. y Yamada, T. (2020) "Preparation of bioplastic using soy protein", *International Journal of Biological Macromolecules*, 149, pp. 1077-1083.

Zárate-Ramírez, L. S., Martínez, I., Romero, A., Partal, P. y Guerrero, A. (2011) "Wheat gluten-based materials plasticised with glycerol and water by thermoplastic mixing and thermomoulding", *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(4), pp. 625–633.

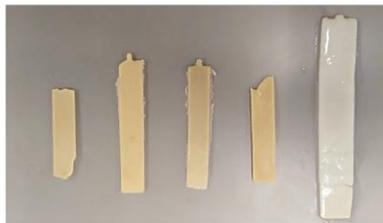
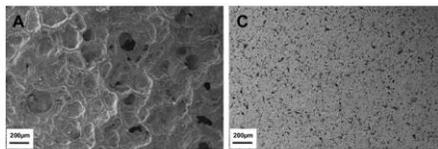
Zárate-Ramírez, L. S., Romero, A., Martínez, I., Bengoechea, C., Partal, P. y Guerrero, A. (2014) "Effect of aldehydes on thermomechanical properties of gluten-based bioplastics", *Food and Bioproducts Processing*, 92(1), pp. 20–29.

Capítulo 4: Incorporación de zinc como micronutriente a las matrices bioplásticas de soja

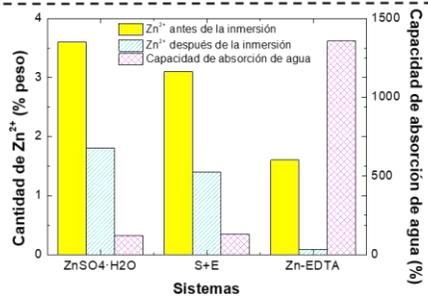
Inyección vs. extrusión



Concentración de sal



Evaluación de la capacidad superabsorbente



Optimización de las propiedades funcionales

4.1 Introducción

En 2020, la producción hortícola mundial alcanzó los 3910 mil millones de euros. Esta producción fue aproximadamente un 13% superior a la de 2015 (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, 2022). Este crecimiento de la explotación hortícola está asociado a una excesiva degradación del suelo, que no puede regenerarse (Feng *et al.*, 2017).

Esta regeneración se potencia mediante el uso de fertilizantes y sustratos que contienen los nutrientes necesarios para el crecimiento exitoso del cultivo deseado (Jin *et al.*, 2011). Los nutrientes se incorporan a los sustratos en forma de sales. Una de las características más importantes de estos fertilizantes es su alta solubilidad en agua, la cual es necesaria para la asimilación de las plantas. Sin embargo, esta alta solubilidad se convierte en un problema debido a la baja asimilación de estos nutrientes por parte de las plantas. De esta forma, las sales no asimiladas por las plantas se solubilizan con el riego o agua de lluvia y acaban lixiviándose, provocando la contaminación del subsuelo y aguas subterráneas por exceso de nutrientes (Kondraju y Rajan, 2019; Sanchez-Hernandez, 2019).

Para mejorar la eficiencia de los fertilizantes, varios trabajos han propuesto incorporarlos en sistemas de liberación controlada (Castro-Enríquez *et al.*, 2019; Daitx *et al.*, 2019; Kong *et al.*, 2019). Estos materiales pueden liberar fertilizantes de manera controlada, siendo mejor asimilados por las plantas. Además, estos sistemas de liberación controlada pueden fabricarse a partir de subproductos o residuos ricos en proteínas de la industria agroalimentaria. Estos materiales podrían utilizarse sin poner en riesgo la seguridad alimentaria, siendo una fuente

de materia prima renovable y relativamente barata (Abdelmoez y Yoshida, 2007). En este contexto, el aislado proteico de soja, derivado del aceite de soja, es una de las materias primas más interesantes por su alto carácter hidrofílico, que permite que las matrices bioplásticas retengan agua y la suministren de forma controlada, mejorando el ciclo del agua, lo que es un gran valor añadido en horticultura (Capezza *et al.*, 2019; Jiménez-Rosado *et al.*, 2019).

Las propiedades de estas matrices bioplásticas a base de soja pueden controlarse mediante las tecnologías y condiciones de procesado utilizadas. Entre las técnicas de procesado, el moldeo por inyección (Fernández-Espada *et al.*, 2019; Aguilar *et al.*, 2020) y la extrusión (Liu *et al.*, 2010; Verbeek y Van Den Berg, 2010) han sido las más utilizadas. No obstante, es necesario investigar la influencia que podría tener la incorporación de sales con nutrientes en estas matrices bioplásticas y optimizar las condiciones de procesado óptimas para estos sistemas.

Todas las ventajas comentadas sobre las matrices bioplásticas de soja y su versatilidad en el procesado hacen de estos materiales un atractivo candidato para la incorporación de micronutrientes esenciales para el desarrollo de las plantas en horticultura. Los micronutrientes son elementos que las plantas necesitan en pequeñas cantidades. Entre ellos, el zinc es uno de los micronutrientes más deficientes en el suelo y el que más está sufriendo la intensificación de la agricultura, ya que es difícilmente reemplazable en el suelo (Hussain *et al.*, 2012). Este micronutriente es crucial para el correcto desarrollo de las plantas y, por tanto, para el rendimiento de los cultivos. Aunque se requiere en cantidades muy pequeñas (15-20 mg/kg de cultivo), el zinc es necesario para la producción de las hormonas del crecimiento y el alargamiento de

entrenados. Además, el zinc activa enzimas responsables de ciertas proteínas y se utiliza en la síntesis de la clorofila y algunos carbohidratos (Uchida, 2000; Navizaga *et al.*, 2017). El zinc se suele incorporar en forma de sal, siendo la más común el sulfato de zinc, lo que genera grandes problemas de contaminación debido a su alta solubilidad en agua (Martínez y Motto, 2000).

El objetivo global de este capítulo fue la incorporación de zinc (micronutriente) en las matrices bioplásticas de soja estudiadas en el capítulo anterior. Para ello, se optimizó las condiciones utilizadas durante el procesado de las matrices bioplásticas con el zinc incorporado. Además, se evaluó la concentración de zinc a incorporar, así como la mejor sal para hacerlo. Finalmente, se optimizó el proceso para conseguir las matrices con las mejores propiedades funcionales.

4.2 Materiales y métodos

Para la elaboración de la matriz bioplástica se utilizó como materias primas el subproducto proteico de soja y la glicerina, manteniéndolos siempre en una proporción 1:1. Una descripción más detallada de estos productos está incluida en la sección 2.1.1 y 2.1.2 del Capítulo 2 (Materiales y métodos, respectivamente). Además, todas las sales de zinc mencionadas en la sección 2.1.3 fueron evaluadas en el presente capítulo para incorporar zinc (micronutriente) a las matrices bioplásticas.

Los diferentes estudios realizados se resumen en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1. Estudios realizados, procesado y sal utilizados, variables estudiadas y sección donde se encuentran los resultados.

Estudio	Procesado	Sal	Variables	Sección
Procesado	Extrusión Inyección	ZnSO ₄ ·H ₂ O	Temperaturas de procesado (90-135 °C)	4.3.1
Concentración de sal	Inyección	ZnSO ₄ ·H ₂ O	Concentración de ZnSO ₄ ·H ₂ O (0-10%)	4.3.2
Sal incorporada	Inyección	ZnSO ₄ ·H ₂ O ZnCO ₃ Zn(ClO ₄) ₂ ZnCl ₂ Zn-EDTA	Intervalo de pH Deslocalización de carga Solubilidad Conductividad Fuerza iónica	4.3.3
Optimización de condiciones	Inyección	ZnSO ₄ ·H ₂ O Zn-EDTA	Concentración de Zn-EDTA (5-15%) Mezcla de sales (3:1 ZnSO ₄ ·H ₂ O:Zn- EDTA)	4.3.4

Durante la evaluación de los diferentes procesados para desarrollar matrices bioplásticas se utilizaron diferentes parámetros. En el caso de la extrusión, se seleccionó una velocidad de alimentación constante de 2,98 g/min. En la Tabla 4.2 se muestran los parámetros seleccionados para evaluar el efecto de la velocidad del tornillo y la temperatura de

boquilla (T_f) en el procesado de matrices bioplásticas mediante extrusión. Una mayor explicación de este proceso de fabricación se puede encontrar en la sección 2.5.1 del Capítulo 2 (Materiales y métodos).

Tabla 4.2. Perfiles de temperatura usados durante la extrusión.

Sistemas	Perfil de temperatura (°C)					T_f (°C)
	4	5	6	7	8	
95 °C	40	70	80	95	95	95
115 °C	40	70	80	95	115	115
135 °C	40	70	80	115	135	135

Por otro lado, las matrices bioplásticas procesadas por inyección se obtuvieron usando diferentes temperaturas en el molde (90, 110 y 130 °C). Los demás parámetros se mantuvieron constantes: temperatura del cilindro 40 °C, presión de inyección de 600 bar durante 20 s y presión de compactación de 200 bar durante 300 s. Una mayor explicación de este proceso de fabricación se puede encontrar en la sección 2.5.2 del Capítulo 2 (Materiales y métodos).

Cabe mencionar que, aunque las matrices bioplásticas sin sal incorporada se pudieron extruir o inyectar a temperaturas más bajas (80 y 70 °C, respectivamente), esto no ocurrió cuando se incorporó la sal, siendo la temperatura mínima de procesado permitida de 90 °C.

Finalmente, todos los estudios supusieron la misma caracterización de las matrices bioplásticas obtenidas. Las técnicas utilizadas durante la caracterización se resumen en la Tabla 4.3.

Tabla 4.3. Técnicas de caracterización usadas para evaluar las matrices bioplásticas con micronutriente incorporado.

Técnicas de caracterización	Sección
Propiedades mecánicas	2.6.4
Retención del micronutriente	2.6.5
Capacidad de absorción de agua	2.6.6
SEM	2.6.7

4.3 Resultados

4.3.1 *Optimización del procesado de matrices bioplásticas con sal incorporada*

En primer lugar, se evaluó el procesado de las matrices bioplásticas con zinc incorporado a partir de extrusión e inyección. Para ello, se fijó una cantidad del 10% en peso de $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ en todas las matrices bioplásticas, modificando las temperaturas usadas durante el procesado. El $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ fue seleccionado por ser la sal más comúnmente usada para paliar la deficiencia de zinc (Cakmak y Kutman, 2018). No se incorporó una cantidad mayor de la sal debido a que era imposible procesar matrices bioplásticas con una mayor concentración de $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$.

4.3.1.1 Propiedades mecánicas

Ensayos dinámicos de flexión

La Figura 4.1 muestra el perfil del módulo elástico (E') y viscoso (E'') de las matrices bioplásticas procesadas mediante extrusión e inyección. Ambos módulos presentan una suave dependencia con la frecuencia. Así, los valores de los módulos crecen a altas frecuencias, lo que podría indicar una especie de movilidad de las cadenas proteicas. Además, se observa cómo E' permanece siempre por encima de E'' , lo que demuestra el fuerte carácter sólido de estos sistemas.

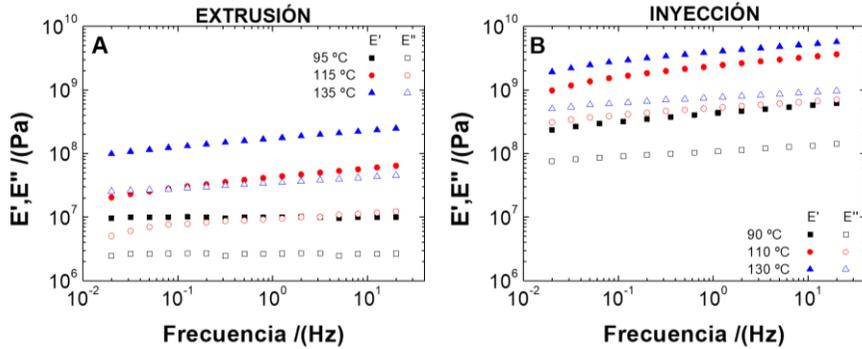


Figura 4.1. Ensayos dinámicos de flexión de las matrices bioplásticas de SPI/Gly con un 10% de $ZnSO_4 \cdot H_2O$ incorporado procesadas a diferentes temperaturas mediante extrusión (A) e inyección (B).

Las propiedades dinámico-mecánicas de las diferentes matrices bioplásticas pueden compararse en la Tabla 4.4. Las matrices bioplásticas inyectadas presentaron valores de módulo elástico (E'_1) y deformación crítica (ϵ_{crit}) superiores a las matrices extruidas. Esto podría atribuirse a su mayor densidad aparente (1,45 vs. 0,37 g/cm^3 para las matrices bioplásticas inyectadas y extruidas, respectivamente, al estar sometidas a diferentes presiones en la etapa de compactación: 600 bar en inyección y 20 bar en extrusión), que permite a los sistemas inyectados tener un mejor comportamiento mecánico.

Tabla 4.4. Parámetros de flexión de las diferentes matrices bioplásticas de SPI/Gly con un 10% de $ZnSO_4 \cdot H_2O$ incorporado procesadas a diferentes temperaturas mediante extrusión e inyección. Las diferentes letras usadas como superíndice en las distintas columnas evidencian diferencias significativas ($p < 0,05$).

Sistemas		ϵ_{crit} (%)	E'_1 (MPa)	$\tan \delta_1$ (-)
Extrusión	95 °C	$0,05 \pm 0,01^a$	10 ± 5^A	$0,26 \pm 0,05^I$
	115 °C	$0,03 \pm 0,01^a$	40 ± 15^A	$0,22 \pm 0,02^I$
	135 °C	$0,15 \pm 0,02^b$	200 ± 30^B	$0,20 \pm 0,03^I$
Inyección	90 °C	$1,00 \pm 0,03^c$	400 ± 24^C	$0,25 \pm 0,03^I$
	110 °C	$0,41 \pm 0,03^d$	2000 ± 300^D	$0,22 \pm 0,02^I$
	130 °C	$0,26 \pm 0,02^e$	4000 ± 230^E	$0,19 \pm 0,02^I$

Con respecto a la temperatura, un incremento de la misma mejora la respuesta dinamo-mecánica de las matrices bioplásticas, como era de esperar según trabajos previos (Fernández-Espada *et al.*, 2016). De esta forma, un aumento de la temperatura genera un mayor entrecruzamiento de las cadenas proteicas, independientemente del proceso utilizado, lo que permite generar una mejora en las propiedades mecánicas de la matriz bioplástica. No obstante, temperaturas superiores a 130-135 °C generan degradación de la proteína usada como biopolímero, dificultando el procesado de la matriz bioplástica. Por este motivo, temperaturas superiores no fueron evaluadas en este estudio.

En cuanto a la tangente de pérdidas ($\tan \delta_1$), es menor que 0,3 en todos los sistemas, lo que indica el significativo carácter sólido de estos sistemas, como se mencionó antes. Este carácter sólido ya ha sido reportado en trabajos previos donde se procesaron matrices bioplásticas similares (Perez-Puyana *et al.*, 2018; Fernández-Espada *et al.*, 2019).

Ensayos estáticos de tracción hasta la rotura

La Figura 4.2 muestra los perfiles de esfuerzo/deformación obtenidos para las diferentes matrices bioplásticas mediante los ensayos de tracción. Todos los sistemas presentaron el mismo perfil: tuvieron un primer aumento lineal del esfuerzo, que corresponde a la zona elástica de deformación. Después, alcanzaron el punto máximo de esfuerzo a partir del cual comenzaron a romperse. Este perfil es típico de las matrices bioplásticas con sal incorporada (Jiménez-Rosado *et al.*, 2018).

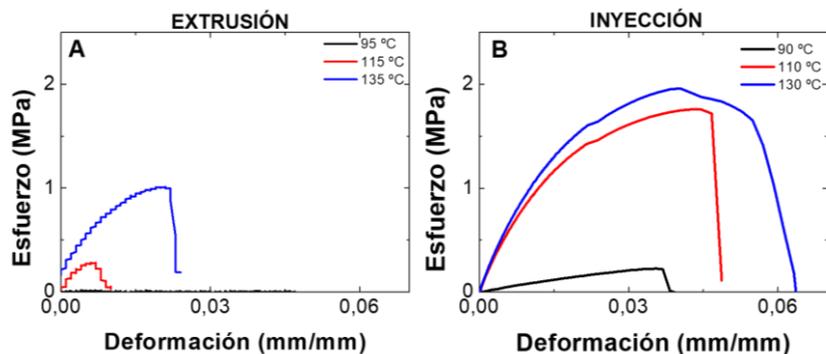


Figura 4.2. Ensayos de tracción hasta la rotura de las matrices bioplásticas SPI/Gly con un 10% de $ZnSO_4 \cdot H_2O$ incorporado procesadas a diferentes temperaturas mediante extrusión (A) e inyección (B).

Los diferentes parámetros obtenidos en estos ensayos se muestran en la Tabla 4.5. Ambas técnicas presentan una gran diferencia entre sí. En este sentido las matrices bioplásticas inyectadas presentan un mayor esfuerzo máximo y deformación en la rotura a altas temperaturas de procesado.

Tabla 4.5. Parámetros de tracción de las diferentes matrices bioplásticas SPI/Gly con un 10% de $ZnSO_4 \cdot H_2O$ incorporado procesadas a diferentes temperaturas mediante extrusión e inyección. Las diferentes letras usadas como superíndice en las distintas columnas evidencian diferencias significativas ($p < 0,05$).

Sistemas		σ_{max} (MPa)	E (MPa)	ϵ_{max} (mm/mm)
Extrusión	95 °C	$0,02 \pm 0,01^a$	$3,2 \pm 0,7^A$	$0,051 \pm 0,030^I$
	115 °C	$0,3 \pm 0,1^b$	84 ± 12^B	$0,012 \pm 0,006^I$
	135 °C	$1,0 \pm 0,2^c$	87 ± 10^B	$0,025 \pm 0,005^I$
Inyección	90 °C	$0,2 \pm 0,1^b$	8 ± 1^C	$0,040 \pm 0,003^{II}$
	110 °C	$1,8 \pm 0,1^d$	100 ± 5^D	$0,049 \pm 0,006^{II}$
	130 °C	$2,0 \pm 0,3^d$	110 ± 7^D	$0,062 \pm 0,002^{III}$

Por otro lado, un incremento de la temperatura produjo un aumento en el esfuerzo, deformación máxima a la rotura y módulo de Young cuando las matrices bioplásticas se procesaron mediante inyección, aunque esta tendencia no fue clara en los bioplásticos procesados por

extrusión. Este comportamiento es similar al obtenido en los ensayos dinámico-mecánicos, lo que confirma la hipótesis planteada. En general, parece que las matrices bioplásticas inyectadas tienen mejores propiedades mecánicas que las extruidas, con una mejora de la resistencia mecánica conforme se aumenta la temperatura. No obstante, cabe mencionar que todas las matrices bioplásticas tienen las propiedades mecánicas suficientes para ser utilizadas como sistemas de liberación controlada en horticultura.

4.3.1.2 Retención del micronutriente

La capacidad de retención de zinc mostrada por las diferentes matrices bioplásticas se puede observar en la Tabla 4.6. Todas las matrices bioplásticas liberaron alrededor de un 50% del micronutriente tras la inmersión en agua destilada durante 1 h. Esta retención es independiente del método de procesamiento utilizado, aunque a mayor temperatura se consigue una mejor retención del micronutriente. Esto puede deberse al mayor entrecruzamiento de las matrices bioplásticas con la temperatura, que favorece la retención del micronutriente. Este comportamiento también se puede observar en la retención del ion sulfato. No obstante, se puede observar que hay una mayor liberación del ion sulfato que del ion zinc. Esto puede deberse a la carga presentada por la proteína en la matriz bioplástica. En este sentido, la proteína fue procesada en condiciones tales que el pH del sistema se encontraba por encima de su punto isoeléctrico, por lo que las cadenas proteicas presentarán una carga neta negativa que repele los iones negativos de sulfato mientras ayuda a retener los iones positivos de zinc.

Tabla 4.6. Contenido en peso de zinc (Zn^{2+}) y sulfato (SO_4^{2-}) de las diferentes matrices bioplásticas SPI/Gly con un 10% de $ZnSO_4 \cdot H_2O$ incorporado procesadas a diferentes temperaturas mediante extrusión e inyección. Las diferentes letras usadas como superíndice en las distintas columnas evidencian diferencias significativas ($p < 0,05$).

Sistemas		Antes de la inmersión		Después de la inmersión	
		Zn ²⁺ (%)	SO ₄ ²⁻ (%)	Zn ²⁺ (%)	SO ₄ ²⁻ (%)
Extrusión	95 °C	3,6 ^a	5,6 ^b	1,7 ^c	0,0 ^f
	115 °C	3,6 ^a	5,6 ^b	1,9 ^d	1,2 ^g
	135 °C	3,6 ^a	5,6 ^b	2,3 ^e	1,8 ^{cd}
Inyección	90 °C	3,6 ^a	5,6 ^b	1,8 ^{cd}	0,0 ^f
	110 °C	3,6 ^a	5,6 ^b	2,0 ^d	4,7 ^h
	130 °C	3,6 ^a	5,6 ^b	2,3 ^e	5,1 ⁱ

Por otro lado, cabe recalcar que esta liberación se produjo debido posiblemente a dos efectos: (i) la solubilidad de la sal, y (ii) la liberación de la glicerina que arrastra la sal hacia fuera de la matriz bioplástica. De esta forma, libera una gran concentración de micronutriente en 1 h, no pudiéndose considerar una liberación controlada.

4.3.1.3 Capacidad de absorción de agua

La capacidad de absorción de agua y la pérdida de material soluble de las diferentes matrices bioplásticas se muestran en la Figura 4.3. Como se puede observar, el incremento de la temperatura produjo una disminución de la capacidad de absorción de agua de los sistemas, siendo más notable al aumentar de 95 a 115 °C en extrusión y de 110 a 130 °C en inyección. Además, a la temperatura más baja se observó una mayor capacidad de absorción de agua en las matrices bioplásticas extruidas que en aquellas inyectadas. En todos los casos, un cambio más severo se observa con la inclusión de la sal en el sistema. Así, esta incorporación genera una pérdida de la capacidad de absorción de las matrices bioplásticas de soja procesadas hasta ahora (en el capítulo anterior se

comprobó que la capacidad de absorción de agua es cercana al 900% para las matrices bioplásticas procesadas a 90 °C sin sal incorporada) (Jiménez-Rosado *et al.*, 2021). De esta forma, las fuerzas iónicas presentes en las sales hacen que su capacidad de absorción en agua de las matrices bioplásticas descienda, independientemente del procesado utilizado, no viéndose afectada por las diferencias entre las propiedades de las diferentes matrices bioplásticas.

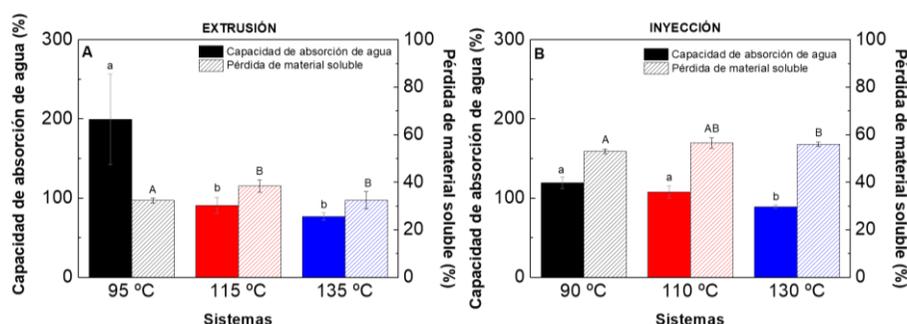


Figura 4.3. Capacidad de absorción de agua y pérdida de material soluble de las matrices bioplásticas SPI/Gly con un 10% ZnSO₄·H₂O incorporado procesadas a diferentes temperaturas mediante extrusión (A) e inyección (B). Las diferentes letras evidencian diferencias significativas ($p < 0,05$).

En cuanto a la pérdida de material soluble, tampoco se observaron diferencias muy notables con respecto a la temperatura, aunque las matrices bioplásticas extruidas presentaron un menor porcentaje que las inyectadas (40 vs. 60%).

Cabe mencionar que, aunque esta capacidad de absorción de agua se vea reducida por la inclusión de la sal, esta capacidad de retención de agua incrementa el valor de estas matrices bioplásticas en el sector hortícola, permitiendo su uso para el abastecimiento de agua en periodos de sequía. En comparación con otros estudios, estas matrices bioplásticas tienen una capacidad de absorción de agua menor que otros utilizados con el mismo fin (Capezza *et al.*, 2019; Chang *et al.*, 2021). Sin embargo,

en este caso, la capacidad de absorción de agua no es la principal propiedad de estos bioplásticos, sino un valor añadido, que también ayuda a la planta a absorber el micronutriente (Rouphael *et al.*, 2012).

4.3.1.4 SEM

La Figura 4.4 muestra la microestructura de las diferentes matrices bioplásticas después de las pruebas de capacidad de absorción de agua. Como se puede observar, las matrices bioplásticas inyectadas y extruidas adoptan diferentes conformaciones durante el hinchamiento. Las matrices bioplásticas inyectadas tenían una superficie plana con poros en su superficie. Por otro lado, las matrices bioplásticas extruidas tenían una estructura más globular a baja temperatura (95 °C) y una estructura más laminar a altas temperaturas (135 °C). Además, las extruidas parecen tener una estructura con mayor número de huecos y mayor porosidad, posiblemente debido a su menor densidad aparente. Sin embargo, en ambos métodos de procesado, parece que un aumento en la temperatura provocó una reducción en los poros presentes en la matriz bioplástica hinchada, lo que puede ser la causa de que se retenga mayor cantidad de micronutriente.

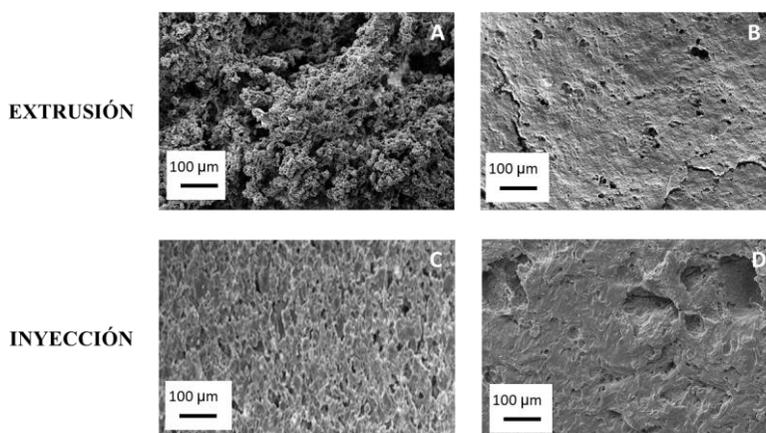


Figura 4.4. Imágenes de las matrices bioplásticas SPI/Gly con un 10% procesadas mediante extrusión a 95 (A) y 135 °C (B) e inyección a 95 (C) y 135 °C (D) tras la inmersión en agua.

4.3.2 *Evaluación de la cantidad de sal incorporada*

Una vez estudiado el procesado de las matrices bioplásticas con sal incorporada, se evaluó la concentración de sal incorporada en las mismas. Para ello, se seleccionó la inyección a 90 °C como el proceso más ideal para desarrollar estas matrices bioplásticas. Esta elección se realizó porque las propiedades mecánicas que presentaba esta matriz bioplástica eran suficientes para la aplicación requerida, no necesitando un mayor gasto energético para su fabricación (como consecuencia de la menor temperatura seleccionada). Además, se escogió el $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ como sal incorporada, variando la concentración del mismo dentro de la matriz (0, 2,5, 5,0 y 10% en peso).

4.3.2.1 Propiedades mecánicas

Ensayos dinámicos de flexión

Las propiedades dinamo-mecánicas de las matrices bioplásticas que contienen diferentes porcentajes de $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ se muestran en la Figura 4.5 a través de sus perfiles del módulo elástico (E') y viscoso (E'') frente a la frecuencia aplicada. Todos los sistemas estudiados mostraron una respuesta predominantemente elástica ($E' > E''$) en todo el rango de frecuencia estudiado. Además, ambos módulos mostraron una ligera dependencia con la frecuencia.

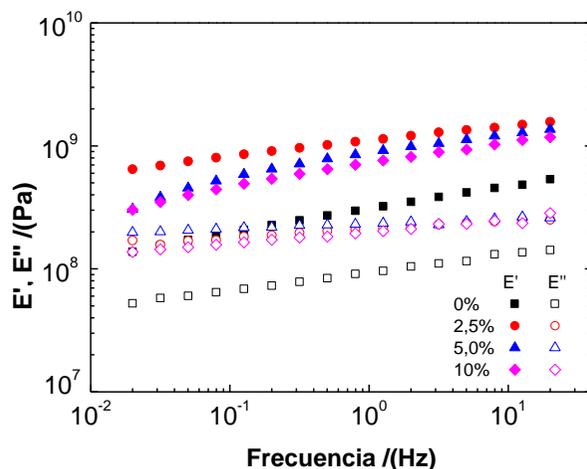


Figura 4.5. Ensayos dinámicos de flexión de las matrices bioplásticas SPI/Gly con diferentes porcentajes de $ZnSO_4 \cdot H_2O$ incorporados procesadas mediante moldeo por inyección a 90 °C.

Las matrices bioplásticas pueden ser mejor comparadas a través de los parámetros mostrados en la Tabla 4.7. Como se puede observar, el cambio en la concentración de sal no generó diferencias significativas en la deformación crítica mostrada por los sistemas. La incorporación de sal provocó un aumento en los valores del módulo de elasticidad (E'_1) y una disminución de la tangente de pérdidas ($\tan \delta_1$). No obstante, aunque la presencia de sal siempre mejoró las propiedades mecánicas de las matrices bioplásticas, es el sistema que tiene el contenido más bajo de sal (2,5% en peso) el que mostró la mayor respuesta elástica. Así, parece que una disminución en el porcentaje de SPI y un aumento en el contenido de sal conducen a un material más rígido. Sin embargo, mayores porcentajes de sal (>2,5% en peso) pueden interferir con la formación de la matriz proteica debilitando su respuesta viscoelástica.

Tabla 4.7. Parámetros de flexión de las diferentes matrices bioplásticas SPI/Gly con diferentes porcentajes de ZnSO₄·H₂O incorporados procesadas mediante moldeo por inyección a 90 °C. Las diferentes letras usadas como superíndice en las distintas columnas evidencian diferencias significativas ($p < 0,05$).

Sistemas	ϵ_{crit} (%)	E'_1 (MPa)	$\tan \delta_1$ (-)
0%	1,01 ± 0,02 ^a	200 ± 19 ^A	0,30 ± 0,02 ^I
2,5%	1,00 ± 0,01 ^a	900 ± 89 ^B	0,19 ± 0,01 ^{II}
5,0%	0,99 ± 0,02 ^a	700 ± 48 ^C	0,26 ± 0,01 ^I
10%	1,00 ± 0,03 ^a	400 ± 24 ^D	0,25 ± 0,03 ^I

Ensayos estáticos de tracción hasta la rotura

En la Figura 4.6 se muestran los perfiles de esfuerzo/deformación obtenidos en los ensayos de tracción de las matrices bioplásticas que contienen diferentes porcentajes de sal. En todos los casos, las curvas exhiben un comportamiento elástico lineal inicial de pendiente constante con la que se puede calcular los valores del módulo de Young. Este comportamiento lineal es seguido por una etapa de deformación plástica con una disminución continua en la pendiente después del límite elástico. La incorporación de sal muestra una disminución considerable de esta zona plástica.

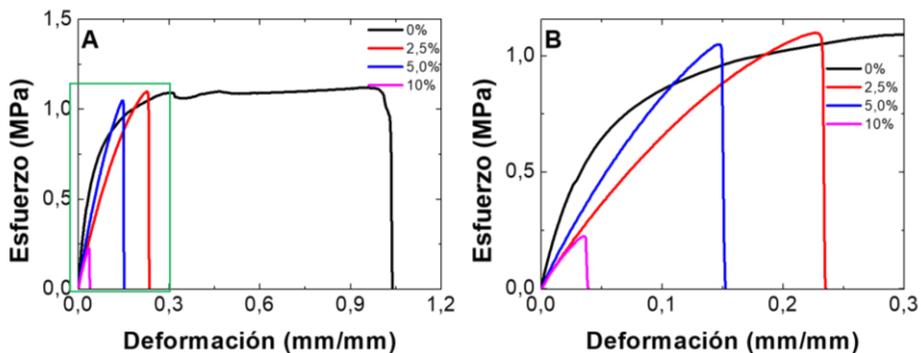


Figura 4.6. Ensayos de tracción hasta la rotura de las matrices bioplásticas SPI/Gly con diferentes porcentajes de ZnSO₄·H₂O incorporados procesadas mediante moldeo por inyección a 90 °C. A: Perfil completo. B: Ampliación de la zona remarcada en verde.

En la Tabla 4.8 se presentan los parámetros de tracción que permiten comparar los diferentes sistemas. Como se puede observar, la incorporación de la sal produjo un descenso en el módulo de Young y una progresiva disminución de la deformación a la rotura en las matrices bioplásticas. Estos parámetros indican que los sistemas son más rígidos cuando aumenta la concentración de sal. Finalmente, no se encontraron diferencias significativas para el esfuerzo máximo, excepto para el sistema del 10% donde disminuye notablemente. De hecho, la menor proporción de SPI y la mayor proporción de $ZnSO_4 \cdot H_2O$ disponible durante el procesado de la matriz bioplástica parece contribuir decisivamente a la disminución de su resistencia mecánica, como ya se comentaba en los ensayos de flexión, reflejando la menor tenacidad de la matriz. Esta puede ser la razón por la cual no se pueden obtener matrices bioplásticas con un mayor porcentaje de sal incorporado.

Tabla 4.8. Parámetros de tracción de las diferentes matrices bioplásticas SPI/Gly con diferentes porcentajes de $ZnSO_4 \cdot H_2O$ incorporados procesadas mediante moldeo por inyección a 90 °C. Las diferentes letras usadas como superíndice en las distintas columnas evidencian diferencias significativas ($p < 0,05$).

Sistemas	σ_{max} (MPa)	E (MPa)	ϵ_{max} (mm/mm)
0%	1,1 ± 0,1 ^a	17 ± 1 ^A	1,037 ± 0,074 ^I
2,5%	1,1 ± 0,1 ^a	8 ± 4 ^B	0,232 ± 0,050 ^{II}
5,0%	1,0 ± 0,1 ^a	9 ± 2 ^B	0,151 ± 0,025 ^{III}
10%	0,2 ± 0,1 ^b	8 ± 1 ^B	0,040 ± 0,003 ^{IV}

4.3.2.2 Retención del micronutriente

La capacidad de retención del micronutriente en los diferentes sistemas se muestra en la Tabla 4.9. Como se puede observar, mientras mayor es la concentración de sal, mayor es la cantidad de sal que permanece en la matriz después de la inmersión. No obstante, la matriz bioplástica que contiene el 10% de sal es la que menor porcentaje de

retención tiene (50 vs. 82% para la matriz bioplástica con un 10 y 2,5% de sal, respectivamente). Así, la matriz bioplástica del 10% parece mostrar una estructura menos integrada que condujo a una liberación más rápida del micronutriente durante la inmersión. En este caso, tampoco se retuvo nada del ion sulfato tras la inmersión. Este resultado es consistente con la hipótesis planteada anteriormente sobre la repulsión del ion debido a la carga de proteína. Por lo tanto, una menor cantidad de zinc en la matriz bioplástica puede permitir una liberación más controlada del micronutriente, aunque aporte una cantidad total inferior de zinc.

Tabla 4.9. Contenido en peso de zinc (Zn^{2+}) y sulfato (SO_4^{2-}) de las diferentes matrices bioplásticas SPI/Gly con diferentes porcentajes de $ZnSO_4 \cdot H_2O$ incorporados procesadas mediante moldeo por inyección a 90 °C. Las diferentes letras usadas como superíndice en las distintas columnas evidencian diferencias significativas ($p < 0,05$).

Sistemas	Antes de la inmersión		Después de la inmersión	
	Zn^{2+} (%)	SO_4^{2-} (%)	Zn^{2+} (%)	SO_4^{2-} (%)
0%	-	-	-	-
2,5%	0,9 ^a	1,4 ^d	0,7 ^A	0,0 ^D
5,0%	1,8 ^b	2,8 ^e	1,1 ^B	0,0 ^D
10%	3,6 ^c	5,6 ^f	1,8 ^C	0,0 ^D

4.3.2.3 Capacidad de absorción de agua

La Figura 4.7 muestra la capacidad de absorción de agua y la pérdida de material soluble para las matrices bioplásticas en función de la cantidad de sal incorporada. Como se puede observar, la incorporación de la sal produjo una disminución drástica de la capacidad de absorción de agua, siendo esta capacidad independiente del contenido de sal. Estos resultados indican que las matrices bioplásticas con $ZnSO_4 \cdot H_2O$ añadido no son buenos absorbentes. Varios factores pueden contribuir a esta disminución en la capacidad de absorción de agua. En primer lugar, se produce una reducción del contenido de proteína y glicerina a medida

que aumenta el contenido de sal, lo que reduce el carácter hidrofílico de la matriz. En segundo lugar, otros autores han informado de un efecto negativo de la fuerza iónica en la absorción de agua (Zayas, 1997; Judawisastra *et al.*, 2017). Además, el aumento descrito anteriormente en las propiedades elásticas de la red biopolimérica afecta a su capacidad de hinchamiento, como se ha encontrado previamente para diferentes bioplásticos basados en proteínas (Zárate-Ramírez *et al.*, 2014; Félix *et al.*, 2016; Fernández-Espada *et al.*, 2016; Perez-Puyana *et al.*, 2016). La ausencia de diferencias significativas en la capacidad de absorción de agua con el aumento de la concentración de sal puede ser consecuencia de la superposición de estos factores (reducción del contenido de proteína y glicerina, aumento de la fuerza iónica y aumento de las propiedades elásticas de la red biopolimérica), donde los dos primeros aumentan progresivamente con el contenido de sal, mientras que el último disminuye a medida que la concentración de sal se incrementa.

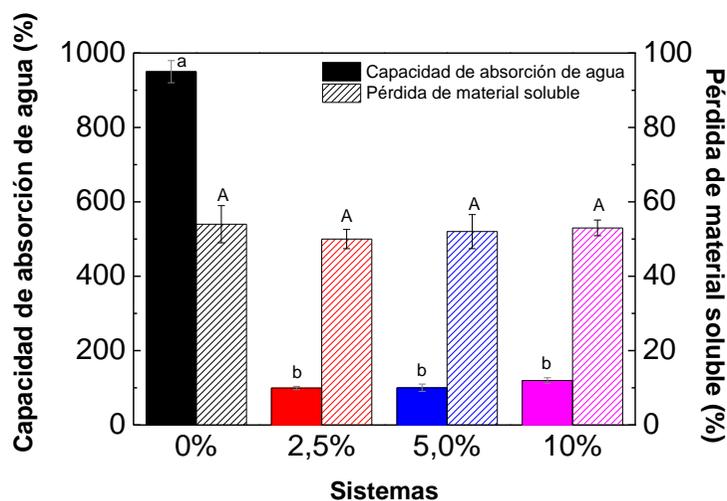


Figura 4.7. Capacidad de absorción de agua y pérdida de material soluble de las matrices bioplásticas SPI/Gly con diferentes porcentajes de $ZnSO_4 \cdot H_2O$ incorporados procesadas mediante moldeo por inyección a 90 °C. Las diferentes letras usadas evidencian diferencias significativas ($p < 0,05$).

En cuanto a la pérdida de material soluble, parece que la glicerina se liberó completamente al medio como materia soluble. En el sistema sin sal también se solubiliza una pequeña proporción de SPI. Cuando el contenido de sal aumento no se observó una diferencia significativa en la pérdida de material soluble. No obstante, estos sistemas tienen una menor proporción de glicerina (para mantener la relación 1:1 SPI:Gly), lo que supone que una mayor cantidad de sal y/o proteína fueron liberadas al medio.

4.3.1.4 SEM

La Figura 4.8 muestra las imágenes obtenidas por SEM para las matrices bioplásticas sin y con un 10% de $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ tras la inmersión en agua. Se puede observar que la matriz bioplástica sin zinc presenta poros de mayor tamaño que los de la matriz que contiene la sal.

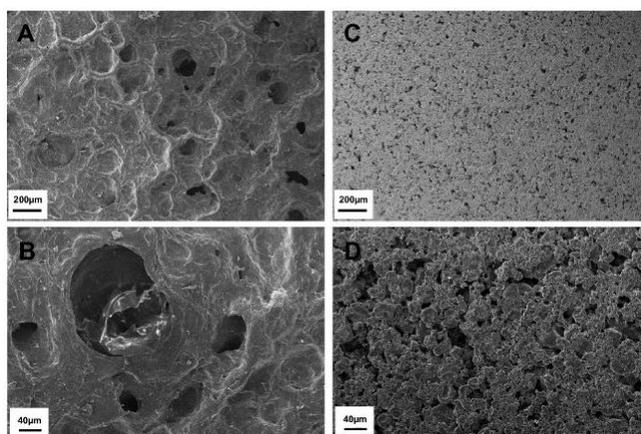


Figura 4.8. Imágenes de las matrices bioplásticas SPI/Gly procesadas sin sal incorporada (50x (A) y 200x (B)) y con un 10% de $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (50x (C) y 200x (D)) procesadas mediante moldeo por inyección a 90 °C tras la inmersión en agua.

Además, el tamaño de poro de la matriz bioplástica sin sal es bastante heterogéneo, oscilando aproximadamente entre 10 y 100 μm . Por otro lado, el tamaño de poro para la matriz al 10% es más homogéneo, entre 5 y 10 μm . Estos resultados indican que la incorporación de sal en la

matriz bioplástica conlleva una reducción del tamaño de los poros, estando estos poros más homogéneamente distribuidos. Este es otro factor que contribuye a explicar la reducción de la capacidad de absorción de agua de estos sistemas.

4.3.3 Influencia del tipo de sal en las propiedades de las matrices bioplásticas

La incorporación de micronutrientes a las matrices bioplásticas estudiadas ha provocado la pérdida de su capacidad superabsorbente. Esta pérdida puede deberse principalmente a diferentes efectos causados por la sal. En este sentido la variación del pH ha sido el efecto más estudiado en este tipo de materiales ya que un cambio en el pH modifica la carga de la proteína (hacia positiva o negativa dependiendo de su punto isoeléctrico), lo que puede provocar un cambio en su estructura (Capezza *et al.*, 2019). Normalmente, las proteínas tienen carga negativa a un pH básico (por encima del punto isoeléctrico), lo que facilita la formación de puentes de hidrógeno con el agua. Por otro lado, la proteína se carga positivamente a pH ácido (por debajo del punto isoeléctrico), generando el efecto contrario. La deslocalización de carga depende completamente de la sal incorporada. Si esta sal tiene un anión resonante, como sulfato o perclorato, cuando se libera al suelo crea una competencia con la matriz bioplástica para generar puentes de hidrógeno con el agua, lo que se ve favorecido en la sal por la deslocalización de esta carga efectiva, dejando a la matriz bioplástica con poca capacidad de absorción. Finalmente, las fuerzas iónicas también vienen dadas por la sal que incorpora el micronutriente. Normalmente, si hay altas fuerzas iónicas en el medio (es decir, en el suelo), la matriz bioplástica tiende a reducir su capacidad

de hincharse (Sadeghi y Hosseinzadeh, 2008; Ma *et al.*, 2011; Montesano *et al.*, 2015).

Estos efectos fueron evaluados utilizando como referencia la matriz bioplástica inyectada a 90 °C con un 10% de ZnSO₄·H₂O. En la Tabla 4.10 se recogen las sales que se utilizaron para comprobar los diferentes efectos. La modificación del pH se realizó sobre la mezcla de referencia (pH 5), a la cual se le agregó durante el mezclado ácido sulfúrico para lograr un pH ácido (pH 4) o hidróxido de sodio para alcanzar un pH básico. Sin embargo, en el último caso no se pudo lograr un pH superior a 7 debido al efecto tampón generado por el ion sulfato de la sal de referencia. Cabe mencionar que no se utilizaron pH extremos para evitar la degradación de la proteína por cambios en el pH (Yates *et al.*, 1983).

Tabla 4.10. Diferentes efectos evaluados y sal utilizada para dicho fin

Efecto	Sal
Referencia	ZnSO ₄ ·H ₂ O
pH	ZnSO ₄ ·H ₂ O + (H ₂ SO ₄ o NaOH)
Deslocalización de carga	ZnCl ₂ Zn(ClO ₄) ₂
Fuerzas iónicas	ZnCO ₃ Zn-EDTA

4.3.3.1 Propiedades mecánicas

Ensayos dinámicos de flexión

La Figura 4.9 muestra las propiedades viscoelásticas de las diferentes matrices bioplásticas en función de la frecuencia aplicada. Todos los sistemas presentan cierta tendencia con la frecuencia aplicada, como se ha observado hasta el momento en todos los estudios desarrollados en este capítulo.

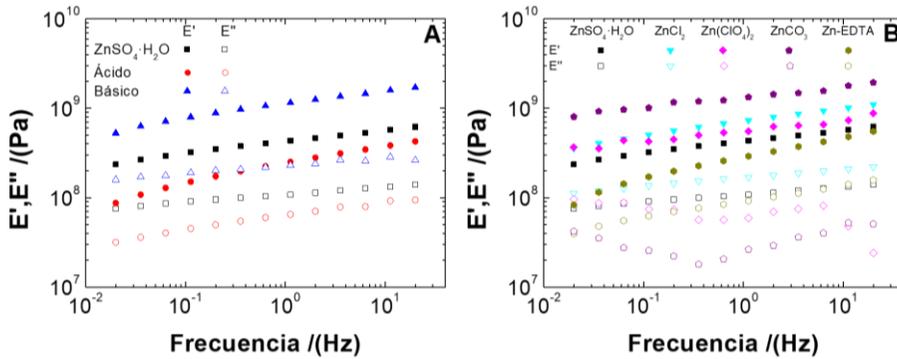


Figura 4.9. Ensayos dinámicos de flexión de las matrices bioplásticas SPI/Gly procesadas mediante moldeo por inyección a 90 °C con un 10% de $ZnSO_4 \cdot H_2O$ a diferentes pH (A) y con un 10% de diferentes sales incorporadas (B).

Una mejor comparación de los sistemas se puede realizar con los parámetros presentes en la Tabla 4.11. Como se puede observar, el comportamiento viscoelástico de cada matriz bioplástica depende fuertemente del aditivo utilizado. Aquellos sistemas preparados en condiciones alcalinas o que contienen $ZnCl_2$ o $ZnCO_3$ muestran propiedades mejoradas (mayor módulo elástico y deformación crítica) en comparación con el sistema de referencia, mostrando una respuesta elástica predominante en todo el rango de frecuencia estudiado ($E' > E''$). Por otro lado, las matrices bioplásticas preparadas en condiciones ácidas y que contienen Zn-EDTA exhiben una microestructura más débil que el sistema de referencia (menor módulo elástico, con mayor dependencia de la frecuencia, mayor tangente de pérdidas y menor deformación crítica). El sistema con $Zn(ClO_4)_2$ incluido no presentan diferencias significativas con el sistema de referencia en cuanto a la deformación crítica o módulo elástico, aunque presenta un carácter más sólido (tangente de pérdidas menor).

Tabla 4.11. Parámetros de flexión de las diferentes matrices bioplásticas SPI/Gly procesadas mediante moldeo por inyección a 90 °C con un 10% de ZnSO₄·H₂O a diferentes pH y con un 10% de diferentes sales incorporadas. Las diferentes letras usadas como superíndice en las distintas columnas evidencian diferencias significativas (p <0,05).

Sistemas	ϵ_{crit} (%)	E'_1 (MPa)	$\tan \delta_1$ (-)
ZnSO ₄ ·H ₂ O	1,00 ± 0,03 ^a	400 ± 24 ^A	0,25 ± 0,03 ^I
Ácido	0,92 ± 0,02 ^b	250 ± 32 ^B	0,26 ± 0,01 ^I
Básico	2,34 ± 0,02 ^c	1150 ± 94 ^C	0,20 ± 0,02 ^{II}
ZnCl ₂	1,24 ± 0,03 ^d	730 ± 15 ^D	0,23 ± 0,03 ^{I,II}
Zn(ClO ₄) ₂	1,01 ± 0,01 ^a	550 ± 70 ^A	0,11 ± 0,01 ^{III}
ZnCO ₃	2,15 ± 0,03 ^e	1340 ± 51 ^E	0,02 ± 0,01 ^{IV}
Zn-EDTA	0,89 ± 0,02 ^b	290 ± 22 ^B	0,37 ± 0,05 ^V

Ensayos estáticos de tracción hasta la rotura

En la Figura 4.10 se muestran los perfiles de esfuerzo/deformación de las diferentes matrices bioplásticas estudiadas. Todas las matrices bioplásticas tuvieron una zona elástica donde el esfuerzo aplicado tiene una respuesta lineal con la deformación aplicada. Esta zona elástica se siguió por otra zona plástica donde se perdió la proporcionalidad lineal hasta que el material se rompió. Cabe mencionar que la matriz bioplástica con Zn-EDTA presentó un importante intervalo plástico antes de su rotura. Este comportamiento es contrario a lo que ocurre en flexión donde la matriz con Zn-EDTA fue la que mostró las peores propiedades (menor módulo elástico y deformación crítica).

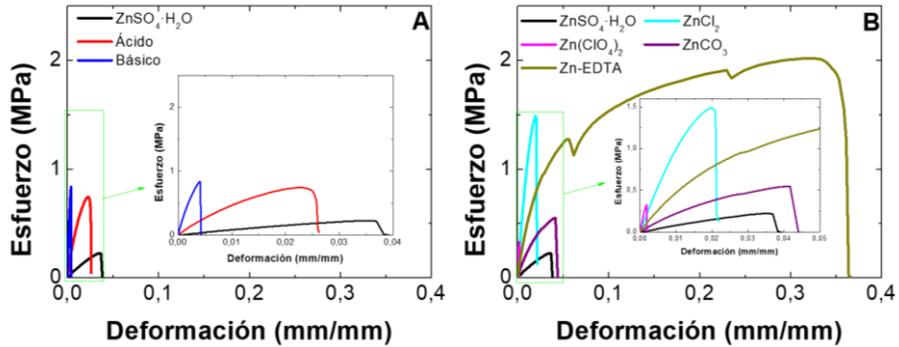


Figura 4.10. Ensayos estáticos de tracción hasta la rotura de las matrices bioplásticas SPI/Gly procesadas mediante moldeo por inyección a 90 °C con un 10% de ZnSO₄·H₂O a diferentes pH (A) y con un 10% de diferentes sales incorporadas (B).

Con respecto a los parámetros de tensión (Tabla 4.12), la modificación del pH produjo en todos los casos un aumento en el esfuerzo máximo (σ_{\max}) y un descenso en la deformación a la rotura (ϵ_{\max}). Sin embargo, el módulo de Young (E) si tuvo diferencias dependiendo del pH utilizado. En este sentido, el pH ácido condujo a un descenso de E, mientras que el pH básico no produjo diferencias significativas. Esta respuesta particular posiblemente fue causada por el cambio en las cargas de la proteína, lo que generó un mayor o menor impedimento estérico consigo mismo y con la sal incorporada. Por otro lado, se encontraron diferencias significativas entre las matrices bioplásticas que contienen diferentes sales, lo que puede atribuirse al diferente volumen involucrado en la incorporación de cada sal en el sistema y su interacción como material de relleno. En este contexto, un 10% en peso de sal en los 60 g de mezcla significa que se deben incorporar 6 g de sal (todas con una densidad parecida), pero debido a los pesos moleculares de cada una de las sales utilizadas (en algunos casos muy diferentes), el volumen de cada sal incorporada es diferente.

Tabla 4.12. Parámetros de tracción de las diferentes matrices bioplásticas SPI/Gly procesadas mediante moldeo por inyección a 90 °C con un 10% de ZnSO₄·H₂O a diferentes pH y con un 10% de diferentes sales incorporadas.. Las diferentes letras usadas como superíndice en las distintas columnas evidencian diferencias significativas (p <0,05).

Sistemas	σ_{max} (MPa)	E (MPa)	ε_{max} (mm/mm)
ZnSO₄·H₂O	0,2 ± 0,1 ^a	8 ± 1 ^A	0,040 ± 0,003 ^I
Ácido	0,7 ± 0,2 ^b	51 ± 4 ^B	0,025 ± 0,010 ^{II}
Básico	0,8 ± 0,1 ^b	275 ± 32 ^C	0,005 ± 0,002 ^{III}
ZnCl₂	1,5 ± 0,1 ^c	111 ± 10 ^D	0,008 ± 0,002 ^{III}
Zn(ClO₄)₂	0,3 ± 0,1 ^a	216 ± 23 ^C	0,002 ± 0,001 ^I
ZnCO₃	0,5 ± 0,1 ^a	21 ± 1 ^E	0,051 ± 0,013 ^{IV}
Zn-EDTA	2,1 ± 0,1 ^d	53 ± 4 ^B	0,261 ± 0,080 ^V

4.3.3.2 Retención del micronutriente

En la Tabla 4.13 se muestra la cantidad de micronutriente que retiene cada matriz bioplástica. Como se puede observar, la matriz bioplástica con mayor carga de micronutriente antes de la inmersión es la que incorpora ZnCO₃, seguida de la que tiene ZnCl₂, posiblemente debido al mayor porcentaje de zinc incorporado en el mismo porcentaje de sal. Por lo mismo, la matriz bioplástica con Zn-EDTA fue la que menor cantidad de zinc incorporó. En cuanto al zinc que queda en las matrices bioplásticas tras la inmersión, el sistema con ZnCO₃ es el que presentan el mayor porcentaje de retención (79%). Esto se puede deber a la insolubilidad de esta sal en agua (Zhang *et al.*, 2004). No obstante, esto puede tener un efecto perjudicial, ya que la solubilidad de los fertilizantes permite la correcta asimilación de los mismos por las plantas (Timilsena *et al.*, 2015). La matriz que contiene ZnSO₄·H₂O, tanto el de referencia como el básico, tienen un porcentaje de retención del 50%, debido a que la proteína tiene carga negativa (pH > punto isoeléctrico de la proteína obtenido en el Capítulo 3 (4,5)) e interactúa con los iones de zinc creando metaloproteínas (Torreggiani *et al.*, 2008). Este efecto parece ocurrir

también en el caso del $ZnCl_2$, aunque en menor medida (40%). En el caso de la matriz bioplástica ácida, presentó mayor pérdida de zinc, debido a la carga positiva de la proteína ($pH < \text{punto isoelectrico de la proteína}$), provocando su liberación por repulsión electrostática. Por otro lado, la matriz bioplástica con Zn-EDTA incorporado fue la que presentó la peor capacidad de retención (6%). Esto se debe a que el Zn-EDTA es una sal compleja que no se ioniza y no puede ser retenida en la matriz bioplástica por interacciones electrostáticas con la proteína, por lo que se libera completamente al agua cuando se solubiliza.

Tabla 4.13. Contenido en peso de zinc (Zn^{2+}) de las diferentes matrices SPI/Gly procesadas mediante moldeo por inyección a 90 °C con un 10% de $ZnSO_4 \cdot H_2O$ a diferentes pH y con un 10% de diferentes sales incorporadas antes y después de una inmersión en agua de 1 h. Las diferentes letras usadas como superíndice en las distintas columnas evidencian diferencias significativas ($p < 0,05$).

Sistemas	Antes de la inmersión	Después de la inmersión
	Zn^{2+} (%)	Zn^{2+} (%)
$ZnSO_4 \cdot H_2O$	3,6 ^a	1,8 ^A
Ácido	3,6 ^a	1,2 ^B
Básico	3,6 ^a	1,8 ^A
$ZnCl_2$	4,8 ^b	1,9 ^A
$Zn(ClO_4)_2$	2,5 ^c	1,8 ^A
$ZnCO_3$	5,2 ^d	4,1 ^B
Zn-EDTA	1,6 ^c	0,088 ^C

De esta forma, si se estima que la cantidad media de zinc que necesitan los cultivos es de 15-20 mg Zn/kg cultivo (Broadley *et al.*, 2007), prácticamente todas las matrices bioplásticas cumplen este requisito incorporando un solo sistema para cada planta. Sin embargo, en el caso de la matriz bioplástica que incorpora Zn-EDTA, se necesita un mínimo de 3 sistemas por planta para suplir la cantidad de zinc necesaria.

4.3.3.3 Capacidad de absorción de agua

La capacidad de absorción de agua y pérdida de material soluble de las diferentes matrices bioplásticas se muestra en la Figura 4.11. Además, el pH, conductividad y potencial- ζ del agua que queda tras el ensayo de absorción se muestra en la Tabla 4.14. Como se puede observar, el cambio en los valores de pH afecta a la capacidad de absorción de agua de las matrices bioplásticas, siendo ligeramente superior a pH ácido (sin diferencias significativas) e inferior a pH básico. Aunque este efecto contradice el encontrado en bibliografía para las matrices bioplásticas basadas en proteínas (Capezza *et al.*, 2019), en este caso puede atribuirse al efecto que la solución ácida o básica tiene en la sal. El efecto amortiguador producido al incorporar una base a la matriz bioplástica con $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ incorporado, produce una mayor rigidez a las matrices bioplásticas, reduciendo su capacidad de absorción de agua. Además, hace que el medio de absorción mantenga un pH neutro (cerca de 7), siendo imposible apreciar la mejora producida en la absorción de agua en medios básicos.

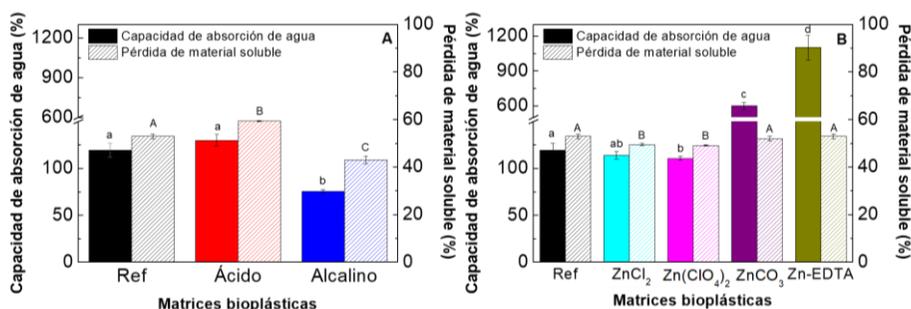


Figura 4.11. Capacidad de absorción de agua y pérdida de material soluble de las matrices bioplásticas SPI/Gly procesadas mediante moldeo por inyección a 90 °C con un 10% de $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ a diferentes pH (A) y con un 10% de diferentes sales incorporadas (B). Las diferentes letras usadas como superíndice en las distintas columnas evidencian diferencias significativas ($p < 0,05$).

En cuanto a la influencia de la deslocalización de carga, se puede analizar comparando la matriz bioplástica de referencia $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ con aquellas que contienen ZnCl_2 o $\text{Zn}(\text{ClO}_4)_2$. Aunque estos efectos cambien la conductividad del agua absorbida (mayor conductividad cuando hay deslocalización de carga), la capacidad de absorción de agua no se ve afectada enormemente.

Tabla 4.14. Valores de pH, conductividad y potencial- ζ del agua de absorción tras los ensayos. Las diferentes letras usadas como superíndice en las distintas columnas evidencian diferencias significativas ($p < 0,05$).

Sistemas	pH	Conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	Potencial-ζ (mV)
ZnSO₄·H₂O	5,0 ^a	325 ^A	9,4 ^I
Ácido	4,1 ^b	342 ^A	9,0 ^I
Básico	6,7 ^c	312 ^A	7,3 ^{II}
ZnCl₂	5,2 ^a	411 ^B	9,2 ^I
Zn(ClO₄)₂	5,0 ^a	451 ^B	9,3 ^I
ZnCO₃	5,5 ^d	204 ^C	18,1 ^{III}
Zn-EDTA	5,6 ^d	131 ^D	27,3 ^{IV}

Finalmente, el efecto de las fuerzas iónicas parece ser el más influyente en la variación de la capacidad de absorción de agua. Las fuerzas iónicas causan una mayor conductividad y menor potencial- ζ en el agua de absorción. Esto crea repulsiones electrostáticas entre el agua de absorción y las matrices bioplásticas, previniendo su hinchamiento para capturar agua. Este efecto reduce significativamente la capacidad de absorción de agua de las matrices. Por ello, aquellos sistemas cuyos medios acuosos tras la inmersión presentan menor conductividad (ZnCO_3 y Zn-EDTA) son los que muestran una mayor capacidad de absorción.

En cuanto a la pérdida de material soluble, parece no ser fuertemente afectada por el cambio de sales o pH en las matrices bioplásticas, siendo entre 50-60% en todos los casos. Así, todos los sistemas perdieron toda

la glicerina presente (debido a su alta afinidad con el agua) y parte de la proteína soluble y sal incorporada. Sin embargo, el sistema alcalino perdió una menor cantidad de material soluble (cercano al 40%), que puede deberse a la mayor rigidez y menor hinchamiento del sistema.

4.3.3.4 SEM

La Figura 4.12 muestra la microestructura de las diferentes matrices bioplásticas después de la inmersión en agua. La diferencia más significativa se encuentra en las matrices bioplásticas de $ZnCO_3$ y $Zn-EDTA$ que tienen una microestructura con poros más grandes, probablemente debido a la mayor capacidad absorción de agua que presentan.

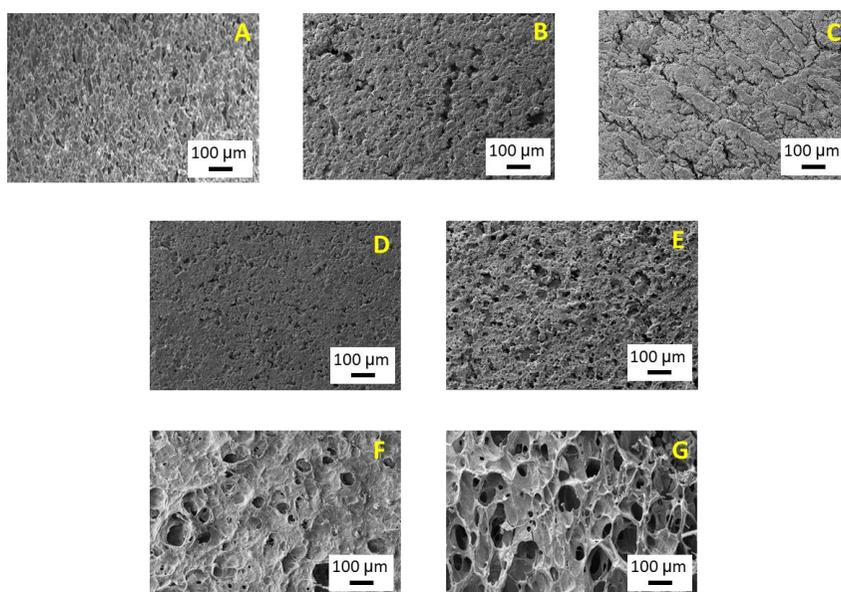


Figura 4.12. Imágenes de las matrices SPI/Gly procesadas mediante moldeo por inyección a 90 °C con un 10% de $ZnSO_4 \cdot H_2O$ a diferentes pH) y con un 10% de diferentes sales incorporadas tras su inmersión en agua. A: $ZnSO_4 \cdot H_2O$. B: Ácido. C: Básico. D: $ZnCl_2$. E: $Zn(ClO_4)_2$. F: $ZnCO_3$. G: $Zn-EDTA$.

El resto de los sistemas tienen una microestructura similar, posiblemente debido a su similar capacidad de absorción de agua. No

obstante, la matriz bioplástica procesada a condiciones básicas (Figura 4.12C) muestra ciertas grietas (direccionadas a la dirección de inyección) en su estructura que pueden estar relacionadas con la mayor fragilidad que el sistema presenta.

Los resultados muestran que, aunque todas las matrices bioplásticas presentan poros, no todas ellas pueden retener una gran cantidad de agua en su interior, debido a que las matrices no pueden hincharse durante la absorción. Este efecto puede atribuirse a las fuerzas iónicas presentes, ya que solamente las matrices que no presentan fuerzas iónicas pueden hincharse y absorber una mayor cantidad de agua.

4.3.4 *Optimización de las propiedades funcionales*

En la sección anterior se demostró que la matriz bioplástica con $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ presenta una alta concentración de zinc, aunque una baja capacidad de absorción de agua. Por el contrario, el sistema con Zn-EDTA permite una gran capacidad de absorción de agua, aunque con una baja concentración del micronutriente. Por este motivo, es necesaria la optimización de las propiedades funcionales de estas matrices bioplásticas. Para ello, en esta sección se evaluará la concentración de Zn-EDTA que se podría incorporar en la matriz bioplástica. Además, se estudiará una mezcla de $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y Zn-EDTA (proporción 3:1), adicionando una cantidad total de sal del 10% en peso (misma concentración que con las sales anteriores), con la finalidad de optimizar las propiedades funcionales (contenido en micronutriente y capacidad de absorción de agua) de la matriz bioplástica. Cabe mencionar que esta proporción se seleccionó para no perjudicar en gran medida la cantidad de zinc proporcionada por el sulfato, incorporando solo en parte el efecto absorbente que podría proporcionar el quelato.

4.3.4.1 Propiedades mecánicas

Ensayos dinámicos de flexión

La Figura 4.13 muestra el perfil del módulo elástico (E') y viscoso (E'') de las matrices bioplásticas con diferentes porcentajes de Zn-EDTA y su mezcla con $ZnSO_4 \cdot H_2O$. Todos los sistemas muestran un perfil similar, donde los módulos aumentan conforme se incrementa la frecuencia.

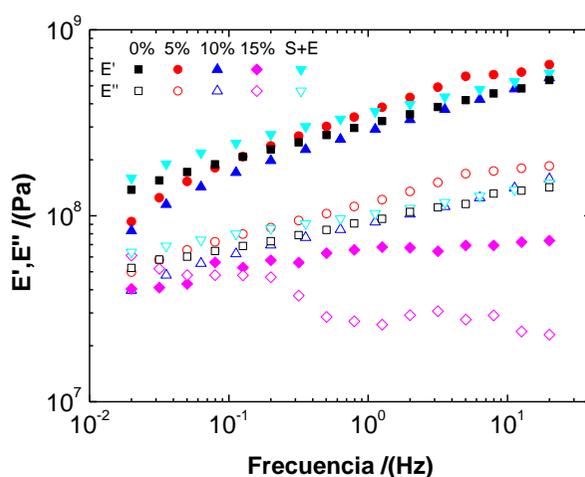


Figura 4.13. Ensayos dinámicos de flexión de las matrices bioplásticas SPI/Gly con diferentes concentraciones de Zn-EDTA y mezcla con $ZnSO_4 \cdot H_2O$ (S+E) procesadas mediante moldeo por inyección a 90 °C.

Una mejor comparación de los sistemas se puede realizar con los parámetros presentes en la Tabla 4.15. Como se puede observar, un aumento en la concentración de Zn-EDTA genera una matriz bioplástica con una mayor deformación crítica, pero un menor módulo elástico. Así, el aumento de la sal provoca una mayor ductilidad de los sistemas. La mezcla de sales (S+E) generó un comportamiento intermedio entre el sulfato y quelato.

Tabla 4.15. Parámetros de flexión de las diferentes matrices bioplásticas SPI/Gly con diferentes concentraciones de Zn-EDTA y mezcla con ZnSO₄·H₂O (S+E) procesadas mediante moldeo por inyección a 90 °C. La matriz bioplástica con un 10% en peso de ZnSO₄·H₂O se incorporó con fines comparativos. Las diferentes letras usadas como superíndice en las distintas columnas evidencian diferencias significativas (p <0,05).

Sistemas	ε_{crit} (%)	E'₁ (MPa)	tan δ₁ (-)
0%	1,01 ± 0,02 ^a	200 ± 19 ^A	0,30 ± 0,02 ^I
5%	0,85 ± 0,04 ^b	383 ± 41 ^B	0,37 ± 0,02 ^{II}
10%	0,89 ± 0,02 ^b	220 ± 22 ^A	0,37 ± 0,05 ^{II}
15%	1,04 ± 0,02 ^a	68 ± 8 ^C	0,37 ± 0,02 ^{II}
S+E	0,82 ± 0,03 ^b	363 ± 27 ^B	0,36 ± 0,04 ^{II}
10%S	1,00 ± 0,03 ^a	400 ± 24 ^B	0,25 ± 0,03 ^{III}

Ensayos estáticos de tracción hasta la rotura

La Figura 4.14 muestra la relación entre el esfuerzo y la deformación en las diferentes matrices bioplásticas. Todas las matrices bioplásticas presentaron una primera zona elástica, donde la deformación podía recuperarse con el tiempo. En esta zona se mantuvo una relación lineal entre deformación y esfuerzo que permitió obtener los valores de los módulos de Young. Luego, se registró un área plástica que permaneció hasta la rotura de las matrices bioplásticas. Una vez superada la zona elástica, las matrices no recuperaron su forma.

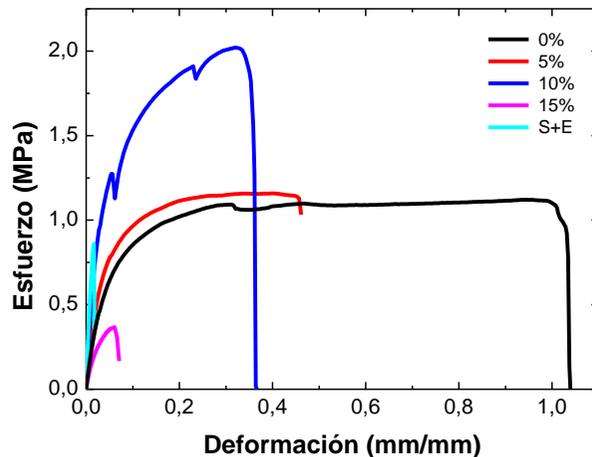


Figura 4.14. Ensayos estáticos de tracción hasta la rotura de las matrices bioplásticas SPI/Gly con diferentes concentraciones de Zn-EDTA y mezcla con ZnSO₄·H₂O (S+E) procesadas mediante moldeo por inyección a 90 °C.

Con respecto a los parámetros de tensión (Tabla 4.16), una mayor incorporación de Zn-EDTA generó una reducción en la deformación a la rotura y un aumento del módulo de Young. Este comportamiento puede deberse a que altos porcentajes de Zn-EDTA perjudica el entrecruzamiento entre las cadenas proteicas de la matriz bioplástica, provocando su menor resistencia mecánica. En cuanto al esfuerzo máximo, este presenta un máximo al incorporar un 10% de Zn-EDTA. El bajo esfuerzo máximo presentado por las matrices bioplásticas que contienen un 15% de Zn-EDTA puede deberse a la poca capacidad de entrecruzamiento en las cadenas proteicas de este sistema, lo que explicaría la razón por la que no se pueden obtener sistemas con un mayor porcentaje de esta sal. En cuanto a la mezcla de sulfato y quelato (S+E), la combinación de sales perjudicó las propiedades a tracción de las matrices bioplásticas presentando una menor deformación máxima que los sistemas unitarios de ambas sales.

Tabla 4.16. Parámetros de tracción de las diferentes matrices bioplásticas SPI/Gly con diferentes concentraciones de Zn-EDTA y mezcla con ZnSO₄·H₂O (S+E) procesadas mediante moldeo por inyección a 90 °C. La matriz bioplástica con un 10% en peso de ZnSO₄·H₂O se incorporó con fines comparativos. Las diferentes letras usadas como superíndice en las distintas columnas evidencian diferencias significativas (p <0,05).

Sistemas	σ_{max} (MPa)	E (MPa)	ε_{max} (mm/mm)
0%	1,1 ± 0,1 ^a	17 ± 1 ^A	1.037 ± 0,074 ^I
5%	1,1 ± 0,1 ^a	19 ± 4 ^A	0,492 ± 0,002 ^{II}
10%	2,1 ± 0,1 ^b	53 ± 4 ^B	0,261 ± 0,080 ^{III}
15%	0,3 ± 0,1 ^c	11 ± 3 ^C	0,007 ± 0,003 ^{IV}
S+E	0,8 ± 0,1 ^d	66 ± 5 ^D	0,003 ± 0,002 ^{IV}
10%S	0,2 ± 0,1 ^c	67 ± 7 ^D	0,040 ± 0,003 ^V

4.3.4.2 Retención del micronutriente

En la Tabla 4.17 se muestra la cantidad de zinc en las matrices bioplásticas antes y después de una inmersión en agua. La cantidad de zinc remanente en las diferentes matrices bioplásticas después de la etapa de absorción no presentó diferencias significativas entre los diferentes porcentajes de Zn-EDTA incorporados. El zinc liberado en la etapa de inmersión fue más pronunciado en las matrices donde se incorporó más Zn-EDTA (15%). Este hecho puede deberse a la menor estructuración de la matriz, junto con la poca capacidad de la matriz proteica para retener esta sal compleja mediante interacciones electrostáticas. Por lo tanto, este ensayo demuestra que el Zn-EDTA no es la sal idónea para realizar un sistema de liberación controlada. Además, su incorporación en el sistema combinado (S+E) provocó una reducción de la cantidad de zinc incorporada por el sulfato.

Tabla 4.17. Contenido en peso de zinc (Zn^{2+}) de las diferentes matrices bioplásticas SPI/Gly con diferentes concentraciones de Zn-EDTA y mezcla con $ZnSO_4 \cdot H_2O$ (S+E) procesadas mediante moldeo por inyección a 90 °C. La matriz bioplástica con un 10% en peso de $ZnSO_4 \cdot H_2O$ se incorporó con fines comparativos. Las diferentes letras usadas como superíndice en las distintas columnas evidencian diferencias significativas ($p < 0,05$).

Sistemas	Antes de la inmersión	Después de la inmersión
	Zn^{2+} (%)	Zn^{2+} (%)
0%	-	-
5%	0,9 ^a	0,087 ^A
10%	1,6 ^b	0,088 ^A
15%	2,7 ^c	0,088 ^A
S+E	3,1 ^d	1,4 ^B
10%S	3,6 ^e	1,8 ^C

4.3.4.3 Capacidad de absorción de agua

La Figura 4.15 muestra tanto la capacidad de absorción de agua como la pérdida de materia soluble. La incorporación de Zn-EDTA mejoró la capacidad de absorción de agua de las matrices bioplásticas (si se comparan con aquellas que incorporan un 10% de $ZnSO_4 \cdot H_2O$ cuya capacidad de absorción es del 109%). Sin embargo, la matriz bioplástica con un 15% de Zn-EDTA no fue resistente tras el ensayo, descomponiéndose. Este comportamiento es debido posiblemente a la menor cantidad de proteína que presenta y su menor estructuración. En la mezcla S+E, la sal predominante al realizar estas pruebas parecía ser el sulfato, ya que no mejoraba la capacidad de absorción de agua de las matrices que lo incorporaban (109% para las matrices con un 10% $ZnSO_4 \cdot H_2O$ frente a 1200% para los sistemas con 10% Zn-EDTA). Por lo tanto, no se logró una sinergia entre las propiedades de ambas sales, llegando incluso a tener peores efectos en comparación con sus sistemas unitarios.

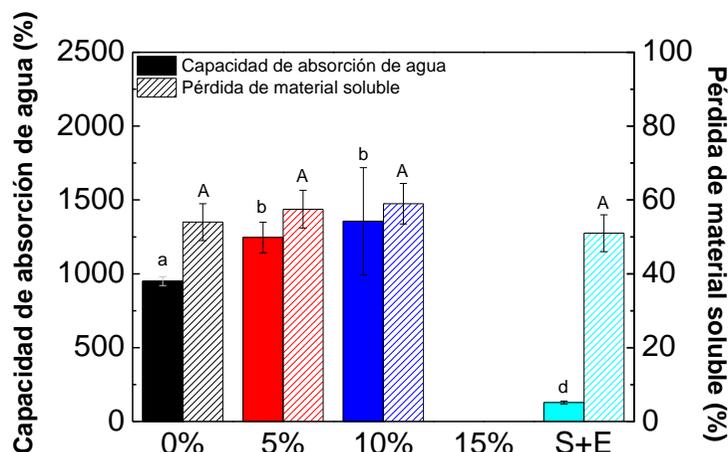


Figura 4.15. Capacidad de absorción de agua y pérdida de material soluble de las matrices bioplásticas SPI/Gly con diferentes concentraciones de Zn-EDTA y mezcla con $ZnSO_4 \cdot H_2O$. (S+E) procesadas mediante moldeo por inyección a 90 °C

En cuanto a la pérdida de material soluble, no hubo diferencias significativas entre los diferentes sistemas, lo que indica que la glicerina se pierde en todos los sistemas debido a su carácter fuertemente hidrofílico. La pérdida de proteína y sal aumentó conforme se incorporó mayores porcentajes de Zn-EDTA, ya que tenían menos cantidad de glicerina, pero la misma pérdida de material soluble. Esto puede deberse al menor fortalecimiento de las matrices, como se mencionó anteriormente.

4.3.4.4 SEM

La Figura 4.16 muestra las imágenes tomadas de las diferentes matrices bioplásticas tras la inmersión en agua. Se observa que el aumento del porcentaje de Zn-EDTA en las matrices hace que estos presenten una estructura más abierta y con poros más grandes. Esto podría deberse al mayor hinchamiento de la matriz al absorber una mayor cantidad de agua, como se observó en el ensayo anterior. Por el mismo motivo, la microestructura del sistema combinado (S+E) presentó una

microestructura similar a la del $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, ya que ambas absorben una cantidad de agua similar.

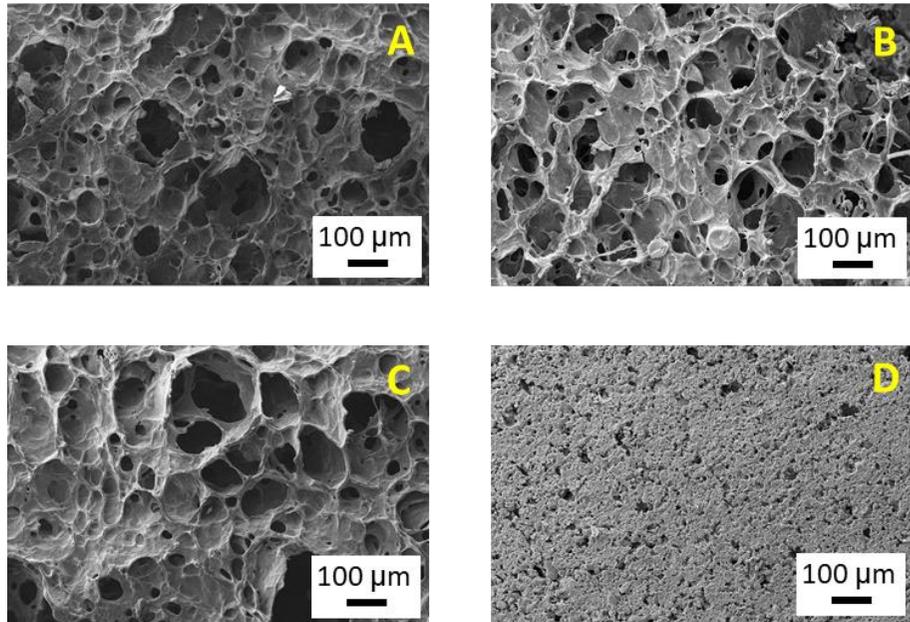


Figura 4.16. Imágenes de las matrices bioplásticas SPI/Gly con diferentes concentraciones de Zn-EDTA: 5% (A), 10% (B) y 15% (C) y mezcla con $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (S+E) (D) procesadas mediante moldeo por inyección a 90 °C tras su inmersión en agua.

4.4 Conclusiones

Las matrices bioplásticas a base de proteína han demostrado su potencial para la incorporación de sales que contienen micronutrientes. De esta forma, se han podido desarrollar matrices bioplásticas con zinc incorporado mediante diferentes técnicas de procesado y utilizando diferentes sales convencionales.

El moldeo por inyección consiguió matrices bioplásticas con una mejor resistencia mecánica (mayor módulo elástico a flexión y esfuerzo máximo y deformación a la rotura a tracción) que la extrusión. Este efecto también se observó al aumentar la temperatura de procesado, independientemente de la técnica utilizada. A este incremento de la temperatura también se le puede atribuir un descenso en la capacidad de absorción de agua. Por este motivo, se seleccionó el moldeo por inyección a una temperatura de 90 °C como la técnica más eficiente para desarrollar las matrices bioplásticas con zinc incorporado.

Además, se ha incorporado a la matriz bioplástica una cantidad importante de micronutriente esencial (zinc) para la planta (hasta un 10% en peso de $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$). No obstante, la incorporación de la sal conduce a matrices bioplásticas más rígidas y menos deformables. Asimismo, estas matrices bioplásticas con $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ implican una reducción significativa de su capacidad de absorción de agua. De hecho, el tamaño de poro de estas matrices bioplásticas está muy influenciado por la presencia del micronutriente, reduciéndose notablemente cuando la sal está presente.

La reducción de la capacidad de absorción de agua de las matrices bioplásticas con sal incorporada se evaluó utilizando diferentes sales.

Así, se comprobó que la deslocalización de carga no produce variaciones en ninguna de las propiedades de las matrices bioplásticas. Además, aunque en estudios previos el nivel de pH parecía tener una gran influencia, su importancia se perdió parcialmente cuando se incorporó una sal a la matriz bioplástica. Así, cuando se bajó el pH no se observó una mejora general en las propiedades mecánicas ni en la capacidad de absorción de agua de la matriz bioplástica, aunque la capacidad de retención de micronutrientes después de un tratamiento severo del agua si descendió, debido a la carga que presentaba la matriz bioplástica. Cuando se aumentó el pH se produjo el efecto contrario, posiblemente debido a la incompatibilidad entre la matriz y el tampón provocado por la sal y la solución alcalina. El efecto de las fuerzas iónicas pareció ser el más pronunciado, ya que las propiedades mecánicas y la capacidad de absorción de agua mejoraron notablemente al incorporar ZnCO_3 o Zn-EDTA. Sin embargo, el ZnCO_3 es insoluble imposibilitando su captación por la planta y el Zn-EDTA incorporó una cantidad muy pequeña de zinc a la matriz bioplástica, debido al bajo peso de zinc que se encuentra en su estructura. Por lo tanto, es necesario buscar una alternativa para mejorar la capacidad de absorción de agua, sin menoscabar la principal utilidad de estos sistemas (la liberación controlada e incorporación de micronutrientes a la planta).

Con la optimización de las propiedades funcionales de las matrices bioplásticas se recalcó que el Zn-EDTA mejora la capacidad de absorción de agua de los sistemas, aunque no se logra una carga importante de zinc ni una liberación controlada del micronutriente con esta sal. Por último, una mezcla de $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y Zn-EDTA no logró crear una sinergia entre sus propiedades. Así, se redujo la cantidad de

zinc incorporada por el sistema de $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, pero sin mejorar su capacidad de absorción de agua de manera significativa.

Tras este trabajo, la matriz bioplástica con un 10% en peso de $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ incorporado y procesado mediante moldeo por inyección a $90\text{ }^\circ\text{C}$ fue seleccionada como el sistema más adecuado para la incorporación de zinc. Esto se debió a la gran cantidad de zinc que incorporó a la matriz bioplástica. Además de mostrar las propiedades mecánicas adecuadas para ser utilizadas como sistemas de liberación controlada. No obstante, es necesario mejorar el procesado, ya que las matrices bioplásticas liberan una gran concentración de micronutriente en poco tiempo (1 h), no pudiéndose considerar como sistemas de liberación controlada.

4.5 Concluding remarks

Protein-based bioplastic matrices have shown their potential to incorporate salts that contain micronutrients. In this way, it has been possible to develop bioplastic matrices with incorporated zinc through different processing techniques and using diverse conventional salts.

Injection molding achieved bioplastic matrices with better mechanical resistance (higher elastic modulus at bending and maximum stress and strain at tension) than extrusion. This effect was also observed by incrementing the processing temperature, regardless of the technique used. A decrease in the water uptake capacity can also be attributed to this increase in temperature. For this reason, injection molding at a mold temperature of 90 °C was selected as the most efficient technique to develop the zinc-incorporated bioplastic matrices.

In addition, a significant amount of essential micronutrient (zinc) for the plant (up to 10 wt% of $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) has been incorporated into the bioplastic matrix. However, the incorporation of salt leads to more rigid and less deformable bioplastic matrices. Likewise, these bioplastic matrices with $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ imply a significant reduction in their water uptake capacity. In fact, the pore size of these bioplastic matrices is highly influenced by the presence of the micronutrient, significantly reducing when salt is present.

The reduction of the water uptake capacity of bioplastic matrices with salt incorporated was evaluated using different salts. Thus, it was found that charge delocalization does not produce variations in any of the properties of the bioplastic matrices. Furthermore, although in previous studies, the pH value seemed to have a great influence, its importance

was partially lost when a salt was incorporated into the bioplastic matrix. Thus, a reduction in pH does not produce a significant effect on the mechanical properties and the water uptake capacity of the bioplastic matrix, although the micronutrient retention capacity after severe water treatment was lower. When the pH was increased, the opposite effect occurred, possibly due to incompatibility between the matrix and the buffer caused by the salt and alkaline solution. The effect of ionic forces appeared to be the most pronounced, as mechanical properties and water absorption capacity were markedly improved. However, ZnCO_3 is insoluble, making its uptake by the plant impossible, and Zn-EDTA incorporated a very small amount of zinc into the bioplastic matrix due to the low weight of zinc found in its structure. Therefore, it is necessary to find an alternative to improve the water absorption capacity, without undermining the main utility of these systems (the controlled incorporation of micronutrients into the plant).

Regarding the optimization of the functional properties of the bioplastic matrices, it was emphasized that Zn-EDTA improves the water absorption capacity of the systems, although a significant load of zinc or a controlled release of the micronutrient is not achieved with this salt. Lastly, a mixture of $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ and Zn-EDTA failed to create a synergy between their properties. Thus, the amount of zinc incorporated by the $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ system was reduced, but without improving its water absorption capacity.

After this work, the bioplastic matrix with 10 wt% of $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ incorporated and processed by injection molding at 90 °C was selected as the most suitable system for the incorporation of zinc. This was due to the large amount of zinc incorporated into this bioplastic matrix and

the appropriate mechanical properties to be used as controlled release systems. However, it is necessary to improve its processing since the bioplastic matrices present a rapid release of the micronutrient and cannot be considered controlled release systems.

Agradecimientos

Parte de este capítulo se realizó gracias a la estancia de investigación realizada en el Instituto Nacional para la Investigación Agronómica (INRAE) de Nantes (Francia) financiada por la Universidad de Sevilla a través de sus ayudas a estancias del VI Plan Propio de Investigación. Especialmente, se agradece al Profesor Dennis Lourdin por tutorizar dicha estancia y a Jean-Eudes Maigret por su ayuda en el laboratorio. Además, se agradece a los servicios de Microanálisis y Microscopía del Centro de Investigación, Tecnología e Innovación de la Universidad de Sevilla (CITIUS) por su asesoramiento durante los ensayos realizados en sus instalaciones.

Publicaciones relacionadas

Jiménez-Rosado, M., Pérez-Puyana, V., Cordobés, F., Romero A. y Guerrero, A. (2018). Development of soy protein-based matrices containing zinc as micronutrient for horticulture. *Industrial Crops and Products*, 121, 345-351.

Jiménez-Rosado, M., Pérez-Puyana, V., Cordobés, F., Romero, A. y Guerrero, A. (2019). Development of superabsorbent soy protein-based bioplastic matrices with incorporated zinc for horticulture. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99, 4825-4832.

Jiménez-Rosado, M., Alonso-González, M., Aguilar, J.M., Cordobés, F. y Romero, A. (2019). Desarrollo de matrices bioplásticas superabsorbentes de proteína de soja con micronutriente incorporado para su uso en horticultura. *Afinidad*, 76, 254-261.

Jiménez-Rosado, M., Perez-Puyana, V., Rubio-Valle, J.F., Guerrero, A. y Romero, A. (2020). Evaluation of superabsorbent capacity of soy protein-based bioplastic matrices with incorporated fertilizer for crops. *Journal of Polymers and the Environment*, 28, 2661-2668.

Jiménez-Rosado, M., Martín, A., Alonso-González, M., Guerrero, A. y Romero, A. (2020). Functional biodegradable protein-based matrices as a potential candidate for micronutrients and water supply. *Polymer Engineering & Science*, 60, 2285-2291.

Jiménez-Rosado, M., Maigret, J.E., Lourdin, D., Guerrero, A. y Romero, A. (2022). Injection molding versus extrusion in the manufacturing of soy protein-based bioplastics with zinc incorporated. *Journal of Applied Polymer Science*, 139, 51630.

Referencias

Abdelmoez, W. y Yoshida, H. (2007) "Mechanical and Thermal Properties of a Novel Protein-Based Plastic Synthesized Using Subcritical Water Technology", *Macromolecules*, 40(26), pp. 9371–9377.

Aguilar, J. M., Bengoechea, C., Pérez, E. y Guerrero, A. (2020) "Effect of different polyols as plasticizers in soy based bioplastics", *Industrial Crops and Products*, 153, p. 112522.

Broadley, M. R., White, P. J., Hammond, J. P., Zelko, I. y Lux, A. (2007) "Zinc in plants: Tansley review", *New Phytologist*, 173(4), pp. 677–702.

Cakmak, I. y Kutman, U. B. (2018) "Agronomic biofortification of cereals with zinc: a review", *European Journal of Soil Science*, 69(1), pp. 172–180.

Capezza, A. J., Newson, W. R., Olsson, R. T., Hedenqvist, M. S. y Johansson, E. (2019) "Advances in the Use of Protein-Based Materials: Toward Sustainable Naturally Sourced Absorbent Materials", *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 7(5), pp. 4532–4547.

Castro-Enríquez, D.-D., Castillo-Ortega, M.-M., Romero-García, J., Rodríguez-Félix, D.-E., Dórame-Miranda, R.-F., Torres-Arreola, W., Vargas-López, J.-M., Burruel-Ibarra, S.-E. y Rodríguez-Félix, F. (2019) "Development of microparticles from wheat glutenins by electrospray and potential application as controlled-release fertilizers", *Bulletin of Materials Science*, 42(1), p. 41.

Chang, L., Xu, L., Liu, Y. y Qiu, D. (2021) "Superabsorbent polymers used for agricultural water retention", *Polymer Testing*, 94, p. 107021.

Daitx, T. S., Giovanela, M., Carli, L. N. y Mauler, R. S. (2019) "Biodegradable polymer/clay systems for highly controlled release of NPK fertilizer", *Polymers for Advanced Technologies*, 30(3), pp. 631–639.

Félix, M., Lucio-Villegas, A., Romero, A. y Guerrero, A. (2016)

"Development of rice protein bio-based plastic materials processed by injection molding", *Industrial Crops & Products*, 79, pp. 152–159.

Feng, D., Bai, B., Wang, H. y Suo, Y. (2017) "Novel Fabrication of Biodegradable Superabsorbent Microspheres with Diffusion Barrier through Thermo-Chemical Modification and Their Potential Agriculture Applications for Water Holding and Sustained Release of Fertilizer", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(29), pp. 5896–5907.

Fernández-Espada, L., Bengoechea, C., Cordobés, F. y Guerrero, A. (2016) "Thermomechanical properties and water uptake capacity of soy protein-based bioplastics processed by injection molding", *Journal of Applied Polymer Science*, 133(24), p. 43524.

Fernández-Espada, L., Bengoechea, C., Sandía, J. A., Cordobés, F. y Guerrero, A. (2019) "Development of novel soy-protein-based superabsorbent matrixes through the addition of salts", *Journal of Applied Polymer Science*, 136(5), p. 47012.

Hussain, S., Maqsood, M. y Miller, L. (2012) "Bioavailable zinc in grains of bread wheat varieties of Pakistan", *Cereal Research Communications*, 40(1), pp. 62–73.

Jiménez-Rosado, M., Perez-Puyana, V., Cordobés, F., Romero, A. y Guerrero, A. (2018) "Development of soy protein-based matrices containing zinc as micronutrient for horticulture", *Industrial Crops and Products*, 121, pp. 345–351.

Jiménez-Rosado, M., Rubio-Valle, J. F., Perez-Puyana, V., Guerrero, A. y Romero, A. (2021) "Comparison between pea and soy protein-based bioplastics obtained by injection molding", *Journal of Applied Polymer Science*, 138(20), p. 50412.

Jiménez-Rosado, M., Perez-Puyana, V., Cordobés, F., Romero, A. y Guerrero, A. (2019) "Development of superabsorbent soy protein-based

bioplastic matrices with incorporated zinc for horticulture", *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99, 4825-4832.

Jin, S., Yue, G., Feng, L., Han, Y., Yu, X. y Zhang, Z. (2011) "Preparation and Properties of a Coated Slow-Release and Water-Retention Biuret Phosphoramidate Fertilizer with Superabsorbent", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(1), pp. 322–327.

Judawisastra, H., Sitohang, R. D. R., Marta, L. y Mardiyati (2017) "Water absorption and its effect on the tensile properties of tapioca starch/polyvinyl alcohol bioplastics", *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 223(012066).

Kondraju, T. T. y Rajan, K. S. (2019) "Excessive fertilizer usage drives agriculture growth but depletes water quality", *ISPRS Annals of Photogrammetry, Remote Sensing and Spatial Information Sciences*, IV-3/W1, pp. 17–23..

Kong, W., Li, Q., Li, X., Su, Y., Yue, Q. y Gao, B. (2019) "A biodegradable biomass-based polymeric composite for slow release and water retention", *Journal of Environmental Management*, 230, pp. 190–198.

Liu, B., Jiang, L. y Zhang, J. (2010) "Development of soy protein/poly(lactic acid) bioplastics", en *Society of Plastics Engineers - Global Plastics Environmental Conference 2010, GPEC 2010*. Orlando: Society of Plastics Engineers.

Ma, Z., Li, Q., Yue, Q., Gao, B., Xu, X. y Zhong, Q. (2011) "Synthesis and characterization of a novel super-absorbent based on wheat straw", *Bioresource Technology*, 102(3), pp. 2853–2858.

Martínez, C. . y Motto, H. . (2000) "Solubility of lead, zinc and copper added to mineral soils", *Environmental Pollution*, 107(1), pp. 153–158.

Montesano, F. F., Parente, A., Santamaria, P., Sannino, A. y Serio, F. (2015)

"Biodegradable Superabsorbent Hydrogel Increases Water Retention Properties of Growing Media and Plant Growth", *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 4, pp. 451–458.

Navizaga, C., Lenzo, C., Zhang, H., Brazienė, Z., Paltanavicius, V., Petrauskiene, J., Mazeika, R., Staugaitis, G., Sviklas, A. M. y Baltrusaitis, J. (2017) "Efficiency Evaluation of Dairy Wastewater Derived Zinc Micronutrient Containing Sustainable Fertilizers", *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 5(8), pp. 6692–6699.

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (2022) *Datos de alimentación y agricultura*. Disponible en: <http://www.fao.org/> (Accedido: Marzo 28, 2022).

Perez-Puyana, V., Felix, M., Romero, A. y Guerrero, A. (2016) "Effect of the injection moulding processing conditions on the development of pea protein-based bioplastics", *Journal of Applied Polymer*, 133(20), pp. 1–9.

Perez-Puyana, V., Felix, M., Romero, A. y Guerrero, A. (2018) "Development of eco-friendly biodegradable superabsorbent materials obtained by injection moulding", *Journal of Cleaner Production*, 198, pp. 312–319.

Relf, D. (1992) "Human Issues in Horticulture", *Hort Technology*, 2(2), pp. 159–171.

Rouphael, Y., Cardarelli, M., Schwarz, D., Franken, P. y Colla, G. (2012) "Effects of Drought on Nutrient Uptake and Assimilation in Vegetable Crops", en *Plant Responses to Drought Stress*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, pp. 171–195.

Sadeghi, M. y Hosseinzadeh, H. (2008) "Synthesis of Starch—Poly(Sodium Acrylate-co-Acrylamide) Superabsorbent Hydrogel with Salt and pH-Responsiveness Properties as a Drug Delivery System", *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 23(4), pp. 381–404.

Sanchez-Hernandez, J. C. (2019) *Bioremediation of Agricultural Soils*. Cola de Ratón: CRC Press.

Timilsena, Y. P., Adhikari, R., Casey, P., Muster, T., Gill, H. y Adhikari, B. (2015) "Enhanced efficiency fertilisers: A review of formulation and nutrient release patterns", *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(6), pp. 1131–1142.

Torreggiani, A., Domènech, J., Atrian, S., Capdevila, M. y Tinti, A. (2008) "Raman study of in vivo synthesized Zn(II)-metallothionein complexes: Structural insight into metal clusters and protein folding", *Biopolymers*, 89(12), pp. 1114–1124.

Uchida, R. (2000) *Essential Nutrients for Plant Growth: Nutrient Functions and Deficiency Symptoms, en Plant Nutrient Management in Hawaii's Soils, approaches for Tropical and Subtropical Agriculture*. Manoa: College of Tropical Agriculture and Human Resources.

Verbeek, C. y Van Den Berg, L. (2010) "Extrusion Processing and Properties of Protein-Based Thermoplastics", *Macromolecular Materials and Engineering*, 295(1), pp. 10–21.

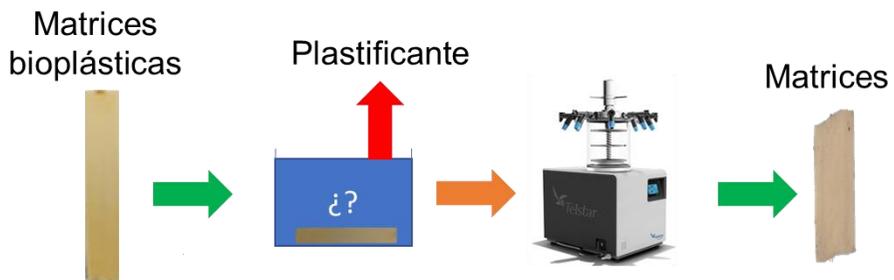
Yater, L. D., Dutson, T. R., Caldwell, J. y Carpenter, Z. L. (1983) "Effect of temperature and pH on the post-mortem degradation of myofibrillar proteins", *Meat Science*, 9, 157-179.

Zárate-Ramírez, L. S., Romero, A., Bengoechea, C., Partal, P. y Guerrero, A. (2014) "Thermo-mechanical and hydrophilic properties of polysaccharide/gluten-based bioplastics", *Carbohydrate Polymers*, 112, pp. 24–31.

Zayas, J. F. (1997) "Water Holding Capacity of Proteins", in Springer (ed.) *Functionality of Proteins in Food*. Berlin: Springer.

Zhang, S., Fortier, H. y Dahn, J. R. (2004) "Characterization of zinc carbonate hydroxides synthesized by precipitation from zinc acetate and potassium carbonate solutions", *Materials Research Bulletin*, 39(12), pp. 1939–1948.

Capítulo 5: Eliminación del plastificante para conseguir una liberación controlada del micronutriente



5.1 Introducción

La alta degradación de los suelos hortícolas junto con la baja eficiencia a corto plazo de otras soluciones (barbecho o labranza de conservación), ha llevado a un uso excesivo de fertilizantes (Fertilizar: Civil association, 2020). Entre sus ventajas se encuentran su rapidez para contrarrestar las carencias del campo y su bajo costo (Flinck, 1982). Sin embargo, también pueden generar serios problemas. El problema más grave es su filtración al subsuelo y aguas subterráneas, que los contaminan con un exceso de nutrientes, siendo peligrosos para el medioambiente y el ser humano. Esta filtración se debe a la baja asimilación de fertilizantes por parte de las plantas, que solo captan una pequeña parte de los fertilizantes incorporados al suelo. Además, esta baja asimilación genera que se deba incorporar una mayor cantidad de fertilizantes al suelo durante el crecimiento del cultivo, lo que se traduce en un mayor costo de producción (Kondraju y Rajan, 2019).

Dentro de este sector, Andalucía tiene el 41,3% de su superficie ocupada por tierras de cultivo, lo que equivale a 4.591.460 ha, con una producción de 9.300.363 toneladas de cultivos en 2018, generando el 9,18% del empleo andaluz. Esto se debe a su clima, ideal para el cultivo durante todo el año. Además, el 62% de los productos cultivados en este territorio cuentan con certificación de calidad (Agencia de Gestión Agraria y Pesquera de Andalucía, 2019). Andalucía se ha convertido en el principal exportador de la comunidad europea, situándose entre los 10 primeros del mundo, siendo sus productos estrella los cereales y leguminosas (Junta de Andalucía, 2020). Entre las frutas y hortalizas, los más exportados son pimientos, tomates, pepinos, calabazas y fresas, siendo Alemania, Francia, Italia y Reino Unido sus principales

compradores (Galdeano, 2002). El suelo agrícola andaluz es arcilloso con materiales calizos antiguos, y suele ser deficiente en micronutrientes como el manganeso, hierro, cobre y zinc, siendo la escasez de este último el más problemático de todos (Peña *et al.*, 2017). Su deficiencia puede disminuir la producción del cultivo en más del 50%, por lo que es vital detectarlo a tiempo y contrarrestarlo (Silva y Uchida, 2000).

La deficiencia de nutrientes y el alto consumo de fertilizantes han generado un nuevo campo de investigación centrado en el estudio de métodos de fertilización más efectivos (Hernández *et al.*, 2016; Pagnani *et al.*, 2018; Shaji *et al.*, 2021). Estas investigaciones no solo se enfocan en reducir la cantidad de fertilizantes utilizados, sino también en buscar técnicas de fertilización competitivas que no encarezcan el producto final, lo cual sigue siendo un desafío. Entre ellos, cobra especial interés el uso de sistemas de liberación controlada (Chen *et al.*, 2020; K.R. *et al.*, 2021). Sin embargo, las materias primas y técnicas utilizadas para fabricar estos sistemas tienen grandes problemas de escalabilidad y, por tanto, no pueden competir con la fertilización convencional (su precio oscila entre 1,50 y 22,00 €/kg frente a los 0,75-3,00 €/kg de los fertilizantes convencionales). En este sentido, el uso de subproductos o residuos agroalimentarios ricos en proteínas es más factible, al suponer una mayor valorización en cuanto a sus aplicaciones tecnológicas (Damodaran, 1997; Bozell, 2006). Además, pueden ser procesados por los mismos métodos utilizados para los plásticos convencionales, lo que los convierte en una alternativa que puede competir con los fertilizantes convencionales (0,50-2,00 €/kg) (De Corato *et al.*, 2018; Gontard *et al.*, 2018).

Uno de los procedimientos más sencillos para el desarrollo de estas matrices bioplásticas, como se ha visto en capítulos anteriores, consiste en homogenizar la proteína y la sal que contiene el micronutriente con un plastificante y, posteriormente, procesar la mezcla resultante mediante moldeo por inyección o extrusión (Song *et al.*, 2011; Klüver y Meyer, 2015; Fernández-Espada *et al.*, 2016). El uso del plastificante es necesario para facilitar el procesado de las matrices. Sin embargo, la presencia del mismo en el interior de las matrices induce a la liberación rápida de gran parte del micronutriente a la tierra de cultivo. Por tanto, antes de utilizarlas, es necesario eliminar el plastificante para poder realizar una liberación debidamente controlada.

Entre los plastificantes utilizados, la glicerina (el más común) tiene una alta afinidad por el agua, siendo una inmersión en la misma el procedimiento más fácil para eliminarlas de las matrices bioplásticas. Sin embargo, la alta solubilidad de las sales utilizadas en horticultura para incorporar los micronutrientes (como el sulfato) hace que estas se pierdan durante la inmersión, eliminándose la posibilidad de liberar los micronutrientes en los cultivos. En este sentido, el principal objetivo de este capítulo fue obtener el mejor protocolo para eliminar eficientemente el plastificante, sin limitar la cantidad de micronutriente incorporado en la matriz. Para ello, se evaluaron diferentes protocolos para la eliminación del plastificante, llegando a su optimización. Finalmente, se evaluaron las propiedades funcionales de las matrices para escoger el método de procesado más eficaz.

5.2 Materiales y métodos

La matriz se fabricó a partir del subproducto de soja, añadiéndole sulfato de zinc monohidratado ($ZnSO_4 \cdot H_2O$) como sal que contiene el micronutriente deseado (zinc). Una descripción más detallada de estos productos está incluida en la sección 2.1.1 y 2.1.3 del Capítulo 2. Además, se utilizó la glicerina como plastificante para facilitar el procesado de las matrices. Este material está descrito en la sección 2.1.2.

En este capítulo se comparan los resultados de las matrices procesadas siguiendo todos los protocolos explicados en la sección 2.7 del Capítulo 2. Además, se estudia la influencia del tipo de disolvente utilizado en el medio de extracción de plastificante. Un resumen de los estudios desarrollados en este capítulo se encuentra en la Tabla 5.1.

Tabla 5.1. Estudios realizados, métodos y medios de inmersión utilizados y sección donde se encuentran los resultados.

Estudio	Método de incorporación de zinc	Medio de inmersión	Sección
Diferentes métodos	A	Etapla previa de mezclado	Agua
	B	Inmersión	Disolución saturada de sal
	A+B	Mezclado + Inmersión	
	C	Segunda etapa de inmersión	Agua + Disolución saturada de sal
Optimización	A	Etapla previa de mezclado	Agua Etanol Mezcla agua/etanol
Evaluación funcional	A	Etapla previa de mezclado	Agua Etanol
	B	Etapla de Inmersión	Disolución saturada de sal

Las matrices elaboradas en los diferentes estudios fueron caracterizadas utilizando las técnicas resumidas en la Tabla 5.2.

Tabla 5.2. Técnicas de caracterización usadas para evaluar las matrices.

Propiedades	Técnica	Sección
Fisicoquímicas	Cinética de eliminación del plastificante	2.8.1.1
	TGA	2.8.1.2
Mecánicas	Compresión dinámica	2.8.2
Morfológicas	SEM	2.8.3.1
	EDAX	2.8.3.2
Funcionales	Micronutriente incorporado	2.8.4.1
	Liberación del micronutriente	2.8.4.2
	Capacidad de absorción de agua	2.8.4.3
Ambientales	Biodegradabilidad	2.8.5
Hortícolas	Evaluación en cultivos	2.8.6

5.3 Resultados y discusión

5.3.1 Evaluación de diferentes métodos para la obtención de la matriz

5.3.1.1 Propiedades mecánicas

La Figura 5.1 muestra los barridos de frecuencia realizados a las matrices procesadas por los diferentes métodos. En este ensayo se registran los módulos elástico y viscoso obtenidos tras la aplicación de una deformación de compresión de baja amplitud, dentro del intervalo viscoelástico lineal. Todas las matrices estudiadas presentaron un comportamiento sólido ($E' > E''$) con una dependencia muy baja de la frecuencia.

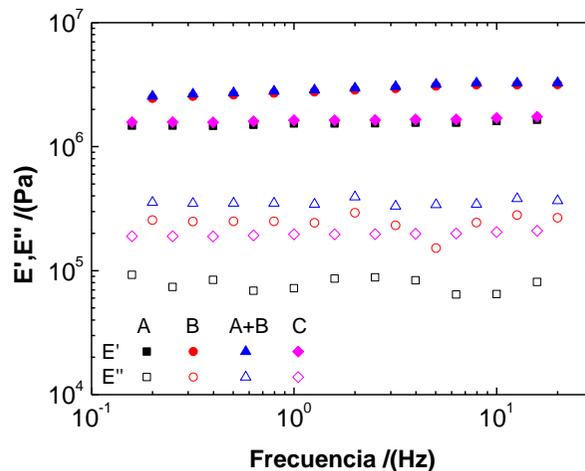


Figura 5.1. Ensayos dinámicos de compresión de las matrices procesadas por los diferentes métodos.

En la Tabla 5.3 se muestran los parámetros característicos de estos ensayos. En primer lugar, se realizaron los barridos de deformación, no encontrando diferencias significativas entre las deformaciones críticas de los diferentes métodos (alrededor del 0,05% en todos los casos). Por otro lado, se puede observar que las matrices obtenidas por inmersión directa

en una disolución saturada de sal (B y A+B) presentan valores del módulo elástico (E'_1) superiores a los de aquellas matrices que se sumergen en agua, ya sea en una sola etapa (A) o como primera etapa (C). Esto puede deberse a la diferencia generada en la estructura de la matriz por cada uno de los dos medios. En este sentido, el agua parece producir un mayor hinchamiento de la matriz, afectando más a su estructura, que la disolución saturada de sal. En cuanto a los valores de la tangente de pérdidas ($\tan \delta_1$), son, en todos los casos, inferiores a 0,2, lo que demuestra que, a pesar de las diferencias encontradas entre los valores del módulo elástico, todas las matrices presentan un carácter predominantemente sólido. No se muestran diferencias significativas entre los valores de $\tan \delta_1$ de las diferentes matrices, lo que indica que la relación entre el módulo elástico y viscoso no se ve afectada significativamente por el cambio en el procesado de las matrices.

Tabla 5.3. Parámetros de compresión de las matrices procesadas por diferentes métodos. Las diferentes letras usadas como superíndice en las distintas columnas evidencian diferencias significativas ($p < 0,05$).

Sistemas	ϵ_{crit} (%)	E'_1 (MPa)	$\tan \delta_1$ (-)
A	$0,04 \pm 0,02^a$	$1,5 \pm 0,2^A$	$0,09 \pm 0,03^I$
B	$0,05 \pm 0,01^a$	$2,8 \pm 0,1^B$	$0,10 \pm 0,02^I$
A+B	$0,06 \pm 0,02^a$	$3,0 \pm 0,2^B$	$0,09 \pm 0,03^I$
C	$0,04 \pm 0,01^a$	$1,6 \pm 0,3^A$	$0,12 \pm 0,01^I$

5.3.1.2 Propiedades morfológicas

SEM

En la Figura 5.2 se muestran las imágenes de SEM de las matrices procesadas por los diferentes métodos. Generalmente, todas las matrices tienen poros homogéneos. Las matrices obtenidas por los métodos A y C tienen el mayor tamaño de poro ($14,7 \pm 5,5$ y $13,2 \pm 2,3 \mu\text{m}$,

respectivamente), sin diferencias significativas entre los dos sistemas. En cambio, las matrices que fueron sometidas a una inmersión en la solución saturada (métodos B y A+B) tienen un tamaño medio de poro de $7,2 \pm 2,3$ y $6,3 \pm 1,5 \mu\text{m}$, respectivamente. Estos resultados son consistentes con los obtenidos en las propiedades mecánicas. De esta forma, las matrices con un tamaño de poro inferior (métodos B y A+B) tienen una estructura más compacta que conduce a mayores módulos elásticos.

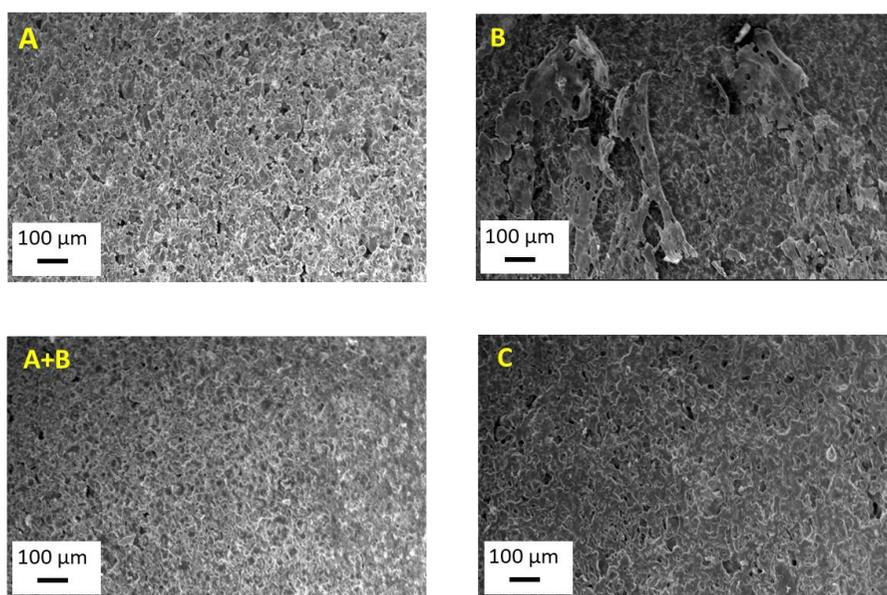


Figura 5.2. Imágenes de SEM de las matrices procesadas por los diferentes métodos.

EDAX

En la Tabla 5.4 se muestran los porcentajes de zinc y azufre obtenidos mediante EDAX en las diferentes zonas de las matrices. Las concentraciones superficiales corresponden a un mapeo realizado a imágenes tomadas de la superficie frontal de cada matriz, mientras que las concentraciones interiores fueron obtenidas en imágenes tomadas de un corte transversal de cada sistema.

Tabla 5.4. Concentración de zinc y azufre (g/kg) obtenidas en los análisis de EDAX en la superficie e interior de las matrices proteicas obtenidas por diferentes métodos. Las diferentes letras usadas como superíndice en las distintas columnas evidencian diferencias significativas ($p < 0,05$).

Concentración (g/kg)		A	B	A+B	C
Zn	Superficie	50 ± 1 ^a	272 ± 26 ^b	275 ± 5 ^b	302 ± 2 ^c
	Interior	42 ± 6 ^a	196 ± 35 ^d	240 ± 7 ^e	322 ± 23 ^c
S	Superficie	8 ± 2 ^f	122 ± 6 ^g	116 ± 7 ^g	139 ± 3 ^h
	Interior	9 ± 2 ^f	65 ± 5 ⁱ	113 ± 6 ^g	87 ± 7 ^j

Se puede observar que, en la matriz obtenida con el método A, el Zn se distribuyó homogéneamente por toda la matriz, debido a que se introduce en la etapa de mezclado homogeneizándose con el resto de las materias primas. En la matriz obtenida por el método B, el porcentaje de Zn que entró en el interior de la matriz es mayor que en el método A, pero mucho menor que el encontrado en la superficie. Este resultado podría deberse a que se produce un recubrimiento inicial de Zn en la superficie de la matriz, favorecido por las fuerzas iónicas de la solución, que parece limitar la penetración de una mayor cantidad de Zn al interior de la matriz. En el caso del sistema procesado por el método A+B, la diferencia de porcentaje de Zn dentro de la matriz y en la superficie fue menor. Esto puede deberse en primer lugar al efecto de homogenización del contenido de Zn de la etapa de mezclado y en segundo a que la etapa de inmersión en la disolución forma el recubrimiento de Zn en la superficie que contrarresta la salida de zinc. Como resultado, la cantidad de Zn retenida en el interior es mucho mayor que en el método A y hay menos diferencias entre el contenido de Zn del interior y de la superficie que en el método B. Finalmente, la matriz obtenida por el método C es la que presentó mayor cantidad de Zn, siendo homogéneo el contenido en la superficie e interior del sistema. Este resultado podría deberse al aumento del tamaño de los poros como consecuencia de la etapa de

inmersión en agua, lo que ayudaría a que el Zn entre en la matriz, impidiendo la formación del recubrimiento hasta que estos poros estén llenos. Por otro lado, si se observan los valores obtenidos para S, se puede comprobar que en todos los casos son notablemente inferiores a los obtenidos para el Zn, incluso considerando sus pesos atómicos relativos. Esto puede deberse a que la proteína se encuentra cargada negativamente, lo cual es favorable a la hora de capturar Zn (ion positivo), pero crea fuerzas repulsivas sobre el sulfato (ion negativo). Cabe mencionar que parte del azufre encontrado pertenece a la misma proteína que tiene aminoácidos que contienen azufre (metionina y cisteína). Sin embargo, el impedimento para la incorporación de sulfato puede considerarse beneficioso, ya que de esta manera los poros de la matriz pueden albergar en mayor medida el micronutriente deseado (Zn).

La Figura 5.3 muestra los espectros obtenidos en el análisis de EDAX de la superficie (S) e interior (I) de las matrices procesadas por los métodos A y B. En estos espectros se observa lo comentado anteriormente, cuando el zinc se incorporó mediante inmersión en solución saturada de sal, se observó una mayor cantidad de Zn en la superficie que en el interior. Sin embargo, esto no sucede cuando el zinc se incorporó en la etapa de mezclado, donde la concentración de zinc parece homogénea en ambas partes. En cuanto al azufre, se observa un comportamiento similar a la del Zn en la matriz procesada por el método B, pero en el método A se retuvo más S en el interior que en la superficie, posiblemente debido a la homogeneización del $ZnSO_4$ en la etapa de mezclado, ya que es más fácil eliminar el sulfato de la superficie que del interior de la matriz.

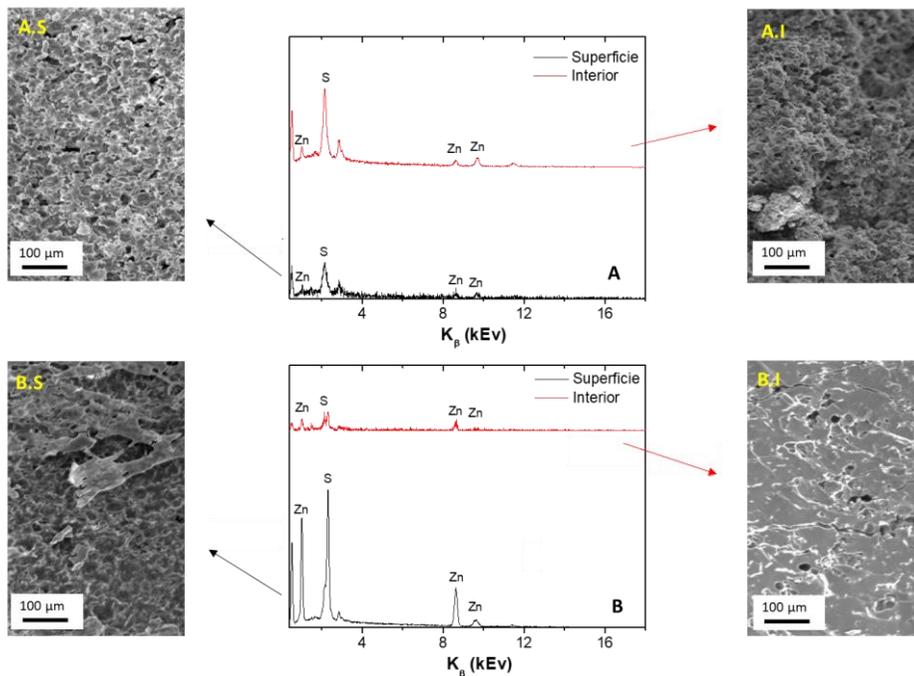


Figura 5.3. Espectros obtenidos en el análisis de EDAX para las matrices procesadas por el método A en la superficie (A.S) e interior (A.I) y por el método B en la superficie (B.S) e interior (B.I).

5.3.1.3 Propiedades funcionales

Micronutriente incorporado

En la Tabla 5.5 se muestra la cantidad de Zn^{2+} y SO_4^{2-} incorporados en las diferentes matrices procesadas. Como se puede observar, las matrices obtenidas por el método A fueron las que incorporaron una menor cantidad de zinc, siendo las obtenidas por el método C las que incorporaron la mayor cantidad. Finalmente, las matrices obtenidas por los métodos B y A+B incorporaron cantidades intermedias, siendo algo superiores para este último método.

Tabla 5.5. Concentraciones de zinc y sulfato obtenidas en los análisis de ICP de las matrices proteicas obtenidas por diferentes métodos. Todos los valores presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre ellos.

Método	Zn²⁺ (mg)	Zn²⁺ (mol/kg)	SO₄²⁻ (mg)	SO₄²⁻ (mol/kg)
A	4,81	0,27	<0,01	<0,01
B	28,1	1,60	41,4	1,54
A+B	33,7	1,92	43,3	1,61
C	49,2	2,81	72,4	2,70

Esta secuencia coincide con la que se obtuvo mediante análisis EDAX. En cuanto a la cantidad de sulfato presente en las matrices, siguió un comportamiento similar al del zinc, donde fue prácticamente inexistente en las matrices elaboradas por el método A. Durante la inmersión, la sal se disuelve en el agua donde permanecen la mayor parte de iones zinc y sulfato. En ambos casos se tenderá a alcanzar un equilibrio dinámico entre la matriz y el medio. La diferencia de comportamiento entre ambos iones puede atribuirse a la carga superficial neta negativa de la matriz proteica que desplaza el equilibrio hacia la matriz por la atracción de iones Zn²⁺ o hacia el medio por la repulsión de iones SO₄²⁻. Sin embargo, en el método B, en el que los iones están inicialmente en el medio en vez de en la matriz, ocurre exactamente lo contrario. La difusión se produce hacia la superficie de la matriz y de allí hacia el interior a través de los poros. En el método B, la etapa de difusión de iones a través de los poros parece ofrecer mucha mayor resistencia que la de difusión desde el medio a la superficie. Cabe destacar que existe una diferencia entre el hinchamiento de la matriz que se produce en la inmersión en agua (método A) y en la disolución de sal (método B), que de hecho conduce a una notable diferencia en el tamaño de los poros ($14,7 \pm 5,5$ y $7,2 \pm 2,3$ μm , respectivamente). Esto también contribuiría a explicar que la cantidad de zinc en las matrices procesadas el método

A sea homogénea en el interior y superficie, mientras que en las procesadas por el método B tengan una mayor concentración en la superficie. En el método A+B, la incorporación de la sal en ambas partes (matriz y medio) hizo que la cantidad de iones dentro de la matriz fuera significativamente superior que en el método B. Finalmente, el método C se diseñó incorporando una primera etapa de inmersión en agua con el objetivo de favorecer el hinchamiento de la matriz antes de la segunda etapa de inmersión (en la disolución saturada). De esta forma, se obtuvieron tamaños de poros similares a los del método A ($13,2 \pm 2,3 \mu\text{m}$), lo que facilitó la difusión de iones desde la superficie de la matriz hacia el interior. Ello permitió una mayor incorporación de iones a la matriz, quedando interior y superficie de las matrices equilibrados en cuanto a sulfato y zinc. Cabe señalar, que, independientemente del método de incorporación de iones empleado, siempre hubo una mayor incorporación de Zn^{2+} en las matrices que de SO_4^{2-} . Así, la relación entre el número de moles de Zn^{2+} y de SO_4^{2-} resulta siempre superior a 3, tanto en la superficie como en el interior de la matriz. Como se mencionó anteriormente, este comportamiento se debe a que la proteína está cargada negativamente (pH de la matriz superior a su punto isoeléctrico), por lo que tiene más afinidad con los iones positivos debido a las fuerzas electrostáticas.

Según Broadley et al. (2007) la cantidad estimada de zinc necesaria en los cultivos es de 15-20 mg/kg. En este sentido, una matriz obtenida por los métodos B, A+B o C podría suplir las necesidades de los cultivos. Sin embargo, la obtenida por el método A tuvo tanta pérdida de zinc durante la etapa de inmersión (se perdió el 54% del Zn^{2+} incorporado en el sistema antes de la inmersión) que no tiene suficiente zinc para suplir su déficit con una sola matriz. Además, la cantidad de azufre que

presentan estas matrices es un valor añadido como nutriente secundario, no alcanzando en ningún caso niveles tóxicos (Komarnisky *et al.*, 2003).

Liberación del micronutriente en agua

El tiempo de liberación del micronutriente de cada matriz también se evaluó midiendo el aumento de conductividad en el medio de liberación (agua). En este sentido, la matriz procesada por el método A tiene el tiempo de liberación máximo (tiempo cuando la conductividad del medio permanece constante) más corto (1 hora). Esto puede deberse a la menor cantidad de Zn que poseen. Las matrices procesadas por los métodos B y A+B tienen un mayor tiempo de retención (2 y 2,17 h, respectivamente). Aunque la modificación realizada en el método A+B no permitió un tiempo de retención significativamente mayor. Por otro lado, la matriz procesada por el método C, que tiene la mayor cantidad de zinc, también presenta el mayor tiempo de retención (2,5 h).

Se puede observar que un simple equilibrio químico no mantiene el zinc dentro de la matriz, ya que su liberación se prolonga en el tiempo. Por lo tanto, se retiene en la matriz gracias a las fuerzas electrostáticas generadas por las cargas negativas de la matriz y las positivas del zinc, como se mencionó anteriormente. Por esta misma razón, se espera que el sulfato se libere más rápidamente que el zinc debido a las fuerzas repulsivas generadas. Estas fuerzas se debilitan debido a la biodegradación de la matriz proteica, generando la liberación controlada del micronutriente. Además, cabe mencionar la eliminación de la glicerina de las matrices permite que la liberación de los micronutrientes sea más lenta que la observada en capítulos anteriores para las matrices bioplásticas (Capítulo 4). Un comportamiento similar fue obtenido por

Essawy et al. en matrices de hidrogel de quitosano-celulosa (Essawy *et al.*, 2016).

Capacidad de absorción de agua

Todas las matrices se sometieron a un ensayo para determinar su capacidad de absorción de agua (Figura 5.4). Todas las matrices presentaron valores de capacidad de absorción de agua entre los 120-140% entre las matrices procesadas por los diferentes protocolos. Esto indica que, aunque no llegan a los límites de los materiales superabsorbentes (1000%) como si lo hace la matriz a base de proteína de soja sin micronutrientes incorporados, sus capacidades de retención de agua son buenas. Ello permite suministrar esta agua a los cultivos en épocas de sequía y, así, aportar a este producto un nuevo valor añadido.

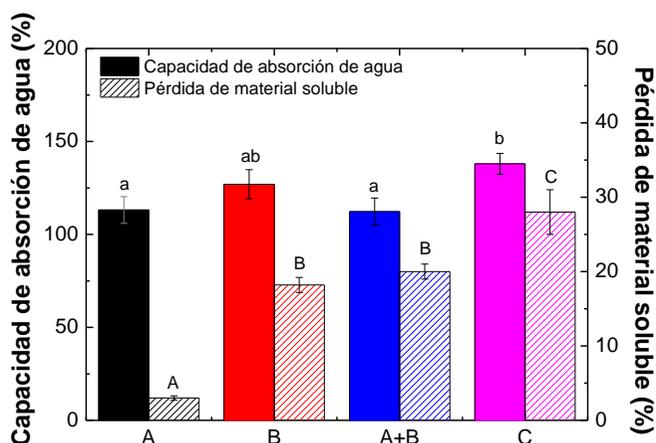


Figura 5.4. Capacidad de absorción de agua y pérdida de material soluble de las matrices procesadas por los diferentes métodos. Las diferentes letras usadas las columnas evidencian diferencias significativas ($p < 0,05$).

En cuanto a la pérdida de material soluble, todas las matrices presentaron diferencias en los valores. Estas diferencias se deben a la cantidad de sal incorporada en cada caso. Así, esta pérdida de material soluble se debe a la eliminación de los iones zinc y sulfato de la matriz,

así como a parte de la proteína soluble. Cabe mencionar que los valores obtenidos son menores que aquellos presentados por las matrices bioplásticas en capítulos anteriores (Capítulo 4). Esto se debe a que las matrices estudiadas en este apartado no presentan glicerina en su composición, ya que esta ha sido eliminada durante el procesado.

5.3.2 Optimización de la retención de micronutriente

De los métodos evaluados anteriormente, el método A es el más directo y el que implica una menor cantidad de materias primas para su desarrollo. En este sentido, aunque sea el método que obtenga matrices con la menor cantidad de sal incorporada, es el sistema que produjo un mayor aprovechamiento de la sal durante el procesado (la matriz procesada por el método A conservó un 46% de la sal incorporada en el mezclado, mientras que al incorporar la sal como una disolución saturada (métodos B y C), las matrices solo lograron captar un 0,03-0,05% de la sal empleada durante el procesado), siendo económicamente más rentable. En este sentido, es necesaria la optimización del método A para que incorpore una cantidad de zinc adecuada para su asimilación por parte de las plantas. Para ello, en este apartado se evaluó el uso de etanol en medio de extracción de la glicerina. El etanol se eligió debido a que la glicerina es muy soluble en este, mientras que el $ZnSO_4 \cdot H_2O$ es insoluble, buscando mejorar la capacidad de retención del micronutriente en las matrices.

5.3.2.1 Propiedades fisicoquímicas

Cinética de eliminación del plastificante

En primer lugar, se evaluó la pérdida de material soluble durante la inmersión de las matrices en los diferentes medios (agua, etanol y mezcla

1:1 agua:etanol) para evaluar la cinética de eliminación del plastificante (Figura 5.5). Como se puede observar, la liberación de material soluble se vio fuertemente afectada por el disolvente utilizado durante la etapa de inmersión. Cuando se utilizó solo agua, la pérdida de material soluble fue mayor, presentando valores entre 50 y 60% y manteniéndose constante después de 8 h de inmersión. Este porcentaje no solo se debe al plastificante, sino que interviene parte de la sal y la proteína. Por lo tanto, se espera que la cantidad de micronutriente perdido sea mayor en este caso.

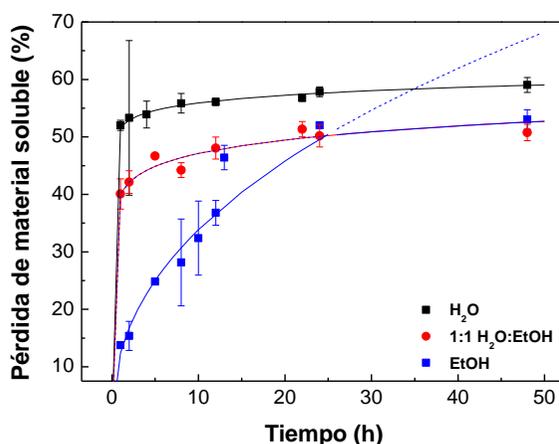


Figura 5.5. Pérdida de material soluble durante la inmersión de las matrices en los diferentes medios.

Al utilizar etanol (EtOH) para la inmersión, la pérdida de material soluble fue considerablemente menor en todo el intervalo de tiempo estudiado, con valores que oscilaron entre 13-50%. Esta disminución de los valores coincide con la baja solubilidad del $ZnSO_4 \cdot H_2O$ y la proteína en etanol. Como resultado, la pérdida de material soluble corresponde casi en su totalidad a la pérdida de glicerina (45% en peso). Así, se espera que la retención de micronutriente en estas matrices sea mayor que en el caso del agua. Además, en este caso, la pérdida de material soluble

aumentó más lentamente que en el caso anterior, tardando mucho más en alcanzar un valor constante (alrededor de 12 h de inmersión). Este comportamiento podría deberse a la menor facilidad del etanol para penetrar a la matriz y arrastrar la glicerina, ya que no puede interactuar con la proteína o la sal.

Como era de esperar, hubo una situación intermedia entre los dos casos anteriores al probar la inmersión en una solución de H₂O:EtOH en relación 1:1. La pérdida de material soluble fue menor que en agua, pero el perfil observado estuvo claramente dominado por el medio acuoso, al menos durante las primeras 10 h de inmersión, presentando un perfil similar. Estos resultados reflejan que sería de esperar que la parte acuosa de la solución liberara parte de la proteína soluble y la sal, aunque en menor medida que en el caso del agua. Sin embargo, después de largos periodos de inmersión (después de las 15-20 h de inmersión), el perfil de liberación se vuelve bastante coincidente con el perfil que se muestra para la inmersión solo en etanol, aunque los sistemas sumergidos en la mezcla agua/etanol alcanzan el equilibrio un poco antes que los sumergidos solamente en etanol. Este comportamiento se debe a que el agua mejora la accesibilidad del medio al interior de la matriz.

Los perfiles de liberación obtenidos se ajustaron a una ecuación potencial (ecuación 1) en términos de la pérdida de material soluble (SML) en función del tiempo (t), expresada en % y h, respectivamente:

$$SML(t) = SML_1 \cdot t^a \quad (1)$$

donde SML_1 es la pérdida de material soluble después de 1 h de inmersión y a es un parámetro adimensional que representa la derivada temporal del crecimiento de la pérdida de material soluble. Los valores

de ambos parámetros se muestran en la Tabla 5.6, para los tres medios utilizados.

Tabla 5.6. Modelos de liberación obtenidos para la pérdida de material soluble de las matrices sumergidas en los diferentes medios.

Medio usado	SML_1 (%)	a (-)
H ₂ O	51,7	0,034
H ₂ O:EtOH	40,1	0,070
EtOH	t < 12,5 h	12,4
	t > 12,5 h	40,1

Los altos valores obtenidos para SML_1 cuando el medio de inmersión es agua evidencia la rápida liberación de la glicerina en este medio. Por otro lado, cuando el medio de inmersión fue solo etanol, el perfil refleja dos etapas diferentes, la primera siguiendo una cinética de liberación mucho más lenta. Vale la pena mencionar que el punto de cambio que tiene lugar de la primera a la segunda etapa parece coincidir con el punto en el que la liberación alcanza la concentración de glicerina en la muestra. Cabe señalar también que el perfil de liberación en la segunda etapa se ajusta a la misma ecuación que la matriz inmersa en la mezcla de medios. Así, el cambio en la cinética de liberación se debe a que la glicerina se ha liberado completamente y los otros componentes tienen una liberación mucho más lenta.

TGA

Se realizaron análisis de TGA para verificar que tras 12 h de inmersión en etanol se había liberado toda la glicerina. Este sistema se seleccionó ya que es el tiempo al que se alcanza el 45% de pérdida de material soluble (el mismo porcentaje que hay de glicerina en los sistemas). Para evaluarlo, se analizó tanto las materias primas (aislado proteico de soja (SPI) y glicerina (Gly)) como las matrices antes (MB)

como después (MF) de la inmersión en etanol. Los análisis se representaron a partir de la derivada primera del peso con la temperatura (Figura 5.6). Así, se puede observar las temperaturas a las que se degrada cada material.

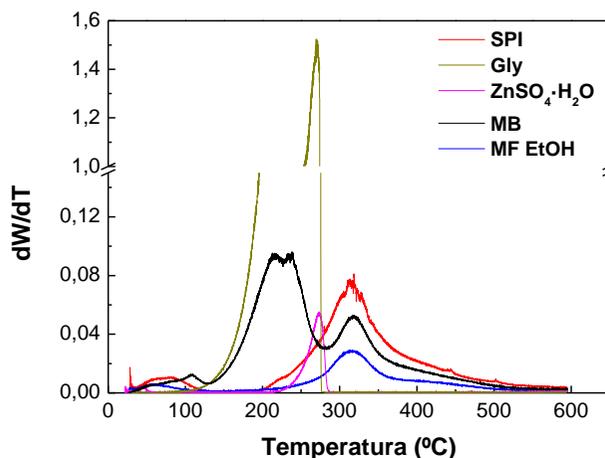


Figura 5.6. TGA de las materias primas (SPI, Gly y $ZnSO_4 \cdot H_2O$), matriz bioplástica antes de la inmersión (MB) y matriz final tras 12 h de inmersión en etanol (MF EtOH)

Como se puede deducir de los perfiles de las materias primas, SPI presenta un primer pico entre 50-100 °C, que corresponde a la humedad de la proteína y un segundo pico entre 200-500 °C que se debe a la degradación de la proteína de soja (Wang *et al.*, 2007). Por otro lado, Gly solo presenta un único pico entre 200-280 °C, lo que podría corresponder a su evaporación. Dado que este pico es inferior a su punto de ebullición (290 °C) y considerando su fuerte dependencia del contenido de agua, la glicerina utilizada debería contener algo de agua residual (del orden del 1%) (Fernández-Espada *et al.*, 2019). En cuanto al $ZnSO_4 \cdot H_2O$, su perfil presenta dos picos, el primero a 50 °C aproximadamente, que se debe a la pérdida del monohidrato y el segundo entre 230-280 °C, que corresponde a la descomposición del $ZnSO_4$ (Sagunthala *et al.*, 2016).

La matriz bioplástica presentó todos los picos correspondientes a las materias primas. Así, presenta un primer pico entre 50-100 °C con su máximo entre 105-110 °C, que corresponde a la pérdida de agua en el sistema (tanto la humedad de la proteína como el hidrato de la sal). En el segundo pico, Gly, $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ se superponen, debido a que sus picos característicos aparecen en la misma región. Se aprecia un tercer pico que corresponde a la degradación del aislado SPI, en el que se aprecia un solapamiento con la degradación del sulfato.

Finalmente, la matriz final (MF EtOH) solo muestra dos picos notables. El primero puede corresponder a la sal monohidratada ya que ésta no se pierde en la etapa de liofilización. El segundo parece estar asociado a la proteína (200-500 °C), si bien puede haber cierta contribución de la sal (hasta 280 °C), pero en menor medida que en la matriz inicial (MB). Además, en este pico no se observó la superposición provocada por la glicerina, por lo que se puede concluir que no había glicerina presente en la matriz después de 12 h de inmersión en etanol, por lo que no sería necesaria una inmersión mayor. Estos resultados explican el cambio de cinética observado en el apartado anterior.

5.3.2.2 Propiedades mecánicas

La Figura 5.7 muestra los perfiles de los módulos elástico (E') y viscoso (E'') frente a la frecuencia de las diferentes matrices estudiadas. Todas las matrices presentaron una respuesta elástica predominante ($E' > E''$) sin apenas dependencia con la frecuencia. Esto indica que todos los sistemas tenían un fuerte carácter sólido.

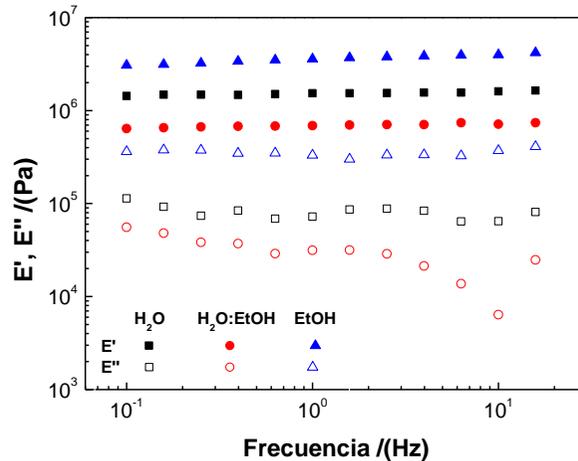


Figura 5.7. Ensayos dinámicos de compresión de las matrices procesadas usando diferentes medios de inmersión (agua, etanol y una mezcla agua:etanol 1:1).

En la Tabla 5.7 se pueden observar los parámetros obtenidos de los ensayos de compresión de los diferentes sistemas, lo que ayuda a su comparación. En cuanto a la deformación crítica, todos los sistemas presentaron valores parecidos (cerca de 0,05%) sin diferencias significativas entre ellos.

Tabla 5.7. Parámetros de flexión de las matrices procesadas usando diferentes medios de inmersión (agua, etanol y una mezcla agua:etanol 1:1). Las diferentes letras usadas como superíndice en las distintas columnas evidencian diferencias significativas ($p < 0,05$).

Sistemas	ϵ_{crit} (%)	E'_1 (MPa)	$\tan \delta_1$ (-)
H ₂ O	$0,04 \pm 0,02^a$	$1,5 \pm 0,2^A$	$0,09 \pm 0,03^I$
H ₂ O:EtOH	$0,05 \pm 0,01^a$	$0,7 \pm 0,1^B$	$0,04 \pm 0,01^{II}$
EtOH	$0,04 \pm 0,02^a$	$3,6 \pm 0,3^C$	$0,08 \pm 0,02^I$

Por otro lado, la matriz obtenida tras la inmersión en etanol obtuvo los valores de módulo elástico más altos. Esto puede ser la causa de la menor pérdida de material soluble durante la inmersión en este medio. En este sentido, el etanol provoca que la matriz sea más compacta con mayores módulos y como consecuencia tenga una menor pérdida de material soluble. Sin embargo, la matriz que se obtuvo por inmersión en

la mezcla agua/etanol mostró los valores más bajos, lo que es un resultado inesperado que difícilmente puede explicarse en términos de pérdida de material soluble y podría deberse a la microestructura de la matriz. En cuanto a la tangente de pérdidas, todos los sistemas presentaron valores por debajo de 0,1, lo que recalca el fuerte carácter sólido de estas matrices.

5.3.2.3 Propiedades morfológicas

En la Figura 5.8 se muestran las imágenes de SEM de las diferentes matrices. Como se observa, la inmersión en agua provoca la formación de poros de gran tamaño, atribuible al mayor hinchamiento de la matriz en medio acuoso. Esto puede relacionarse con la mayor pérdida de material soluble que se observó en estos sistemas durante la inmersión. La inmersión en etanol, por el contrario, da lugar a un menor hinchamiento, lo que hace que los poros presentes sean de menor tamaño y más uniforme, y que va acompañado de una menor pérdida de material soluble. Este efecto también contribuye a los valores de módulo elástico más altos que se encontraron en las matrices tras la inmersión en etanol, ya que su estructura es más compacta.

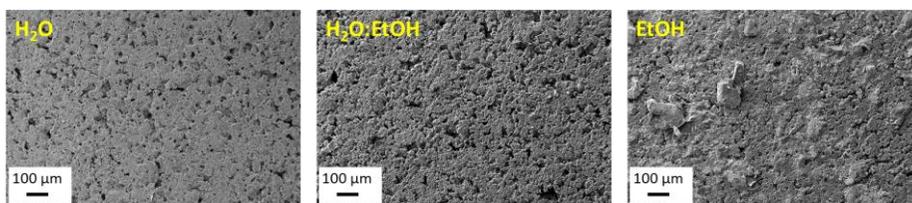


Figura 5.8. Imágenes de SEM de las matrices procesadas usando diferentes medios de inmersión tras 24 h de inmersión (agua, etanol y una mezcla agua:etanol 1:1).

En cuanto a la matriz obtenida de la inmersión en la mezcla agua/etanol, parece que presenta poros grandes y pequeños. Así, es la matriz que presenta un mayor número de poros, lo cual sugiere que el efecto controlante durante la etapa inicial de inmersión debe ser el

hinchamiento de la matriz relacionado con la presencia de agua. Sin embargo, tras esta etapa inicial, la presencia de etanol puede desempeñar un papel de inhibición en el crecimiento de los poros. Como resultado, la microestructura final de esta matriz es más heterogénea que la del resto, lo que podría estar relacionado con sus menores valores en el módulo elástico (peor resistencia mecánica).

5.3.2.4 Propiedades funcionales

Micronutriente incorporado

La Tabla 5.8 muestra la cantidad de Zn^{2+} y SO_4^{2-} en las matrices procesadas usando los diferentes medios de inmersión. Como se puede observar, la matriz obtenida tras la inmersión en agua fue la que presentó la menor cantidad de iones zinc o sulfato, lo que corrobora la mayor pérdida de material soluble observada. Estos resultados se deben a la alta solubilidad del $ZnSO_4$ en agua (577 g/kg agua a 25 °C (Lide, 2006)).

Tabla 5.8. Carga de zinc (Zn^{2+}) y sulfato (SO_4^{2-}) obtenidas en los análisis de ICP de las matrices procesadas usando diferentes medios de inmersión (agua, etanol y una mezcla agua:etanol 1:1). Todos los valores presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre ellos.

Sistemas	Zn^{2+} (mg)	Zn^{+2} (mol/kg)	SO_4^{2-} (mg)	SO_4^{2-} (mol/kg)
H₂O	4,81	0,27	<0,01	<0,01
H₂O:EtOH	9,94	0,56	7,12	0,26
EtOH	15,3	0,86	22,5	0,84

Por otro lado, las matrices obtenidas tras la inmersión en etanol fueron las que presentaron una mayor cantidad de micronutriente, debido a la poca solubilidad de la sal en etanol (0,29 g/kg etanol a 25 °C (Seidell y Linke, 1940)). Estos resultados son coherentes con los obtenidos en la

cinética de liberación del plastificante, donde el agua fue el medio que presentó la mayor pérdida de material soluble y el etanol el que obtuvo menores pérdidas. En cuanto a la matriz obtenida tras la inmersión en la mezcla agua/etanol, esta presentó valores intermedios entre la sumergida en agua y etanol.

En cuanto al ion sulfato, este se liberó por completo en el agua, mientras que la inmersión en etanol permitió que parte del mismo se retuviera en la matriz. Esto puede deberse a que la sal no se ionizó durante la inmersión en etanol, lo que no provocó fuerzas repulsivas entre las cargas negativas de la proteína y el ion sulfato.

La concentración de proteína de las diferentes matrices puede calcularse al conocer la cantidad de zinc y sulfato que contienen, siendo del 98,2, 94,3 y 88,2% en peso para las matrices inmersas en agua, mezcla agua/etanol y etanol, respectivamente. En principio, cuanto mayor es la concentración de proteína, más fuerte se forma la red de proteínas y, por lo tanto, se logran mayores propiedades viscoelásticas. Este hecho puede explicar el comportamiento mecánico mostrado anteriormente en las matrices, donde la matriz inmersa en agua presentó un mayor módulo elástico que la inmersa en una mezcla agua/etanol.

Liberación del micronutriente

Para medir la liberación del micronutriente, cada matriz se sumergió en agua para calcular la cinética de liberación en la misma mediante medidas de conductividad electrolítica en función del tiempo (Figura 5.9). Como se puede observar, la evolución en el tiempo fue diferente para cada matriz. De esta forma, la conductividad del medio fue altamente influenciada por la concentración de sal en cada sistema. Así, la matriz obtenida tras inmersión en agua presentó los menores valores

de conductividad, mientras que la obtenida tras inmersión en etanol obtuvo los mayores.

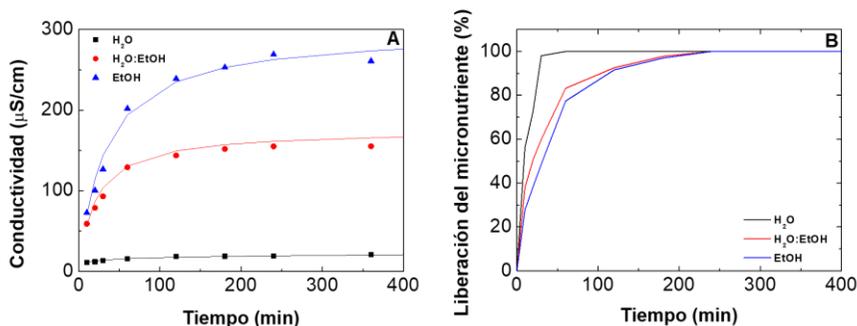


Figura 5.9. Liberación del micronutriente en agua para las matrices obtenidas mediante diferentes medios de inmersión (agua, etanol y una mezcla agua:etanol 1:1). A: Conductividad vs. tiempo. B: Porcentaje de liberación vs. tiempo.

Las diferencias encontradas entre las matrices también produjeron un cambio en el tiempo de liberación del micronutriente. De esta forma, la matriz obtenida tras la inmersión en etanol fue la que presentó un tiempo de liberación más prolongado (alcanza el 100% a los 240 min aproximadamente, mientras que la matriz de inmersión en agua lo alcanza a los 60 min). Esto puede deberse a la microestructura presentada por ambas matrices, siendo más fácil la liberación en la matriz obtenida por inmersión en agua, ya que presentó poros más grandes.

Capacidad de absorción de agua

Como se ha comentado anteriormente, uno de los valores agregados de estas matrices es su capacidad de absorción de agua (Capezza *et al.*, 2019). Esta propiedad convierte a estas matrices en una fuente de agua para el cultivo, reduciendo la cantidad de agua de riego necesaria para la producción y, por tanto, mejorando la eficiencia del ciclo del agua. La Figura 5.10 muestra la capacidad de absorción de agua y pérdida de material soluble de las matrices obtenidas tras inmersión en diferentes

medios. En este caso, las matrices estudiadas presentan cierta capacidad absorbente, pero ninguna alcanza el límite superabsorbente (>1000%). De este modo, la matriz con mayor capacidad de captación de agua fue la obtenida tras la inmersión en agua. Respecto a los otros dos sistemas, no se observaron diferencias significativas entre ambos, aunque su absorción fue mucho menor que en la matriz obtenida por inmersión en agua. Esta baja capacidad de captación de agua podría estar relacionada con la mayor carga iónica de las matrices con mayor contenido de micronutriente (Sadeghi y Hosseinzadeh, 2008).

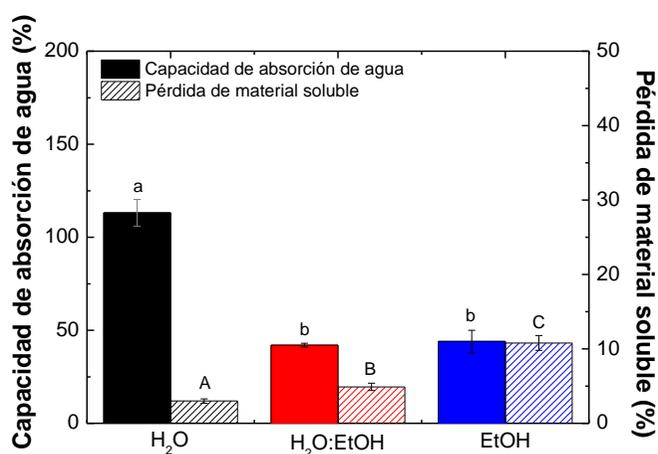


Figura 5.10. Capacidad de absorción de agua y pérdida de material soluble de las matrices procesadas usando diferentes medios de inmersión (agua, etanol y una mezcla agua:etanol 1:1). Las diferentes letras usadas las columnas evidencian diferencias significativas ($p < 0,05$).

En cuanto a la pérdida de material soluble, los valores obtenidos se corresponden con la sal que contiene cada matriz (H₂O: 1,4%; H₂O:EtOH: 4,9%; EtOH:10,8%).

5.3.3 Evaluación funcional de las matrices seleccionadas

Finalmente, con el objetivo de evaluar el comportamiento de las matrices en el cultivo se compararon funcionalmente algunas matrices.

Para ello, se seleccionaron las matrices procesadas por el método A mediante inmersión en agua y etanol (A_{H_2O} y A_{EtOH} , respectivamente), ya que es el método más directo y eficiente para fabricar matrices, así como aquella procesada por el método B, que incorporaba más sal que el método A, pero superficialmente. En este sentido, se evaluó la influencia de la presencia del micronutriente en toda la matriz o únicamente en su superficie y la cantidad de zinc incorporada.

5.3.3.1 Carga y distribución del micronutriente

En la Tabla 5.9 se muestra la cantidad de zinc y sulfato presente en las diferentes matrices y obtenido mediante ICP y EDAX. El protocolo utilizado en el procesamiento de las matrices es determinante en la cantidad de micronutriente incorporado en la matriz. El método A usando agua es el que incorpora la menor cantidad de zinc y sulfato en la matriz. Este comportamiento se debe, como se ha comentado anteriormente, a la alta solubilidad del $ZnSO_4 \cdot H_2O$ en agua, pasando al medio durante la inmersión. Sin embargo, se puede observar que algo de zinc queda retenido en la matriz, lo que se ha atribuido anteriormente a las cargas negativas de las cadenas proteicas que generan interacciones atractivas con los iones de zinc.

Tabla 5.9. Contenido y distribución de zinc (Zn^{2+}) y sulfato (SO_4^{2-}) en las matrices procesadas usando diferentes protocolos. Las diferentes letras usadas como superíndice en las distintas columnas evidencian diferencias significativas ($p < 0,05$).

Sistemas	ICP		EDAX			
	Zn ²⁺ (mg)	SO ₄ ²⁻ (mg)	Superficie		Interior	
			Zn (%)	S (%)	Zn (%)	S (%)
A_{H_2O}	4,81	<0,01	54 ^a	-	46 ^c	-
A_{EtOH}	15,3	22,5	52 ^a	47 ^A	48 ^{ac}	53 ^A
B	28,1	41,4	58 ^b	65 ^B	42 ^d	35 ^C

El etanol corrige el problema de la alta solubilidad del $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ en agua, ya que en este medio es insoluble. De esta forma, la retención de zinc en la matriz aumenta de 4,81 a 15,3 mg. Además, el cambio en la etapa de incorporación del micronutriente (método B) produjo también una mayor carga de micronutriente en la matriz (28,1 mg), siendo el que más zinc aporta.

En cuanto a la distribución del micronutriente, cuando el zinc se incorporó durante el mezclado (método A, ya sea con agua o etanol) la distribución de zinc y azufre en la matriz fue homogénea. Sin embargo, parece que la cantidad de zinc tiende a ser mayor en la superficie que en el interior de la matriz. Esto podría deberse a la penetración del disolvente en la matriz, que arrastra el zinc de adentro hacia afuera, dejando un gradiente de concentración creciente desde el interior de la matriz hacia su superficie. En el caso del etanol, este gradiente es menos pronunciado debido a su menor capacidad de eliminar el $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$.

El cambio al método B condujo a un aparente gradiente más significativo en las concentraciones de zinc y azufre entre la superficie y el interior de la matriz. En este caso, ambos iones ingresaron en la matriz debido a la diferencia de concentraciones entre el medio (saturado en sal) y la matriz. Así, hubo una difusión desde el disolvente hacia la superficie de la matriz y desde esta superficie hacia el interior de la matriz a través de los poros que al ser más pequeños ofrecen mayor resistencia a la difusión. Además, durante la penetración de los iones también actúan otros efectos como la penetración del disolvente al eliminar la glicerina, la presión osmótica, la hidrofilia de la matriz y las cargas negativas de la superficie de las proteínas. De esta forma, al ser la superficie más accesible, el contenido en zinc y azufre fue mayor en esta parte de la

matriz. Cabe mencionar que el gradiente fue más significativo en el contenido de azufre que en el de zinc. Este comportamiento podría estar inducido por las fuerzas de repulsión mencionadas anteriormente entre los iones sulfato y las cargas proteicas, que dificultan la infiltración del sulfato en la matriz, siendo más superficial. Además, del mayor tamaño del ion sulfato que puede provocar una mayor resistencia a la difusión de este a través de los poros de la matriz.

5.3.3.2 Liberación del micronutriente en agua

La liberación del micronutriente de las diferentes matrices en agua se puede observar en la Figura 5.11. Todas las matrices presentaron una liberación prolongada en el tiempo, lo que indica su capacidad para liberar el micronutriente de forma controlada.

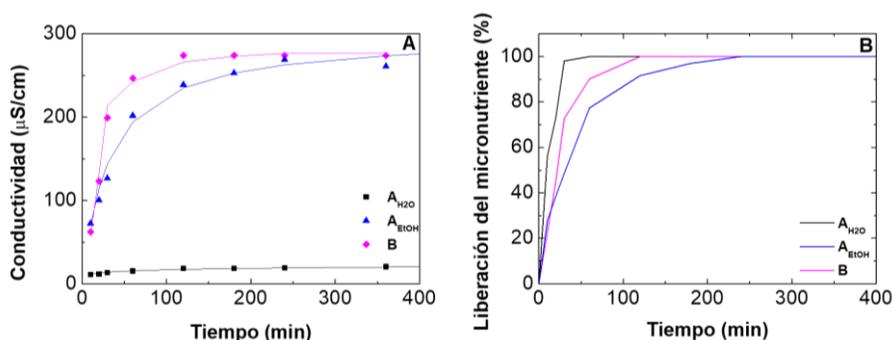


Figura 5.11. Liberación del micronutriente en agua de las matrices seleccionadas. A: Conductividad vs. tiempo. B: Porcentaje de liberación vs. tiempo.

Como se puede observar, la conductividad presentada por las diferentes matrices depende de la cantidad de zinc presente en las mismas. De este modo, la matriz procesada por el método A con agua fue la que presentó la menor conductividad. Además, esta matriz fue la que presentó una liberación más rápida, posiblemente por la microestructura de la matriz y la menor cantidad de micronutriente que presenta. Sin embargo, la matriz procesada por el método A con etanol

y la procesada por el método B tienen una carga de micronutriente similar (conductividad máxima parecida) aunque su liberación es diferente. En este caso, la liberación de la matriz procesada por el método B es más rápida, debido posiblemente a la distribución de zinc presentada por la matriz, que presenta una mayor concentración en la superficie (Tabla 5.9).

5.3.3.3 Liberación del micronutriente en suelo

La Figura 5.12 muestra las medidas de conductividad tomadas del agua de lixiviado (A) y el porcentaje de liberación del micronutriente (B) obtenidos en los estudios de liberación en suelo. Estos estudios muestran la misma tendencia ya observada en el agua: todos los sistemas presentan una liberación controlada que es más rápida al principio y se ralentiza con el tiempo. Esta cinética puede ser beneficiosa para los cultivos, ya que el zinc es fundamental para la formación de los entrenudos de las plantas y, para su crecimiento, requiriendo una mayor cantidad los primeros días de cultivo, donde las plantas gastan su mayor cantidad de energía para crecer y una menor cantidad al final cuando se están formando los frutos (Broadley *et al.*, 2007).

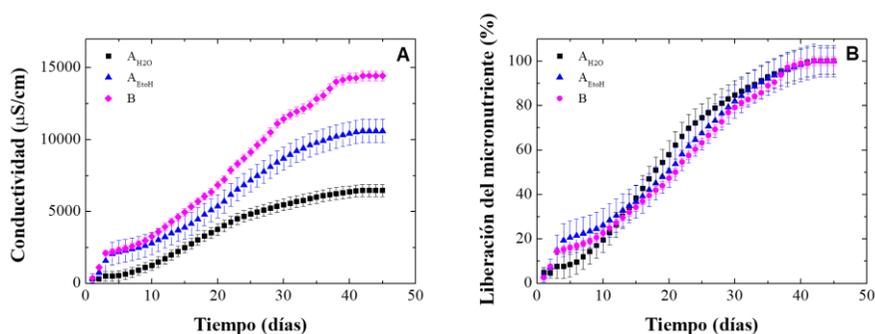


Figura 5.12. Liberación del micronutriente en suelo de las matrices seleccionadas. A: Conductividad vs. tiempo. B: Porcentaje de liberación vs. tiempo.

Los perfiles obtenidos para las matrices procesadas por el método A, ya sean con agua o etanol, son similares. Los primeros 20 días tuvieron la misma pendiente, aunque los valores de la matriz obtenida con etanol fueron mayores incrementándose la diferencia a partir del día 20. Esto se debe a que ambas liberaron zinc en la misma proporción, aunque la matriz obtenida con etanol, al tener una mayor cantidad de zinc, presentó una mayor liberación. Por otro lado, el perfil obtenido para la matriz procesada por el método B cambió, teniendo una pendiente más pronunciada y, por tanto, una liberación más rápida. Este comportamiento podría deberse a la distribución de zinc en esta matriz, como ya se mencionó anteriormente. De esta forma, a medida que el micronutriente se encontraba más superficial en la matriz, se liberó más rápidamente con respecto a las otras matrices. Sin embargo, todas las matrices tenían una liberación que se extendía a aproximadamente 40 días de uso. Por ello, se considera que son ideales para cultivos con un crecimiento similar al de la lechuga, el pimiento y el calabacín, que suelen recolectarse a los 40-50 días de cultivo.

5.3.3.4 Capacidad de absorción de agua

La Figura 5.13 muestra la capacidad de absorción de agua de las matrices procesadas por los diferentes métodos. Esta capacidad depende no solo de cómo se haya incorporado el micronutriente sino también de la cantidad de carga de micronutrientes y su distribución en la matriz.

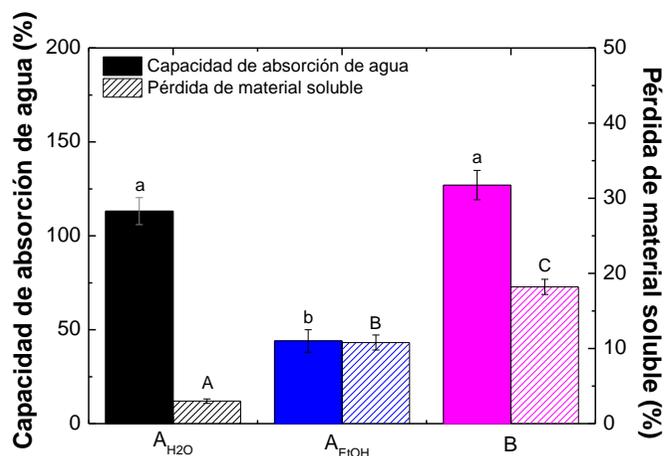


Figura 5.13. Capacidad de absorción de agua y pérdida de material soluble de las matrices seleccionadas. Las diferentes letras usadas las columnas evidencian diferencias significativas ($p < 0,05$).

Las matrices procesadas por el método A incorporan el micronutriente en el mezclado, aunque la capacidad de absorción de agua de la matriz procesada mediante una inmersión en etanol fue menor. Esto podría explicarse por la mayor cantidad de sal presente en esta matriz (37,8 vs. 4,81 mg para A_{E_tOH} y A_{H₂O}, respectivamente), lo que evita que se hinche durante la absorción debido a las fuerzas electrostáticas (Sadeghi y Hosseinzadeh, 2008; Ma *et al.*, 2011; Montesano *et al.*, 2015). Sin embargo, la matriz procesada por el método B fue la que retuvo la mayor cantidad de sal (69,5 mg), no presentando la peor capacidad de absorción de agua. Este comportamiento es la posible causa de la distribución de micronutrientes. En este sentido, los iones de zinc y sulfato se transfieren rápidamente al agua, dejando una mayor cantidad de poros libres que pueden ser llenados por agua.

En cuanto a la pérdida de material soluble, este corresponde con la sal que contiene cada matriz (1,4, 10,8 y 19,8% para A_{H₂O}, A_{E_tOH} y B, respectivamente), siendo mayor para la matriz obtenida por el método B debido a que es la que más sal presentó en su estructura.

5.3.3.5 Biodegradabilidad

La Figura 5.14 muestra el aspecto macroscópico de las matrices durante el estudio de biodegradabilidad. Según las imágenes, las matrices no parecían deteriorarse hasta después de 10 a 20 días, cuando comenzaron a cambiar de color y se rompieron cuando fueron desenterradas. Las matrices procesadas por el método A con agua y el método B parecieron tener el mismo comportamiento durante su biodegradabilidad (tiempo máximo aproximadamente 30 días), mientras que la matriz procesada por el método A con etanol tuvo un mayor tiempo de descomposición (aproximadamente 40 días). Esto es posiblemente por la microestructura presentada por esta matriz que es más cerrada ya que no ha estado en contacto con el agua durante su procesado.

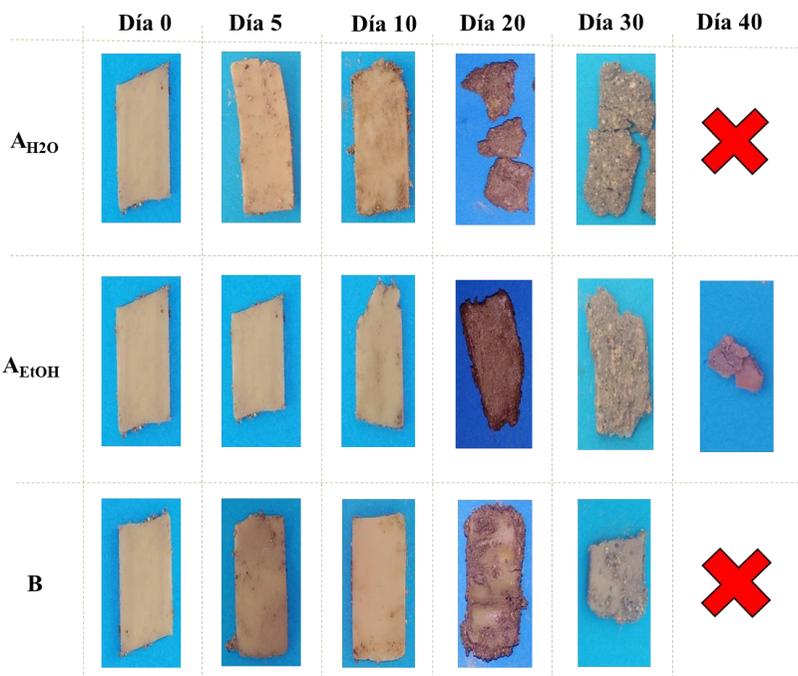


Figura 5.14. Imágenes de las matrices seleccionadas en diferentes momentos del estudio de biodegradación. Nota: El ancho de las muestras en el día 0 es de 10 mm. Las demás imágenes se obtuvieron con el mismo foco de la cámara.

Este comportamiento podría explicar la cinética de liberación que tuvo lugar. Durante los primeros 10 días de cultivo, las matrices mantuvieron su integridad física, liberando solo el micronutriente que el agua podía transferir fuera de la matriz. Este arrastre es mayor cuanto mayor es la cantidad de micronutriente en la superficie de la matriz, lo que explica la mayor velocidad de la matriz procesada por el método B en esta etapa. Después de esta etapa, el micronutriente que se libera es el que se une a las cadenas biopoliméricas. Esta es la razón por la que tarda más en liberarse, ya que requiere un cierto grado de biodegradación de la matriz. Además, se puede observar que la matriz tardó lo mismo en degradarse que en liberar todo el micronutriente. Así, la liberación controlada del micronutriente se debe a dos efectos principales: (i) la difusión debida a la diferencia de concentración entre la matriz y el medio (ya sea el suelo o el agua de riego); y (ii) la biodegradación de la matriz. En este caso, el primer efecto es más importante al principio, mientras que el segundo es determinante al final.

5.3.3.6 Evaluación en cultivos

Finalmente, las matrices se probaron en cultivos reales para determinar el grado de asimilación. La Figura 5.15 muestra las lechugas y pimientos cultivados en este análisis y sometidos al tratamiento con las diferentes matrices (A_{H_2O} , A_{EtOH} y B). Además, un control positivo (con fertilización convencional) y un control negativo (sin fertilización) se incluyeron también en la comparación.

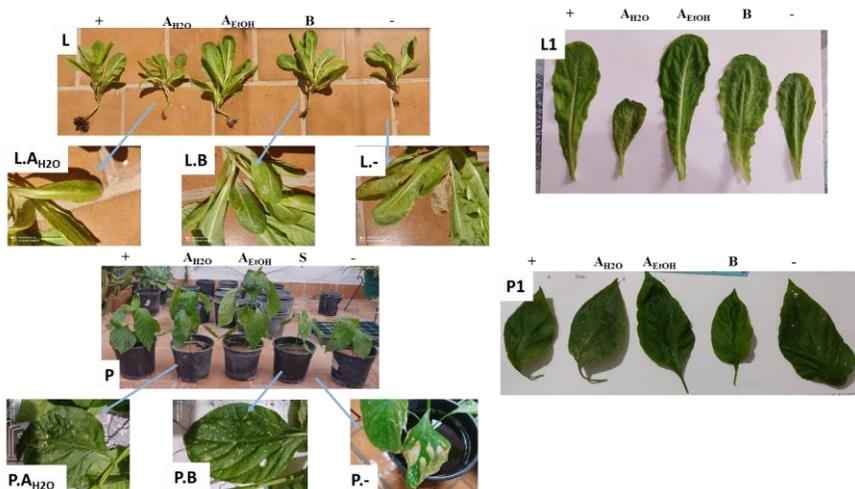


Figura 5.15. Fotografías de lechugas (L) y pimientos (P) fertilizados con las diferentes matrices, mediante fertilización convencional (+) o sin fertilización (-). L-, L.A_{H2O}, L.B, P-, P.A_{H2O}, P.B: imágenes detalladas de los defectos visuales. L1 y P1: comparación de las hojas más grandes de cada cultivo.

En primer lugar, se observaron diferencias entre las distintas lechugas (L) y pimientos (P) cultivados. Dependiendo de la cantidad de zinc incorporado, las plantas presentaban un aspecto más homogéneo o no. Los cultivos del control negativo (-), así como los que tenían incorporadas las matrices procesadas por los métodos A con agua y B, presentaron ciertos defectos, como hojas deformadas, manchas marrones y raíces más cortas. Sin embargo, estos defectos no se encontraron en los cultivos del control positivo (+) y los que tenían incorporada la matriz procesada por el método A con etanol. Estas diferencias también se observaron en la altura de la planta, dimensiones de las hojas y follaje total del cultivo (Tabla 5.10 para lechuga y Tabla 5.11 para pimiento). De esta forma, las matrices procesadas por el método A con etanol fueron las más eficientes, produciendo plantas más grandes y con más hojas, mostrando mejores resultados que incluso cuando se utiliza la fertilización convencional (control positivo). Por otro lado, la matriz

procesada por el método A con agua no generó grandes diferencias con respecto al control negativo, lo que indica que su incorporación como fertilizante no es beneficiosa. Esto puede deberse a la poca cantidad de micronutriente que contienen que no es suficiente para paliar las deficiencias de zinc en los cultivos. La matriz procesada por el método B mostró un comportamiento interesante, con resultados similares a los de la matriz procesada por el método A con etanol cuando se usó en lechuga, pero también similares a los del control negativo cuando se usó en pimiento. Este comportamiento se debe al crecimiento del cultivo. De esta forma, como la lechuga crece más rápido, la liberación más rápida de zinc de la matriz procesada por el método B es asimilable por la lechuga durante su crecimiento. Sin embargo, como el pimiento tiene un crecimiento más lento, la rápida liberación del micronutriente hace que haya poca cantidad de micronutriente durante parte del crecimiento (sobre todo al final).

Tabla 5.10. Características de Las lechugas fertilizadas con las diferentes matrices, mediante fertilización convencional (+) o sin fertilización (-). Las diferentes letras usadas como superíndice en las distintas columnas evidencian diferencias significativas ($p < 0,05$).

Método	Altura (cm)	Follaje		Contenido de Zn (ppm)
		Dimensión (h x w) cm	Número de hojas	
+	26 ^a	11,2 x 3,4 ^A	11 ^I	70,1
A _{H2O}	20 ^b	8,4 x 3,3 ^B	8 ^{II}	32,7
A _{E1OH}	28 ^a	15,5 x 5,7 ^C	14 ^{III}	155,3
B	25 ^a	13,1 x 5,2 ^D	14 ^{III}	94,4
-	19 ^b	12,6 x 5,2 ^D	6 ^{II}	28,8

Tabla 5.11. Características de los pimientos fertilizados con las diferentes matrices, mediante fertilización convencional (+) o sin fertilización (-). Las diferentes letras usadas como superíndice en las distintas columnas evidencian diferencias significativas ($p < 0,05$).

Método	Altura (cm)	Follaje		Contenido de Zn (ppm)
		Dimensión (h x w) cm	Número de hojas	
+	30 ^a	19,6 x 9,7 ^A	15 ^I	29,7
A _{H₂O}	36 ^b	16,4 x 9,0 ^B	14 ^I	16,7
A _{E₁OH}	42 ^c	19,1 x 9,4 ^A	15 ^I	71,0
B	28 ^a	13,2 x 7,5 ^C	9 ^{II}	51,6
-	30 ^a	14,5 x 7,5 ^C	8 ^{II}	13,5

En cuanto a la cantidad de zinc asimilado por cada planta, tanto los cultivos de lechuga como los de pimiento que fueron sometidos a fertilización con la matriz procesada con el método A con etanol fueron los que retuvieron mayor cantidad de zinc, superando a la fertilización convencional (control positivo). Cabe mencionar que este valor no alcanzó valores de toxicidad (<200 ppm), lo que provocaría una intoxicación alimentaria (Fosmire, 1990). Esto podría aumentar el valor de estos vegetales, haciendo que este método de fertilización sea aún más eficiente. La matriz procesada por método B también superó los valores de asimilación de la fertilización convencional, corroborando la eficiencia de liberación controlada de micronutrientes en los cultivos, aunque no alcanzó los valores alcanzados por la matriz procesada por el método A con etanol. Por su parte, la matriz procesada por método A con agua, si bien mejoró la cantidad de zinc en la planta con respecto al control negativo (sin fertilización), no alcanzó los valores esperados. Esto se debe a la baja cantidad de zinc que retiene la matriz. También cabe mencionar que las matrices procesadas por los métodos A con etanol y B contenían azufre (iones sulfato), lo que puede contrarrestar el pH del suelo (que suele ser básico en suelos ausentes de zinc (Hibbard,

1921)), lo que no ocurrió con la matriz procesada por el método A con agua.

Los estudios de germinación determinaron que las matrices no presentaron ningún problema para la correcta germinación de las semillas, por lo que pueden incorporarse desde la siembra del cultivo, aliviando el proceso. Además, la capacidad de agua del suelo aumentó entre un 26 a 43% cuando se incorporaron las matrices. Esto se debe a que la capacidad de absorción de agua de las matrices, aunque baja, permitió retener el agua de riego y utilizarla de manera más efectiva en los cultivos como fuente de agua adicional. Esto redujo la frecuencia de riego en aproximadamente un 33%.

5.4 Conclusiones

La eliminación del plastificante de las matrices bioplásticas permitió obtener un sistema que permitía la liberación controlada del micronutriente. De esta forma, ha sido posible obtener matrices con propiedades funcionales óptimas para su uso en cultivos como sistemas de liberación controlada de zinc. Además, estas matrices presentaron unas propiedades mecánicas suficientes para su uso en horticultura y una capacidad de absorción que permite añadirle valor al producto.

De esta forma, aunque la incorporación del micronutriente mediante la homogenización de todos los componentes en un mezclado puede considerarse el método más directo (método A), el uso de agua como medio de extracción del plastificante arrastra la mayor parte del micronutriente, lo que la convierte en un método ineficaz.

Por otro lado, la incorporación del micronutriente en una etapa posterior de inmersión en disolución saturada (método B o C) permite cargar a la matriz con una cantidad mayor de micronutriente, aunque este se deposita mayoritariamente en la superficie de la matriz, haciendo que su liberación sea más rápida. Además, la cantidad de sal que se necesita incorporar en la disolución frente a la que queda en la matriz hace que haya un gran desperdicio de la misma durante el procesado.

En este sentido, la optimización del método A cambiando el medio de extracción por etanol pareció ser la vía más factible para la industrialización de estas matrices. Durante el cultivo, estas matrices han aportado el zinc necesario para el correcto desarrollo de lechugas y pimientos en suelos deficientes en zinc, mejorando incluso la eficacia de los fertilizantes convencionales, tantos en cultivos de desarrollo rápido

(lechuga) como cultivos de desarrollo más lento (pimientos). También hicieron posible reducir su riego. Todo esto conduce a cultivos mejor desarrollados y con más cantidad de zinc incorporado, utilizando menos recursos (bajando los precios). Este trabajo ha abierto una nueva posibilidad de crear dispositivos más eficientes para la incorporación de fertilizantes a los cultivos, las cuales producen excelentes resultados en los cultivos.

5.5 Concluding remarks

The elimination of the plasticizer from the bioplastic matrices made it possible to obtain a system that allowed the controlled release of the micronutrient. In this way, it has been possible to obtain matrices with optimal functional properties for use in crops as zinc-controlled-release systems. In addition, these matrices presented sustainable mechanical properties for use in horticulture and a water uptake capacity that allows adding value to the product.

In this way, although the incorporation of the micronutrient through the homogenization of all the components in a mixture can be considered the most direct method (method A), the use of water as an extracting medium drags most of the micronutrient, which makes it an ineffective method.

On the other hand, the incorporation of the micronutrient in a subsequent stage of immersion in saturated solution (method B or C) allows the matrix to be loaded with a greater amount of micronutrient, although it is mainly deposited on the surface of the matrix, causing its quick release. In addition, the amount of salt that needs to be incorporated into the solution compared to those remains in the matrix means that there is a great waste of it during processing.

In this sense, the optimization of method A by changing the extraction medium for ethanol seemed to be the most feasible way for the industrialization of these matrices. During cultivation, these matrices have provided the necessary zinc for the proper development of crops in zinc-deficient soils, even improving the effectiveness of conventional fertilizers, both in fast-growing crops (lettuce) and slower-growing crops

(pepper). These matrices also made it possible to reduce their irrigation. All of this leads to better grown and with more zinc incorporated, using fewer resources (lowering prices). This work has opened a new possibility of creating more efficient devices for the incorporation of fertilizers into crops, which produce excellent results in crops.

Agradecimientos

Se agradece a los servicios de Microanálisis, Microscopía e Invernadero del Centro de Investigación, Tecnología e Innovación de la Universidad de Sevilla (CITIUS) por su asesoramiento durante los ensayos realizados en sus instalaciones.

Publicaciones relacionadas

Jiménez-Rosado, M., Perez-Puyana, V., Rubio-Valle, J.F., Guerrero, A. y Romero, A. (2020). Processing of biodegradable and multifunctional protein-based polymer materials for the potential controlled release of zinc and water in horticulture. *Journal of Applied Polymer Science*, 137, 49419.

Jiménez-Rosado, M., Alonso-González, M., Rubio-Valle, J.F., Perez-Puyana, V. y Romero, A. (2020). Biodegradable soy protein-based matrices for the controlled release of zinc in horticulture. *Journal of Applied Polymer Science*, 137, 49187.

Jiménez-Rosado, M., Rubio-Valle, J.F., Perez-Puyana, V., Guerrero, A. y Romero, A. (2021). Eco-friendly protein-based materials for a sustainable fertilization in horticulture. *Journal of Cleaner Production*, 286, 124948.

Jiménez-Rosado, M., Perez-Puyana, V., Guerrero, A. y Romero, A. (2021). Controlled release of zinc from soy protein-based matrices to plants. *Agronomy*, 11, 580.

Referencias

Agencia de Gestión Agraria y Pesquera de Andalucía (2019) *Caracterización del sector agrario y pesquero de Andalucía*. Sevilla: Consejería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Desarrollo Sostenible de la Junta de Andalucía.

Bozell, J. J. (2006) "Feedstocks for the Future: Using Technology Development as a Guide to Product Identification", in *Feedstocks for the Future*, pp. 1–12.

Broadley, M. R., White, P. J., Hammond, J. P., Zelko, I. y Lux, A. (2007) "Zinc in plants: Tansley review", *New Phytologist*, 173(4), pp. 677–702.

Capezza, A. J., Newson, W. R., Olsson, R. T., Hedenqvist, M. S. y Johansson, E. (2019) "Advances in the Use of Protein-Based Materials: Toward Sustainable Naturally Sourced Absorbent Materials", *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 7(5), pp. 4532–4547.

Chen, J., Fan, X., Zhang, L., Chen, X., Sun, S. y Sun, R. (2020) "Research Progress in Lignin-Based Slow/Controlled Release Fertilizer", *ChemSusChem*, 13(17), pp. 4356–4366.

De Corato, U., De Bari, I., Viola, E. y Pugliese, M. (2018) "Assessing the main opportunities of integrated biorefining from agro-bioenergy co/by-products and agroindustrial residues into high-value added products associated to some emerging markets: A review", *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 88, pp. 326–346.

Damodaran, S. (1997) *Food Proteins and Their Applications*. New York: Routledge.

Essawy, H. A., Ghazy, M. B. M., El-Hai, F. A. y Mohamed, M. F. (2016) "Superabsorbent hydrogels via graft polymerization of acrylic acid from chitosan-cellulose hybrid and their potential in controlled release of soil

nutrients", *International Journal of Biological Macromolecules*, 89, pp. 144–151.

Fernández-Espada, L., Bengoechea, C., Cordobés, F. y Guerrero, A. (2016) "Thermomechanical properties and water uptake capacity of soy protein-based bioplastics processed by injection molding", *Journal of Applied Polymer Science*, 133(24), p. 43524.

Fernández-Espada, L., Bengoechea, C., Sandía, J. A., Cordobés, F. y Guerrero, A. (2019) "Development of novel soy-protein-based superabsorbent matrixes through the addition of salts", *Journal of Applied Polymer Science*, 136(5), p. 47012.

Fertilizar: Civil association (2020) *Use of fertilizers in 2019*. Disponible en: <https://www.fertilizar.org.ar/> (Accedido: Agosto17, 2020).

Flinck, A. (1982) *Fertilizers and fertilization: introduction and practical guide to crop fertilization*. Weinheim: Verlag hemie.

Fosmire, G. J. (1990) "Zinc toxicity", *The American Journal of Clinical Nutrition*, 51(2), pp. 225–227.

Galdeano, E. (2002) "Economic impact of the quality and environmental actions on the value added in horticultural cooperatives of Andalusia", en *24th International Congress of CIRIEC*. Milano: CIRIEC.

Gontard, N., Sonesson, U., Birkved, M., Majone, M., Bolzonella, D., Celli, A., Angellier-Coussy, H., Jang, G.-W., Verniquet, A., Broeze, J., Schaer, B., Batista, A. P. y Sebok, A. (2018) "A research challenge vision regarding management of agricultural waste in a circular bio-based economy", *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 48(6), pp. 614–654.

Hernández, T., Chocano, C., Moreno, J.-L. y García, C. (2016) "Use of compost as an alternative to conventional inorganic fertilizers in intensive lettuce (*Lactuca sativa* L.) crops—Effects on soil and plant", *Soil and Tillage*

Research, 160, pp. 14–22.

Hibbard, P. L. (1921) "Sulfur for neutralizing alkali soil", *Soil Science*, 11(5), pp. 385–388.

Junta de Andalucía (2020) *Exportaciones e importaciones agroalimentarias*. Disponible en: <https://www.juntadeandalucia.es/organismos/agriculturaganaderiapescaydesarrollosostenible/servicios/estadistica-cartografia/estadisticas-agricolas/paginas/comercio-exterior-agricola.html> (Accedido: Octubre 24, 2020).

K.R., R., Thomas, S., Kalarikkal, N. y K., J. (2021) "Nanotechnology in controlled-release fertilizers", in *Controlled Release Fertilizers for Sustainable Agriculture*. Elsevier, pp. 169–181.

Kartini, I., Lumbantobing, E. T., Suyanta, S., Sutarno, S. y Adnan, R. (2020) "Bioplastic Composite of Carboxymethyl Cellulose/N-P-K Fertilizer", *Key Engineering Materials*, 840, pp. 156–161.

Klüver, E. y Meyer, M. (2015) "Thermoplastic processing, rheology, and extrudate properties of wheat, soy, and pea proteins", *Polymer Engineering & Science*, 55(8), pp. 1912–1919.

Komarnisky, L. A., Christopherson, R. J. y Basu, T. K. (2003) "Sulfur: its clinical and toxicologic aspects", *Nutrition*, 19(1), pp. 54–61.

Kondraju, T. T. y Rajan, K. S. (2019) "Excessive fertilizer usage drives agriculture growth but depletes water quality", *ISPRS Annals of Photogrammetry, Remote Sensing and Spatial Information Sciences*, IV-3/W1, pp. 17–23.

Lide, D. R. (2006) *CRC Handbook of Chemistry and Physics*. Boca Raton: CRC Press/Taylor and Fancis Group.

Ma, Z., Li, Q., Yue, Q., Gao, B., Xu, X. y Zhong, Q. (2011) "Synthesis and

characterization of a novel super-absorbent based on wheat straw", *Bioresource Technology*, 102(3), pp. 2853–2858.

Merino, D., Gutiérrez, T. J. y Alvarez, V. A. (2019) "Potential Agricultural Mulch Films Based on Native and Phosphorylated Corn Starch With and Without Surface Functionalization with Chitosan", *Journal of Polymers and the Environment*, 27(1), pp. 97–105.

Mesias, V. S., Agu, A. B., Benablo, P. J., Chen, C.-H. y Penalzoza, D. J. (2019) "Coated NPK Fertilizer Based on Citric Acid-Crosslinked Chitosan/Alginate Encapsulant", *Journal of Ecological Engineering*, 20(11), pp. 1–12.

Montesano, F. F., Parente, A., Santamaria, P., Sannino, A. y Serio, F. (2015) "Biodegradable Superabsorbent Hydrogel Increases Water Retention Properties of Growing Media and Plant Growth", *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 4, pp. 451–458.

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (2022) *Datos de alimentación y agricultura*. Disponible en: <http://www.fao.org/> (Accedido: Marzo 28, 2022).

Pagnani, G., Pellegrini, M., Galieni, A., D'Egidio, S., Matteucci, F., Ricci, A., Stagnari, F., Sergi, M., Lo Sterzo, C., Pisante, M. y Del Gallo, M. (2018) "Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) in Cannabis sativa "Finola" cultivation: An alternative fertilization strategy to improve plant growth and quality characteristics", *Industrial Crops and Products*, 123, pp. 75–83.

Peña, A., Gálvez, A., Rodríguez-Liévana, J. A., Jiménez de Cisneros, C., López Galindo, A., Viseras, C. y Caballero, E. (2017) "Adsorption of nutrients on natural Spanish clays for enriching seed coatings", *Adsorption*, 23(6), pp. 821–829.

Sadeghi, M. y Hosseinzadeh, H. (2008) "Synthesis of Starch—Poly(Sodium Acrylate-co-Acrylamide) Superabsorbent Hydrogel with Salt and pH-

Responsiveness Properties as a Drug Delivery System", *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 23(4), pp. 381–404.

Sagunthala, P., Veeravazhuthi, V., Hemalatha, P. y Yasotha, P. (2016) "A study on the growth and characterization of zinc sulphate mono hydrate doped glycine NLO single crystals", *Ferroelectrics*, 504(1), pp. 96–103.

Saïdou, A., Kuyper, T. W., Kossou, D. K., Tossou, R. y Richards, P. (2004) "Sustainable soil fertility management in Benin: learning from farmers", *NJAS - Wageningen Journal of Life Sciences*, 52(3–4), pp. 349–369.

Scherr, S. J. (2020) *Soil degradation: a threat to developing-country food security by 2020?* Washington D.C.: International Food Policy Research Institute.

Seidell, A. y Linke, W. F. (1940) *Solubilities of inorganic and metal organic compounds; a compilation of quantitative solubility data from the periodical literature*. New York: D. Van Nostrand Company.

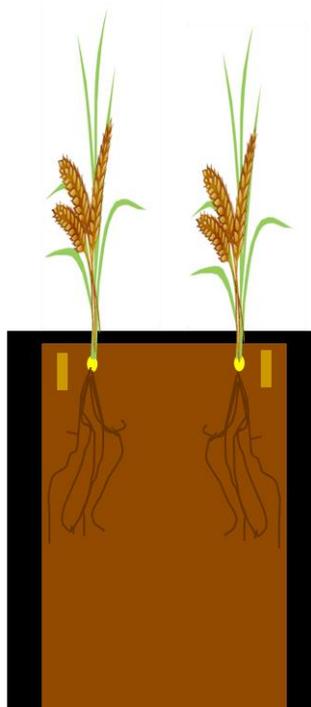
Shaji, H., Chandran, V. y Mathew, L. (2021) "Organic fertilizers as a route to controlled release of nutrients", en *Controlled Release Fertilizers for Sustainable Agriculture*. Amsterdam: Elsevier, pp. 231–245.

Silva, J. y Uchida, R. (2000) "Essential Nutrients for Plant Growth", in *Plant Nutrition Management in Hawaii's soils, approaches and application to tropical and subtropical agriculture*. Hawaii: CTAHR editorial.

Song, F., Tang, D.-L., Wang, X.-L. y Wang, Y.-Z. (2011) "Biodegradable Soy Protein Isolate-Based Materials: A Review", *Biomacromolecules*, 12(10), pp. 3369–3380.

Wang, H., Jiang, L. y Fu, L. (2007) "Properties of molded soy protein isolate plastics", *Journal of Applied Polymer Science*, 106(6), pp. 3716–3720.

Capítulo 6: Uso de matrices de liberación controlada para la incorporación de zinc a diferentes variedades de cebada



6.1 Introducción

La cebada (*Hordeum vulgare*) es una planta monocotiledónea anual. Es un cereal de gran importancia tanto en humanos como en animales por su contenido energético y de aminoácidos (Briggs, 2012). De esta forma, es el cuarto cereal más cultivado a nivel mundial, solo superado por el maíz, trigo y arroz (Tadele, 2018). En 2020 se cosecharon 51 millones de hectáreas de cebada, produciéndose 157 millones de toneladas. Los países más productores son Rusia, Francia, Alemania, Australia y España, que producen entre 16 y 9 millones de toneladas de cebada cada uno (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, 2022).

Entre los usos de la cebada, se destaca el consumo humano a través de un proceso de tostado y molido (máchica) o en el pan (Jaeger *et al.*, 2021). Sin embargo, su uso principal es la producción de cerveza, whisky y ginebra a partir de su malta (Düzgün, 2021). Además de sus propiedades nutricionales, la cebada también tiene propiedades antiespasmódicas, astringentes, digestivas y antifebriles, por lo que se suele utilizar en ciertos medicamentos (Ó'Nualláin, 2019).

El cambio climático, sumado a la creciente demanda de cultivos, ha perjudicado el rendimiento de cultivos como la cebada debido al estrés térmico y abiótico o la degradación del suelo (Khalid, 2020). Todo esto ha derivado en cultivos menos nutritivos que afectan a los humanos (Haq *et al.*, 2022).

La deficiencia de zinc es el problema nutricional más generalizado en los cultivos (Alloway, 2009). El zinc es un micronutriente requerido en pequeñas cantidades por los cultivos o los humanos. Sin embargo, su uso

es crucial para el organismo de ambos (Frassinetti *et al.*, 2006). El zinc es necesario para el correcto funcionamiento y estabilidad de muchas proteínas del cultivo. Además, es fundamental tener disponibilidad de zinc cerca de las raíces durante el crecimiento de la planta para ayudar a las membranas celulares. De lo contrario, estas membranas pierden su estabilidad y se vuelven permeables, exudando varios compuestos ricos en carbono (por ejemplo, azúcares y aminoácidos) desde las raíces hacia el suelo, lo que fomenta la presencia de patógenos y aumenta la susceptibilidad al ataque de los cultivos (Moreira *et al.*, 2018). Por otro lado, las plantas que se desarrollan en condiciones de deficiencia de zinc no son capaces de utilizar toda la energía luminosa absorbida durante el proceso de fotosíntesis, ya que la enzima superóxido dismutasa (enzima que cataliza el proceso de fotosíntesis) es altamente dependiente del zinc. Así, la energía que la planta no puede utilizar genera radicales libres de oxígeno que dañan la clorofila y los lípidos, generando clorosis y necrosis (Cakmak, 2000; Huang *et al.*, 2000). Además, el zinc participa en la biosíntesis del ácido indolacético, ya que es fundamental para la síntesis del triptófano, que es el precursor de este ácido (Cakmak *et al.*, 1999). Por lo tanto, está involucrado en el crecimiento y elongación de las células. En este sentido, la deficiencia de zinc provoca una reducción en la elongación de los brotes y entrenudos de crecimiento y la formación de folíolos (Hafeez *et al.*, 2013). El zinc también es importante en la fertilidad de las plantas. De esta forma, actúa en los procesos de maduración y producción de semillas, así como favorece la formación, polinización, viabilidad y fertilidad del polen (Laware y Raskar, 2014). Así, la deficiencia de zinc podría reducir el rendimiento de la producción hasta en un 20% (Castellanos-Ramos y Santiago-Rodríguez, 2014). Además, el zinc proporciona protección a las plantas

contra los patógenos, especialmente aquellos en el suelo, debido a que la mayoría de los patógenos tienen baja tolerancia al zinc (Vivas *et al.*, 2006). Finalmente, la concentración de zinc en semillas de cebada y otros cereales es muy importante para la nutrición humana (Cakmak, 2008).

En los humanos, la deficiencia de zinc también es notable. De esta forma, ralentiza la tasa de crecimiento de los niños. Además, retrasa el desarrollo sexual en adolescentes y provoca impotencia en los hombres. La deficiencia de zinc también causa pérdida de cabello, diarrea, lesiones oculares y cutáneas y pérdida del apetito. Finalmente, puede causar pérdida de peso, problemas de cicatrización y disminución del gusto (Maret y Sandstead, 2008).

Por lo general, la deficiencia de zinc se mitiga en los cultivos a través de la fertilización en suelos o foliar, siendo el sulfato de zinc o zinc quelatado con EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) los fertilizantes más utilizados (Cakmak y Kutman, 2018). Sin embargo, esta fertilización no es muy efectiva debido a la baja movilidad del zinc en el floema de la planta, provocando grandes problemas de contaminación en el subsuelo y las aguas subterráneas (Ju *et al.*, 2004; Yasuor *et al.*, 2020). Una alternativa que se ha probado recientemente para mejorar esta fertilización es el uso de matrices de liberación controlada a base de proteínas (Jiménez-Rosado *et al.*, 2021). Sin embargo, existen pocos estudios que evalúen el uso de estas matrices proteicas en cultivos. Por ello, la novedad de este estudio es la evaluación, en profundidad, del uso de estas matrices en un cultivo tan importante como es la cebada.

En este sentido, el objetivo principal de este capítulo fue evaluar el efecto que el zinc y la proteína de las matrices de liberación controlada tienen sobre las diferentes variedades de cebada. Para ello, se comparó,

en primer lugar, las semillas de las diferentes variedades de cebada. Finalmente, se evaluó como les afectó la incorporación de matrices con o sin zinc en su crecimiento.

6.2 Materiales y métodos

6.2.1 *Materiales*

Seis variedades diferentes de cebada (*Hordeum vulgare*) fueron utilizadas en este capítulo: Barke (una cebada cervecera de primavera, de dos hileras, criada en Alemania), Golden Promise (una cebada de primavera, británica, clásica), Morex (una variedad maltera de seis hileras, de Italia), WB-200 (identificador del banco de germoplasma HOR7531, una variedad de primavera, mejorada, de Polonia), WB-379 (identificador del banco de germoplasma HOR11123, una raza autóctona tradicional de primavera, de Italia) y WB-446 (identificador del banco de germoplasma BCC1576, una variedad autóctona tradicional de primavera, de España).

Además, para el estudio se utilizaron matrices proteicas de soja con y sin zinc incorporado (MZ y M, respectivamente). Estas matrices se desarrollaron conforme al método A (sección 2.9.1) utilizando etanol como medio de inmersión, al ser las matrices más eficientes obtenidas en el capítulo anterior (Capítulo 5). Las matrices MZ contienen un 4,4% (15,3 mg) de zinc. Estas matrices tienen un tiempo de liberación controlada y biodegradabilidad de 40 días

6.2.2 *Caracterización de las semillas*

6.2.2.1 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

La estructura fisicoquímica del endospermo y cáscara de las diferentes semillas se evaluó mediante FTIR. Para esto, las semillas se cortaron longitudinalmente por la mitad con un bisturí para exponer el endospermo. Se utilizó un espectrómetro Alpha compact FTIR (Bruker, EE.UU.) con un detector ATR (Figura 6.1) y cristal de diamante para

evaluar ambas partes (endospermo y cáscara). Los diferentes espectros se obtuvieron enfocando cada una de las partes en el detector. Los espectros se obtuvieron entre $4000-400\text{ cm}^{-1}$ a una resolución de 4 cm^{-1} . Cada espectro fue el promedio de 64 escáneres.



Figura 6.1. Espectrómetro Alpha compact FTIR con detector ATR

6.2.2.2 Espectroscopía Raman

Los enlaces químicos del endospermo también fueron evaluados por espectroscopía Raman. De esta forma, se utilizó un espectroscopio Jasco NRS-2000C (Japón) con un detector CCD digital congelado a una temperatura de 160 K (Figura 6.2). Los espectros Raman se obtuvieron entre $3200-100\text{ cm}^{-1}$ con 4 cm^{-1} de resolución y 15 mW de potencia. Cada espectro fue el promedio de 16 escáneres. Cabe mencionar que, debido al fondo de alta fluorescencia, fue imposible registrar espectros Raman de la cáscara de las semillas, evaluándose únicamente el endospermo.



Figura 6.2. Espectroscopio Jasco NRS-2000C con detector CCD digital congelado.

6.2.2.3 Contenido de zinc

La determinación de zinc se realizó por espectroscopía de emisión atómica de plasma acoplado inductivamente (ICP-AES) en las diferentes

semillas. Para realizar estas mediciones, las semillas fueron primero digeridas en un microondas usando ácidos (1:5 H₂O₂:HNO₃). El líquido resultante se sometió a 6000 K en un ICP SpectroBlue TI (Spectro, Alemania), donde se obtuvo el contenido de zinc debido a su longitud de onda característica (213,86 nm). Una explicación más detallada de este protocolo puede encontrarse en la sección 2.8.5 del Capítulo 2.

6.2.2.4 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Las muestras fueron cortadas y liofilizadas para eliminar su contenido en agua sin alterar su microestructura. Posteriormente, se recubrieron con una fina película de Paladio/Oro para mejorar su conductividad eléctrica y, así, mejorar la calidad de las micrografías. Este paso se realizó en una unidad Leica ACE600 (Alemania) montada sobre soportes de aluminio con cola de carbono. Luego, se observó la microestructura del endospermo de las diferentes variedades de cebada mediante SEM utilizando un microscopio Zeiss EVO (Alemania) con un voltaje de aceleración de 10 kV. Las imágenes fueron analizadas en el programa Image-J (software libre). Esta técnica también se utilizó para determinar el espesor de la cáscara. Una explicación más detallada de este protocolo puede encontrarse en la sección 2.10.3.1 del Capítulo 2.

6.2.3 *Condiciones de crecimiento del cultivo*

En primer lugar, las semillas se germinaron. Para ello, se sumergieron en hipoclorito de sodio al 1,5% durante 5 min y se enjuagaron con agua destilada. Luego, se incubaron a 20 °C para promover la germinación. Solo las semillas germinadas se utilizaron para los experimentos.

Las semillas se sembraron en *rhizoboxes* (30 x 60 cm, ancho x alto), como se muestra en la Figura 6.3, para facilitar el análisis del crecimiento de raíces.

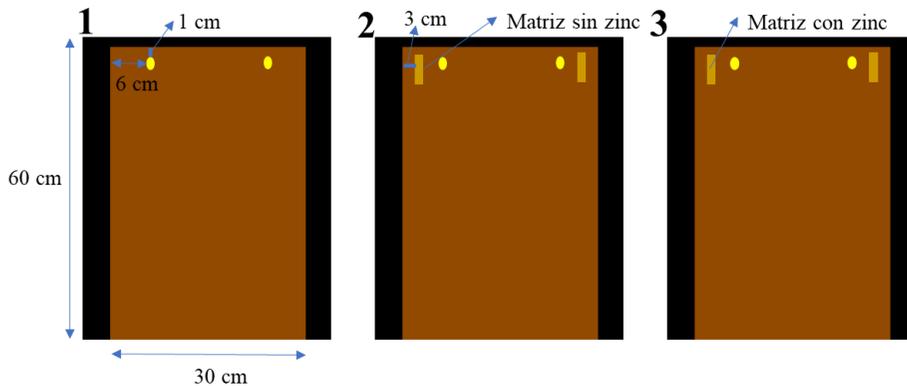


Figura 6.3. Esquema de los rhizoboxes. 1: Referencia. 2: Matriz sin zinc. 3: Matriz con zinc.

El crecimiento se realizó siguiendo un trabajo previo (Kirschner *et al.*, 2021), manteniendo las raíces en oscuridad y a un ángulo de 30°. Se realizaron tres experimentos diferentes para evaluar el efecto de incorporar la matriz en el cultivo: referencia (sin matriz), matriz sin zinc (M) y matriz con zinc (MZ). Una matriz se enterró junto a cada semilla. En total se realizaron 4 repeticiones por tratamiento y variedad de cebada, asignándolas en un diseño de bloques al azar. Todas las muestras se colocaron en un invernadero durante 20 días con una temperatura de $23,5 \pm 1,5$ °C, 50% de humedad relativa y un fotoperiodo de 10 h. El suelo se mantuvo al 100% de su capacidad de retención de agua. Después del ensayo, las plantas con sus raíces fueron cuidadosamente extraídas y almacenadas individualmente en bolsas de plástico a 4 °C hasta su caracterización.

6.2.4 *Caracterización de las plantas*

6.2.4.1 Análisis del crecimiento de las raíces

Las raíces de cada réplica se escanearon en los *rhizoboxes* cada 5 días para evaluar su crecimiento. Finalmente, las imágenes se analizaron en el programa Image-J (software libre) para obtener el número de raíces, su tamaño y ángulo.

6.2.4.2 FTIR

Los espectros de las hojas, tallos y raíces de cada planta se obtuvieron con el mismo procedimiento descrito para las semillas (sección 6.2.2.1). Cabe mencionar que los tallos se midieron por dentro, cortando una sección de ellos con un bisturí.

6.2.4.2 Contenido de zinc

El contenido en zinc de cada planta se obtuvo siguiendo el mismo protocolo descrito para las semillas (sección 6.2.2.3).

6.2.5 *Análisis estadístico*

Se realizaron al menos cuatro replicados de cada muestra. El análisis estadístico se obtuvo de la misma forma explicada en la sección 2.9 del Capítulo 2.

6.3 Resultados y discusión

6.3.1 Diferencias en las semillas de las diferentes variedades de cebada

La Figura 6.4 muestra los espectros de las cáscaras y endospermos de las diferentes semillas. Como puede verse, ambas partes tienen un perfil similar. De esta forma, se observa la banda de vibración del grupo O-H (3320 cm^{-1}), que se debe al agua residual presente en las semillas. Los polisacáridos (celulosa, hemicelulosa y lignina) presentan una banda entre 1260 y 870 cm^{-1} debido al modo de vibración de los grupos C-O-C. Se encontró otra banda entre 2970 y 2840 cm^{-1} correspondiente a las vibraciones C-H_x del contenido de lípidos en las semillas. Estos lípidos también se pudieron observar en la banda de 1780 cm^{-1} que corresponde a compuestos éster. Además, los espectros muestran estructuras proteicas en las muestras, las cuales se pueden observar en las bandas entre 1520 y 1280 cm^{-1} que corresponden a grupos amida. Todos estos picos también fueron identificados en trabajos anteriores, siendo el perfil típico de las semillas de cebada (Gürsoy, 2019).

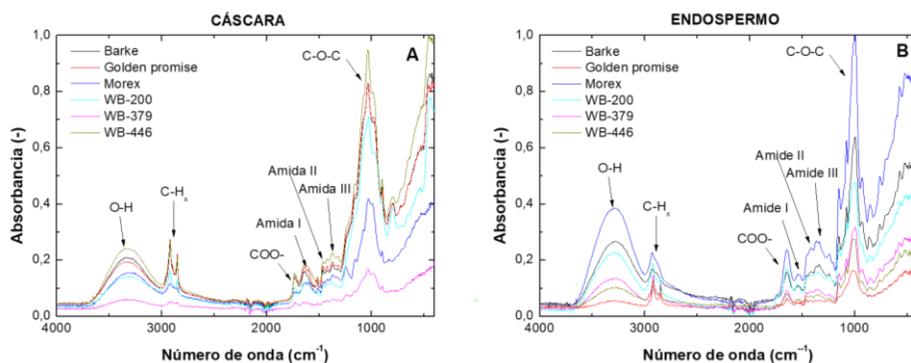


Figura 6.4. Espectro FTIR de las semillas. A: Cáscara. B: Endospermo.

Comparando ambas partes, se puede observar que la cáscara tiene generalmente más celulosa, hemicelulosa y lignina que el endospermo, a excepción de Morex y WB-379. Esto se explica por la función protectora de la cáscara, debiendo ser lo suficientemente fuerte para que la semilla no sea dañada por insectos, bacterias o condiciones climáticas. Por otro lado, el endospermo se utiliza como fuente de nutrientes para el embrión durante la germinación, por lo que posee más proteínas y lípidos (Yan *et al.*, 2014).

De las diferentes variedades de cebada, la WB-379 es la que menos polisacáridos tiene en su cáscara y, por tanto, será la más desprotegida. Morex también tiene una baja cantidad de polisacáridos en la cáscara en comparación con las otras variedades. Sin embargo, tiene la fuente nutricional más alta en el endospermo (los picos asociados a las proteínas y lípidos son más altos). Los endospermos menos nutritivos son Golden Promise, WB-446 y WB-379, por lo que tendrán más energía para prosperar por sí mismos y formar plantas.

La Figura 6.5 muestra los espectros Raman del endospermo de las diferentes semillas estudiadas. El endospermo de cebada tiene gránulos de almidón incrustados en una matriz proteica y paredes celulares compuestas de arabinoxilano y glucanos. También contiene celulosa, ácidos fenólicos y heteromananos (Fincher y Stone, 1986). Todos estos compuestos se manifiestan en los espectros Raman. Así, los polisacáridos se observan en la banda C-O-C ($1160-1080\text{ cm}^{-1}$). Más específicamente, el almidón tiene una banda a 485 cm^{-1} , correspondiente a la unidad de glucopiranososa. Las proteínas están representadas por el pico característico del enlace peptídico (C-N) a 947 cm^{-1} . Finalmente, los componentes fenólicos se manifiestan en la vibración de los grupos OH

(3020-2880 cm^{-1}). Además, se presentan componentes con fósforo (875 cm^{-1}). Estos perfiles fueron similares a los obtenidos en trabajos anteriores para semillas de cebada nativa y malteada (Galvis *et al.*, 2015).

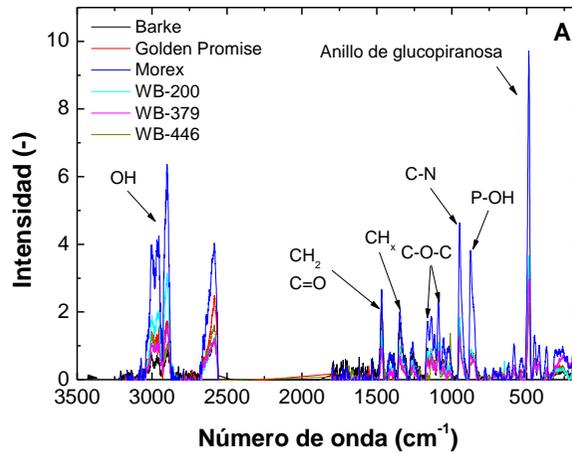


Figura 6.5. Espectro Raman del endospermo de las diferentes variedades de cebada.

Todas las variedades de cebada tienen un perfil Raman similar. Sin embargo, se observan pequeñas diferencias, similares a las discutidas en los perfiles de FTIR. En este sentido, se pueden observar los polisacáridos y proteínas presentes en el endospermo de cada semilla. Los lípidos también se ven presentados en ambos perfiles (Raman y FTIR). Morex presenta la mejor reserva nutricional (picos característicos de proteínas y lípidos más intensos), siendo los menos nutritivos los endospermos de Golden Promise, WB-446 y WB-379.

En la Tabla 6.1 se puede observar la concentración de zinc de las diferentes semillas. Como se puede observar, Golden Promise es el que presenta la peor concentración de zinc, seguida de WB-379 y WB-446. Es interesante recalcar que las semillas que presentaron un perfil proteico más bajo en FTIR fueron las que mostraron una menor cantidad de zinc.

Esto sugiere que el zinc está involucrado en las cadenas de proteínas (Genc *et al.*, 2002).

Tabla 6.1. Contenido en zinc en las diferentes semillas de cebada. Las diferentes letras usadas como superíndice en las distintas columnas evidencian diferencias significativas ($p < 0,05$).

Variedad	Contenido en zinc (ppm)
Barke	48 ^a
Golden promise	33 ^b
Morex	47 ^a
WB-200	54 ^c
WB-379	39 ^d
WB-446	40 ^d

La Figura 6.6 muestra las imágenes SEM del endospermo de las diferentes semillas. Todos ellos presentan una microestructura similar formada por gránulos. Esta microestructura es similar a la obtenida en trabajos anteriores (Wijngaard *et al.*, 2007; Nair *et al.*, 2011).

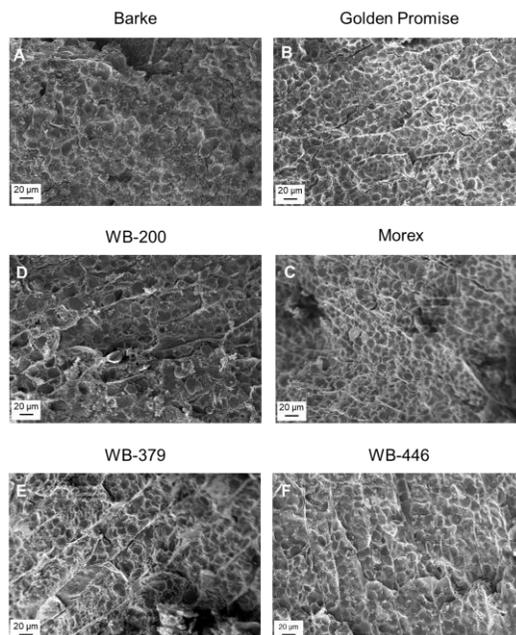


Figura 6.6. Imágenes de SEM del endosperma de las diferentes semillas de cebada. A: Barke. B: Golden Promise. C: Morex. D: WB-200. E: WB-379. F: WB-446.

Los gránulos observados tienen diferentes tamaños (Tabla 6.2), siendo los más pequeños los de Golden Promise y los más grandes los de WB-200.

Tabla 6.2. Datos obtenidos de las imágenes de SEM. Las diferentes letras usadas como superíndice en las distintas columnas evidencian diferencias significativas ($p < 0,05$).

Variedad	Gránulos (nm)	Espesor de la cáscara (nm)
Barke	15,7 ^a	25,4 ^A
Golden promise	8,7 ^b	25,2 ^A
Morex	12,4 ^a	15,4 ^B
WB-200	17,2 ^c	20,8 ^C
WB-379	13,3 ^a	7,2 ^D
WB-446	13,9 ^a	26,1 ^E

Generalmente, cuanto más proteína y zinc hay en el endospermo, mayor es el tamaño de los gránulos. Lo cual generalmente sigue una tendencia lineal con la concentración de zinc presentada en las semillas (Tamaño de gránulos = $0,332 \cdot [\text{Zn}] - 0,9108$; $R^2 = 0,957$).

Respecto al espesor de la cáscara, cuanto mayor sea el contenido de polisacáridos observado en los espectros de FTIR, mayor será el espesor de la cáscara. Así, la semilla de WB-379 es la que presenta menor espesor y, en cambio, la WB-446 es la que presenta mayor espesor.

6.3.2 Evaluación del efecto de las matrices sobre las plantas

La Figura 6.7 muestra los datos obtenidos del análisis de raíces de las diferentes plantas. En primer lugar, se observa cómo las propiedades fisicoquímicas y microestructurales de las semillas influyen en la prosperidad de las plantas finales. De esta forma, si se comparan los sistemas de referencia, a los que no se les ha realizado ningún tratamiento, se puede observar que algunas semillas no lograron formar una planta. Golden Promise, Morex y WB-200 no prosperaron

posiblemente debido a uno de estos factores: (i) la gruesa cáscara que los rodea que no permite la eclosión de la semilla; (ii) la mala fuente nutricional que presentan en el endospermo; o una combinación de ambos. De esta forma, Golden Promise tiene una de las cáscaras más gruesas y una baja presencia de proteína y zinc en el endospermo. WB-200 tiene una cáscara gruesa y una presencia moderada de proteína en el endospermo, insuficiente para prosperar por sí sola. Sin embargo, Morex tiene una cáscara estrecha y una buena reserva de proteína y zinc. Por tanto, en este caso, su no prosperidad no tiene un origen fisicoquímico, y puede deberse a la irregularidad observada en los gránulos observados por SEM, siendo también pequeños con respecto a los demás.

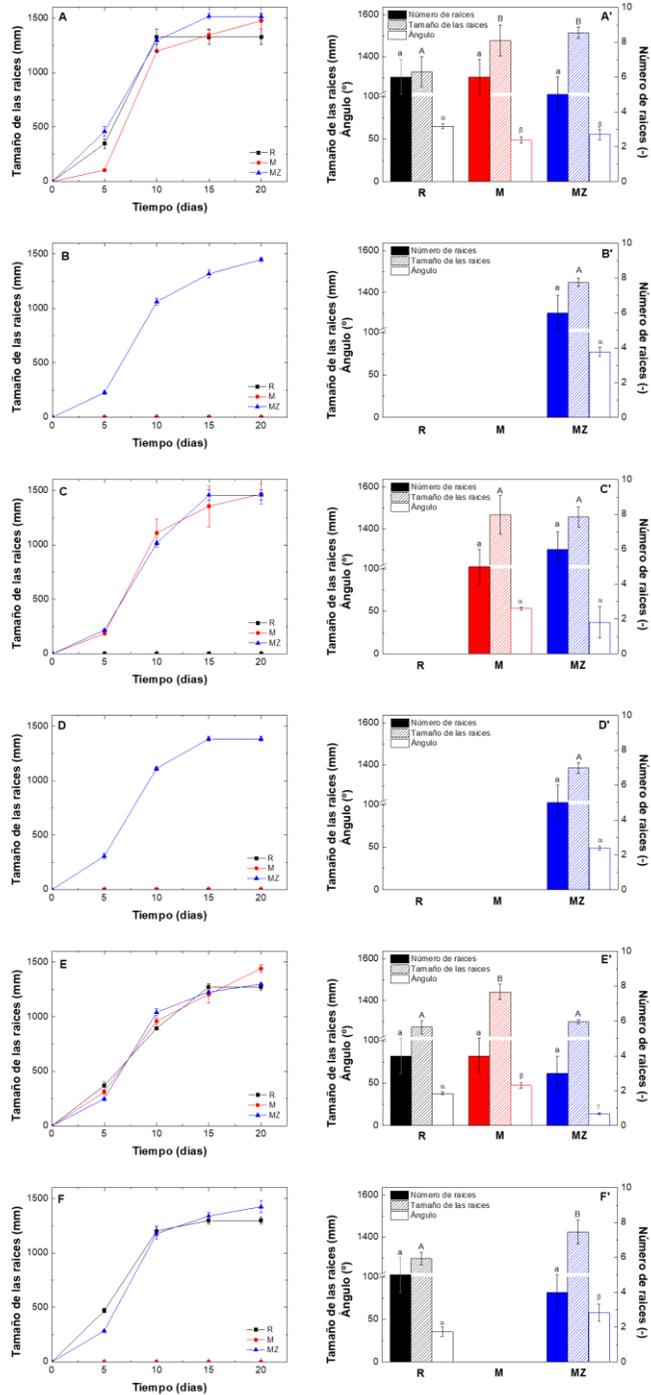


Figura 6.7. Datos obtenidos de los análisis de las raíces de las diferentes raíces. A, A': Barke. B, B': Golden Promise. C, C': Morex. D, D': WB-200. E, E': WB-379. F, F': WB-446. Las diferentes letras usadas evidencian diferencias significativas ($p < 0,05$).

Respecto a los diferentes tratamientos, las matrices libres de zinc (M) mejoraron la calidad del reservorio proteico, posiblemente por la bioestimulación que generan los aminoácidos (Radu *et al.*, 2010; Souri y Bakhtiarizade, 2019). De esta forma, permite que se formen las plantas de la variedad Morex. Por otro lado, las matrices con zinc (MZ) permiten la prosperidad de todas las variedades de cebada, independientemente de sus propiedades fisicoquímicas y morfología. Esto indica que el zinc presente en la matriz permite la eclosión de la semilla independientemente de su espesor, posiblemente porque puede penetrar en la semilla. Además, mejora la bioestimulación generada por la proteína. Sin embargo, la morfología de las plantas no se ve alterada por la inclusión de las matrices. De esta forma, no se observan diferencias significativas en el tamaño, número o ángulo de las raíces de las plantas que prosperaron (Figura 6.7A'-F').

Los espectros FTIR de las diferentes partes de las plantas se observan en la Figura 6.8. Debido a que no se encontraron diferencias significativas entre las diferentes plantas, solo se representó los espectros de la variedad Barke como ejemplo de todos los sistemas. Como se puede observar, todos los sistemas tienen el mismo perfil independientemente del tratamiento. Esto es consistente con los resultados obtenidos en el análisis de raíces. Por lo que se puede concluir que la inclusión de las matrices para mejorar los rendimientos de las plantas no altera su estructura.

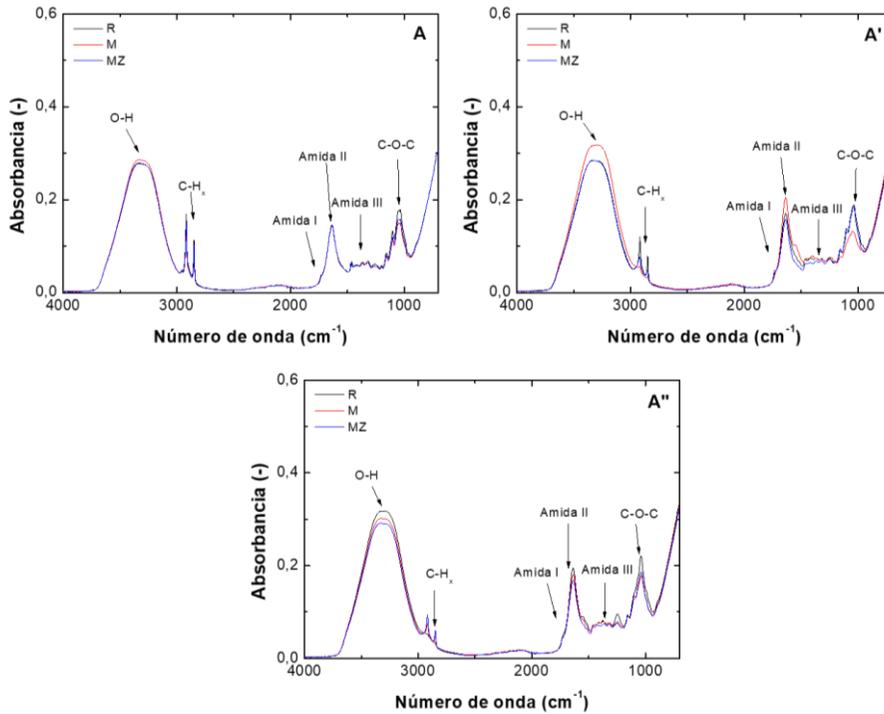


Figura 6.8. Espectro FTIR de las hojas (A), tallos (B) y raíces (C) de la cebada variedad *Barke*.

Finalmente, la concentración de zinc de las plantas se muestra en la Tabla 6.3. La incorporación de matrices, incluso sin zinc, mejora la absorción de zinc del medio. De esta forma, las plantas tratadas con M tienen una mejor absorción de zinc del medio. Este comportamiento podría deberse a dos efectos: (i) los aminoácidos presentes en la matriz son capaces de complejar el zinc, aumentando su capacidad para ser captado por las plantas y (ii) los aminoácidos podrían estimular la síntesis de fitosideróforos para mejorar la asimilación del zinc (Nakib *et al.*, 2021; Northover *et al.*, 2021). Sin embargo, el tratamiento MZ es el más próspero, obteniendo las plantas con mayor capacidad de zinc (50% más). Todo esto representa una mejora nutricional ya que serviría para paliar las carencias de zinc en la población (Alloway, 2009). Además, el zinc asimilado por la planta a través de la matriz con zinc presenta una

correlación lineal con el zinc contenido en la semilla ($Zn\text{-Planta} = 4,858 \cdot Zn\text{-semilla} + 102$, $R^2 = 0,998$). De esta forma, mientras más zinc presenta la semilla, mejor lo asimila la planta, reflejándose en su análisis final.

Tabla 6.3. Contenido en zinc (ppm) de las diferentes plantas de cebada. Las diferentes letras usadas como superíndice en las distintas columnas evidencian diferencias significativas ($p < 0,05$).

Variedad	[Zn] (ppm)		
	R	M	MZ
Barke	223 ^a	270 ^c	335 ^e
Golden promise	-	-	280 ^f
Morex	-	272 ^c	331 ^e
WB-200	-	-	362 ^g
WB-379	194 ^b	235 ^d	291 ^h
WB-446	196 ^b	-	294 ^h

6.4 Conclusiones

En conclusión, se han podido identificar las diferencias fisicoquímicas y microestructurales entre distintas variedades de semillas de cebada y relacionarlas con la prosperidad del cultivo. Además, se ha encontrado un tratamiento a través de matrices a base de proteína de soja con zinc incorporado que mejoran la germinación de las semillas y el rendimiento de los cultivos, obteniendo plantas con mayor contenido en zinc. Todo esto ha dado lugar a una cebada enriquecida con zinc que podría utilizarse para mejorar los problemas de deficiencia de este nutriente en humanos. Sin embargo, todo esto es un trabajo inicial, y sería conveniente evaluar, en futuros estudios, la inclusión de matrices en sistemas a gran escala y su implicación en la salud humana.

6.5 Concluding remarks

To sum up, it has been possible to identify the physicochemical and microstructural differences between different varieties of barley seeds and relate them to the prosperity of the crop. In addition, a treatment has been found through soy protein-based matrices with zinc incorporated that improve seed germination and crop yield, obtaining plants with a higher zinc content. All this has led to zinc-enriched barley that could be used to improve deficiency problems of this nutrient in humans. However, all this is an initial work, and it would be convenient to evaluate, in future studies, the inclusion of matrices in large-scale systems and their implication for human health.

Agradecimientos

Parte de este capítulo se realizó gracias a la estancia de investigación realizada en la Universidad de Bolonia de Bolonia (Italia). Especialmente, se agradece al Profesor Adamo Rombolà por tutorizar dicha estancia y al Profesor Silvio Salvi por proporcionar las semillas de las diferentes variedades de cebada. Además, se agradece a los servicios de Microanálisis y Microscopía del Centro de Investigación, Tecnología e Innovación de la Universidad de Sevilla (CITIUS) por su asesoramiento durante los ensayos realizados en sus instalaciones.

Publicaciones relacionadas

Jiménez-Rosado, M., Di Foggia, M., Rosignoli, S., Guerrero, A., Rombolà, A. y Romero, A. (2022). Effect of zinc and protein content in different barley varieties: Use of controlled release matrices. *Agronomy*, *UNDER REVIEW*.

Referencias

Alloway, B. J. (2009) "Soil factors associated with zinc deficiency in crops and humans", *Environmental Geochemistry and Health*, 31(5), pp. 537–548.

Briggs, D. E. (2012) *Barley*. Londres: Springer Netherlands.

Cakmak, I. (2000) "Tansley Review No. 111", *New Phytologist*, 146(2), pp. 185–205.

Cakmak, I. (2008) "Enrichment of cereal grains with zinc: Agronomic or genetic biofortification?", *Plant and Soil*, 302(1–2), pp. 1–17.

Cakmak, I., Kalaycı, M., Ekiz, H., Braun, H. J., Kılınç, Y. y Yılmaz, A. (1999) "Zinc deficiency as a practical problem in plant and human nutrition in Turkey: A NATO-science for stability project", *Field Crops Research*, 60(1–2), pp. 175–188.

Cakmak, I. y Kutman, U. B. (2018) "Agronomic biofortification of cereals with zinc: a review", *European Journal of Soil Science*, 69(1), pp. 172–180.

Castellanos-Ramos, J. y Santiago-Rodríguez, D. (2014) *Zinc (zn) in crop nutrition*. Disponible en:
<https://www.engormix.com/agricultura/articulos/zinc-nutricion-cultivos-t31354.htm> (Accedido: Mayo 13, 2022).

Düzgün, M. (2021) "Determination and evaluation of quality parameters in cool climate cereals", en *Theoretical and Practical New Approaches in Cereal Science and Technology*. Ankara: IKSAD Publishing House, pp. 147–223.

Fincher, G. B. y Stone, B. A. (1986) "Cell walls and their components, in: American association of cereal chemists", *Advances in Cereal Science and Technology* 1, 1986, pp. 207–296.

Frassinetti, S., Bronzetti, G. L., Caltavuturo, L., Cini, M. y Croce, C. Della (2006) "The Role of Zinc in Life: A Review", *Journal of Environmental*

Pathology, Toxicology and Oncology, 25(3), pp. 597–610.

Galvis, L., Bertinetto, C. G., Holopainen, U., Tamminen, T. y Vuorinen, T. (2015) "Structural and chemical analysis of native and malted barley kernels by polarized Raman spectroscopy (PRS)", *Journal of Cereal Science*, 62, pp. 73–80.

Genc, Y., McDonald, G. K. y Graham, R. D. (2002) "Critical deficiency concentration of zinc in barley genotypes differing in zinc efficiency and its relation to growth responses", *Journal of Plant Nutrition*, 25(3), pp. 545–560.

Gürsoy, T. (2019) "ATR-FTIR analyzes of a series process of barley plant wastes in order to prepare composite filling materials", en *Current Academic Studies in Natural Science and Mathematics Sciences*. Cetinje: IVPE.

Hafeez, B., Khanif, Y. M. y Saleem, M. (2013) "Role of zinc in plant nutrition- A review", *American Journal of Experimental Agriculture*, 3(2), pp. 374–391.

Haq, S. M., Hassan, M., Jan, H. A., Al-Ghamdi, A. A., Ahmad, K. y Abbasi, A. M. (2022) "Traditions for Future Cross-National Food Security—Food and Foraging Practices among Different Native Communities in the Western Himalayas", *Biology*, 11(3), p. 455.

Huang, C., Barker, S. J., Langridge, P., Smith, F. W. y Graham, R. D. (2000) "Zinc Deficiency Up-Regulates Expression of High-Affinity Phosphate Transporter Genes in Both Phosphate-Sufficient and -Deficient Barley Roots", *Plant Physiology*, 124(1), pp. 415–422.

Jaeger, A., Zannini, E., Sahin, A. W. y Arendt, E. K. (2021) "Barley Protein Properties, Extraction and Applications, with a Focus on Brewers' Spent Grain Protein", *Foods*, 10(6), p. 1389.

Jiménez-Rosado, M., Perez-Puyana, V., Guerrero, A. y Romero, A. (2021) "Controlled Release of Zinc from Soy Protein-Based Matrices to Plants",

Agronomy, 11(3), p. 580.

Ju, X., Liu, X., Zhang, F. y Roelcke, M. (2004) "Nitrogen Fertilization, Soil Nitrate Accumulation, and Policy Recommendations in Several Agricultural Regions of China", *AMBIO: A Journal of the Human Environment*, 33(6), pp. 300–305.

Khalid, S. (2020) *Agronomy: Climate Change*. Londres: IntechOpen.

Kirschner, G. K., Rosignoli, S., Guo, L., Vardanega, I., Imani, J., Altmüller, J., Milner, S. G., Balzano, R., Nagel, K. A., Pflugfelder, D., Forestan, C., Bovina, R., Koller, R., Stöcker, T. G., Mascher, M., Simmonds, J., Uauy, C., Schoof, H., Tuberosa, R., Salvi, S. y Hochholdinger, F. (2021) "Enhanced gravitropism 2 encodes a sterile alpha motif–containing protein that controls root growth angle in barley and wheat", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(35), e2001526118.

Laware, S. L. y Raskar, S. (2014) "Influence of Zinc Oxide Nanoparticles on Growth, Flowering and Seed Productivity in Onion", *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3(7), pp. 874–881.

Maret, W. y Sandstead, H. H. (2008) "Possible roles of zinc nutrition in the fetal origins of disease", *Experimental Gerontology*, 43(5), pp. 378–381.

Moreira, A., Moraes, L. A. C. y dos Reis, A. R. (2018) "The Molecular Genetics of Zinc Uptake and Utilization Efficiency in Crop Plants", in *Plant Micronutrient Use Efficiency*. Elsevier, pp. 87–108.

Nair, S., Knoblauch, M., Ullrich, S. y Baik, B.-K. (2011) "Microstructure of hard and soft kernels of barley", *Journal of Cereal Science*, 54(3), pp. 354–362.

Nakib, D., Slatni, T., Di Foggia, M., Rombolà, A. D. y Abdelly, C. (2021) "Changes in organic compounds secreted by roots in two Poaceae species (*Hordeum vulgare* and *Polypogon monspeliensis*) subjected to iron deficiency", *Journal of Plant Research*, 134(1), pp. 151–163.

Northover, G. H. R., Mao, Y., Ahmed, H., Blasco, S., Vilar, R., Garcia-España, E. y Weiss, D. J. (2021) "Effect of salinity on the zinc(II) binding efficiency of siderophore functional groups and implications for salinity tolerance mechanisms in barley", *Scientific Reports*, 11(1), p. 16704.

Ó'Nualláin, F. (2019) *A Quick Cuppa Herbal*. Cork: Mercier Press.

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (2022) *Datos de alimentación y agricultura*. Disponible en: <http://www.fao.org/> (Accedido: Marzo 28, 2022).

Radu, F., Ahmadi, M., Cojocariu, L., Marian, F., Bostan, C. y Borozan, A. (2010) "Genotype-biostimulations interactions in some high quality active principles appearance for alfalfa", *Research Journal of Agricultural Science*, 42(1), pp. 526–530.

Souri, M. K. y Bakhtiarizade, M. (2019) "Biostimulation effects of rosemary essential oil on growth and nutrient uptake of tomato seedlings", *Scientia Horticulturae*, 243, pp. 472–476.

Tadele, Z. (2018) "Economic analysis of the barley market and related uses", en *Grasses as Food and Feed*. Londres: IntechOpen.

Vivas, A., Biró, B., Ruíz-Lozano, J. M., Barea, J. M. y Azcón, R. (2006) "Two bacterial strains isolated from a Zn-polluted soil enhance plant growth and mycorrhizal efficiency under Zn-toxicity", *Chemosphere*, 62(9), pp. 1523–1533.

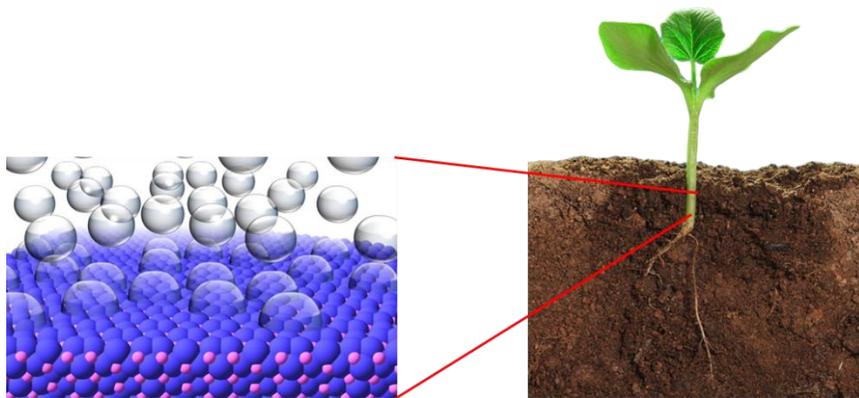
Wijngaard, H. H., Renzetti, S. y Arendt, E. K. (2007) "Microstructure of Buckwheat and Barley During Malting Observed by Confocal Scanning Laser Microscopy and Scanning Electron Microscopy", *Journal of the Institute of Brewing*, 113(1), pp. 34–41.

Yan, D., Duermeyer, L., Leoveanu, C. y Nambara, E. (2014) "The Functions of the Endosperm During Seed Germination", *Plant and Cell Physiology*, 55(9),

pp. 1521–1533.

Yasuor, H., Yermiyahu, U. y Ben-Gal, A. (2020) "Consequences of irrigation and fertigation of vegetable crops with variable quality water: Israel as a case study", *Agricultural Water Management*, 242, p. 106362.

Capítulo 7: Fertilizantes a base de nanopartículas como un nuevo reto en horticultura



7.1 Introducción

En los últimos años, la nanociencia ha tenido un gran impacto en muchos de los sectores industriales, incluyendo el hortícola (Zhao *et al.*, 2019). Así, se considera una ciencia emergente, orientada a la elaboración, caracterización y aplicación de materiales de dimensiones nanométricas, entre 0,1 y 100 nm, llegando a niveles atómicos y moleculares (Saylan *et al.*, 2019). La nanociencia se considera un campo interdisciplinar debido al amplio abanico de oportunidades que ofrece a un gran intervalo de sectores industriales. De esta forma, se puede presenciar su utilización en medicina e industria farmacéutica (Almendral y Satchi-Fainaro, 2019), industria alimentaria (Konur, 2019), así como en agricultura y horticultura (Konur, 2019).

Actualmente, el sector hortícola afronta grandes desafíos provenientes de la alta demanda de sus productos, así como del cambio climático (Berardi y Geisler, 2019). De esta forma, se enfrentan a un estancamiento de sus cultivos debido a la baja eficiencia del uso de nutrientes del suelo, los cuales son ya de por sí deficientes debido a la excesiva degradación del mismo (Alloway, 2008). Además, también se presenta una disminución de la superficie agrícola, debida al incremento de la población, así como una deficiente disponibilidad de agua para riego y escasez de la mano de obra (Berardi y Geisler, 2019). A todo esto se le suma el incremento sostenido del 4% de la demanda de productos agrícolas y hortícolas, sobre todo en el sector alimentario (Manimaran, 2015). Por lo tanto, para hacer frente al mercado y poder abastecer la demanda de manera óptima y con productos de calidad, es necesario buscar alternativas eficientes.

En este sentido, la nanociencia ha abierto una posibilidad de enfrentarse a esos problemas. Así, permite detectar la presencia de plagas y enfermedades desde el principio permitiendo poder actuar a tiempo para no perder el cultivo (Dissanayake *et al.*, 2019). Además, también permite aplicar la cantidad correcta de fertilizantes y pesticidas que promuevan la productividad, al mismo tiempo que garanticen la seguridad del medio ambiente (evitando usar excesos de fertilizantes y pesticidas), la no contaminación de alimentos, así como una mayor eficiencia en el uso de insumos agrícolas, lo que reduce los costes de la producción (Nuruzzaman *et al.*, 2016). En este contexto, se han desarrollado y caracterizado nuevos materiales basados en el uso de nanopartículas metálicas, poliméricas o inorgánicas para aumentar la productividad del cultivo, así como para perfeccionar la captura e inmovilización de nutrientes por parte de las plantas (Kottegoda *et al.*, 2011).

Estos sistemas reducen al mínimo la lixiviación de los fertilizantes al subsuelo o aguas subterráneas, previniendo la contaminación de los mismos por exceso de nutrientes. Además, mejoran la absorción de nutrientes por las plantas, mitigando la eutrofización al reducir la transferencia de nitrógeno a los mantos acuíferos subterráneos (Liu y Lal, 2015). Entre estas nanopartículas, las más utilizadas son las de óxido de zinc (ZnO), las cuales no solo permiten abastecer de zinc al cultivo, sino que también tiene un carácter plaguicida, que ayuda a prevenir a las plantas de la infección de plagas, sin contaminar al cultivo, ni afectar a la calidad del mismo (Naderi y Danesh-Shahraki, 2013).

Las nanopartículas metálicas pueden ser sintetizadas a partir de diferentes métodos, tanto físicos como químicos (Talam *et al.*, 2012).

Entre ellos, el método coloidal (también conocido como precipitado) ha sido el más utilizado, debido a la facilidad para modular las características finales de las nanopartículas. Así, este método parte de la mezcla de un precursor y un reductor, que dan un producto que tras someterlo a un tratamiento térmico se calcina obteniendo las nanopartículas. Así, las características de estas nanopartículas se pueden modelar a partir de la concentración de precursor y reductor utilizada, la relación de los mismos o la temperatura de calcinación (Chen *et al.*, 2008).

Desde un punto de vista químico, el agente reductor suele ser un hidróxido que permite que los grupos $-OH$ se unan al catión del precursor y formen un hidróxido intermedio. Dicho intermedio puede generar las nanopartículas tras un tratamiento térmico. Sin embargo, el uso de estos agentes reductores a menudo genera materiales tóxicos (materiales de partida sin reaccionar, exceso de reactivos y subproductos resultantes de reacciones secundarias o vías de degradación) (Sheldon, 2005). También suele encarecer el producto final, contribuyendo a la huella de carbono (Prabhu y Poulouse, 2012) y limitando su uso en aplicaciones como la horticultura, ya que la presencia de estos materiales podría ser perjudicial para el ser humano (Varma, 2012).

Para superar estos inconvenientes, el uso de polifenoles como agentes reductores podría reducir los costes de fabricación, proporcionando también métodos más ecológicos (Debnath y Gupta, 2018). De esta manera, el uso de estos reactivos puede maximizar los productos deseados y minimizar los subproductos (Li y Trost, 2008; Li, 2016). Esta síntesis se conoce como síntesis verde, ya que se utiliza un componente,

que puede proceder de un residuo, de origen vegetal en vez de una sal, reduciendo la contaminación producida.

Los polifenoles son compuestos de origen natural que contienen ciertas plantas (Parveen *et al.*, 2016). Estos se caracterizan por la presencia de más de un grupo fenol por molécula (en general, cada molécula presenta de 2 a 14 grupos –OH, lo que se correlaciona con su actividad antioxidante) (Gironi y Piemonte, 2011). Debido a la gran disponibilidad de grupos –OH, los polifenoles pueden actuar como agentes reductores en la síntesis de nanopartículas, evitando además la generación de productos secundarios tóxicos (Agarwal *et al.*, 2017). En este sentido, permiten una síntesis eficiente debido a su selectividad (Trost, 1991). Estos polifenoles se pueden extraer fácilmente de las plantas solubilizándolos en disolventes polares, como alcoholes o agua (Prado *et al.*, 2021). Sin embargo, es importante controlar los parámetros de extracción (es decir, temperatura, tiempo, concentración, etc.) para optimizar la cantidad de grupos polifenoles extraídos y su actividad antioxidante, lo que determinará su capacidad para reducir los precursores para obtener las nanopartículas (Pietrzak *et al.*, 2014; Özbek *et al.*, 2020).

Dada la importancia y beneficios potenciales que parece tener el uso de nanopartículas en horticultura, se planteó como objetivo de este capítulo la síntesis de nanopartículas de ZnO, usando agentes reductores químicos y naturales (polifenoles) mediante el método de precipitación coloidal. Además, la extracción de estos polifenoles a partir del pimiento también se optimizó. Finalmente, las nanopartículas se incorporaron en las matrices de liberación controlada optimizadas en capítulos anteriores con la intención de generar un sistema más especializado y eficaz.

7.2 Materiales y métodos

Las nanopartículas evaluadas en este capítulo se sintetizaron utilizando cloruro de zinc (ZnCl_2) como precursor. Como agente reductor se utilizó hidróxido sódico (NaOH , método químico) o un extracto de pimienta rico en polifenoles (método verde). Una descripción más detallada de estas materias primas se puede obtener en la sección 2.1.4 del Capítulo 2.

La extracción de polifenoles de los pimientos se realizó siguiendo el protocolo descrito en la sección 2.3.1 del Capítulo 2. Además, la calidad de los polifenoles se evaluó a partir del contenido total de polifenoles (sección 2.4.1) y la actividad antioxidante (sección 2.4.2) de los diferentes extractos obtenidos, obteniendo modelos matemáticos para modular su comportamiento (sección 2.4.1).

Por otro lado, las nanopartículas fueron sintetizadas mediante el método coloidal, tanto para la síntesis química como para la verde. Este método está detallado en la sección 2.3 del Capítulo 2. Las diferentes nanopartículas fueron caracterizadas con las técnicas resumidas en la Tabla 7.1.

Tabla 7.1. Técnicas de caracterización usadas para evaluar las nanopartículas.

Técnica	Sección
DRX	2.4.3
TEM	2.4.4
EDAX	2.4.5
SEM	2.4.6
FTIR	2.4.7

Las nanopartículas fueron incorporadas en diferentes concentraciones (1, 2 y 4,5% en peso) en las matrices bioplásticas compuestas por el

aislado proteico de soja (sección 2.1.1) y glicerina (sección 2.1.2) y procesadas mediante moldeo por inyección (sección 2.5.2), usando diferentes temperaturas de molde (70, 90 y 110 °C). Estas matrices bioplásticas fueron caracterizadas con las técnicas resumidas en la Tabla 7.2.

Tabla 7.2. Técnicas de caracterización usadas para evaluar las matrices bioplásticas.

Técnica	Sección
Propiedades mecánicas	2.6.4
Capacidad de absorción de agua	2.6.6
Liberación del micronutriente en agua	2.8.4.2
Biodegradabilidad	2.8.5

Finalmente, matrices con la concentración de nanopartículas y la temperatura de molde seleccionadas fueron elaboradas a partir del método A (sección 2.7.1) usando etanol como medio de extracción, ya que fue el método óptimo que se obtuvo en el Capítulo 5. En este sentido, se compararon las matrices con $ZnSO_4 \cdot H_2O$, nanopartículas de ZnO químicas y nanopartículas de ZnO verdes incorporadas. Las matrices elaboradas en este capítulo fueron caracterizadas utilizando las técnicas resumidas en la Tabla 7.3.

Tabla 7.3. Técnicas de caracterización usadas para evaluar las matrices.

Técnica	Sección
Propiedades mecánicas	2.8.2
Capacidad de absorción de agua	2.8.4.3
Liberación del micronutriente	2.8.4.2
Biodegradabilidad	2.8.5
Evaluación en cultivos	2.8.6

7.3 Resultados y discusión

7.3.1 Optimización de la extracción de polifenoles del pimiento

7.3.1.1 Efecto de la temperatura y tiempo de mezclado

Se optimizó la extracción de polifenoles del pimiento estableciendo la mejor combinación de temperaturas y tiempos de extracción. En cuanto al disolvente de extracción, se seleccionó metanol en base a los buenos resultados demostrados en trabajos previos para la extracción de polifenoles (Nurhanan y Wan Rosli, 2012; Vijayalaxmi *et al.*, 2015; Ferchichia *et al.*, 2021). La relación pimiento:metanol se estableció en 1:1 con 100 g de pimiento y 100 mL de metanol.

La Tabla 7.4 muestra que, por lo general, cuanto mayor fue la temperatura de mezclado, mayor es el contenido total de polifenoles (TPC) en los extractos, aunque la temperatura de 35 °C parece tener el mejor comportamiento. Este efecto también se observó para el tiempo de extracción, aunque en menor medida. Estos resultados indican una posible interacción entre el sustrato (pimiento) y el disolvente (metanol), favorecida a altas temperaturas y tiempos de extracción más prolongados. Sin embargo, la AA no mostró un comportamiento similar, ya que la mayor AA se logró a 50 °C, seguida de 20 °C. Además, un aumento en el tiempo de extracción mejoró la AA de los extractos a 20 y 35 °C, pero la empeoró a 50 °C. Esta observación puede explicarse considerando que si bien temperaturas más altas (50 °C) pueden favorecer el proceso de extracción, la exposición prolongada de los polifenoles a esas temperaturas altera su estructura (Spigno *et al.*, 2007; Casagrande *et al.*, 2018).

Tabla 7.4. Contenido total de polifenoles (TPC) y actividad antioxidante (AA) de los extractos obtenidos utilizando diferentes temperaturas y tiempo de extracción. Se utilizaron códigos para modelar los parámetros (-1: valor mínimo; 1: valor máximo). Las diferentes letras usadas como superíndice en las distintas columnas evidencian diferencias significativas ($p < 0,05$).

Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Código temperatura	Código tiempo	TPC (mg GAE/ml extracto)	AA (mg GAE/ml extracto)
20	15	-1	-1	239,7 ^a	11951,3 ^A
	30	-1	0	260,2 ^b	12768,0 ^{AB} _E
	45	-1	1	262,0 ^b	12391,3 ^B
35	15	0	-1	269,3 ^{ac}	9321,3 ^C
	30	0	0	267,9 ^{ac}	9304,7 ^C
	45	0	1	290,2 ^c	12011,3 ^{AB} _E
50	15	1	-1	242,9 ^{ab}	16034,7 ^D
	30	1	0	275,6 ^c	13841,3 ^E
	45	1	1	256,5 ^{ab}	12114,7 ^{AB}

Se utilizaron modelos cuadráticos para predecir tanto el TPC como las respuestas de la AA (Ecuación 1 y 2 y Tabla 7.5) teniendo en cuenta las temperaturas (A) y los tiempos (B) empleados y evitando los términos que no fueran significativos (factor estadístico $F > 50$ y nivel de confianza menor al 95% ($p > 0,05$)).

$$\text{TPC} = 275,8 + 1,5 \cdot A + 8,8 \cdot B - 18,9 \cdot A^2 \quad (1)$$

$$\text{AA} = 10212,4 + 813,3 \cdot A - 131,7 \cdot B - 1090,0 \cdot A \cdot B + 2971,1 \cdot A^2 \quad (2)$$

Tabla 7.5. Exponentes del modelo obtenido para el contenido total de polifenoles (TPC) y la actividad antioxidante (AA) de los extractos obtenidos a diferentes temperaturas (A) y tiempo (B) de mezclado.

Modelo Término independiente	TPC			AA		
	Exponente	F	p	Exponente	F	p
	-	4,20	0,0258	-	8,50	0,0013
	275,8	-	-	10212,4	-	-
A	1,5	0,14	0,7113	813,3	5,10	0,0418
B	8,8	4,88	0,0443	-131,7	0,13	0,7207
A·B	-	-	-	-1090,0	6,10	0,0281
A ²	-18,9	7,57	0,0156	2971,1	22,66	0,0004
Falta de ajuste	-	1,44	0,2982	-	1,44	0,0537

Los resultados se presentan en la Figura 7.1. Los gráficos de superficie de respuesta indican que el tiempo de extracción no tuvo una influencia significativa en el TPC, siendo incluido solo por la convergencia del modelo. Sin embargo, la falta de ajuste y el valor de error puro (el modelo presenta un valor de F cercano a 4 y/o $p < 0,05$) indican la buena reproducibilidad de los resultados experimentales (Tabla 7.5).

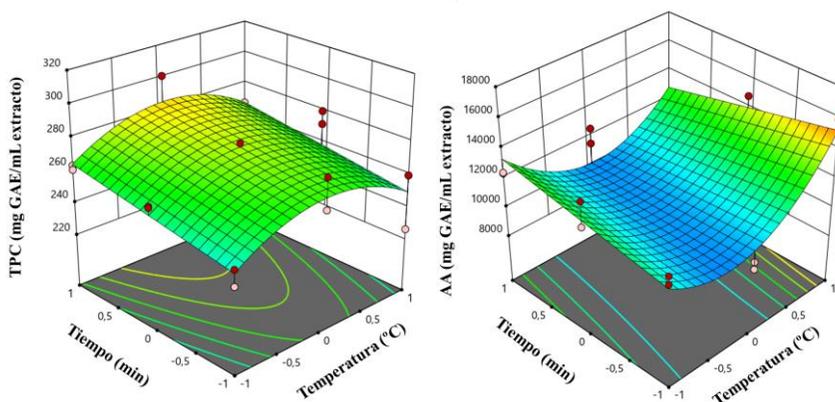


Figura 7.1. Superficie de respuesta del contenido total de polifenoles (TPC) y la actividad antioxidante (AA) de los extractos obtenidos a diferentes temperaturas y tiempos de extracción. Las temperaturas y los tiempos se codifican de -1 a 1 siendo los valores mínimo (20 °C y 15 min) y máximo (50 °C y 45 min), respectivamente.

Por otro lado, el tiempo de extracción afectó en mayor medida la AA de los extractos, creando así un efecto antagónico con la temperatura de mezclado. Por otro lado, los modelos cuadráticos mostraron efectos opuestos de tiempo y temperatura sobre el TPC y la AA. En otras palabras, los valores más altos de TPC se lograron para las actividades antioxidantes más bajas. Esto podría deberse a que el método utilizado para medir TPC no discrimina entre polifenoles funcionales (que tienen AA) y polifenoles no funcionales. Por tanto, no se puede concluir por este método que a mayor presencia de polifenoles corresponda una mayor calidad del extracto obtenido, lo que hace necesario determinar su AA. Resultados similares se obtuvieron en estudios anteriores (Favre *et al.*, 2020).

Los parámetros fueron optimizados para maximizar el TPC y AA, ya que interesan extractos con gran cantidad de polifenoles para ser usados como agentes reductores en la síntesis de nanopartículas. No obstante, estos polifenoles no influyen en la síntesis si no tienen AA. De esta forma y tras de optimizar los resultados, los valores de 50 °C y 34,7 min para la temperatura y tiempo de extracción, respectivamente, fueron seleccionados como las condiciones óptimas para maximizar ambas propiedades de los extractos.

7.3.1.2 Efecto de la relación pimienta:metanol

Una vez definidas las condiciones óptimas de extracción (50 °C y 34,7 min), se evaluó la mejor relación pimienta:metanol (Tabla 7.6). En primer lugar, se observó que un aumento en la cantidad de pimienta y metanol (aunque manteniendo la relación sustrato:disolvente) tuvo un efecto negativo tanto en la TPC como en la AA. Esta observación podría explicarse considerando que cuando se emplean mayores cantidades de

sustrato y disolvente, estos no pueden interactuar adecuadamente y, por lo tanto, el proceso de extracción se vuelve menos eficiente. Por otro lado, un aumento en la cantidad de pimiento (50, 100, 200, 400 g) manteniendo el volumen de metanol (100 mL), condujo a una mejora en la TPC. En cambio, el TPC disminuyó cuando la cantidad de pimiento fue constante (100 g) y el volumen de metanol se incrementó (50, 100, 200, 400 mL). En ambos casos, la AA no pareció alterarse significativamente. De esta forma, se puede predecir que el metanol tiene una gran capacidad para extraer polifenoles del pimiento siempre que exista una buena interacción entre el pimiento y el metanol. Por lo tanto, mayores cantidades de metanol no contribuyen a mejorar la extracción de polifenoles. Por el contrario, contribuyen a diluir los extractos obtenidos. Resultados similares se encontraron en la literatura (Galvan d'Alessandro *et al.*, 2012).

Tabla 7.6. Contenido total de polifenoles (TPC) y actividad antioxidante (AA) de los extractos obtenidos utilizando diferentes cantidades de pimiento (P) y metanol (M). Se utilizaron códigos para modelar los parámetros (-1: valor mínimo; 1: valor máximo). Las diferentes letras usadas como superíndice en las distintas columnas evidencian diferencias significativas ($p < 0,05$).

P (g)	M (mL)	Relación	Código P	Código M	TPC (mg GAE/ml extracto)	AA (mg GAE/ml extracto)
50	50	1/1	-1	-1	443,4 ^a	13924,7 ^A
100	100	1/1	-0,71	-0,71	361,3 ^b	13614,7 ^A
200	200	1/1	-0,14	-0,14	316,5 ^b	12324,7 ^B
400	400	1/1	1	1	297,5 ^{bd}	11741,3 ^C
100	50	2/1	-0,71	-1	564,3 ^c	12801,3 ^{DF}
100	200	1/2	-0,71	-0,14	289,7 ^d	12534,7 ^D
100	400	1/4	-0,71	1	131,1 ^e	9578,0 ^E
50	100	1/2	-1	-0,71	308,8 ^{bd}	13088,0 ^F
200	100	2/1	-0,14	-0,71	557,0 ^c	12791,3 ^{DF}
400	100	4/1	1	-0,71	548,8 ^c	12161,3 ^{BD}

Además, en este caso, un modelo cuadrático podría predecir la respuesta de TPC (Ecuación 3). Sin embargo, la AA debe describirse con un modelo de interacción de dos factores (2FI, Ecuación 4). Ambos modelos fueron obtenidos dependiendo de las cantidades de pimienta (P) y metanol (M) utilizadas Tabla 7.7. Nuevamente, la falta de ajuste y el valor de error puro indicaron la buena reproducibilidad de los resultados experimentales.

$$\text{TPC} = 344,3 + 115,8 \cdot P - 197,5 \cdot M - 115,1 \cdot P^2 + 139,1 \cdot M^2 \quad (3)$$

$$\text{AA} = 11864,4 + 172,4 \cdot P - 1170,1 \cdot M + 911,9 \cdot P \cdot M \quad (4)$$

Tabla 7.7. Exponentes del modelo obtenido para el contenido total de polifenoles (TPC) y la actividad antioxidante (AA) de los extractos obtenidos utilizando diferentes cantidades de pimienta (P) y metanol (M).

Modelo Término independiente	TPC			AA		
	Exponente	F	p	Exponente	F	p
	-	64,86	<0,0001	-	24,67	<0,0001
	344,3	-	-	11864,4	-	-
P	115,8	83,24	<0,0001	172,4	0,8622	0,3678
M	-197,5	242,39	<0,0001	-1170,1	39,70	<0,0001
P·M	-	-	-	911,9	18,15	0,0007
P²	-115,1	19,36	0,0006	-	-	-
M²	139,1	28,25	0,0001	-	-	-
Falta de ajuste	-	8,39	0,0533	-	1,96	0,1741

La superficie de respuesta generada por estos modelos se muestra en la Figura 7.2. El TPC se vio afectado cuadráticamente por la cantidad de pimienta y el volumen de metanol en la misma medida (exponentes similares), aunque no se encontraron interacciones significativas entre ellos. Por el contrario, estas variables afectaron linealmente la AA, siendo el efecto del metanol el más influyente (mayor exponente). Además, se observó un fuerte efecto sinérgico entre ambas variables. La

optimización de estas variables independientes para obtener la máxima TPC y AA con la menor cantidad de pimienta y metanol posible se logró con 89,1 g de pimienta y 50 mL de metanol (relación pimienta:metanol 1,8:1).

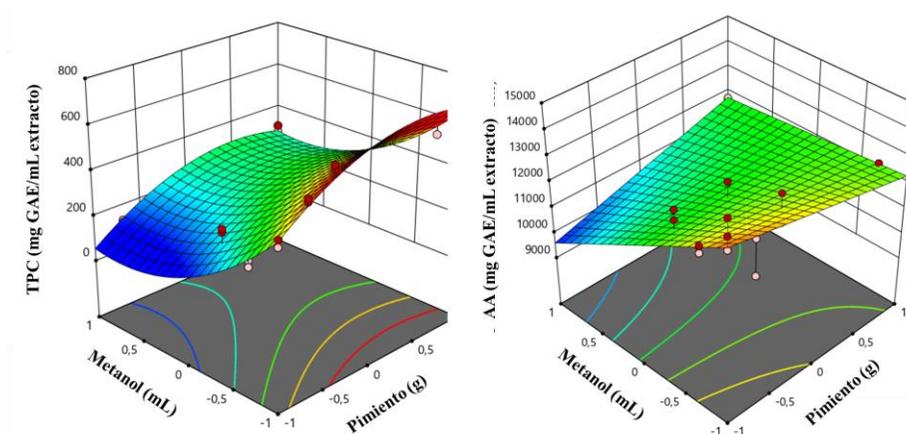


Figura 7.2. Superficie de respuesta del contenido total de polifenoles (TPC) y la actividad antioxidante (AA) de los extractos obtenidos utilizando diferentes cantidades de pimienta y metanol. Las temperaturas y los tiempos se codifican de -1 a 1 siendo los valores mínimo (50 g pimienta o 50 mL de metanol) y máximo (400 g de pimienta o 400 mL de metanol), respectivamente.

7.3.1.3 Efecto del disolvente de extracción

Aparte del metanol, se evaluaron el agua y etanol como disolventes de extracción. Para ello, se usaron la temperatura y tiempo óptimos de extracción (50 °C y 34,7 min, respectivamente) y una aproximación de las cantidades óptimas de pimienta y disolvente (100 g de pimienta y 50 mL de disolvente; relación pimienta:disolvente 2:1). En la Tabla 7.8 se muestra el TPC y la AA obtenida con los diferentes disolventes de extracción.

Tabla 7.8. Contenido total de polifenoles (TPC) y actividad antioxidante (AA) de los extractos obtenidos utilizando diferentes disolventes. Las diferentes letras usadas como superíndice en las distintas columnas evidencian diferencias significativas ($p < 0,05$).

Disolvente	TPC (mg GAE/mL extracto)	AA (mg GAE/mL extracto)
Metanol	564,7 ^a	12801,3 ^A
Agua	438,4 ^b	13994,7 ^B
Etanol	398,4 ^c	15664,7 ^C

El metanol fue el mejor disolvente para la extracción de polifenoles, ya que permitió el mayor TPC. Este resultado podría deberse a dos efectos. Primero, la mayor polaridad del disolvente mejoró la extracción de polifenoles, como ya fue informado por Do et al. (Do *et al.*, 2014). Por otra parte, todos los grupos polifenólicos tienen una gran solubilidad en disolventes alcohólicos. Esto último podría ser la razón por la cual el agua, aunque tiene mayor polaridad que el metanol, no obtuvo el mejor valor de TPC, ya que los taninos condensados, las ligninas y los ácidos hidroxicinámicos (grupos polifenólicos) no se pueden disolver en agua, lo que reduce los rendimientos de extracción de polifenoles en este disolvente (Haminiuk *et al.*, 2012). En cuanto a la AA, su comportamiento fue opuesto al del TPC, aunque todos los disolventes fueron capaces de extraer polifenoles con alta AA.

7.3.1.4 Efecto de la parte del pimiento empleada en los procesos de extracción

También se analizaron el TPC y la AA de los polifenoles extraídos de diferentes partes del pimiento (entero, pulpa o residuos). Para ello, se utilizó la temperatura y tiempo óptimos de extracción (50 °C y 34,7 min, respectivamente) y cantidades de pimiento y disolvente óptimas (100 g de pimiento y 50 mL de metanol). Los resultados que se muestran en la Tabla 7.9 indican que los desechos de pimiento tenían más contenido de polifenoles que la pulpa de pimiento. Sin embargo, los polifenoles

encontrados en la pulpa tenían mayor AA que los encontrados en los desechos. Esto puede deberse al tiempo que estos polifenoles llevan en la planta, ya que el pedúnculo, las semillas y el pericarpio (parte de desecho) son las primeras partes que se forman en el pimiento (Rylski, 2018).

Tabla 7.9. Contenido total de polifenoles (TPC) y actividad antioxidante (AA) de los extractos obtenidos utilizando diferentes partes del pimiento. Las diferentes letras usadas como superíndice en las distintas columnas evidencian diferencias significativas ($p < 0,05$).

Disolvente	TPC (mg GAE/mL extracto)	AA (mg GAE/mL extracto)
Entero	564,7 ^a	12801,33 ^A
Pulpa	465,64 ^b	14951,33 ^B
Residuos	542,45 ^a	7878,00 ^C

7.3.2 Síntesis de nanopartículas de óxido de zinc: método químico vs. verde

Una vez optimizado el proceso de extracción de polifenoles se sintetizaron nanopartículas de ZnO. Estas nanopartículas se sintetizaron mediante el método químico y el método verde. En esta último, se utilizaron extractos del pimiento entero y de los residuos obtenidos con las condiciones óptimas de extracción (50 °C y 34,7 min de mezclado, 100 g de pimiento/residuos de pimiento y 50 mL de metanol) como agente reductor. Cabe mencionar que el uso de los residuos se seleccionó debido a que, aunque tenga la menor actividad antioxidante, beneficia el modelo de economía circular, dándole un nuevo uso a unos residuos infravalorados.

Por lo general, la síntesis química obtuvo un rendimiento superior (70-85%) que la verde (1-5% en el caso del pimiento entero y 20-40% para los residuos de pimiento) en todos los sistemas evaluados en este

capítulo. Por lo tanto, aún es necesaria una optimización de la síntesis de nanopartículas verdes para aumentar el rendimiento del proceso.

7.3.2.1 DRX

La Figura 7.3 muestra el patrón DRX de todas las nanopartículas sintetizadas a diferentes concentraciones de precursor y relación precursor:agente reductor. Todos los perfiles presentaron los nueve picos característicos ($2\theta = 31,8, 34,5, 36,4, 47,7, 56,7, 62,9, 66,4, 68,0$ y $69,1^\circ$) de zincita hexagonal ZnO (indexada por JCPDS Card No. 01-089-0510) (Jabeen *et al.*, 2014). A su vez, los perfiles de las nanopartículas químicas mostraron otros picos ($2\theta = 29,9$ y $45,5$), que corresponden a impurezas debidas a la presencia de NaOH durante la síntesis. Estas impurezas fueron $\text{NaZnCl}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y $\text{Zn}_2\text{OCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$.

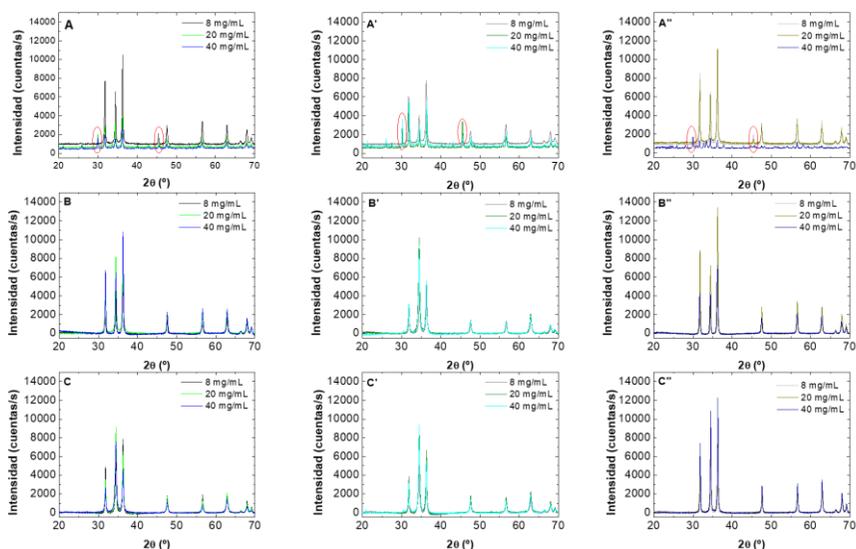


Figura 7.3. Perfiles de DRX de las nanopartículas de ZnO obtenidas usando NaOH (A, A' y A''), polifenoles de pimienta (B, B' y B'') y polifenoles de residuo de pimienta (C, C' y C'') como agentes reductores a diferentes concentraciones de precursor (8, 20 y 40 mg/mL) y relaciones precursor:agente reductor (1:1 (A, B, C), 1:2 (A', B', C') y 2:1 (A'', B'' y C'')). Los óvalos rojos indican los picos de las impurezas $\text{NaZnCl}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y $\text{Zn}_2\text{OCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$.

El porcentaje de ZnO en las nanopartículas sintetizadas químicamente varió según la concentración del precursor (ZnCl_2) (las concentraciones más altas dieron lugar a una menor pureza) y la relación precursor:agente reductor (la relación 2:1 dio lugar a las nanopartículas más puras) (Tabla 7.10). Las nanopartículas verdes sintetizadas a partir de polifenoles no presentaron impurezas. Esto indica una gran ventaja de la síntesis verde frente a la química, ya que permite producir nanopartículas de ZnO puras (100% de pureza en la parte cristalina, que es la que se puede analizar con esta técnica).

Los picos de difracción agudos observados en los perfiles de DRX indican la alta cristalinidad de las nanopartículas. De forma consistente, todas las nanopartículas presentaron un índice de cristalinidad (cantidad cristalina y no amorfa en las muestras) superior al 60%. Sin embargo, no se observaron patrones claros de comportamiento determinados ni por la concentración de ZnCl_2 ni por las proporciones precursor:agente reductor. Con respecto al tamaño del cristal, el método verde condujo a nanopartículas más pequeñas en comparación con el método químico (24–43 y 35–70 nm para nanopartículas verdes y químicas, respectivamente). Tamaños similares fueron reportados previamente (Ahmed *et al.*, 2017) por otros extractos de polifenoles, como *Nephelium lappaceum* L. (25–40 nm), *L. lechenaultiana* (20–65 nm) o *Aloe vera* (25–40 nm). Además, en general, cuanto mayor sea la concentración de ZnCl_2 a la misma proporción de precursor:agente reductor, menor tamaño tendrán las nanopartículas. El tamaño de las nanopartículas es muy importante para la aplicación en horticultura, ya que tienen que ser asimiladas por los poros de las raíces de las plantas, que tienen un diámetro entre 5 y 40 nm (Eichert *et al.*, 2008).

Tabla 7.10. Parámetros de DRX (porcentaje de ZnO, índice de cristalinidad y tamaño de cristal) de las nanopartículas de ZnO obtenidas utilizando NaOH (químicas), polifenoles de pimiento y polifenoles de residuos de pimientos como agentes reductores a diferentes concentraciones de precursor (ZnCl₂) y ratios precursor:agente reductor. Las diferentes letras usadas como superíndice en las distintas columnas evidencian diferencias significativas ($p < 0,05$).

Ratio	Sistemas		Porcentaje de ZnO (%)			Cristalinidad (%)			Tamaño de cristal (nm)		
	ZnCl ₂ (mg/mL)	Agente reductor (mg/mL)	Químicas	Pimiento	Residuo de pimiento	Químicas	Pimiento	Residuo de pimiento	Químicas	Pimiento	Residuo de pimiento
1:1	8	8	86 ^a	100	100	83 ^A	80 ^{AB}	79 ^B	49 ^a	36 ^γ	35 ^{γe}
	20	20	65 ^b	100	100	78 ^B	75 ^{BC}	78 ^B	46 ^β	30 ^e	28 ^e
	40	40	55 ^c	100	100	77 ^B	70 ^C	76 ^{BC}	37 ^γ	28 ^{αg}	24 ^z
1:2	8	16	88 ^a	100	100	78 ^B	69 ^{CD}	61 ^F	35 ^{γe}	29 ^{αg}	40 ^γ
	20	40	48 ^d	100	100	77 ^B	70 ^C	73 ^C	48 ^{αβ}	25 ^z	33 ^e
	40	80	36 ^e	100	100	77 ^B	71 ^C	77 ^B	52 ^a	26 ^z	27 ^e
2:1	8	4	87 ^a	100	100	77 ^B	67 ^D	66 ^D	70 ^δ	38 ^γ	43 ^γ
	20	10	93 ^f	100	100	81 ^A	77 ^B	79 ^B	51 ^a	36 ^γ	35 ^{γe}
	40	20	37 ^e	100	100	80 ^{AB}	89 ^E	82 ^A	47 ^{αβ}	30 ^e	32 ^e

7.3.2.2 TEM y EDAX

Se seleccionaron las nanopartículas químicas sintetizadas con una relación 1:2 de precursor:agente reductor y con una concentración de precursor de 8 mg/mL; así como aquellas sintetizadas por el método verde (tanto con el pimiento entero y los residuos de pimiento) con una relación 1:1 de precursor:agente reductor y una concentración de precursor de 8 mg/mL. Esta selección se realizó por su tamaño de cristal (cercano a 35 nm), siendo este el tamaño óptimo para su incorporación en cultivos (Eichert *et al.*, 2008). La microestructura de estas nanopartículas se muestra en la Figura 7.4 (A, B y C para nanopartículas químicas, de pimiento y de residuos de pimiento, respectivamente) así como su distribución de tamaño (A', B' y C' para las nanopartículas químicas, de pimiento y residuos de pimiento, respectivamente).

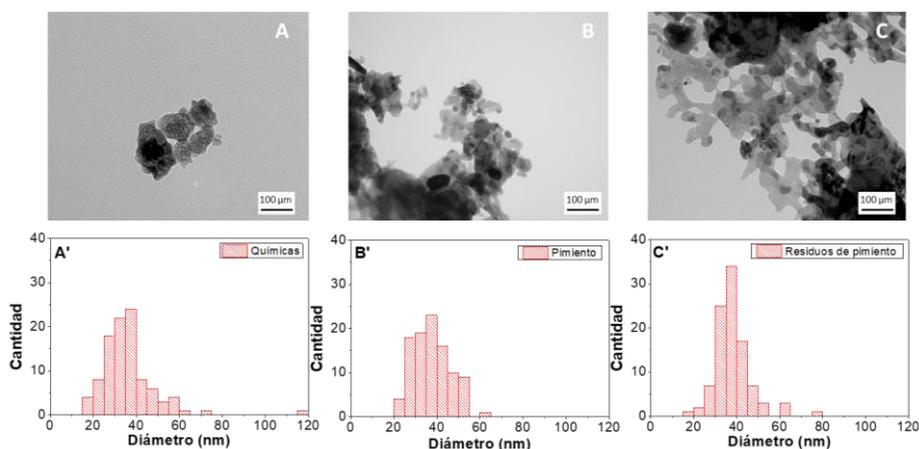


Figura 7.4. Imágenes TEM y distribución de tamaño de las nanopartículas de ZnO obtenidas usando NaOH (A y A'), polifenoles de pimiento (B y B') y polifenoles de residuos de pimiento (C y C') como agentes reductores.

Las nanopartículas obtenidas químicamente tenían una estructura más esférica que las verdes. Además, aunque el tamaño medio de las nanopartículas fue similar en los tres casos (35 nm, en consonancia con los tamaños obtenidos por DRX), la distribución de tamaños fue más

heterogénea para las nanopartículas obtenidas químicamente que para las verdes.

Por otro lado, los análisis de EDAX muestran que todas las nanopartículas presentan cierta contaminación superficial (5, 1 y 3% atómico para nanopartículas químicas, pimienta y residuos de pimienta, respectivamente). Estos pueden ser asignados a residuos de Cl (presentes en el precursor de la síntesis) y polifenoles (agente reductor en la síntesis verde de nanopartículas), quienes presentan picos a la misma energía. Así, todas las nanopartículas tienen más del 90% atómico de pureza (eliminando la contaminación superficial), siendo más puras las verdes (99 y 97% de pureza en las nanopartículas de pimienta y de residuos de pimienta, respectivamente, vs. 95% de pureza en las químicas). Como estos compuestos son generalmente amorfos, no pudieron identificarse correctamente por DRX, correspondiendo a la parte no cristalina identificada en la Tabla 7.10.

7.3.2.3 SEM

Las imágenes SEM de las diferentes nanopartículas se muestran en la Figura 7.5. El análisis de estas imágenes afirma la distribución del tamaño de nanopartículas observada por TEM. Además, también se pudo observar la formación de agregados formados por estas nanopartículas. Aunque todas las nanopartículas formaron agregados, las más pequeñas fueron de las nanopartículas obtenidas de pimienta entera ($13 \pm 7 \mu\text{m}$) y, las de mayor tamaño, fueron las nanopartículas obtenidas de desecho de pimienta ($33 \pm 8 \mu\text{m}$). La formación de aglomerados de tamaño similar también fue reportada en trabajos previos (Benitez-Salazar *et al.*, 2021). Estos resultados podrían deberse a la menor actividad antioxidante de los extractos de polifenoles de desecho de pimienta, que inhiben en menor

medida la tensión superficial de las nanopartículas que los obtenidos del pimientero entero. Por su parte, las nanopartículas obtenidas químicamente mostraron una agregación media ($22 \pm 20 \mu\text{m}$), aunque con gran dispersión, posiblemente debido a las impurezas presentes en su composición. Por tanto, se puede concluir que la presencia de las estructuras complejas de los polifenoles contribuye a la funcionalización de las nanopartículas, lo que evitaría la agregación. No obstante, los polifenoles deberían conservar su actividad antioxidante (es decir, no degradarse) para poder transmitir dicha propiedad a las nanopartículas obtenidas.

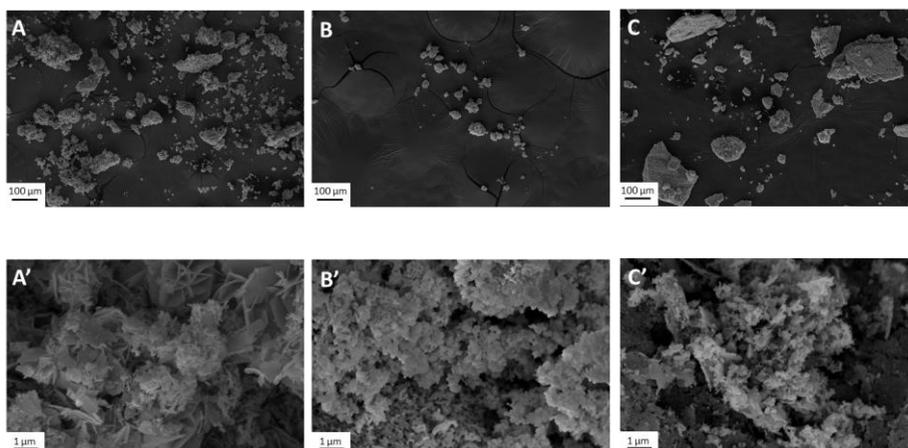


Figura 7.5. Imágenes SEM de las nanopartículas de ZnO obtenidas usando NaOH (A y A'), polifenoles de pimientero (B y B') y polifenoles de residuos de pimientero (C y C') como agentes reductores.

7.3.2.4 FITR

La Figura 7.6 muestra el perfil FTIR de las nanopartículas seleccionadas. Todas las muestras presentaron los dos picos característicos de las nanopartículas de ZnO (Xiong *et al.*, 2006; Sharmila *et al.*, 2019): uno a 505 cm^{-1} , asociado al complejo defecto de vacancia de oxígeno (complejo V_{O}) en ZnO, y el otro, a 437 cm^{-1} , correspondiente a la vibración de flexión del enlace Zn-O ($\delta\text{Zn-O}$),

siendo más pronunciado en las nanopartículas verdes. La presencia de estas últimas bandas demuestra que las nanopartículas de ZnO se han sintetizado con éxito.

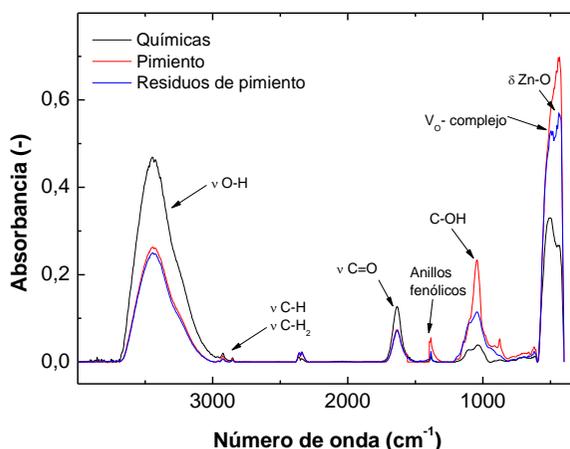


Figura 7.6. Perfiles FTIR de las nanopartículas de ZnO obtenidas usando NaOH, polifenoles de pimiento y polifenoles de residuos de pimiento como agentes reductores.

Además de estas dos bandas, también se observaron otros picos de absorción que pueden atribuirse a modos vibratorios asociados a los polifenoles o a las impurezas que quedan en la síntesis química, que ya se observaron en el análisis de EDAX. La banda a 3400 cm^{-1} se puede atribuir al estiramiento de los grupos OH (νOH) presentes en el extracto de polifenoles y NaOH (Shigesato *et al.*, 1988). Las bandas débiles a 2900 y 2850 cm^{-1} surgen de las vibraciones de estiramiento de los grupos CH_2 y CH (νCH_2 ; νCH de anillos aromáticos en polifenoles), presentes en todos los compuestos orgánicos, incluidos los polifenoles (Sivam *et al.*, 2012). La banda en 1625 cm^{-1} se puede atribuir a la vibración de estiramiento de los grupos carbonilo ($\nu\text{C}=\text{O}$), lo que podría corresponder a los polisacáridos presentes en los pimientos que han pasado al extracto (Janaki *et al.*, 2015), y también a la humedad presente en las muestras. A su vez, las bandas a 1384 cm^{-1} surgen de grupos

fenólicos que quedaron en las nanopartículas (Scano, 2021). Finalmente, la banda a 1039 cm^{-1} se puede atribuir a la flexión C–OH (δCOH) de alcoholes aromáticos, secundarios y terciarios, es decir, grupos OH unidos a los grupos fenólicos y carbohidratos que también pueden haber sido extraídos (Scano, 2021). Como se mencionó anteriormente, estos compuestos son generalmente amorfos, por lo que no pudieron ser identificados correctamente por DRX, correspondiendo a la parte no cristalina reportada en la Tabla 7.10.

7.3.3 Incorporación de nanopartículas de ZnO a matrices bioplásticas

Tras sintetizar las nanopartículas, estas fueron introducidas en las matrices bioplásticas de SPI/Gly para utilizarse como fertilizantes en los sistemas de liberación controlada. En este sentido, se evaluó, en primer lugar, la concentración de nanopartículas incorporadas (1,0, 2,0 y 4,5% en peso) y la temperatura de moldeo utilizada (70, 90 y 110 °C). Para ello, se seleccionaron las nanopartículas químicas sintetizadas con una relación 1:2 de precursor:agente reductor y con una concentración de precursor de 8 mg/mL. Esta selección se realizó porque estas nanopartículas tienen un tamaño de partícula óptimo para su incorporación en cultivos (35 nm), así como por su rendimiento, que fue mayor que el de las nanopartículas verdes.

7.3.3.1 Propiedades mecánicas

Ensayos dinámicos de flexión

La Figura 7.7 muestra los perfiles de flexión de las diferentes matrices bioplásticas. Todos los sistemas tienen perfiles similares en módulo elástico (E') y viscoso (E''), independientemente de la carga de

micronutrientes y la temperatura del molde utilizada. De esta forma, ambos módulos aumentan con la frecuencia a un ritmo que tiende a hacerse constante a alta frecuencia, dando lugar a una pendiente inferior a 0,19. Este comportamiento puede deberse a una extensión de los enlaces que se recuperan instantáneamente, no saliendo del rango lineal de deformaciones en el intervalo estudiado.

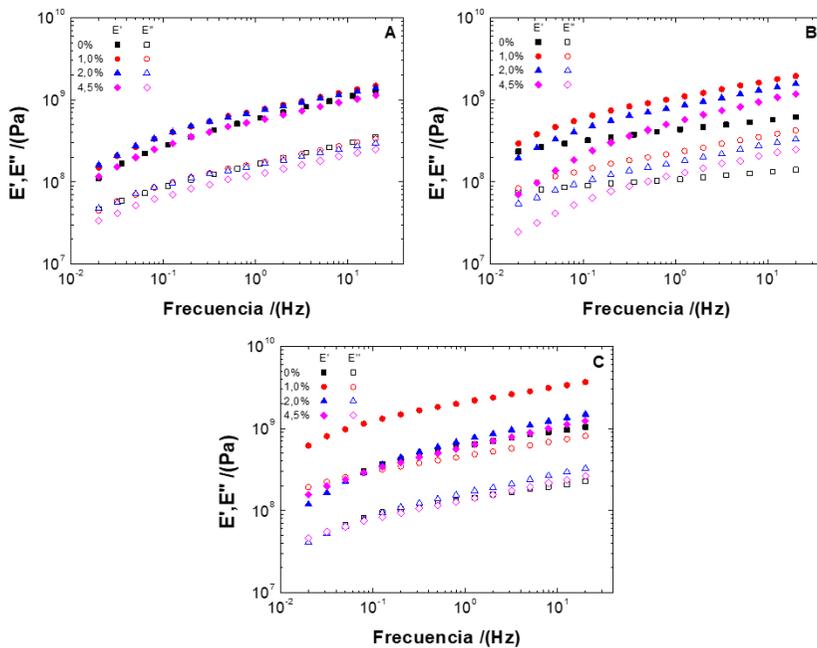


Figura 7.7. Ensayos dinámicos de flexión de las matrices bioplásticas en función de la concentración de nanopartículas de ZnO procesadas a diferentes temperaturas de molde. A: 70°C. B: 90 °C. C: 110 °C.

Una mejor comparación de los sistemas puede observarse en la Tabla 7.11. El efecto del contenido de nanopartículas sobre el módulo elástico depende de la temperatura del molde. Entre las diferentes temperaturas de molde utilizadas, a 70 °C las concentraciones de 1-2% de ZnO mostraron una mayor deformación crítica y módulo elástico, que disminuyeron al aumentar la concentración al 4,5%. Esta diferencia fue más notable cuando la temperatura del molde utilizada fue de 90 °C y

110 °C. En este sentido, una baja carga de micronutrientes (1,0 y 2,0% en peso) incrementó los valores de E' y ϵ_{crit} mientras que cargas más altas (4,5% en peso) lo redujeron. A estas temperaturas, la incorporación de nanopartículas de ZnO también induce un aumento en la dependencia de la frecuencia, que es más evidente a 90 °C. La mejora con la carga de micronutrientes podría atribuirse a la interacción entre las nanopartículas y las cadenas proteicas que contribuye a un reforzamiento de las matrices bioplásticas (Ramesan *et al.*, 2018; Amjadi *et al.*, 2019). Estas interacciones y por ende el reforzamiento de la matriz se hacen más importantes al aumentar la temperatura de procesado, mejorando las propiedades mecánicas de los bioplástico. No obstante, independientemente de la temperatura de moldeo, existe un límite de concentración de nanopartículas a partir del cual se produce el efecto contrario de debilitamiento estructural de la matriz. Es decir, un exceso de nanopartículas puede llegar a interferir en las interacciones entre cadenas proteicas reduciendo la consistencia del entramado. Así, en la Tabla 7.11, se aprecia una reducción de E' (y de ϵ_{crit}) al aumentar la concentración de nanopartículas (a 4,5% y 70°C o a partir de 2% y 90-110°C). Se debe tener en cuenta que un mayor contenido de nanopartículas implica también una reducción del contenido proteico disponible que puede perjudicar el desarrollo de la red proteica. Comportamientos similares ya han sido observados en estudios previos, donde los materiales de relleno mejoraron las propiedades mecánicas hasta una cierta concentración, reduciéndolas a concentraciones más altas (Saenghirunwattana *et al.*, 2014; Fu *et al.*, 2020).

Tabla 7.11. Parámetros de flexión de las diferentes matrices bioplásticas con nanopartículas (NPs) de ZnO incorporadas y procesadas a diferentes temperaturas de moldeo. Las diferentes letras usadas como superíndice en las distintas columnas evidencian diferencias significativas ($p < 0,05$).

Temperatura (°C)	NPs (% en peso)	ϵ_{crit} (%)	E'_1 (MPa)	$\tan \delta_1$ (-)
70	0	$0,55 \pm 0,01^a$	435 ± 20^A	$0,28 \pm 0,05^I$
	1,0	$0,78 \pm 0,01^b$	744 ± 35^B	$0,23 \pm 0,01^{II}$
	2,0	$1,00 \pm 0,01^c$	759 ± 15^B	$0,23 \pm 0,02^{II}$
	4,5	$0,55 \pm 0,02^a$	585 ± 30^A	$0,22 \pm 0,03^{II}$
90	0	$1,07 \pm 0,02^d$	624 ± 21^{AG}	$0,27 \pm 0,02^I$
	1,0	$1,10 \pm 0,03^d$	1105 ± 13^D	$0,21 \pm 0,01^{II}$
	2,0	$1,41 \pm 0,03^e$	863 ± 30^E	$0,21 \pm 0,02^{II}$
	4,5	$1,06 \pm 0,02^d$	573 ± 20^A	$0,23 \pm 0,02^{II}$
110	0	$1,12 \pm 0,02^d$	561 ± 12^A	$0,25 \pm 0,02^{I,II}$
	1,0	$1,21 \pm 0,01^f$	1989 ± 103^F	$0,07 \pm 0,01^{III}$
	2,0	$1,41 \pm 0,02^e$	680 ± 27^G	$0,26 \pm 0,02^{II}$
	4,5	$1,13 \pm 0,03^d$	583 ± 11^A	$0,24 \pm 0,03^{I,II}$

En cuanto a $\tan \delta$, todos los sistemas presentaron valores similares, entre 0,2 y 0,35. Esto indica que todos los bioplásticos tenían un fuerte carácter sólido que se mejoraba con la incorporación de nanopartículas o con el aumento de la temperatura. Este comportamiento es característico en bioplásticos basados en proteínas, encontrándose en otros trabajos. Así, Yue et al. (2012) también encontraron este comportamiento en la proteína de semilla de algodón (Yue *et al.*, 2012); los bioplásticos procesados por Perez et al. (2016) a base de proteína de guisante muestran también este carácter sólido (Perez *et al.*, 2016); y Gómez-Heincke et al. (2017) obtuvieron resultados similares con proteínas de gluten de arroz, patata y trigo (Gómez-Heincke *et al.*, 2017).

Ensayos estáticos de tracción hasta la rotura

En la Tabla 7.12 se muestran las propiedades de tracción de las diferentes matrices bioplásticas. En primer lugar, el esfuerzo máximo (σ_{\max}) aumentó cuando se aplicaron temperaturas más altas, siendo más notable cuando se partió de valores más bajos de esfuerzo (0 y 4,5% en peso de nanopartículas). Además, el 1,0 y 2,0 % en peso de nanopartículas aumentaron el esfuerzo máximo a la misma temperatura, mientras que el 4,5% lo redujo. Esta evolución confirma la existencia de algún efecto perjudicial sobre el desarrollo de la red proteica provocado por un exceso de nanopartículas. Este comportamiento es similar al obtenido con las propiedades viscoelásticas lineales en flexión, aunque para este parámetro solo es significativo a la temperatura más baja, lo que indica que hay un esfuerzo máximo a partir del cual el sistema no mejora.

Tabla 7.12. Parámetros de tracción de las diferentes matrices bioplásticas con nanopartículas (NPs) de ZnO incorporadas y procesadas a diferentes temperaturas de moldeo. Las diferentes letras usadas como superíndice en las distintas columnas evidencian diferencias significativas ($p < 0,05$).

Temperatura (°C)	NPs (% en peso)	σ_{\max} (MPa)	E (MPa)	ϵ_{\max} (mm/mm)
70	0	$0,7 \pm 0,2^a$	$7,1 \pm 0,7^A$	$0,43 \pm 0,10^I$
	1,0	$1,3 \pm 0,2^{bc}$	24 ± 2^B	$5,34 \pm 0,05^{II}$
	2,0	$1,1 \pm 0,2^{ab}$	26 ± 2^B	$3,11 \pm 0,21^{III}$
	4,5	$0,6 \pm 0,3^a$	14 ± 4^C	$0,76 \pm 0,32^I$
90	0	$1,4 \pm 0,1^{bc}$	27 ± 4^B	$1,13 \pm 0,14^{IV}$
	1,0	$1,3 \pm 0,1^{bc}$	68 ± 3^D	$5,54 \pm 0,27^{II}$
	2,0	$1,2 \pm 0,2^b$	39 ± 3^E	$5,20 \pm 0,31^{II}$
	4,5	$1,1 \pm 0,2^{ac}$	15 ± 2^C	$3,12 \pm 0,25^{III}$
110	0	$1,5 \pm 0,1^c$	13 ± 4^C	$7,21 \pm 0,32^V$
	1,0	$1,4 \pm 0,1^{bc}$	91 ± 10^F	$8,47 \pm 0,42^{VI}$
	2,0	$1,4 \pm 0,1^{bc}$	30 ± 5^B	$7,93 \pm 0,37^{V,VI}$
	4,5	$1,4 \pm 0,1^{bc}$	16 ± 1^C	$5,64 \pm 0,25^{II}$

La deformación a la rotura (ϵ_{\max}) y el módulo de Young (E) muestran un comportamiento similar al de la tensión máxima, aunque en este caso, el efecto es más significativo para todas las temperaturas, y las nanopartículas al 1,0% en peso mostraron generalmente los valores más altos.

Finalmente, cabe mencionar que todas las matrices bioplásticas que contienen ZnO presentan mejores propiedades mecánicas que las formulados con sulfato de zinc, lo que supone una ventaja para su manipulación (Jiménez-Rosado *et al.*, 2018).

7.3.3.2 Capacidad de absorción de agua

La Figura 7.8 muestra la capacidad de absorción de agua y pérdida de materia soluble de las diferentes matrices bioplásticas. Como se puede observar, el aumento tanto de la temperatura como del porcentaje de nanopartículas de ZnO redujo la capacidad de absorción de agua de las matrices bioplásticas, haciendo que éstas perdieran su capacidad superabsorbente. Este comportamiento podría deberse al menor volumen libre y al mayor entrecruzamiento de los sistemas cuando aumenta la temperatura del molde o el porcentaje de nanopartículas, reduciendo el espacio libre para albergar agua. Además, cabe mencionar que estas matrices bioplásticas mejoran la capacidad de captación de agua generada por los sistemas estudiados en capítulos anteriores (Capítulo 4) con el mismo propósito, donde se incorporaron sales microparticuladas en lugar de nanopartículas, mejorando, en este caso, su funcionalidad.

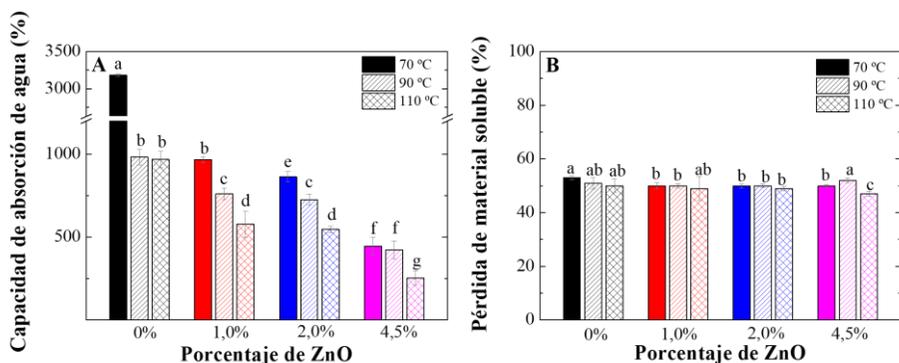


Figura 7.8. Capacidad de absorción de agua (A) y pérdida de material soluble (B) de las matrices bioplásticas con nanopartículas de ZnO procesadas a diferentes temperaturas de molde. Las diferentes letras usadas evidencian diferencias significativas ($p < 0,05$).

En cuanto a la pérdida de materia soluble, no hubo diferencias significativas entre los sistemas. Tan sólo hay una tendencia a disminuir cuando aumenta el contenido de nanopartículas ya que ello implica un ligero descenso en la cantidad de glicerina presente en la matriz. Esto indica que, aunque cambie la estructura, los bioplásticos siempre mantienen su integridad liberando el plastificante incorporado (glicerina) y una mínima parte de la proteína soluble o las nanopartículas incorporadas.

7.3.3.3 Liberación del micronutriente en agua

Las matrices bioplásticas procesadas a una temperatura de molde de 90 °C con diferente concentración de nanopartículas incorporadas se seleccionaron para evaluar su perfil de liberación en agua. Como se puede observar, todos los sistemas presentaron una liberación rápida en tiempos de prueba cortos, probablemente debido a la mayor diferencia de concentraciones entre el sistema y el medio. Esta liberación se estabiliza en el tiempo hasta alcanzar el tiempo máximo de liberación.

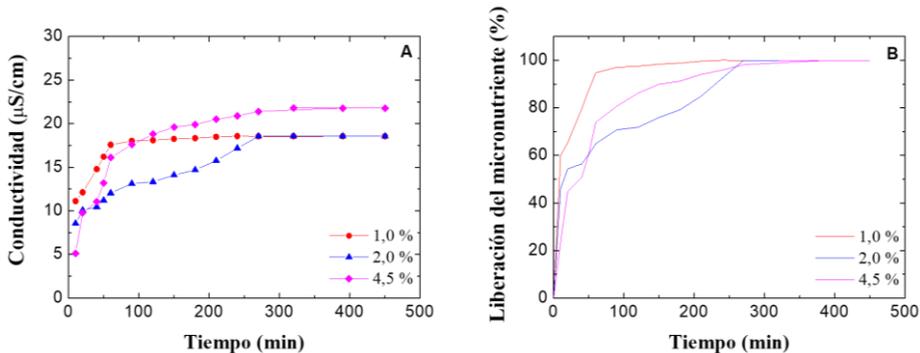


Figura 7.9. Liberación del micronutriente en agua para las matrices bioplásticas con nanopartículas incorporadas y procesadas a 90 °C. A: Conductividad vs. tiempo. B: Porcentaje de liberación vs. tiempo.

En cuanto al tiempo máximo de liberación, a mayor concentración de nanopartículas, más prolongada es la liberación en el tiempo. Esto indica que todas las nanopartículas incorporadas se liberan de forma controlada. Además, este tiempo máximo de liberación es superior al encontrado cuando se utilizan sales microparticuladas (240 min) en lugar de nanopartículas (240-300 min) (Jiménez-Rosado *et al.*, 2020), lo que indica que en esta ocasión se controla mejor la liberación.

Cabe mencionar que la liberación controlada en suelo fue imposible de evaluarla debido a la baja conductividad generada por las nanopartículas, así como su nula solubilidad y pequeño tamaño que hizo que la presencia de las nanopartículas no se detectara en el agua de lixiviado.

7.3.3.4 Biodegradabilidad

Finalmente, en la Tabla 7.13 se indica el tiempo de degradación de cada matriz bioplástica. Como se puede observar, las temperaturas más altas del molde conducen a matrices bioplásticas más duraderas, lo que sin duda está relacionado al mayor desarrollo de la matriz y a las mejores propiedades mecánicas observadas con el aumento de la temperatura. Sin

embargo, la incorporación de nanopartículas en las matrices bioplásticas provocó que esta degradación fuera más rápida, excepto para los sistemas con 1,0% en peso de nanopartículas. Este comportamiento podría deberse a que, cuando se liberan las nanopartículas, existen más huecos libres donde la matriz bioplástica es más susceptible a la degradación, acelerando así este proceso. Este comportamiento ya ha sido informado por Abdullah et al. (2020) (Abdullah *et al.*, 2020). Cabe señalar que, en todos los casos, las matrices bioplásticas se descomponen en sus elementos primarios (principalmente nitrógeno), sirviendo como fertilizante suplementario para el cultivo y no siendo necesario su remoción después de su uso. Además, se podría modificar el tiempo de degradación de las matrices bioplásticas mediante la incorporación de nanopartículas y un cambio de temperatura del molde, haciéndolos muy versátiles, por lo que podrían ser utilizados en todo tipo de cultivos hortícolas.

Tabla 7.13. Tiempo de degradación de las diferentes matrices bioplásticas con nanopartículas (NPs) de ZnO incorporadas y procesadas a diferentes temperaturas de moldeo.

NPs (% en peso)	Tiempo de degradación (días)		
	70 °C	90 °C	110 °C
0	40	60	70
1,0	40	60	70
2,0	20	40	50
4,5	10	20	30

7.3.4 Comparación de matrices con $ZnSO_4 \cdot H_2O$, nanopartículas químicas y nanopartículas verdes

Finalmente, se comparó las matrices elaboradas con 10% en peso $ZnSO_4 \cdot H_2O$ (micropartículas) y 4,5% en peso de nanopartículas de ZnO

obtenidas por el método químico y el verde (usando los extractos ricos en polifenoles obtenidos de los restos de pimienta en las condiciones óptimas). Esta concentración de nanopartículas se seleccionó para igualar la cantidad de zinc incorporado en las matrices con micro y nanopartículas. Todas estas matrices se procesaron con el método A usando etanol como medio de extracción, a partir de matrices bioplásticas moldeadas a 90 °C .

7.3.4.1 Propiedades mecánicas

La Figura 7.10 muestra los perfiles del módulo elástico (E') y viscoso (E'') obtenidos mediante compresión dinámica de las diferentes matrices. Como se puede observar, todas las matrices presentaron un carácter altamente sólido ($E' > E''$). Además, en todos los sistemas el módulo elástico (E') aumenta solo ligeramente con la frecuencia.

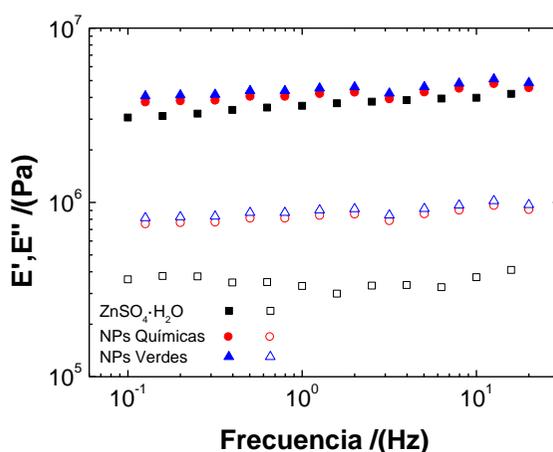


Figura 7.10. Propiedades dinámicas a compresión de las diferentes matrices.

Una mejor comparación de los sistemas puede observarse en la Tabla 7.14. Los sistemas no presentaron diferencias significativas en los valores del módulo elástico (E'_1). No obstante, los sistemas con nanopartículas presentaron una mayor deformación crítica (ϵ_{crit}) y tangente de pérdidas, lo que explica su menor rigidez. Esto puede

deberse al menor volumen de partículas que tienen que ser incorporados en los sistemas con nanopartículas para conseguir la misma concentración de zinc (10 vs. 4,5% para $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y nanopartículas de ZnO , respectivamente).

Tabla 7.14. Parámetros de compresión de las diferentes matrices. Las diferentes letras usadas como superíndice en las distintas columnas evidencian diferencias significativas ($p < 0,05$).

Sistemas	ϵ_{crit} (%)	E'_1 (MPa)	$\tan \delta_1$ (-)
ZnSO₄·H₂O	$0,04 \pm 0,02^a$	$3,6 \pm 0,3^A$	$0,08 \pm 0,02^I$
NPs químicas	$0,07 \pm 0,01^b$	$4,2 \pm 0,5^A$	$0,20 \pm 0,04^{II}$
NPs verdes	$0,07 \pm 0,01^b$	$4,5 \pm 0,5^A$	$0,20 \pm 0,02^{II}$

7.3.4.2 Capacidad de absorción de agua

La Figura 7.15 muestra la capacidad de absorción de agua y pérdida de material soluble de las diferentes matrices tras su inmersión en agua durante 24 h. Como se puede observar, la incorporación de nanopartículas genera una capacidad de absorción de agua más alta que la incorporación de la sal convencional. Esto puede deberse a la diferencia en la fuerza iónica que genera el sulfato con respecto a las nanopartículas en el medio de absorción, ya que estas últimas no son solubles en agua.

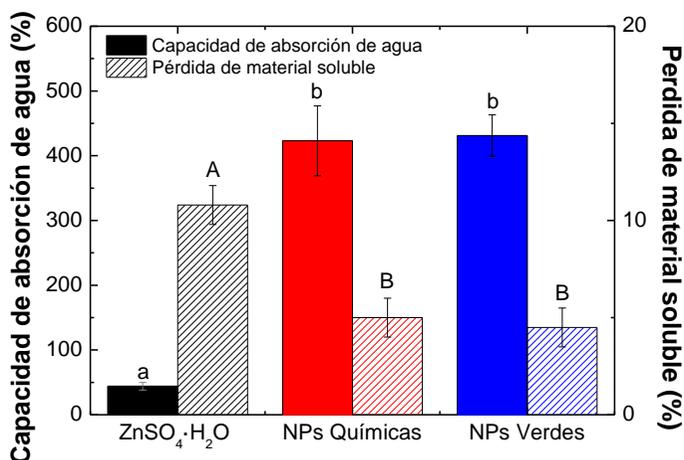


Figura 7.15. Capacidad de absorción de agua y pérdida de material soluble de las diferentes matrices. Las diferentes letras usadas las columnas evidencian diferencias significativas ($p < 0,05$).

En cuanto a la pérdida de material soluble, la matriz con ZnSO₄·H₂O fue la que presentó un mayor valor, seguramente debido a la mayor cantidad de sal presente en la misma (10,8%), mientras que los que tienen nanopartícula presentan una pérdida menor (aproximadamente 4,5%).

7.3.4.3 Liberación del micronutriente

La Figura 7.15 muestra el porcentaje de liberación del micronutriente en agua medido en el medio acuoso a partir de la conductividad generada por los nutrientes liberados. Como se puede observar, la incorporación de nanopartículas hace que el tiempo máximo de liberación sea mayor (320 y 390 min para las nanopartículas químicas y verdes, respectivamente, frente a 240 min para el ZnSO₄·H₂O). Esto puede deberse a la solubilidad de la sal frente a las nanopartículas, como se ha comentado anteriormente.

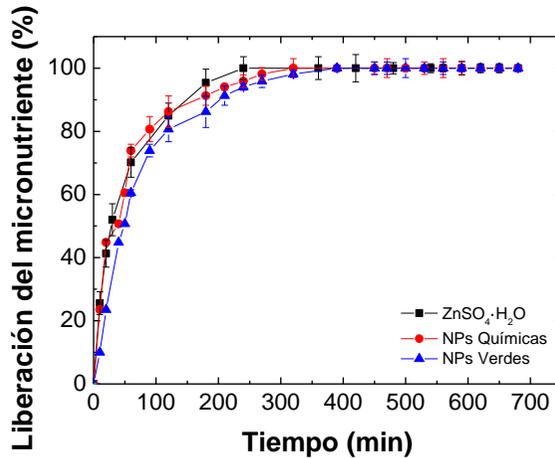


Figura 7.16. Cinética de liberación del micronutriente en agua de las diferentes matrices.

Otro hecho observable es que las nanopartículas verdes tienen una liberación más lenta que las químicas. De esta forma, las matrices con nanopartículas verdes tienen una pendiente de liberación menos pronunciada, aunque su tiempo de liberación no es significativamente diferente. Este comportamiento puede deberse a la superficie más reactiva de las nanopartículas verdes, las cuales aún retienen restos de polifenoles, que ayudan a su interacción con las cadenas proteicas.

En cuanto a la liberación controlada en suelo fue imposible de evaluarla al igual que antes debido a la baja conductividad generada por las nanopartículas, así como su nula solubilidad y pequeño tamaño que hizo que la presencia de las nanopartículas no se detectara en el agua de lixiviado.

7.3.4.4 Biodegradabilidad

La biodegradabilidad de las diferentes matrices fue evaluada visualmente durante su descomposición en el suelo. El aspecto de las matrices tras ser desenterradas a diferentes tiempos puede observarse en la Figura 7.17. Como se puede observar, las matrices con nanopartículas tienen un tiempo de biodegradación menor que las obtenidas con

$ZnSO_4 \cdot H_2O$. Este comportamiento puede deberse a la inestabilidad superficial de las nanopartículas que provoca que la matriz de proteína se degrade más rápidamente (Abdullah *et al.*, 2020). No obstante, se puede observar que las matrices con nanopartículas verdes tienen un tiempo de biodegradación mayor que las nanopartículas químicas. Esto se puede deber a los restos de polifenoles que quedan en las nanopartículas verdes, que interactúan con la matriz permitiéndole una mayor estabilidad.

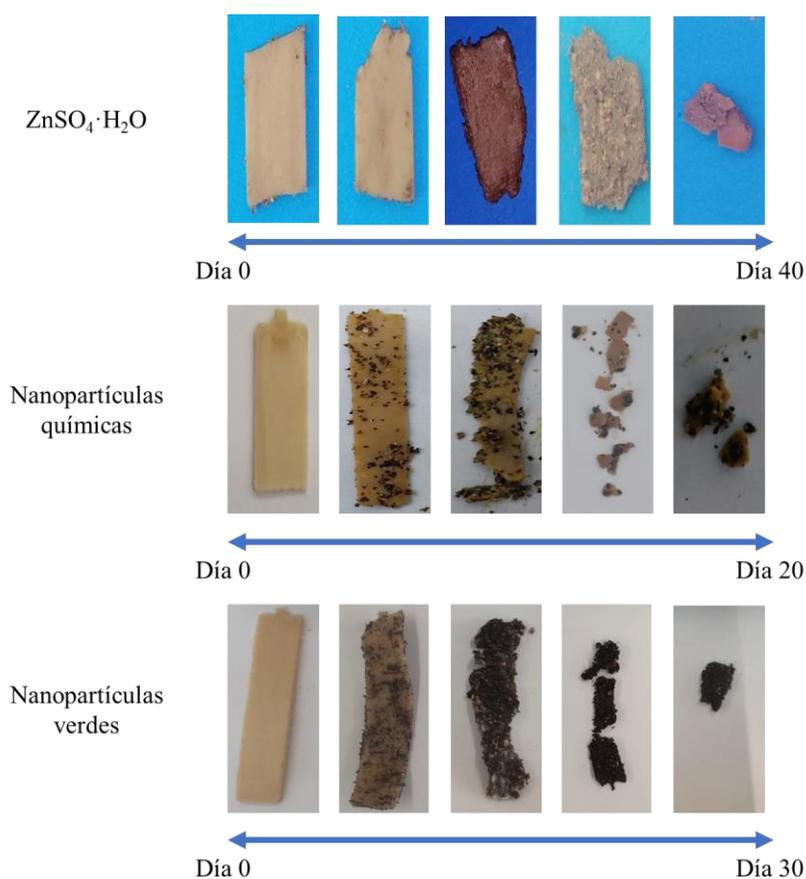


Figura 7.17. Biodegradabilidad de las diferentes matrices.

7.3.4.5 Evaluación en cultivos

Finalmente, la funcionalidad de las matrices para suministrar zinc a los cultivos se evaluó en pimientos. En la Tabla 7.15 se muestran los datos obtenidos en la evaluación de los pimientos tratados con las matrices que contienen $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y nanopartículas de ZnO sintetizadas por método químico y verde. También se incluyó un control positivo (con fertilización convencional) y un control negativo (sin fertilización). Además, en la Figura 7.18 se puede observar el aspecto visual de los diferentes pimientos. Como se puede observar, todas las plantas tratadas con las matrices tuvieron una mejor respuesta que las tratadas mediante fertilización convencional (mayor peso y carga de micronutriente). Además, las plantas asimilaron mejor las nanopartículas que el $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, presentando un mayor contenido de micronutrientes. Este efecto podría deberse al tamaño de las nanopartículas, que pueden ser mejor asimiladas por las raíces de las plantas (Khan *et al.*, 2019). Finalmente, las nanopartículas verdes presentaron un mejor resultado que las químicas. Este efecto puede deberse a la mejor asimilación de las impurezas superficiales que presentan las nanopartículas verdes (polifenoles) que también son beneficiosos para el crecimiento de las plantas (Wang *et al.*, 2020).

Tabla 7.15. Asimilación de micronutrientes (MN) y fisiología del cultivo tras el uso de las diferentes matrices. También se incluyó un control positivo (fertilización convencional) y un control negativo (sin fertilización).

Sistema	Contenido MN (mg/kg)	Peso (g)	Hojas	
			Número	Tamaño (h x w) cm
Control positivo	35,6	63,3 ± 1,4	16 ± 1	15,6 x 10,1
ZNSO ₄ ·H ₂ O	155,3	62,5 ± 5,2	14 ± 1	14,6 x 5,6
NPs Químicas	167,2	77,2 ± 0,7	17 ± 3	16,0 x 9,8
NPs Verdes	170,4	78,0 ± 1,9	19 ± 1	15,9 x 9,6
Control negativo	15,5	8,8 ± 0,5	10 ± 1	13,0 x 4,2

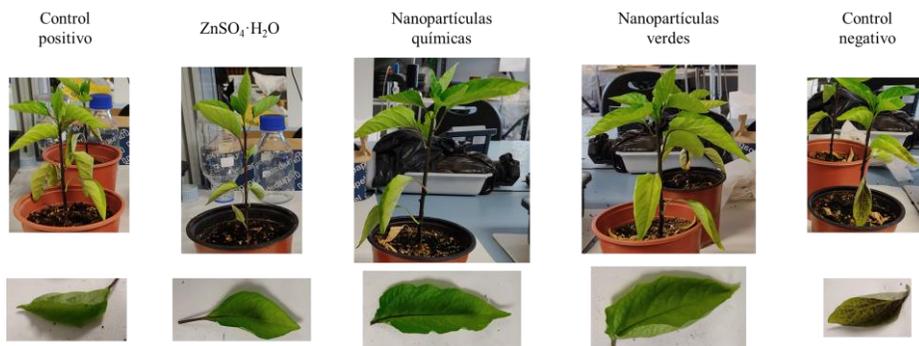


Figura 7.18. Aspecto visual de los pimientos obtenidas tras el tratamiento con las diferentes matrices. También se incluyeron los controles positivo (fertilización convencional) y negativo (sin fertilización).

Por otro lado, la reducción de la necesidad de riego fue mayor en el caso de la incorporación de las nanopartículas (ya sean químicas o verdes) que en el $ZnSO_4 \cdot H_2O$ (50 vs. 33%). Lo que es coherente con la mayor capacidad de absorción de agua de los sistemas con nanopartículas y lo que permite tener un beneficio extra a estos sistemas.

7.4 Conclusiones

Los polifenoles obtenidos de pimiento (*Capsicum annuum*) pueden usarse para la síntesis de nanopartículas, lo que conduce a la producción de nanopartículas más puras y rentables utilizando enfoques sostenibles. Además, el uso de residuos de pimiento como agentes reductores representa una estrategia inteligente para el aprovechamiento de residuos en el contexto de economía circular. Sin embargo, hay algunos aspectos a considerar al sintetizarlos, como el método de extracción de los polifenoles, la concentración de materias primas y la relación precursor:agente reductor utilizado durante la síntesis. De esta forma, la síntesis verde de nanopartículas a partir de extractos de polifenoles de pimiento es un método que genera menos impurezas y sustancias tóxicas que la síntesis química.

Además, estas nanopartículas pueden incorporarse en las matrices bioplásticas en concentraciones óptimas para su uso en horticultura (4,5% en peso). Así, se puede unir dos líneas novedosas y de gran interés en horticultura (sistemas de liberación controlada y nanofertilización), generando interesantes sinergias entre ellas.

Si se comparan las matrices obtenidas incorporando las nanopartículas (tanto químicas como verdes) con aquellas obtenidas con $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, los sistemas con nanopartículas mejoraron la capacidad de absorción de agua y la asimilación del micronutriente por parte del cultivo. Esto supone una mejora del producto, que es más funcional, y un mayor acercamiento a la economía circular al sintetizar los fertilizantes a partir de residuos de pimiento.

7.5 Concluding remarks

Polyphenols obtained from peppers (*Capsicum annuum*) can be used for nanoparticle synthesis, leading to the production of purer and more cost-effective nanoparticles using sustainable approaches. In addition, the use of pepper waste as reducing agents represents a smart strategy for the use of waste in the context of the circular economy. However, there are some aspects to consider when synthesizing them, such as the polyphenol extraction method and the concentration and precursor:reducing agent ratio used during the nanoparticle synthesis. In this way, the green synthesis of nanoparticles from pepper polyphenol extracts is a method that generates fewer impurities and toxic substances than chemical synthesis.

In addition, these nanoparticles can be incorporated into bioplastic matrices in optimal concentrations for use in horticulture (4.5% by weight). Thus, two novel lines of great interest in horticulture (controlled release and nanofertilization systems) can be joined, generating interesting synergies between them.

If the matrices obtained incorporating the nanoparticles (both chemical and green) are compared with those obtained with $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, the systems with nanoparticles improved the water absorption capacity and the assimilation of the micronutrient by the crop. This supposes an improvement of the product, which is more functional, and a greater approach to the circular economy by synthesizing fertilizers from pepper residues.

Agradecimientos

Este capítulo ha sido posible gracias a la estancia de investigación realizada en el Consejo Nacional de Investigaciones Científica y Técnicas (CONICET) y Universidad Nacional de La Plata (UNLP) de La Plata (Argentina) financiada por el Banco Santander en su convocatoria Iberoamérica Investigación 2020/2021. Especialmente, se agradece a la Profesora Andrea Gomez-Zavaglia por tutorizar dicha estancia. También se agradece a los servicios de Microanálisis, Microscopía y Rayos X del Centro de Investigación, Tecnología e Innovación de la Universidad de Sevilla (CITIUS) por su asesoramiento durante los ensayos realizados en sus instalaciones.

Publicaciones relacionadas

Jiménez-Rosado, M., Perez-Puyana, V., Sanchez-Cid, P., Guerrero, A. y Romero, A. (2021). Incorporation of ZnO nanoparticles into soy protein-based bioplastics to improve their functional properties. *Polymers*, 13, 486.

Jiménez-Rosado, M., Gomez-Zavaglia, A., Guerrero, A. y Romero, A. (2022). Green synthesis of ZnO nanoparticles using polyphenol extracts from pepper waste (*Capsicum annuum*). *Journal of Cleaner Production*, 350, 131541.

Referencias

Abdullah, A. H. D., Putri, O. D., Fikriyyah, A. K., Nissa, R. C., Hidayat, S., Septiyanto, R. F., Karina, M. y Satoto, R. (2020) "Harnessing the excellent mechanical, barrier and antimicrobial properties of zinc oxide (ZnO) to improve the performance of starch-based bioplastic", *Polymer-Plastics Technology and Materials*, 59(12), pp. 1259–1267.

Agarwal, H., Venkat Kumar, S. y Rajeshkumar, S. (2017) "A review on green synthesis of zinc oxide nanoparticles – An eco-friendly approach", *Resource-Efficient Technologies*, 3(4), pp. 406–413.

Ahmed, S., Annu, Chaudhry, S. A. y Ikram, S. (2017) "A review on biogenic synthesis of ZnO nanoparticles using plant extracts and microbes: A prospect towards green chemistry", *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 166, pp. 272–284.

Alloway, B. J. (2008) *Micronutrient deficiencies in global crop production*, *Micronutrient Deficiencies in Global Crop Production*. Berlin: Springer.

Almendral, M. J. and Satchi-Fainaro, R. (2019) "Perspectives of nanoscience and nanotechnology in medicine and pharmacy", *FarmaJournal*, 1(4), pp. 46–47.

Amjadi, S., Emaminia, S., Heyat Davudian, S., Pourmohammad, S., Hamishehkar, H. y Roufegarinejad, L. (2019) "Preparation and characterization of gelatin-based nanocomposite containing chitosan nanofiber and ZnO nanoparticles", *Carbohydrate Polymers*, 216, pp. 376–384.

Benitez-Salazar, M. I., Niño-Castaño, V. E., Dueñas-Cuellar, R. A., Caldas-Arias, L., Fernández, I. y Rodríguez-Páez, J. E. (2021) "Chemical synthesis versus green synthesis to obtain ZnO powders: Evaluation of the antibacterial capacity of the nanoparticles obtained by the chemical method", *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(6), p. 106544.

Berardi, G. M. y Geisler, C. C. (2019) *The social consequences and challenges of new agricultural technologies*. Reino Unido: Taylor & Francis.

Casagrande, M., Zanela, J., Wagner, A., Busso, C., Wouk, J., Iurekevicz, G., Montanher, P. F., Yamashita, F. y Malfatti, C. R. M. (2018) "Influence of time, temperature and solvent on the extraction of bioactive compounds of *Baccharis dracunculifolia*: In vitro antioxidant activity, antimicrobial potential, and phenolic compound quantification", *Industrial Crops and Products*, 125, pp. 207–219.

Chen, C. C., Liu, P. y Lu, C. H. (2008) "Synthesis and characterization of nano-sized ZnO powders by direct precipitation method", *Chemical Engineering Journal*, 144(3), pp. 509–513.

Debnath, D. y Gupta, A. K. (2018) "Optimizing the fabrication of nano-plasmonic silver-nitrogen co-doped zinc oxide ($\text{Ag}_x\text{Zn}_{(1-x)}\text{N}_y\text{O}_{(1-y)}$) mediated by ammonia template: Insight into its enhanced physiochemical and photocatalytic behavior", *Journal of Molecular Liquids*, 249, pp. 334–345.

Dissanayake, N. M., Arachchilage, J. S., Samuels, T. A. y Obare, S. O. (2019) "Highly sensitive plasmonic metal nanoparticle-based sensors for the detection of organophosphorus pesticides", *Talanta*, 200, pp. 218–227.

Do, Q. D., Angkawijaya, A. E., Tran-Nguyen, P. L., Huynh, L. H., Soetaredjo, F. E., Ismadji, S. y Ju, Y.-H. (2014) "Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*", *Journal of Food and Drug Analysis*, 22(3), pp. 296–302.

Eichert, T., Kurtz, A., Steiner, U. y Goldbach, H. E. (2008) "Size exclusion limits and lateral heterogeneity of the stomatal foliar uptake pathway for aqueous solutes and water-suspended nanoparticles", *Physiologia Plantarum*, 134(1), pp. 151–160.

Favre, L. C., Rolandelli, G., Mshicileli, N., Vhangani, L. N., dos Santos

Ferreira, C., van Wyk, J. y Buera, M. del P. (2020) "Antioxidant and anti-glycation potential of green pepper (*Piper nigrum*): Optimization of β -cyclodextrin-based extraction by response surface methodology", *Food Chemistry*, 316, p. 126280.

Ferchichia, L., Chohraa, D. y Mellouk, K. (2021) "Total phenolic content, total flavonoid and antioxidant activity of methanolic and ethanolic extract of the flowers of a fruit tree *cydoniablona*: Quince from eastern algeria", *Annals of the Romanian Society for Cell Biology*, 25(7), pp. 1078–1087.

Fu, H., Li, X., Gong, W., Tian, H. y Zhou, H. (2020) "Enhanced electrical and dielectric properties of plasticized soy protein bioplastics through incorporation of nanosized carbon black", *Polymer Composites*, p. pc.25790.

Galvan d'Alessandro, L., Kriaa, K., Nikov, I. y Dimitrov, K. (2012) "Ultrasound assisted extraction of polyphenols from black chokeberry", *Separation and Purification Technology*, 93, pp. 42–47.

Gironi, F. y Piemonte, V. (2011) "Temperature and solvent effects on polyphenol extraction process from chestnut tree wood", *Chemical Engineering Research and Design*, 89(7), pp. 857–862.

Gómez-Heincke, D., Martínez, I., Stading, M., Gallegos, C. y Partal, P. (2017) "Improvement of mechanical and water absorption properties of plant protein based bioplastics", *Food Hydrocolloids*, 73, pp. 21–29.

Haminiuk, C. W. I., Maciel, G. M., Plata-Oviedo, M. S. V. y Peralta, R. M. (2012) "Phenolic compounds in fruits - an overview", *International Journal of Food Science & Technology*, 47(10), pp. 2023–2044.

Jabeen, M., Iqbal, M. A., Kumar, R. V., Ahmed, M. y Javed, M. T. (2014) "Chemical synthesis of zinc oxide nanorods for enhanced hydrogen gas sensing", *Chinese Physics B*, 23(1), p. 018504.

Janaki, A. C., Sailatha, E. y Gunasekaran, S. (2015) "Synthesis,

characteristics and antimicrobial activity of ZnO nanoparticles", *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 144, pp. 17–22.

Jiménez-Rosado, M., Perez-Puyana, V., Cordobés, F., Romero, A. y Guerrero, A. (2018) "Development of soy protein-based matrices containing zinc as micronutrient for horticulture", *Industrial Crops and Products*, 121, pp. 345–351.

Jiménez-Rosado, M., Alonso-González, M., Rubio-Valle, J. F., Perez-Puyana, V. y Romero, A. (2020) "Biodegradable soy protein-based matrices for the controlled release of zinc in horticulture", *Journal of Applied Polymer Science*, p. 49187.

Khan, M. R., Adam, V., Rizvi, T. F., Zhang, B., Ahamad, F., Joško, I., Zhu, Y., Yang, M. y Mao, C. (2019) "Nanoparticle–Plant Interactions: Two-Way Traffic", *Small*, 15(37), p. 1901794.

Konur, O. (2019) "Nanotechnology Applications in Food: A Scientometric Overview", en *Nanoscience for Sustainable Agriculture*. Suiza: Springer International Publishing, pp. 683–711.

Kottegoda, N., Munaweera, I., Madusanka, N. y Karunaratne, V. (2011) "A green slow-release fertilizer composition based on urea-modified hydroxyapatite nanoparticles encapsulated wood", *Current Science*, 101(1), pp. 73–78.

Li, C.-J. (2016) "Reflection and perspective on green chemistry development for chemical synthesis—Daoist insights", *Green Chemistry*, 18(7), pp. 1836–1838.

Li, C.-J. y Trost, B. M. (2008) "Green chemistry for chemical synthesis", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(36), pp. 13197–13202.

Liu, R. y Lal, R. (2015) "Potentials of engineered nanoparticles as fertilizers

for increasing agronomic productions", *Science of the Total Environment*, 514, pp. 131–139.

Manimaran, M. (2015) "A review on nanotechnology and its implications in agriculture and food industry", *Asian Journal of Plant Science and Research*, 5(7), pp. 13–15.

Naderi, M. H. y Danesh-Shahraki, A. (2013) "Nanofertilizers and their roles in sustainable agriculture", *Environmental Science*, 5, pp. 2229–2232.

Nurhanan, R. y Wan Rosli, I. (2012) "Evaluation of Polyphenol Content and Antioxidant Activities of Some Selected Organic and Aqueous Extracts of Cornsilk (*Zea Mays Hairs*)", *Journal of Medical and Bioengineering*, 1(1), pp. 48–51.

Nuruzzaman, M., Rahman, M. M., Liu, Y. y Naidu, R. (2016) "Nanoencapsulation, Nano-guard for Pesticides: A New Window for Safe Application", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(7), pp. 1447–1483.

Özbek, H. N., Halahlih, F., Göğüş, F., Koçak Yanık, D. y Azaizeh, H. (2020) "Pistachio (*Pistacia vera* L.) Hull as a Potential Source of Phenolic Compounds: Evaluation of Ethanol–Water Binary Solvent Extraction on Antioxidant Activity and Phenolic Content of Pistachio Hull Extracts", *Waste and Biomass Valorization*, 11(5), pp. 2101–2110.

Parveen, K., Banse, V. y Ledwani, L. (2016) "Green synthesis of nanoparticles: Their advantages and disadvantages", in *AIP Conference Proceedings*. AIP Conference Proceedings, p. 020048.

Perez, V., Felix, M., Romero, A. y Guerrero, A. (2016) "Characterization of pea protein-based bioplastics processed by injection moulding", *Food and Bioproducts Processing*. Institution of Chemical Engineers, 97, pp. 100–108.

Pietrzak, W., Nowak, R. y Olech, M. (2014) "Effect of extraction method

on phenolic content and antioxidant activity of mistletoe extracts from *Viscum album subsp. abietis*", *Chemical Papers*, 68(7), pp. 976–982.

Prabhu, S. y Poulouse, E. K. (2012) "Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects", *International Nano Letters*, 2(1), p. 32.

Prado, J. M., Vardanega, R., Debien, I. C. N., Meireles, M. A. A., Gerschenson, L. N., Sowbhagya, H. B., Chemat, S., Prado, J. M., Vardanega, R., Debien, I. C. N., Meireles, M. A. A., Gerschenson, L. N., Sowbhagya, H. B. y Chemat, S. (2021) "Conventional extraction", en *Food Waste Recovery*. London: Elsevier, pp. 109–127.

Ramesan, M. T., Siji, C., Kalaprasad, G., Bahuleyan, B. K. y Al-Maghrabi, M. A. (2018) "Effect of Silver Doped Zinc Oxide as Nanofiller for the Development of Biopolymer Nanocomposites from Chitin and Cashew Gum", *Journal of Polymers and the Environment*, 26(7), pp. 2983–2991.

Rylski, I. (2018) "Pepper (*Capsicum*)", en *Handbook of Fruit Set and Development*. Boca Raton: CRC Press, pp. 341–354.

Saenghirunwattana, P., Noomhorm, A. y Rungsardthong, V. (2014) "Mechanical properties of soy protein based “green” composites reinforced with surface modified cornhusk fiber", *Industrial Crops and Products*, 60, pp. 144–150.

Saylan, Y., Yavuz, H., Ülger, C., Denizli, A. y Sağlam, N. (2019) "Introduction to Nanoscience, Nanomaterials, Nanocomposite, Nanopolymer, and Engineering Smart Materials", en *Microbial Nanobionics*. Suiza: Springer, pp. 1–12.

Scano, P. (2021) "Characterization of the medium infrared spectra of polyphenols of red and white wines by integrating FT IR and UV–Vis spectral data", *LWT*, 147, p. 111604.

Sharmila, G., Thirumarimurugan, M. y Muthukumaran, C. (2019) "Green synthesis of ZnO nanoparticles using *Tecoma castanifolia* leaf extract: Characterization and evaluation of its antioxidant, bactericidal and anticancer activities", *Microchemical Journal*, 145, pp. 578–587.

Sheldon, R. A. (2005) "Green solvents for sustainable organic synthesis: state of the art", *Green Chemistry*, 7(5), p. 267.

Shigesato, Y., Murayama, A., Kamimori, T. y Matsuhiro, K. (1988) "Characterization of evaporated amorphous WO₃ films by Raman and FTIR spectroscopies", *Applied Surface Science*, 33–34, pp. 804–811.

Sivam, A. S., Sun-Waterhouse, D., Perera, C. O. y Waterhouse, G. I. N. (2012) "Exploring the interactions between blackcurrant polyphenols, pectin and wheat biopolymers in model breads; a FTIR and HPLC investigation", *Food Chemistry*, 131(3), pp. 802–810.

Spigno, G., Tramelli, L. y De Faveri, D. M. (2007) "Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics", *Journal of Food Engineering*, 81(1), pp. 200–208.

Talam, S., Karummuri, S. R. y Gunnam, N. (2012) "Synthesis, characterization and spectroscopic properties of ZnO nanoparticles", *International Scholarly Research Network*, 2012, p. 372505.

Trost, B. (1991) "The Atom Economy—A Search for Synthetic Efficiency", *Science*, 254(5037), pp. 1471–1477.

Varma, R. S. (2012) "Greener approach to nanomaterials and their sustainable applications", *Current Opinion in Chemical Engineering*, 1(2), pp. 123–128.

Vijayalaxmi, S., Jayalakshmi, S. K. y Sreeramulu, K. (2015) "Polyphenols from different agricultural residues: extraction, identification and their antioxidant properties", *Journal of Food Science and Technology*, 52(5), pp.

2761–2769.

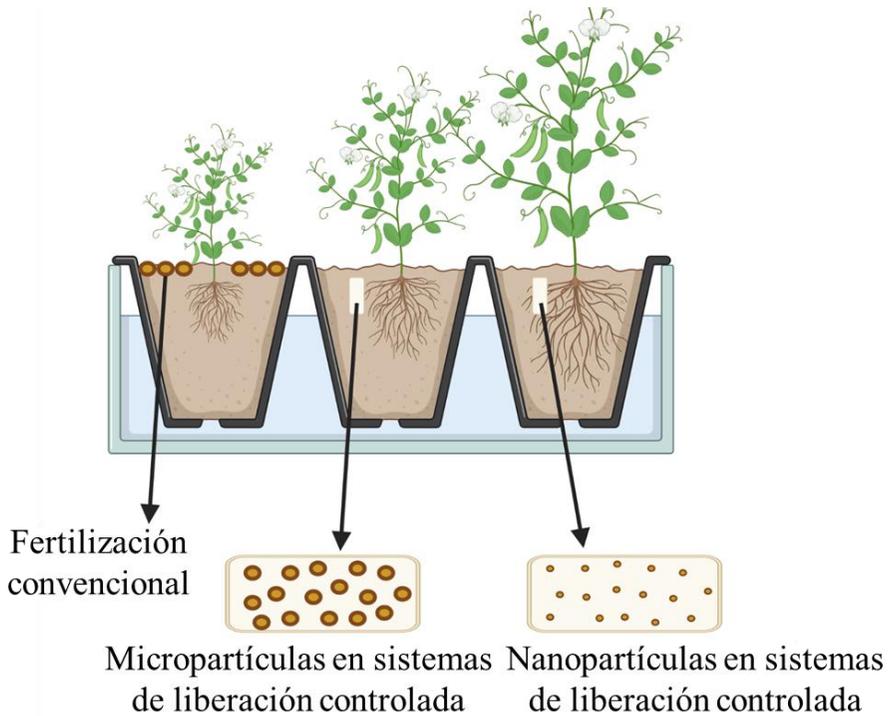
Wang, Z., Geng, Y. y Liang, T. (2020) "Optimization of reduced chemical fertilizer use in tea gardens based on the assessment of related environmental and economic benefits", *Science of The Total Environment*, 713, p. 136439.

Xiong, G., Pal, U., Serrano, J. G., Ucer, K. B. y Williams, R. T. (2006) "Photoluminescence and FTIR study of ZnO nanoparticles: the impurity and defect perspective", *physica status solidi (c)*, 3(10), pp. 3577–3581.

Yue, H.-B., Cui, Y.-D., Shuttleworth, P. S. y Clark, J. H. (2012) "Preparation and characterisation of bioplastics made from cottonseed protein", *Green Chemistry*, 14(7), p. 2009.

Zhao, Y., Bai, C., Brinker, C. J., Chi, L., Dawson, K. A., Gogotsi, Y., Halas, N. J., Lee, S.-T., Lee, T., Liz-Marzán, L., Miller, J. F., Mitra, S., Nel, A. E., Nordlander, P., Parak, W. J., Rowan, A., Rogach, A. L., Rotello, V. M., Tang, B. Z., Wee, A. T. S. y Weiss, P. S. (2019) "Nano as a Rosetta Stone: The Global Roles and Opportunities for Nanoscience and Nanotechnology", *ACS Nano*, 13(10), pp. 10853–10855.

Capítulo 8: Incorporación de diferentes micronutrientes a las matrices de liberación controlada: micro vs. nanopartículas



8.1 Introducción

El uso de matrices bioplásticas de base biológica como sistemas de liberación controlada de fertilizantes proporcionarían claras ventajas en términos de cero toxicidad y alta biodegradabilidad frente a la fertilización convencional y el uso de sistemas plásticos. Esto los convierte en una propuesta atractiva para incorporar nutrientes esenciales para la salud y el desarrollo de las plantas en horticultura (Pulat y Yoltay, 2017; Akalin y Pulat, 2020a; Pimenta *et al.*, 2022).

Los nutrientes son elementos necesarios para las plantas. Entre ellos, aunque necesarios en pequeñas cantidades, los micronutrientes son muy importantes para el crecimiento y desarrollo de las plantas (Alloway, 2008). Hay siete micronutrientes esenciales en la horticultura: Hierro (Fe), Cobre (Cu), Boro (B), Zinc (Zn), Manganeso (Mn), Molibdeno (Mo), Níquel (Ni) y Cloro (Cl). Es muy importante cubrir las necesidades de estos micronutrientes en los cultivos para tener una producción satisfactoria de materiales de alta calidad (Alloway, 2008). La deficiencia de estos micronutrientes depende de la zona de cultivo, aunque, por lo general, las deficiencias más frecuentes se encuentran para Zn, Fe, Cu y Mn (López-Rayó *et al.*, 2016). El Zn es necesario para producir la hormona del crecimiento y el alargamiento de los entrenudos. Además, activa las enzimas responsables de ciertas proteínas, se utiliza en la síntesis de clorofila y en la conversión de almidones a azúcares (energía vegetal) (Silva y Uchida, 2000). El Cu activa ciertas enzimas involucradas en la síntesis de lignina y es esencial para varios sistemas enzimáticos (Smeets *et al.*, 2009). También es necesario en el proceso de fotosíntesis y es crucial para la respiración de las plantas (Ishka *et al.*, 2022). El papel del Fe es clave, ya que interviene en la síntesis de

clorofila y participa en otros procesos enzimáticos y metabólicos sin los cuales las plantas no pueden llevar a cabo su ciclo de vida (Rahman *et al.*, 2020). Finalmente, y Mn participa en la síntesis de clorofila, vitaminas, ATP y lignina, la asimilación de nitratos, la activación hormonal y la división celular (Schmidt y Husted, 2019). Por ello, es muy importante cubrir las carencias de estos micronutrientes sin perjudicar el rendimiento productivo. Normalmente, para cubrir estas carencias, se incorporan al suelo micronutrientes en forma de quelatos o sales sulfatadas, siendo estas últimas las más utilizadas. Sin embargo, la alta solubilidad de los quelatos y sulfatos los hace ineficaces (la cantidad que asimila la planta es muy inferior a la que tiene que incorporar al suelo), especialmente en cultivos de regadío (Ferrandon y Chamel, 1988). Sales más insolubles como los óxidos, no pueden usarse para paliar estas deficiencias, ya que no pueden disociarse para ser incorporados a las plantas (Wellburn, 1990). Por otro lado, actualmente se investiga el uso de nanopartículas (nanofertilización), ya que pueden mejorar la asimilación de nutrientes por parte de las plantas (Zulfıqar *et al.*, 2019). Además, las nanopartículas también influyen en algunos procesos metabólicos de las plantas, ayudándolas a movilizar los nutrientes para su absorción. Finalmente, el costo de su aplicación suele ser menor, ya que se requieren en pequeñas cantidades (Seleiman *et al.*, 2020). Además, aunque sean insolubles pueden ser asimilados por las plantas ya que su pequeño tamaño permite su asimilación por los poros de las plantas (Rastogi *et al.*, 2017).

De esta forma, el objetivo principal de este capítulo fue evaluar el uso de las matrices a base de proteína de soja, estudiadas en esta tesis, como sistemas de liberación controlada de micronutrientes. Además, se comparó el uso de micro y nanopartículas como proveedores de

micronutrientes, evaluando las propiedades mecánicas y funcionales de los diferentes sistemas.

8.2 Materiales y métodos

Las matrices se procesaron a partir del subproducto de soja, usando la glicerina como plastificante en proporciones 1:1, para facilitar el procesado de las mismas mediante moldeo por inyección con una temperatura de compactación de 90 °C. Una descripción más detallada de estos productos se puede observar en las secciones 2.1.1 y 2.1.2 del Capítulo 2. Las matrices fueron obtenidas a partir del método A (sección 2.7.1) usando etanol como medio de extracción, ya que fue el método óptimo que se obtuvo en el Capítulo 5.

Las sales microparticuladas incorporadas fueron sulfatos comerciales de zinc, hierro, cobre y manganeso. Una descripción más detallada de ellos se encuentra en la sección 2.1.3 del Capítulo 2. En cuanto a las nanopartículas, estas fueron sintetizadas mediante el método químico de precipitación coloidal explicado en la sección 2.3. En este sentido, se utilizó una concentración de 0,2 M de precursor y 0,4 M de reductor (condiciones óptimas obtenidas en el Capítulo 7 para nanopartículas químicas). De esta forma, las sales microparticuladas tuvieron un tamaño de 500-1000 μm mientras que el tamaño de las nanopartículas es de 34-36 nm (tamaño adecuado para su incorporación en plantas (Eichert *et al.*, 2008)).

Un resumen con todas las matrices evaluadas y sus concentraciones durante la etapa de mezclado se muestran en la Tabla 8.1. Cabe recalcar que todas las matrices tuvieron la misma concentración inicial de micronutrientes en el procesado (3,63% en peso) para que se pudiera comparar su efecto a igualdad de nutrientes.

Tabla 8.1. Contenido de las diferentes matrices procesadas.

Sistema		SPI (%)	Gly (%)	Sal (%)	Micronutriente (%)
Micropartículas	Zn	45,0	45,0	10,0 (ZnSO ₄ ·H ₂ O)	3,63 (Zn ²⁺)
	Fe	41,0	41,0	18,0 (FeSO ₄ ·7H ₂ O)	3,63 (Fe ²⁺)
	Cu	43,0	43,0	14,0 (CuSO ₄ ·5H ₂ O)	3,63 (Cu ²⁺)
	Mn	44,5	44,5	11,0 (MnSO ₄ ·H ₂ O)	3,63 (Mn ²⁺)
	Mezcla	43,3	43,3	2,5 (ZnSO ₄ ·H ₂ O)	0,90 (Zn ²⁺)
				4,5 (FeSO ₄ ·7H ₂ O)	0,90 (Fe ²⁺)
				3,5 (CuSO ₄ ·5H ₂ O)	0,90 (Cu ²⁺)
				2,9 (MnSO ₄ ·H ₂ O)	0,90 (Mn ²⁺)
Nanopartículas	Zn	47,75	47,75	4,5 (ZnO)	3,63 (Zn ²⁺)
	Fe	47,65	47,65	4,7 (FeO)	3,63 (Fe ²⁺)
	Cu	47,75	47,75	4,5 (CuO)	3,63 (Cu ²⁺)
	Mn	47,56	47,65	4,7 (MnO)	3,63 (Mn ²⁺)
	Mezcla	47,7	47,7	1,1 (ZnO)	0,90 (Zn ²⁺)
				1,2 (FeO)	0,90 (Fe ²⁺)
				1,1 (CuO)	0,90 (Cu ²⁺)
				1,2 (MnO)	0,90 (Mn ²⁺)

Las matrices elaboradas en este capítulo fueron caracterizadas utilizando las técnicas resumidas en la Tabla 8.2.

Tabla 8.2. Técnicas de caracterización usadas para evaluar las matrices.

Técnica	Sección
Propiedades mecánicas	2.8.2
Capacidad de absorción de agua	2.8.4.3
Liberación del micronutriente	2.8.4.2
Biodegradabilidad	2.8.5
Evaluación en cultivos	2.8.6

8.3 Resultados y discusión

8.3.1 Propiedades mecánicas

La Figura 8.1 muestra las propiedades mecánicas de los sistemas en modo compresión con diferentes micropartículas (Figura 8.1A) y nanopartículas (Figura 8.1B). Se ha incluido como referencia un sistema sin ningún micronutriente (Ref). Como puede observarse, todos los sistemas presentan un perfil similar, donde el módulo elástico (E') solo aumenta ligeramente con la frecuencia. Estos resultados indican que los sistemas son estables. Además, presentan un módulo elástico muy por encima del módulo viscoso (resultado no mostrado). Esto hace que la tangente de pérdidas (módulo viscoso/módulo elástico) de los sistemas sea de 0,2–0,3, lo que destaca su fuerte carácter sólido.

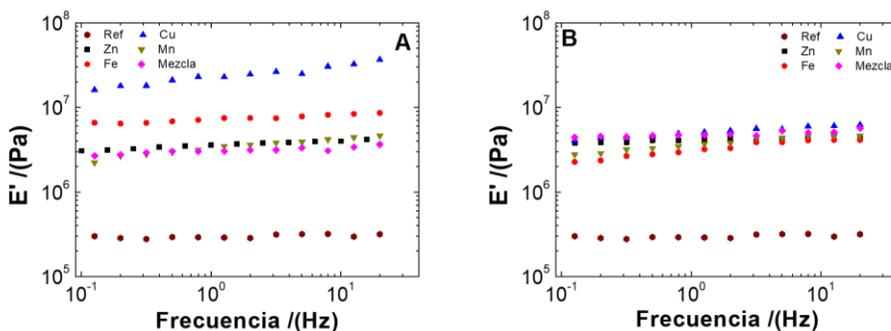


Figura 8.1. Propiedades dinámicas en compresión de las matrices con diferentes sales de sulfato microparticuladas (A) y nanopartículas de óxido metálico (B) incorporadas.

La incorporación de cualquier micronutriente aumenta significativamente los valores de E' . Esto podría deberse al refuerzo que se produce al incorporar la sal (ya sea en forma de micro o nanopartículas). Sin embargo, el comportamiento es diferente para micro y nanopartículas. Una mejor comparación puede verse en la Tabla 8.3. Así, las micropartículas generan distintos refuerzos, que podrían deberse

a posibles interacciones entre las sales metálicas (Zn, Fe, Cu o Mn) y la proteína de soja o su actuación como material de relleno. De esta forma, el sulfato de cobre alcanza los valores más altos de E' , seguido por el de hierro, porque interactúan con las cadenas proteicas reforzándolas. Sin embargo, los sulfatos de Zn o de Mn no parece mostrar este efecto. Cabe recalcar que la mezcla de componentes impide también que se puedan alcanzar las interacciones del sulfato de Cu o de Fe que requerirían una mayor concentración, quedándose en valores similares a las matrices con sulfato de Zn o de Mn.

Tabla 8.3. Parámetros de compresión de las matrices con diferentes sales de sulfato microparticuladas y nanopartículas de óxido metálico incorporadas. El sistema de referencia (Ref) se incluyó a efectos de comparación. Las diferentes letras usadas como superíndice en las distintas columnas evidencian diferencias significativas ($p < 0,05$).

Sistemas		ϵ_{crit} (%)	E'_1 (MPa)	$\tan \delta_1$ (-)
Ref		0,10 ^a	$0,2 \pm 0,1^A$	$0,31 \pm 0,06^I$
Micropartículas	Zn	$0,04 \pm 0,02^b$	$3,6 \pm 0,3^{BE}$	$0,08 \pm 0,02^{II}$
	Fe	$0,02 \pm 0,01^b$	$7,5 \pm 0,4^C$	$0,06 \pm 0,02^{II}$
	Cu	$0,02 \pm 0,01^b$	$22,9 \pm 0,4^D$	$0,06 \pm 0,02^{II}$
	Mn	$0,03 \pm 0,01^b$	$3,5 \pm 0,2^{BE}$	$0,08 \pm 0,01^{II}$
	Mezcla	$0,04 \pm 0,02^b$	$3,0 \pm 0,3^B$	$0,08 \pm 0,02^{II}$
Nanopartículas	Zn	$0,07 \pm 0,01^c$	$4,2 \pm 0,5^E$	$0,20 \pm 0,04^{III}$
	Fe	$0,08 \pm 0,01^c$	$3,2 \pm 0,5^B$	$0,17 \pm 0,03^{III}$
	Cu	$0,07 \pm 0,02^c$	$5,1 \pm 0,4^E$	$0,18 \pm 0,04^{III}$
	Mn	$0,08 \pm 0,02^{ac}$	$3,7 \pm 0,3^{BE}$	$0,17 \pm 0,02^{III}$
	Mezcla	$0,06 \pm 0,02^c$	$4,7 \pm 0,3^E$	$0,21 \pm 0,05^{III}$

Cuando se incorporan nanopartículas, no se observan interacciones entre las nanopartículas y proteínas. Así, los sistemas de nanopartículas no muestran diferencias significativas en los valores de E' cuando se cambia el micronutriente. En este sentido, las nanopartículas actúan como un material de relleno, que aumentan los módulos del sistema de referencia, aunque no interactúan con la proteína. Esto puede deberse a la fuerte interacción de los óxidos que no se dividen iónicamente para generar interacciones electrostáticas con las cadenas proteicas.

Por otro lado, la deformación crítica y tangente de pérdidas no generó diferencias significativas entre los diferentes micronutrientes. No obstante, la incorporación de nanopartículas en vez de micropartículas genera un aumento en ambos, posiblemente debido al menor volumen de material de relleno incorporado que le da a la matriz una mayor flexibilidad. Es interesante destacar que todos los sistemas redujeron la flexibilidad con respecto a la matriz de referencia (menor deformación crítica y tangente de pérdidas cuando se incorporó sal), lo que podría deberse a su función como material de relleno.

8.3.2 *Capacidad de absorción de agua*

La Figura 8.2 muestra la capacidad de absorción de agua (Figura 8.2A) y pérdida de materia soluble (Figura 8.2B) de los sistemas con diferentes micro y nanopartículas incluidas. Se ha incluido como referencia un sistema sin ningún micronutriente (Ref).

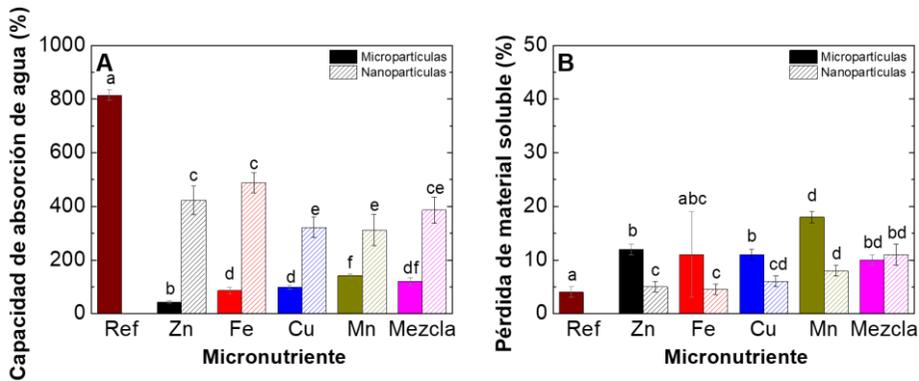


Figura 8.2. Capacidad de absorción de agua (A) y pérdida de material soluble (B) de las matrices con diferentes sales de sulfato microparticuladas y nanopartículas de óxido metálico incorporadas. Las diferentes letras usadas las columnas evidencian diferencias significativas ($p < 0,05$).

Como puede verse, las nanopartículas permiten una mejor capacidad de absorción de agua que las micropartículas, independientemente del micronutriente incorporado (valores cercanos a 400 vs. 100% para sistemas de nano y micropartículas, respectivamente). Este comportamiento podría deberse a las mayores interacciones electrostáticas generadas por las sales microparticuladas, que inhiben los sistemas para absorber agua (Judawisastra *et al.*, 2017). De esta manera, las micropartículas generaron una conductividad en el agua de 150 a 300 $\mu\text{S}/\text{cm}$, mientras que las nanopartículas generaron valores entre 20 a 60 $\mu\text{S}/\text{cm}$, mostrando las mayores fuerzas iónicas generadas cuando hay micropartículas en el medio. Estos resultados muestran la mejor capacidad de los sistemas con nanopartículas incorporadas para ser utilizados como reservorios de agua. Este depósito de agua permite que el agua de lluvia o de riego que la planta no ha tomado se almacene y se suministre lentamente cuando sea necesario, lo que le permitiría permanecer más tiempo sin regar. Por tanto, sería un valor añadido para estos sistemas. Sin embargo, todos los sistemas presentan menor capacidad de absorción de agua que el sistema de referencia (sin sal),

posiblemente debido a que su estructura es más compacta al tener sales o nanopartículas.

En cuanto a la pérdida de materia soluble, todos los sistemas con sales presentan una pérdida de material soluble superior al sistema de referencia, lo que indica que perdieron las sales incorporadas y/o una parte de las proteínas solubles. Aunque no se observan grandes diferencias, los sistemas que incorporaron nanopartículas en general presentaron pérdidas de material soluble más bajas que los que incorporaron micropartículas, posiblemente debido a la menor solubilidad de las nanopartículas que son más difíciles de liberar en agua. De hecho, los sistemas con óxido de zinc o de hierro pierden menos material soluble que la matriz de referencia.

8.3.3 *Liberación del micronutriente*

Liberación en agua

La liberación del micronutriente calculado a partir de la conductividad medida en el medio de liberación (agua) con el tiempo se presenta en la Figura 8.3 para los sistemas con micropartículas (Figura 8.3A) y nanopartículas (Figura 8.3B). Por lo tanto, la liberación de sal se representó a lo largo del tiempo. Todos los sistemas presentaron el mismo perfil de liberación en el agua: una primera liberación rápida seguida de una caída de la pendiente hasta completar la liberación.

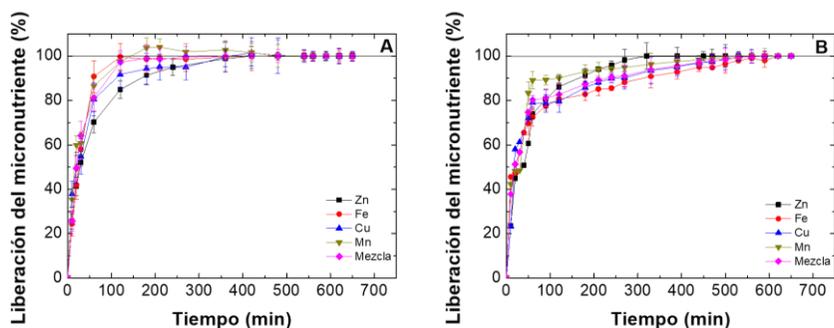


Figura 8.3. Perfil de liberación en agua de las matrices con diferentes micro (A) y nanopartículas (B).

Sin embargo, el tiempo máximo de liberación solo depende del tamaño de partícula, siendo similar para cada micronutriente. Así, las micropartículas generaron una liberación más rápida que las nanopartículas (tiempo máximo de liberación: 450 y 530 min para micro y nanopartículas, respectivamente), posiblemente debido a la mayor solubilidad de los sulfatos (micropartículas) que de los óxidos (nanopartículas) (de Romaña *et al.*, 2003). Cabe mencionar que los óxidos microparticulados no pueden ser utilizados como fertilizantes, debido a su insolubilidad, es decir, no pueden disociarse para ser incorporados a las plantas (Wellburn, 1990). Por otro lado, los óxidos nanoparticulados pueden ser asimilados por las plantas debido a su menor tamaño e inestabilidad superficial (Rastogi *et al.*, 2017).

Liberación en suelo

La Figura 8.4 muestra la liberación del micronutriente en el suelo a lo largo del tiempo de los diferentes sistemas. No obstante, debido a los bajos valores de conductividad que producen los sistemas con nanopartículas incorporadas, así como a su insolubilidad (lo que dificulta su arrastre con el agua), los resultados obtenidos por los sistemas de nanopartículas no presentan valores de conductividad significativos en

los lixiviados, por lo que no pudieron ser evaluados. Este efecto se puede ver desde dos puntos de vista. Por un lado, puede ser una ventaja, ya que no contamina las aguas subterráneas y estarían disponibles para las plantas aunque se liberen de la matriz. Por otro lado, podría ser un inconveniente si no es asimilado por las plantas, provocando la contaminación por exceso de nutrientes en el suelo.

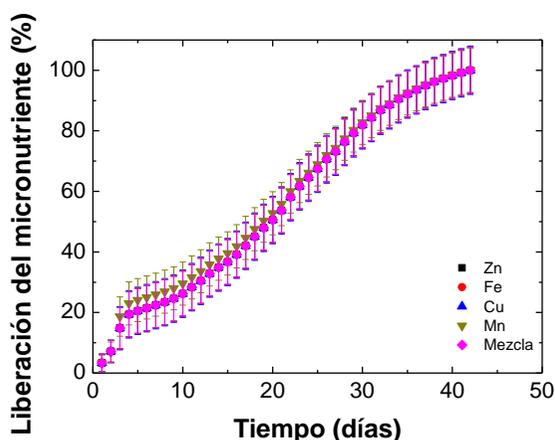


Figura 8.4. Perfil de liberación en suelo de las matrices con diferentes micropartículas.

En cuanto a los sistemas con micropartículas incorporadas, todos los sistemas presentaron un perfil similar donde los primeros días (10 días) se observa una liberación más lenta, posiblemente porque la sal aún no ha llegado al final de la columna de lixiviación. Luego la liberación es más rápida hasta que decrece hasta alcanzar la máxima liberación, asimilando al perfil observado en agua, aunque en un tiempo mayor. Así, la liberación controlada se prolongó durante 40 días, siendo más lenta que en el agua como se predijo en estudios anteriores (Akalin y Pulat, 2020b). Este tiempo de liberación es adecuado para cultivos de ciclo corto, como lechuga, pimiento, calabacín o fresas, ya que podría adaptarse a lo largo de su crecimiento y maduración.

8.3.4 Biodegradabilidad

En la Figura 8.5 se muestra la apariencia visual de los sistemas con micro y nanopartículas durante el análisis de biodegradación. Como se puede observar, los sistemas con nanopartículas se biodegradan en menos tiempo (20 días) que los sistemas con micropartículas (40 días), no observándose diferencias significativas con el cambio de micronutriente incorporado. Este comportamiento podría deberse a la inestabilidad superficial de las nanopartículas, provocando que su medio de soporte (proteínas) se degrade para buscar cierta estabilidad (Abdullah *et al.*, 2020). Cabe mencionar que ambas matrices con micro y nanopartículas también se biodegradan en menos tiempo que los sistemas de referencia (sin micronutrientes) que necesitan 60 días para biodegradarse por completo.

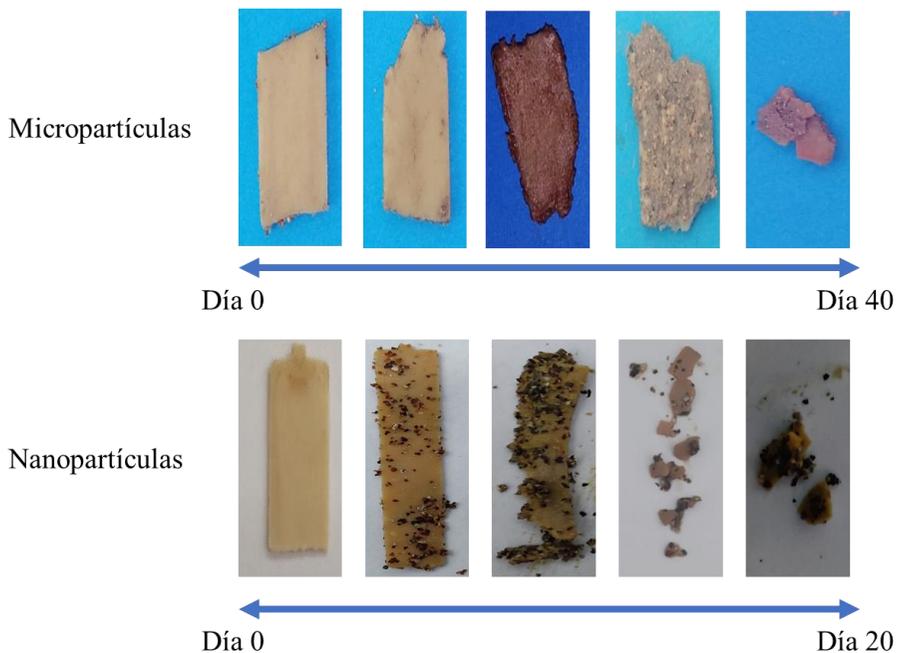


Figura 8.5. Biodegradabilidad de las matrices con micro y nanopartículas.

Por otro lado, se obtuvo un valor similar al comparar el tiempo de biodegradación con el tiempo máximo de liberación al suelo de los sistemas con micropartículas incorporadas. Por lo tanto, se produjo una liberación controlada durante la biodegradación del sistema, posiblemente porque los micronutrientes interactúan con la matriz basada en proteínas. Si se predice un comportamiento similar en sistemas con nanopartículas, la liberación de nutrientes es más rápida (20 días). Sin embargo, como se mencionó anteriormente, estos no serían lixiviados, por lo que seguirían siendo asimilables por las plantas.

8.3.5 *Evaluación en cultivos*

En la Tabla 8.4 se muestran los datos obtenidos de la evaluación de lechugas fertilizadas con los diferentes sistemas. Además, en la Figura 8.6 se puede observar el aspecto visual de las lechugas tratadas con los sistemas con diferentes micro y nanopartículas, incluyendo el control positivo (fertilización convencional) y control negativo (sin fertilización). De manera similar, estos resultados se pueden encontrar en la Tabla 8.5 y la Figura 8.7 para los pimientos dulces italianos. Como se puede apreciar, la fertilización mejoró la calidad de ambos cultivos, ya que el control negativo obtuvo los peores resultados (menor contenido de micronutrientes, peso y dimensiones).

Con respecto a los diferentes métodos de fertilización, el contenido de micronutrientes es mayor en los cultivos fertilizados con los sistemas de liberación controlada que con la fertilización convencional, muy probablemente mejorado por la exposición continua del micronutriente, lo que permite la liberación controlada. Además, las lechugas y los pimientos asimilan mejor las nanopartículas que las micropartículas. Este efecto podría deberse al tamaño de las nanopartículas, que pueden

ser mejor asimiladas por los poros de las plantas (Khan *et al.*, 2019), además del menor lixiviado, lo que permite que esté disponible para los cultivos por más tiempo. Esta mayor asimilación de micronutrientes también se observa en la fisiología de la planta. En este sentido, las lechugas y pimientos cultivados con sistemas de liberación controlada presentan mayor peso y dimensiones, y mayor número de hojas, siendo especialmente superior cuando se utilizan nanopartículas en lugar de micropartículas. Todo esto se puede observar en las Figuras 8.6 y 8.7, donde las lechugas y los pimientos tratados con nanopartículas son más grandes y frondosos. Además, todas las plantas reflejan un color verde en sus parámetros de color, lo que indica su correcta formación de clorofila, indicador de que la planta se está desarrollando correctamente (Palta, 1990). Sin embargo, aquellas plantas fertilizadas con nanopartículas mostraron un color verde más parecido a los pigmentos de clorofila (mayor croma y claridad, y menor tono), lo que demuestra que esta fertilización favorece su síntesis, permitiendo que la planta obtenga una mayor cantidad de energía y, por ende, un mayor crecimiento, como se mencionó anteriormente.

Por otro lado, la mezcla de micronutrientes en los sistemas de liberación controlada tiene un comportamiento diferente en lechuga y pimiento. En el primero, esta fertilización mejora el método convencional. Sin embargo, el sistema mixto favorece la asimilación del hierro y el cobre, mientras que el zinc y el manganeso son bloqueados, probablemente por los otros dos micronutrientes incorporados. Por ello, aunque se obtienen lechugas más nutridas y de mayor tamaño que en la fertilización convencional, no existe sinergia entre los diferentes micronutrientes para conseguir un realce completo. Este bloqueo de micronutrientes se observó en mayor medida en pimientos, donde ni

siquiera se pudieron obtener los fertilizados con los sistemas que contienen micropartículas. De igual forma, los pimientos fertilizados con mezclas de nanopartículas fueron más pequeños que los convencionales.

Por otro lado, la capacidad de captación de agua mostrada por los sistemas de liberación controlada permitió reducir en un 33% la necesidad de riego cuando se incorporaban las micropartículas. En el caso de las nanopartículas, la mayor capacidad de captación de agua de los sistemas les permitió reducir aún más la necesidad de riego hasta en un 50%, siendo un potencial reservorio de agua que podría incrementar la funcionalidad de estos sistemas.

Tabla 8.4. Asimilación de micronutrientes (MN) y fisiología del cultivo tras el uso de los diferentes sistemas en lechugas.

Sistema	MN incorporado	Contenido MN (mg/kg)	Peso (g)	Hojas			Color		
				Número	Tamaño (h x w) cm	Croma	Tono	Claridad	
Control positivo	Zn/Fe/Cu/Mn	35,6/235,9/4,9/35,6	63,3 ± 1,4	16 ± 1	15,6 x 10,1	28,2 ± 3,0	-67,7 ± 8,8	46,6 ± 1,4	
	Zn	155,3	62,5 ± 5,2	14 ± 1	14,6 x 5,6	25,6 ± 1,5	-66,6 ± 2,88	42,3 ± 2,1	
	Fe	263,2	92,7 ± 2,7	17 ± 1	21,0 x 7,9	27,2 ± 1,2	-66,8 ± 2,7	45,6 ± 0,7	
Microparticulas	Cu	5,9	63,3 ± 5,5	18 ± 1	14,1 x 6,8	25,4 ± 1,2	-65,3 ± 3,2	43,8 ± 0,1	
	Mn	128,9	70,9 ± 2,2	17 ± 1	22,2 x 8,2	21,8 ± 1,6	-64,9 ± 5,0	38,0 ± 0,8	
	Zn/Fe/Cu/Mn	55,2/618,2/11,9/79,9	59,8 ± 0,8	21 ± 1	22,3 x 7,1	27,3 ± 1,0	-68,4 ± 1,1	44,2 ± 0,2	
Nanoparticulas	Zn	167,2	77,2 ± 0,7	17 ± 3	16,0 x 9,8	29,5 ± 4,1	-68,6 ± 4,8	45,8 ± 5,0	
	Fe	340,5	108,2 ± 3,3	21 ± 2	20,5 x 10,1	29,7 ± 0,8	-67,9 ± 2,9	46,3 ± 0,1	
	Cu	7,9	80,2 ± 2,1	19 ± 2	15,1 x 6,5	33,8 ± 1,9	-72,4 ± 5,3	52,3 ± 1,7	
Control negativo	Mn	135,9	90,2 ± 3,4	21 ± 1	15,4 x 7,8	26,3 ± 0,6	-67,5 ± 1,3	44,5 ± 1,6	
	Zn/Fe/Cu/Mn	55,8/963,2/18,9/93,2	81,1 ± 1,4	25 ± 1	22,4 x 10,4	27,8 ± 0,4	-68,4 ± 1,1	45,4 ± 0,1	
	-	15,5/74/4/2/25,3	8,8 ± 0,5	10 ± 1	13,0 x 4,2	26,4 ± 2,2	-67,5 ± 2,7	43,7 ± 0,8	

Control positivo		
	Micropartículas	Nanopartículas
Zn		
Fe		
Cu		
Mn		
Mezcla		
Control negativo		

Figura 8.6. Aspecto visual de las lechugas obtenidas tras el tratamiento con las diferentes matrices. También se incluyeron los controles positivo (fertilización convencional) y negativo (sin fertilización).

Tabla 8.5. Asimilación de micronutrientes (MN) y fisiología del cultivo tras el uso de los diferentes sistemas en pimientos.

Sistema	MN incorporado	Contenido MN (mg/kg)	Peso (g)	Hojas			Color		
				Número	Tamaño (h x w) cm	Croma	Tono	Claridad	
Control positivo	Zn/Fe/Cu/Mn	41,1/1519,9/14,1/128,8	21,1 ± 1,0	11 ± 1	12,1 x 5,2	27,6 ± 0,4	-72,8 ± 5,0	46,5 ± 0,7	
	Zn	71,0	28,1 ± 1,4	10 ± 1	12,6 x 6,4	23,3 ± 1,4	-64,3 ± 4,8	40,8 ± 0,9	
	Fe	1945,4	15,3 ± 2,4	11 ± 1	15,9 x 7,5	24,0 ± 0,1	-71,9 ± 1,4	40,8 ± 0,9	
	Cu	20,8	24,6 ± 2,9	12 ± 2	15,9 x 7,5	19,3 ± 1,3	-73,3 ± 5,4	42,6 ± 0,7	
Microparticulas	Mn	179,6	16,1 ± 1,0	10 ± 1	12,7 x 5,1	26,9 ± 1,5	-72,4 ± 5,5	43,8 ± 0,4	
	Zn/Fe/Cu/Mn	-	-	-	-	-	-	-	
	Zn	82,3	32,6 ± 0,1	12 ± 1	17,6 x 6,6	26,6 ± 0,2	-67,7 ± 3,0	41,9 ± 0,1	
	Fe	11150,5	40,4 ± 1,4	15 ± 1	19,3 x 9,7	28,7 ± 0,2	-73,9 ± 1,0	47,4 ± 0,2	
Nanoparticulas	Cu	670,4	57,7 ± 1,3	13 ± 1	18,4 x 9,5	32,5 ± 1,9	-77,9 ± 0,3	45,5 ± 0,1	
	Mn	262,4	29,5 v 3,1	14 ± 1	16,3 x 8,0	29,0 ± 1,2	75,0 ± 4,7	48,9 ± 1,6	
	Zn/Fe/Cu/Mn	59,9/2925,0/16,8/130,5	8,9 ± 0,2	7 ± 1	9,4 x 4,2	30,7 ± 0,7	-69,8 ± 1,8	45,5 ± 0,6	
	-	8,7/480,9/4,3/56,2	14,2 ± 2,9	9 ± 1	10,0 x 5,2	27,5 ± 0,1	-69,5 ± 4,0	41,9 ± 0,1	

Control positivo		
	Microparticulas	Nanoparticulas
Zn		
Fe		
Cu		
Mn		
Mezcla		
Control negativo		

Figura 8.7. Aspecto visual de las plantas de pimientos obtenidas tras el tratamiento con las diferentes matrices. También se incluyeron los controles positivo (fertilización convencional) y negativo (sin fertilización).

8.4 Conclusiones

Es posible lograr una fertilización controlada de micronutrientes a partir de sistemas basados en proteína de soja, siendo más efectiva que la fertilización convencional al obtener cultivos más nutridos y más grandes y siendo menos contaminante, ya que se biodegradan en sustancias no tóxicas después de su uso. De esta forma, las matrices basadas en proteína de soja con las propiedades mecánicas y funcionales adecuadas podrían ser procesadas con diferentes micronutrientes en micro y nanopartículas. Sin embargo, los sistemas con nanopartículas presentaron mejores características: mayor capacidad de absorción de agua, liberación más lenta y mayor tiempo de asentamiento en el suelo. Todo esto permitió una mejor asimilación de los micronutrientes en los cultivos, lo que se tradujo en su mayor tamaño. Además, se puede obtener una mayor reducción del riego como valor añadido de estos sistemas. No obstante, no se recomienda la mezcla de micronutrientes en una misma matriz (ya sean micro o nanopartículas), ya que no presenta efectos sinérgicos entre ellos. En este sentido, este estudio abre la puerta a una fertilización novedosa, más eficiente y menos contaminante que podría trasladarse a cultivos a gran escala.

8.5 Concluding remarks

To sum up, it is possible to achieve a controlled fertilization of micronutrients from soy protein-based systems, being more effective than conventional fertilization by obtaining more nourished and larger crops and less soil pollution, as they biodegrade into non-toxic substances after use. In this way, soy protein-based systems with suitable mechanical and functional properties could be processed with different micro and nanoparticulate micronutrients. Nevertheless, systems with nanoparticles presented better characteristics: higher water uptake capacity, slower release and longer settling time in the soil. All this allowed for a better assimilation of micronutrients in the crops, which translated into their larger size. In addition, a greater reduction in irrigation can be obtained as an added value of these systems. However, the mixture of micronutrients in the same matrix (either micro or nanoparticles) is not recommended, since it does not present synergistic effects between them. In this sense, this study opens the door to a novel, more efficient and less polluting fertilization that could be transferred to large-scale crops.

Agradecimientos

Se agradece a los servicios de Microanálisis e Invernadero del Centro de Investigación, Tecnología e Innovación de la Universidad de Sevilla (CITIUS) por su asesoramiento durante los ensayos realizados en sus instalaciones.

Publicaciones relacionadas

Jiménez-Rosado, M., Perez-Puyana, V., Guerrero, A. y Romero, A. (2022). Micronutrient-controlled-release protein-based systems for horticulture: micro vs. nanoparticles. *Industrial Crops and Products*, 185, 115128.

Referencias

Abdullah, A. H. D., Putri, O. D., Fikriyyah, A. K., Nissa, R. C., Hidayat, S., Septiyanto, R. F., Karina, M. y Satoto, R. (2020) "Harnessing the excellent mechanical, barrier and antimicrobial properties of zinc oxide (ZnO) to improve the performance of starch-based bioplastic", *Polymer-Plastics Technology and Materials*, 59(12), pp. 1259–1267.

Akalin, G. O. y Pulat, M. (2020a) "Controlled release behavior of zinc-loaded carboxymethyl cellulose and carrageenan hydrogels and their effects on wheatgrass growth", *Journal of Polymer Research*, 27(1), p. 6.

Akalin, G. O. y Pulat, M. (2020b) "Preparation and characterization of κ -carrageenan hydrogel for controlled release of copper and manganese micronutrients", *Polymer Bulletin*, 77(3), pp. 1359–1375.

Alloway, B. J. (2008) *Micronutrient deficiencies in global crop production*, *Micronutrient Deficiencies in Global Crop Production*. Berlin: Springer.

Aqsa, N. K. (2021) "A Review on concerns about soil quality and innovative methods for improving soil health", *Emergent Life Sciences Research*, 7, pp. 5–13.

Bullock, D. G. (1992) "Crop rotation", *Critical Reviews in Plant Sciences*, 11(4), pp. 309–326.

Eichert, T., Kurtz, A., Steiner, U. y Goldbach, H. E. (2008) "Size exclusion limits and lateral heterogeneity of the stomatal foliar uptake pathway for aqueous solutes and water-suspended nanoparticles", *Physiologia Plantarum*, 134(1), pp. 151–160.

Ferrandon, M. y Chamel, A. R. (1988) "Cuticular retention, foliar absorption and translocation of Fe, Mn and Zn supplied in organic and inorganic form", *Journal of Plant Nutrition*, 11(3), pp. 247–263.

Haifa (2020) *Multicote micro*. Disponible en: <https://www.haifa->

group.com/es/multicote-micro-0 (Accedido: Agosto 17, 2020).

Hazell, P. y Wood, S. (2008) "Drivers of change in global agriculture", *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 236(1491), pp. 495–515.

Ishka, M. R., Chia, J.-C. y Vatamaniuk, O. K. (2022) "Advances in understanding of copper function and transport in plants", en *Cation Transporters in Plants*. Cola de Ratón:Elsevier, pp. 205–226.

Judawisastra, H., Sitohang, R. D. R., Marta, L. y Mardiyati (2017) "Water absorption and its effect on the tensile properties of tapioca starch/polyvinyl alcohol bioplastics", *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 223, p. 012066.

Khan, M. R., Adam, V., Rizvi, T. F., Zhang, B., Ahamad, F., Joško, I., Zhu, Y., Yang, M. y Mao, C. (2019) "Nanoparticle–Plant Interactions: Two-Way Traffic", *Small*, 15(37), p. 1901794.

Kondraju, T. T. y Rajan, K. S. (2019) "Excessive fertilizer usage drives agriculture growth but depletes water quality", *ISPRS Annals of Photogrammetry, Remote Sensing and Spatial Information Sciences*, IV-3/W1, pp. 17–23.

López-Rayó, S., Nadal, P. y Lucena, J. J. (2016) "Novel chelating agents for iron, manganese, zinc, and copper mixed fertilisation in high pH soil-less cultures", *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(4), pp. 1111–1120.

Manzano, V., García, N. L., Ramírez, C. R., D'Accorso, N. y Goyanes, S. (2019) "Mulch Plastic Systems: Recent Advances and Applications", en *Polymers for Agri-Food Applications*. Cham: Springer International Publishing, pp. 265–290.

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (2022) *Datos de alimentación y agricultura*. Disponible en:

<http://www.fao.org/> (Accedido: Marzo 28, 2022).

Palta, J. P. (1990) "Leaf chlorophyll content", *Remote Sensing Reviews*, 5(1), pp. 207–213.

Pimenta, I. F., Figueiredo, L. R. F., Santos, A. M. C., Oliveira, J. E. y Medeiros, E. S. (2022) "Development of controlled release fertilizer systems for KCl using glycerol-based polymers", *Journal of Applied Polymer Science*, 139(10), p. 51747.

Projar (2020) *Nutricote: controlled release fertilizer*. Disponible en: https://www.projar.es/productos/productos-hortofruticultura-jardineria/fertilizantes/abonos_minerales/fertilizantes-de-liberacion-controlada/fertilizante-de-liberacion-controlada-nutricote/ (Accedido: Agosto 17, 2020).

Pulat, M. y Yoltay, N. (2017) "Smart fertilizers: preparation and characterization of gelatin-based hydrogels for controlled release of MAP and AN fertilizers", *Agrochimica*, 60(4), pp. 249–261.

Rahman, R., Sofi, J. A., Javeed, I., Malik, T. H. y Nisar, S. (2020) "Role of Micronutrients in Crop Production", *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 11, pp. 2265–2287.

Rastogi, A., Zivcak, M., Sytar, O., Kalaji, H. M., He, X., Mbarki, S. y Brestic, M. (2017) "Impact of Metal and Metal Oxide Nanoparticles on Plant: A Critical Review", *Frontiers in Chemistry*, 5, p. 78.

de Romaña, D. L., Lönnerdal, B. y Brown, K. H. (2003) "Absorption of zinc from wheat products fortified with iron and either zinc sulfate or zinc oxide", *The American Journal of Clinical Nutrition*, 78(2), pp. 279–283.

Schmidt and Husted (2019) "The Biochemical Properties of Manganese in Plants", *Plants*, 8(10), p. 381.

Seleiman, M. F., Almutairi, K. F., Alotaibi, M., Shami, A., Alhammad, B.

A. y Battaglia, M. L. (2020) "Nano-Fertilization as an Emerging Fertilization Technique: Why Can Modern Agriculture Benefit from Its Use?", *Plants*, 10(1), p. 2.

Silva, J. y Uchida, R. (2000) "Essential Nutrients for Plant Growth", en *Plant Nutrition Management in Hawaii's soils, approaches and application to tropical and subtropical agriculture*. Hawaii: CTAHR editorial.

Smeets, K., Opdenakker, K., Remans, T., Van Sanden, S., Van Belleghem, F., Semane, B., Horemans, N., Guisez, Y., Vangronsveld, J. y Cuypers, A. (2009) "Oxidative stress-related responses at transcriptional and enzymatic levels after exposure to Cd or Cu in a multipollution context", *Journal of Plant Physiology*, 166(18), pp. 1982–1992.

Stabenow, D. (2014) "Agricultural Act of 2014", Nueva York: *US House of Representatives*.

Wainwright, H., Jordan, C. y Day, H. (2014) "Environmental Impact of Production Horticulture", in *Horticulture: Plants for People and Places, Volume 1*. Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 503–522.

Wellburn, A. R. (1990) "Tansley Review No. 24 Why are atmospheric oxides of nitrogen usually phytotoxic and not alternative fertilizers?", *New Phytologist*, 115(3), pp. 395–429.

Zulfiqar, F., Navarro, M., Ashraf, M., Akram, N. A. y Munné-Bosch, S. (2019) "Nanofertilizer use for sustainable agriculture: Advantages and limitations", *Plant Science*, 289, p. 110270.

Reflexiones finales

Esta tesis doctoral ha generado un nuevo concepto de fertilización, más eficiente y menos contaminante, que es un punto de partida clave para la horticultura intensiva que se plantea en estos tiempos. Así, este trabajo ha permitido el desarrollo de un sistema de liberación controlada (matriz) biodegradable y sostenible que permite suministrar micronutrientes a cultivos hortícolas de forma eficiente.

En primer lugar, se ha podido revalorizar un subproducto de soja rico en proteínas como materia prima para el desarrollo de la matriz que favorece la economía circular, muy beneficiosa a nivel industrial, reduciendo la huella de carbono del producto y la generación de residuos. De esta forma, se ha planteado un sistema sencillo para cerrar el ciclo de un producto que proviene de un cultivo y acaba como fertilizante para otro, siendo este un objetivo muy perseguido por los Objetivos de Desarrollo Sostenible de la Agenda 2030.

Respecto al procesado, el uso de un plastificante (glicerina) en proporción 1:1 con el aislado proteico de soja y el moldeo por inyección (con 300 s de compactación, y una temperatura de moldeo de 90 °C) seguido de un tratamiento dehidrotérmico a 50 °C durante 24 h han sido clave para conseguir las matrices bioplásticas con el micronutriente incorporado. En cuanto a la sal, el sulfato fue el más adecuado para la incorporación del micronutriente, mostrando las propiedades más adecuadas para liberarse controladamente. No obstante, fue necesaria la eliminación del plastificante para asegurar la correcta liberación controlada. En este sentido, la incorporación de una etapa de inmersión en etanol seguida de una liofilización del sistema (método A optimizado) fue clave para obtener matrices que permitían la liberación controlada de

los micronutrientes, ya que permitió la eliminación del plastificante sin arrastrar al micronutriente incorporado que permanece de forma homogénea en la matriz. De esta forma, los cultivos hortícolas se adaptaron correctamente a los tiempos de biodegradación de las matrices y la velocidad de liberación de los micronutrientes. Además, su fácil fabricación permite una gran versatilidad, debido a que permite conferir diferentes rangos de biodegradabilidad, liberación y carga de nutrientes. Así, se pueden utilizar en todo tipo de cultivos, desde cultivos de crecimiento rápido, como la lechuga, el pimiento o el calabacín a cultivos más lentos como el tomate, la zanahoria y la cebolla.

Por último, el uso de nanopartículas como portadoras del micronutriente mejoró las propiedades funcionales de los sistemas, permitiendo una mejor asimilación de los micronutrientes por parte de las plantas, así como una reducción de la cantidad de riego necesaria.

En conclusión, se plantean dos sistemas como los más prósperos a nivel industrial: (i) aquel con sulfato incorporado, que mejora la eficiencia de asimilación de las sales convencionales, siendo un producto asequible y competitivo frente a la fertilización convencional; y (ii) aquel que incorporar nanopartículas, siendo un producto más exclusivo, que da mejores beneficios y puede industrializarse como producto de gama alta.

No obstante, citando a Aristóteles “es de vital importancia para quien desee alcanzar una certeza en su investigación, el saber dudar todo el tiempo”. En este sentido, esta tesis solo es el principio de un camino largo y hay muchas proyecciones futuras que se deberían tener en cuenta. Por ello, sería necesario escalar industrialmente la producción de los sistemas, así como comprobar su uso en cultivos intensivos. Además,

sería conveniente la búsqueda de otros procesados, como la compresión, que eviten el uso de plastificantes para acortar el tiempo de procesado.

Concluding thoughts

This doctoral thesis has generated a new concept of fertilization, more efficient and less polluting, which is a key starting point for intensive horticulture that arises in these times. Thus, this work has allowed the development of a biodegradable and sustainable controlled release system (matrix) that efficiently supplies micronutrients to horticultural crops.

Firstly, it has been possible to revalue a protein-rich soy by-product as a raw material for the development of the matrix that favors the circular economy, which is very beneficial at an industrial level, reducing the carbon footprint of the product and the waste generation. In this way, a simple system has been proposed to close the cycle of a product that comes from one crop and ends up as fertilizer for another, this being an objective highly pursued by the Sustainable Development Goals of the 2030 Agenda.

Regarding the processing method, the use of a plasticizer (glycerol) in a 1:1 ratio with the soy protein isolate and injection molding (with 300 s of compaction and a molding temperature of 90 °C) followed by a dehydrothermal treatment at 50 °C for 24 h have been key to achieve bioplastic matrices with the incorporated micronutrient. As for the salt, the sulfate was the most suitable for the incorporation of the micronutrient, showing the most suitable properties for controlled release. However, plasticizer removal was necessary to ensure proper controlled release. In this sense, the incorporation of an ethanol immersion stage followed by freeze-drying of the system (optimized method A) was key to obtaining matrices that allowed the controlled release of micronutrients, since it allowed the plasticizer removal

without dragging the incorporated micronutrient that remains homogeneously in the matrix. In this way, the horticultural crops were correctly adapted to the biodegradation times of the matrices and the release rate of the micronutrients. In addition, its easy manufacture allows great versatility, since it allows conferring different ranges of biodegradability, release and nutrient load. Thus, they can be used in all types of crops, from fast-growing crops such as lettuce, pepper or courgette to slower crops such as tomato, carrot and onion.

Finally, the use of nanoparticles as carriers of the micronutrient improved the functional properties of the systems, allowing better assimilation of the micronutrients by the plants, as well as a reduction in the amount of irrigation required.

In conclusion, two systems are proposed as the most prosperous at the industrial level: (i) the one with incorporated sulfate, which improves the assimilation efficiency of conventional salts, being an affordable and competitive product compared to conventional fertilization; and (ii) one that incorporates nanoparticles, being a more exclusive product that provides better benefits and can be industrialized as a high-end product.

However, citing Aristotle "it is of vital importance for those who wish to achieve certainty in his investigation, to know how to doubt all the time". In this sense, this thesis is only the beginning of a long road and there are many future projections that should be considered. For this reason, it would be necessary to industrially scale the production of the systems, as well as verify their use in intensive crops. In addition, it would be convenient to search for other process methodologies, such as compression, that avoid the use of plasticizers to shorten the processing time.

Glosario de abreviaciones

AA: Actividad antioxidante

CAA: Capacidad de absorción de agua

CuO: Óxido de cobre

CuSO₄: Sulfato de cobre

DHT: Tratamiento dehidrotérmico

DRX: Difracción de rayos X

DSC: Calorimetría diferencial de barrido

E: Módulo de Young

E': Módulo elástico

E'': Módulo viscoso

EDAX: Análisis dispersivo de energía de rayos X

FeO: Óxido de hierro(II)

FeSO₄: Sulfato de hierro(II)

FTIR: Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier

Gly: Glicerina

H₂O: Agua

M: Matriz dosificadora

MBP: Matriz bioplástica

MH: Matriz hinchada

MI: Moldeo por inyección

MN: Micronutriente

MnO: Óxido de manganeso

MnSO₄: Sulfato de manganeso

NP: Nanopartícula

pI: Punto isoeléctrico

PMS: Pérdida de material soluble

SEM: Microscopía electrónica de barrido

SPI: Aislado proteico de soja

tan δ : tangente de pérdidas

TEM: Microscopía electrónica de transmisión

TGA: Análisis termogravimétrico

TPC: Contenido total de polifenoles

US: Ultrasonidos

ZnO: Óxido de zinc

ZnSO₄: Sulfato de zinc

ϵ_{crit} : deformación crítica

ϵ_{max} : deformación a la rotura

σ_{max} : esfuerzo máximo

ANEXO I: RELACIÓN DE PUBLICACIONES DE LA TESIS DOCTORAL

En este anexo se encuentra la relación de artículos relacionados con la presente tesis doctoral. Todos ellos tienen un código QR con el que acceder a él a través de un dispositivo móvil y un hipervínculo (pinchando el código) que direcciona hacia la publicación.

1) Jiménez-Rosado, M., Pérez-Puyana, V., Cordobés, F., Romero A. y Guerrero, A. (2018). Development of soy protein-based matrices containing zinc as micronutrient for horticulture. *Industrial Crops and Products*, 121, 345-351.



2) Jiménez-Rosado, M., Perez-Puyana, V., Cordobés, F., Romero, A. y Guerrero, A. (2019). Development of superabsorbent soy protein-based bioplastic matrices with incorporated zinc for horticulture. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99, 4825-4832.



3) Jiménez-Rosado, M., Alonso-González, M., Aguilar, J.M., Cordobés, F. y Romero, A. (2019). Desarrollo de matrices bioplásticas superabsorbentes de proteína de soja con micronutriente incorporado para su uso en horticultura. *Afinidad*, 76, 254-261.



4) Jiménez-Rosado, M., Bouroudian, E., Perez-Puyana, V., Guerrero, A. y Romero, A. (2020). Evaluation of different strengthening methods in the mechanical and functional properties of soy protein-based bioplastics. *Journal of Cleaner Production*, 262, 121517.



5) Jiménez-Rosado, M., Rubio-Valle, J. F., Perez-Puyana, V., Guerrero, A. y Romero, A. (2020). Use of heat treatment for the development of protein-based bioplastics. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 18, 100341.



6) Jiménez-Rosado, M., Perez-Puyana, V., Rubio-Valle, J.F., Guerrero, A. y Romero, A. (2020). Evaluation of superabsorbent capacity of soy protein-based bioplastic matrices with incorporated fertilizer for crops. *Journal of Polymers and the Environment*, 28, 2661-2668.



7) Jiménez-Rosado, M., Martín, A., Alonso-González, M., Guerrero, A. y Romero, A. (2020). Functional biodegradable protein-based matrices as a potential candidate for micronutrients and water supply. *Polymer Engineering & Science*, 60, 2285-2291.



8) Jiménez-Rosado, M., Perez-Puyana, V., Rubio-Valle, J.F., Guerrero, A. y Romero, A. (2020). Processing of biodegradable and multifunctional protein-based polymer materials for the potential controlled release of zinc and water in horticulture. *Journal of Applied Polymer Science*, 137, 49419.



9) Jiménez-Rosado, M., Alonso-González, M., Rubio-Valle, J.F., Perez-Puyana, V. y Romero, A. (2020). Biodegradable soy protein-based matrices for the controlled release of zinc in horticulture. *Journal of Applied Polymer Science*, 137, 49187.



10) Jiménez-Rosado, M., Perez-Puyana, V., Guerrero, A. y Romero, A. (2021). Bioplastic matrices for sustainable agricultural and horticultural applications. *Bioplastics for Sustainable Development*. Singapour: Springer.



11) Jiménez-Rosado, M., Rubio-Valle, J. F., Perez-Puyana, V., Guerrero, A. y Romero, A. (2021). Comparison between pea and soy protein-based bioplastics obtained by injection molding. *Journal of Applied Polymer Science*, 138, 50412.



12) Jiménez-Rosado, M., Rubio-Valle, J.F., Perez-Puyana, V., Guerrero, A. y Romero, A. (2021). Eco-friendly protein-based materials for a sustainable fertilization in horticulture. *Journal of Cleaner Production*, 286, 124948.



13) Jiménez-Rosado, M., Perez-Puyana, V., Guerrero, A. y Romero, A. (2021). Controlled release of zinc from soy protein-based matrices to plants. *Agronomy*, 11, 580.



14) Jiménez-Rosado, M., Perez-Puyana, V., Sanchez-Cid, P., Guerrero, A. y Romero, A. (2021). Incorporation of ZnO nanoparticles into soy protein-based bioplastics to improve their functional properties. *Polymers*, 13, 486.



15) Jiménez-Rosado, M., Maigret, J.-E., Perez-Puyana, V., Romero, A. y Lourdin, D. (2022). Revaluation of a soy protein by-product in eco-friendly bioplastics by extrusion. *Journal of Polymers and the Environment*, 30, 1587-1599.



16) Jiménez-Rosado, M., Maigret, J.E., Lourdin, D., Guerrero, A. y Romero, A. (2022). Injection molding versus extrusion in the manufacturing of soy protein-based bioplastics with zinc incorporated. *Journal of Applied Polymer Science*, 139, 51630.



17) Jiménez-Rosado, M., Gomez-Zavaglia, A., Guerrero, A. y Romero, A. (2022). Green synthesis of ZnO nanoparticles using polyphenol extracts from pepper waste (*Capsicum annum*). *Journal of Cleaner Production*, 350, 131541.



18) Jiménez-Rosado, M., Perez-Puyana, V., Guerrero, A. y Romero, A. (2022). Micronutrient-controlled-release protein-based systems for horticulture: micro vs. nanoparticles. *Industrial Crops and Products*, 185, 115128.



19) Jiménez-Rosado, M., Di Foggia, M., Rosignoli, S., Guerrero, A., Rombolà, A. y Romero, A. (2022). Effect of zinc and protein content in different barley varieties: Use of controlled release matrices. *Agronomy*, UNDER REVIEW.