

Informe Científico de Beca de Entrenamiento

Desarrollo de contenedores biodegradables basados en gelatina con liberación controlada de fertilizantes

Director de beca: Dra. Barbosa Silvia

Dra. Castillo Luciana

Autor: Poggio Franco

Período: 10/2015-10/2016

Introducción

La estabilidad química que hace del polímero sintético un material ideal para muchas aplicaciones, es aquella también que puede generar serios problemas cuando éste es desechado. Debido a la elevada resistencia del polímero a la degradación microbiana, este material no es fácilmente biodegradable y, por lo tanto, se acumula en el medio ambiente [1]. A su vez, como consecuencia del carácter no renovable de los recursos petroleros, se ha incrementado el interés en el empleo de polímeros biodegradables y, en particular, aquellos de origen renovable [2,3]. En los últimos años, se están estudiando las proteínas de origen animal y vegetal como materias primas adecuadas para el desarrollo de biopolímeros debido al bajo costo y alta disponibilidad de las mismas [4].

La gelatina (Ge) es una proteína animal derivada de la hidrólisis parcial del colágeno, uno de los constituyentes más abundantes en los tejidos conectivos de los mamíferos y peces. Además, la gelatina al mezclarse con un mínimo de agua u otros plastificantes, reduce su temperatura de transición vítrea, lo que facilita la deformación y procesabilidad sin degradarse térmicamente. Esto implica que se pueden utilizar los mismos métodos que se emplean tradicionalmente para polímeros termoplásticos, tales como la extrusión o inyección, permitiendo obtener materiales a gran escala utilizando el equipamiento preexistente [5].

Particularmente, la inherente biodegradabilidad de la gelatina la convierte en un material muy atractivo para ser utilizado en el desarrollo de macetas o contenedores para diferentes cultivos ya que permitiría que puedan ser trasplantados a la tierra directamente, sin necesidad de retirar el recipiente. Por otra parte, la incorporación de fertilizantes en la formulación de los contenedores biodegradables permitiría incrementar la eficiencia de absorción de los nutrientes por parte de la planta ya que se evitarían pérdidas por escorrentía superficial, lixiviación y vaporización. Además, la biodegradabilidad de la gelatina favorecería la liberación controlada de los fertilizantes incluidos en su formulación. Ambas ventajas de los contenedores biodegradables basados en gelatina le permitirían competir económicamente en el mercado [6].

Objetivo

El objetivo principal de este trabajo es desarrollar contenedores biodegradables basados en gelatina (Ge) con liberación controlada de fertilizantes (urea). Estos deberán ser estables en condiciones previas al trasplante (condiciones de vivero), y una vez llevados al suelo, deberán degradarse y liberar los nutrientes de manera regulada.

Para alcanzar este objetivo resulta necesario evaluar la influencia de la urea sobre la Ge, para luego seleccionar las formulaciones de Ge - solución de urea (U) que permitan establecer las condiciones óptimas de procesamiento y buenas prestaciones mecánicas. Además, se emplearán distintas técnicas de procesamiento para determinar la operación adecuada para la obtención del recipiente.

Materiales y técnicas experimentales

El trabajo consta de dos secciones: la primera comprende la optimización de la formulación de gelatina (Ge) - solución de urea (U) en función de las propiedades de flujo que permitan su mezclado e inyección y de las prestaciones mecánicas necesarias para la aplicación como contenedor. La segunda sección tiene como objetivo evaluar diferentes técnicas de procesamiento para la obtención del recipiente.

Materiales

Para las formulaciones se empleó gelatina bovina 150 H (Ge, punto isoeléctrico Ip: 5,1), provista por Rousselot (Buenos Aires, Argentina). La solución de urea 8M (U) que sirvió como plastificante se obtuvo a partir de urea granulada suministrada por PROFERTIL S.A (Bahía Blanca, Argentina) [7].

Técnicas Experimentales

- *Obtención de las mezclas de gelatina*

Cada una de las formulaciones desarrolladas en la primera sección del trabajo se obtuvieron a partir de 5 g de Ge y diferentes cantidades de U o agua destilada (30, 40 y 50 % p/p de solución en base seca de Ge). En la **Tabla 1** se muestran las nomenclaturas de las mezclas estudiadas. A fines comparativos y con el objetivo de comprender el efecto de la urea sobre la Ge se obtuvieron muestras con 40 % p/p de agua destilada.

Nomenclatura	Ge (g)	Fase Líquida (g)
Ge + 30 % U	5,00	1,50
Ge + 40 % U	5,00	2,00
Ge + 50 % U	5,00	2,50
Ge + 40 % H ₂ O	5,00	2,00

Tabla 1. Nomenclatura y contenido de Ge y de fase líquida de las muestras.

El proceso de obtención de las muestras a base de gelatina comprendió por tres etapas. Inicialmente, para lograr una mezcla homogénea e hidratar la Ge, se realizó un mezclado manual durante 15 minutos de los componentes (Ge y U) a temperatura ambiente. La segunda etapa consistió en procesar el material homogéneo en una mezcladora-inyectora (Atlas-Laboratory MiniMixer/Minimolder, **Figura 1a**) a 60 °C y 100 rpm durante 20 minutos. La última etapa fue la de inyección del material mezclado, obteniendo probetas rectangulares (75 mm x 12mm x 3mm, **Figura 1b**) o circulares (diámetro: 25 mm, espesor: 3 mm, **Figura 1c**). Una vez retirada la probeta del molde, la misma se colocó en una bolsa sellada de polietileno en una heladera a 4 °C hasta el momento de ser utilizada para evitar el envejecimiento.

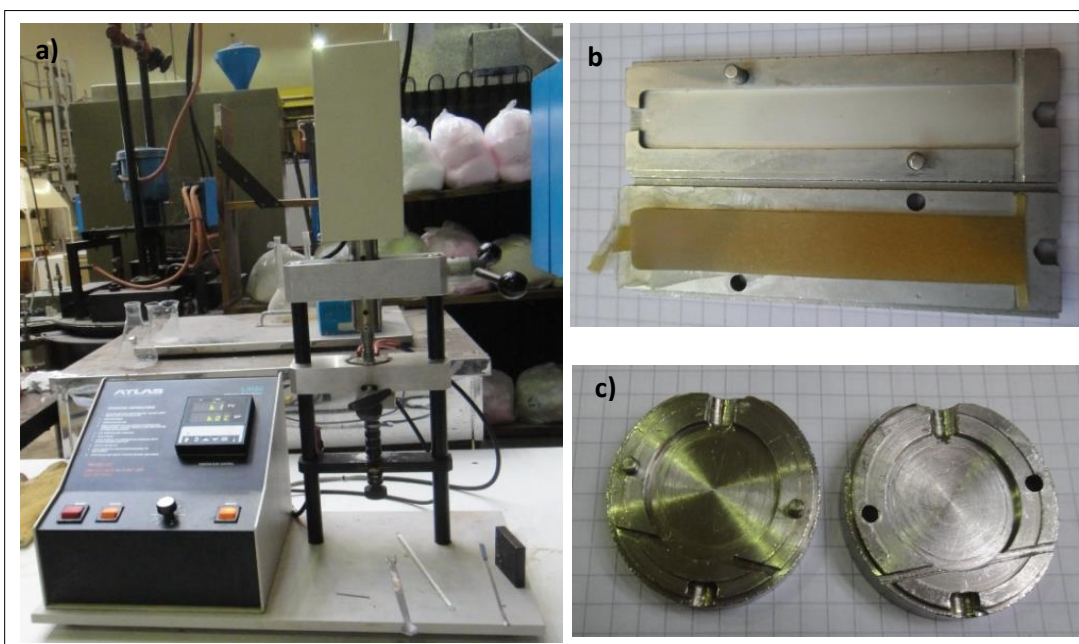


Figura 1. a) Mezcladora-inyectora para la obtención de las probetas. b) Molde rectangular. c) Molde circular.

Para la segunda sección del trabajo se utilizó una mezcladora en fundido (Brabender) de manera de obtener una mayor cantidad de mezcla. Las condiciones de procesamiento fueron 30 minutos de mezclado a una velocidad de 50 rpm, habiendo realizado un premezclado de los componentes durante 15 minutos. Posteriormente, a partir de las mezclas, se propusieron dos formas de obtener el recipiente. Una de las alternativas fue la termocompresión de las formulaciones para desarrollar láminas en una prensa calefactora, que luego fueron termoformadas. La otra opción consistió en el empleo de un molde macho-hembra especialmente construido para este fin (**Figura 2**) que se colocó sobre una placa calefactora a

90 °C. Por el propio peso del macho, no es necesario aplicar presión externa. A medida que la mezcla fluye, el material adopta la forma del molde.



Figura 2. Dispositivo especialmente construido empleado para el moldeo.

- *Acondicionamiento de las muestras*

Para la realización de los distintos ensayos, las mezclas de gelatina se acondicionaron a una humedad relativa controlada (60 %) en el interior de un contenedor con solución de glicerol-agua preparada según la norma ASTM D5032-97.

- *Estudio reológico*

Con el fin de conocer las propiedades de flujo de las formulaciones Ge-U, se realizaron barridos en frecuencia con un rango de 0,01-100 Hz a una temperatura de 60°C en un reómetro (ARG2, TA Instruments) con geometría de platos paralelos (diámetro: 2,5 cm) y una deformación del 0,05%.

Dado que en trabajos preliminares se determinó la influencia de la pérdida de humedad durante el ensayo reológico [8], se decidió llevar a cabo la misma metodología empleando una delgada capa de polidimetilsiloxano (PDMS, Petrarch Systems Inc.) de aproximadamente 1 mm sobre el borde expuesto de la muestra.

- *Propiedades mecánicas*

Los ensayos de tracción se llevaron a cabo en un equipo Instron 3369 (Darmstadt, Alemania) con una celda de 50 kN, a una velocidad de 10 mm/min y a temperatura

ambiente. Las muestras fueron acondicionadas a 60% HR durante una semana previa al ensayo. Se determinó el módulo elástico como el promedio de cinco réplicas para cada una de las formulaciones de gelatina.

- *Contenido de humedad (MC)*

Se determinó el contenido de humedad de las muestras estabilizadas durante dos semanas en una cámara con humedad relativa del 60 %. Al cabo de ese tiempo, las muestras se pesaron en una balanza de laboratorio (Explorer Pro Ohaus) registrando su masa estabilizada (m_s). Luego se las llevó a una estufa de vacío a 105 °C durante 24 horas y se las pesó nuevamente (m_h).

Para determinar el contenido de humedad, se utilizó la *Ecuación (1)* que es una relación entre la masa de muestra seca respecto a la masa estabilizada.

$$MC (\%) = \frac{m_h - m_s}{m_h} * 100 \quad (1)$$

Resultados y Discusiones

Primera Parte

En esta primera sección se buscó determinar la formulación de Ge-U óptima para la aplicación, a partir del estudio de sus propiedades de flujo y mecánicas.

- ***Obtención de las mezclas de gelatina***

Las condiciones de procesamiento de las muestras se determinaron a partir de ensayos exploratorios. Los porcentajes de solución de urea utilizados fueron 30, 40 y 50 % p/p en base seca de Ge. En el caso de cantidades de fase líquida menores a 30 % p/p, el mezclado resultaba ineficiente, quedando granos de Ge que dificultaban la posterior inyección. Para porcentajes de solución mayores al 50 % se obtenían mezclas muy flexibles que se deformaban fácilmente cuando se las retiraba del molde.

A partir de estudios previos realizados en el grupo de investigación, el tiempo de mezclado óptimo para mezclas de Ge plastificada era de 45 minutos [8]. Particularmente, en las formulaciones con solución de urea, el tiempo de mezclado se redujo a 20 minutos debido a que la presencia de la solución endurecía la mezcla, consiguiendo de esta manera un mezclado adecuado y condiciones de inyección apropiadas.

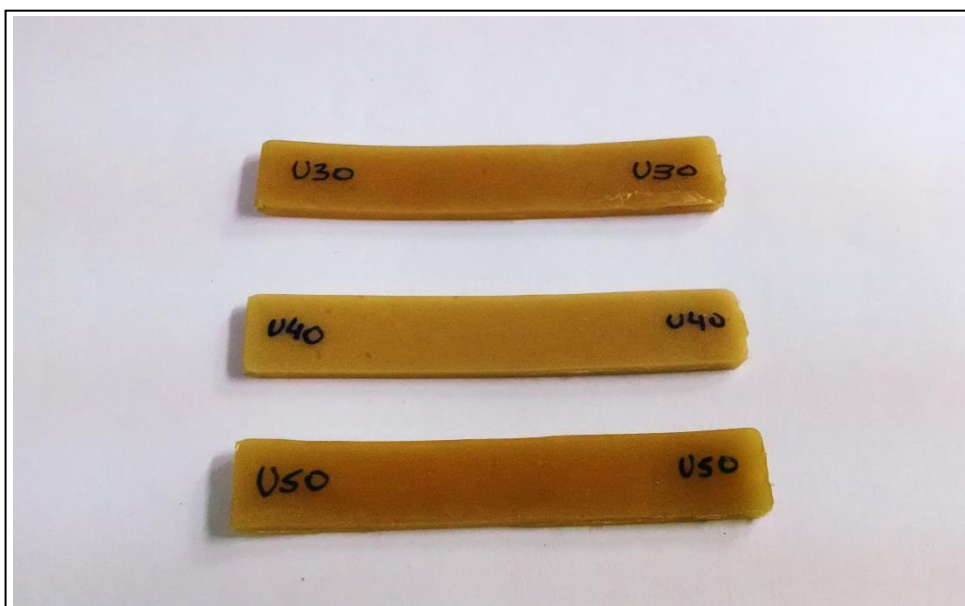


Figura 3. Barras de Ge con distintos porcentajes de U, estabilizadas durante una semana a 60% HR.

Las diferentes formulaciones de gelatina no presentaron diferencias significativas en cuanto a su aspecto (**Figura 3**). Sin embargo, las mezclas Ge + 30 % U resultaron ser las más rígidas al ser manipuladas, mientras que las que contienen el mayor porcentaje de solución (Ge + 50 % U) presentaron una mayor flexibilidad.

- *Ensayos reológicos*

Para determinar las propiedades de flujo de las mezclas, se realizaron barridos en frecuencia con un rango de 0,01-100 Hz a una temperatura de 60 °C. Las respuestas de las muestras ante esfuerzos de corte oscilatorios fueron repetitivas en todos los casos y se muestran en la **Figura 4**.

Se observó que un aumento en la cantidad de solución de urea (mayor cantidad de agua presente en las mezclas), la viscosidad disminuyó notablemente. Esta reducción se explicó debido a que el agua actuó como plastificante, restringiendo así la regeneración de las triples hélices originadas por uniones de hidrógeno, lo que interrumpe las interacciones entre las cadenas proteicas. Durante el procesamiento se evidenció que al aumentar el contenido de la fase líquida, la inyección de las mezclas resultó más sencilla debido a una viscosidad menor de las mismas.

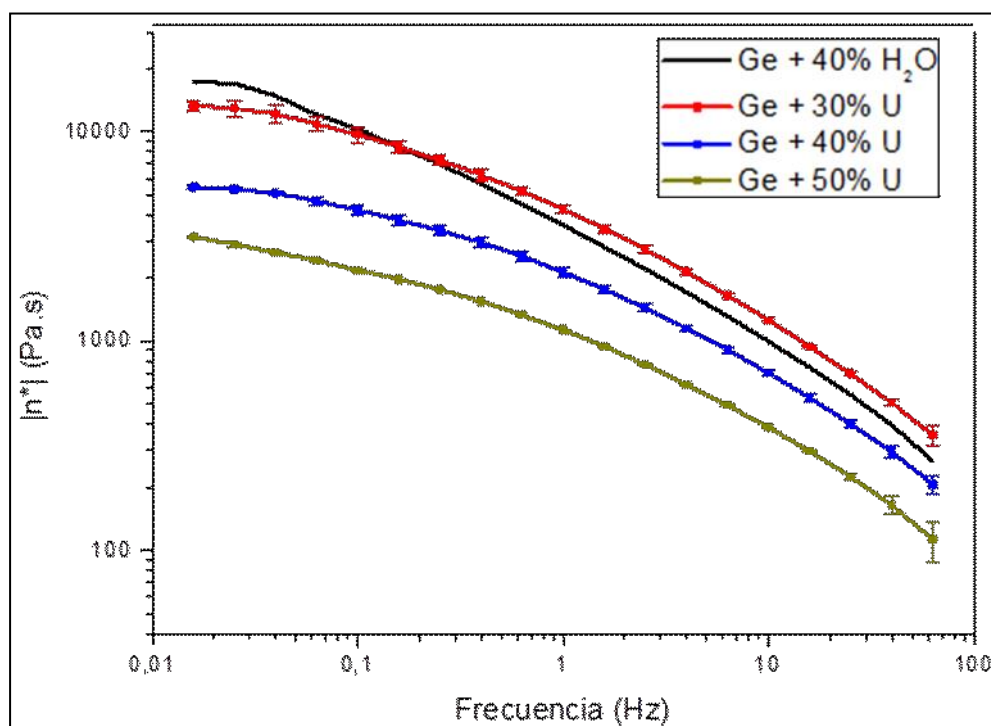


Figura 4. Viscosidad compleja (n^*) vs frecuencia para las distintas formulaciones de gelatina.

Se analizaron comparativamente las mezclas conteniendo de 40 % de agua destilada y 40% de solución de urea, respectivamente, y se observó que para valores altos de frecuencia de oscilación los comportamientos de las muestras fueron similares. Esta observación indicó que el agregado de urea no modificó significativamente la macroestructura de la mezcla a base de Ge. Sin embargo, el comportamiento fue disímil entre las muestras cuando se realizó el análisis a nivel microestructural (frecuencia con valores pequeños). Esta diferencia podría deberse a que la urea probablemente impidió las interacciones del tipo puente hidrógeno entre las cadenas de gelatina y, sumado al efecto plastificante del agua de la solución, se obtuvo una mezcla con una viscosidad menor.

- *Contenido de humedad*

Se determinó el contenido de humedad de las muestras Ge-U acondicionadas dos semanas a 60 % de humedad relativa. Los resultados obtenidos de este estudio se muestran en la **Figura 5**, a partir de los cuales se observó que las muestras con mayor contenido de U tuvieron un incremento en el contenido de humedad. Este resultado se debe al carácter hidrofílico de la urea presente en la matriz y no a la mayor cantidad de fase líquida, ya que las mezclas fueron acondicionadas a la misma humedad. La variación que se observó entre las muestras con igual contenido de fase líquida (40 %) fue insignificante.

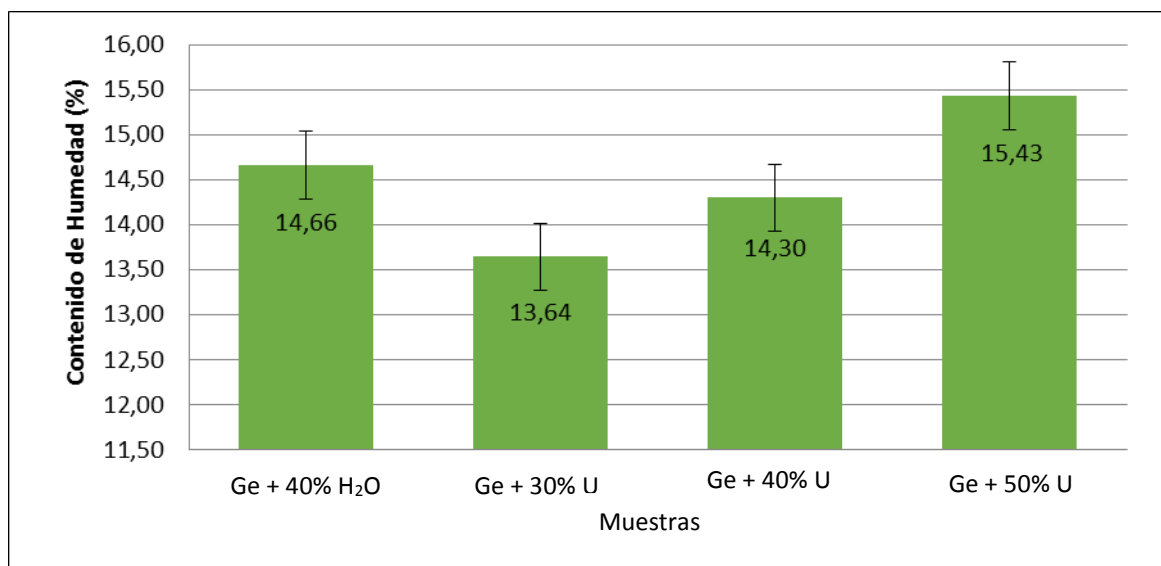


Figura 5. Contenido de humedad para las distintas mezclas de Ge-U (8 M) y muestra control con agua destilada (Ge + 40 % H₂O).

- **Propiedades mecánicas**

Con el objetivo de cuantificar la diferencia en rigidez que se observó entre las mezclas, se llevaron a cabo ensayos de tracción a una velocidad de 10 mm/min. Esta velocidad fu seleccionada debido a que en ensayos exploratorios a 50 mm/min, las muestras se fracturaron rápidamente con una pequeña deformación, por lo que se decidió reducir la velocidad del ensayo. Además, los extremos de las probetas se recubrieron con cinta de papel para mejorar el agarre de las mordazas del equipo. Sin embargo, a altos valores de deformación, las muestras se deslizaron de la mordaza inferior (**Figura 6**). Este escenario estuvo presente en todas las réplicas, como se puede observar en la **Figura 7**, pero dado que lo que se buscó determinar fue el módulo elástico y no la deformación o resistencia a la rotura, el deslizamiento de las probetas a altas deformaciones no resultó relevante en el análisis.

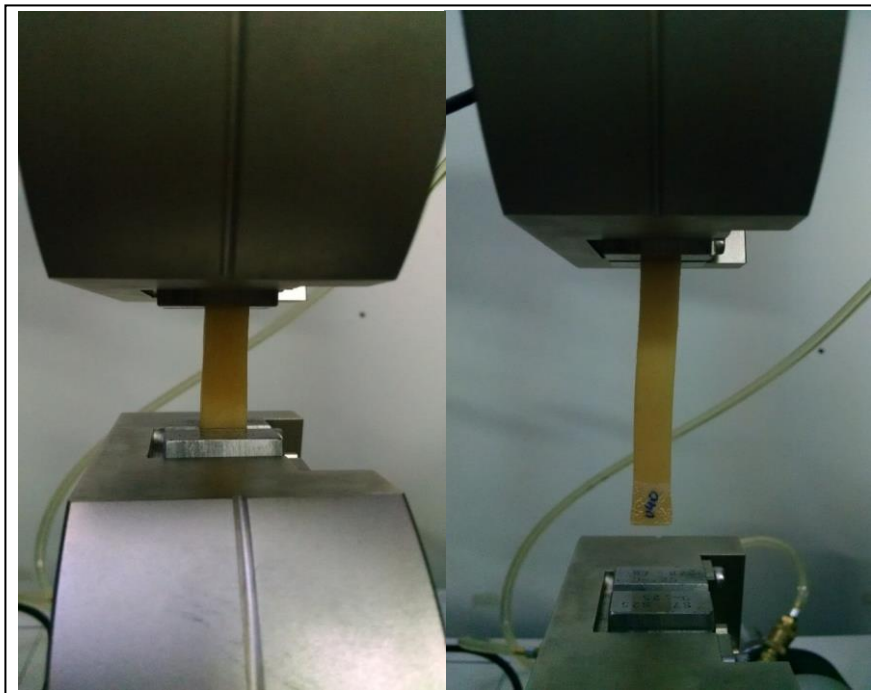


Figura 6. Posición inicial y final del ensayo de tracción para la mezcla Ge + 40 % U.

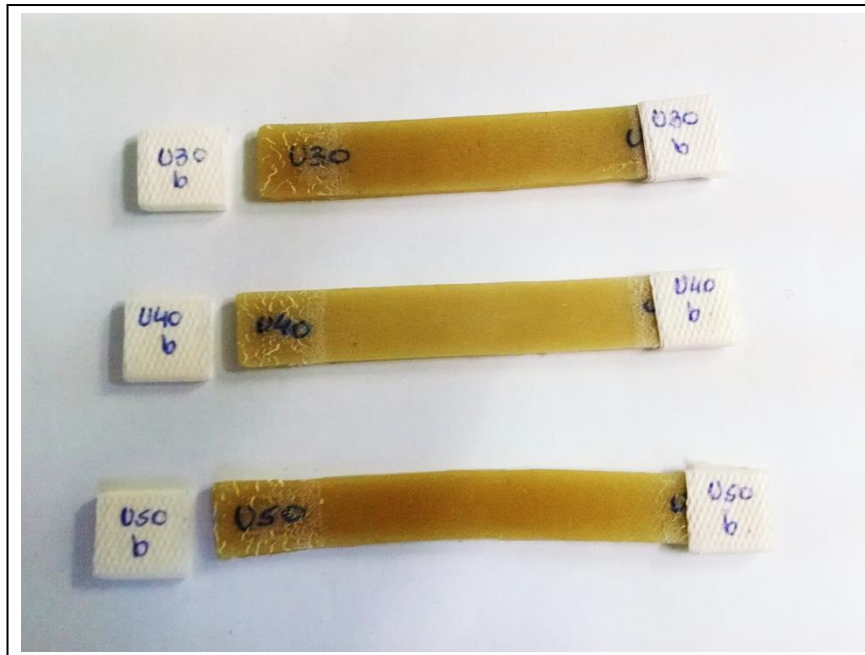


Figura 7. Probetas de las formulaciones de gelatina al finalizar el ensayo de tracción.

Los resultados obtenidos en el ensayo mecánico se muestran en la **Tabla 2**. La muestra con menor contenido de U (Ge + 30 % U) resultó tener un módulo elástico 114 % mayor que la muestra Ge + 40 % U. En cambio, la muestra con mayor cantidad de fase líquida (Ge + 50 % U) presentó un módulo que es prácticamente el 60 % del valor del de la muestra con 40 % de solución de urea.

Tabla 2. Valores del módulo elástico para las muestras.

Muestra	Módulo elástico (MPa)
Ge + 30 % U	$5,70 \pm 1,20$
Ge + 40 % U	$2,68 \pm 0,38$
Ge + 50 % U	$1,59 \pm 0,06$

El objetivo de la primera parte del trabajo fue determinar la formulación con el mayor contenido de urea posible, de manera tal que la inyección fuera sencilla y que se alcanzaran las prestaciones mecánicas deseadas para la aplicación propuesta. A partir de los resultados obtenidos, se encontró que si bien la mezcla conteniendo 50 % U era la que mayor cantidad de fertilizante presentaba y la que más fácilmente se inyectaba, el módulo elástico era inferior al valor requerido. La formulación Ge + 50 % U resultó ser muy flexible, por lo que no fue considerada ya que no soportaría el peso de la tierra que contendría el

recipiente. Frente a esta situación, la mezcla que reunió las características deseadas fue la Ge + 40% U. En este sentido, esta formulación presentó un valor medio de viscosidad tal que la inyección resultó sencilla así como también un módulo elástico y una flexibilidad apropiada para la aplicación.

Segunda Parte

Esta sección se llevó a cabo una vez seleccionada la formulación óptima de Ge + U, y tuvo como objetivo estudiar las posibles técnicas de procesamiento para obtener el contenedor deseado.

En el moldeo a partir de una lámina prensada se tuvieron serios inconvenientes al momento de realizar el desmolde. Como se puede apreciar en la **Figura 8**, en los laterales del contenedor se formaban pliegues sin lograr la uniformidad. En cambio, los resultados obtenidos al emplear el termomoldeo de la mezcla empleando un molde macho-hembra fueron satisfactorios. En tal sentido, se obtuvieron contenedores de espesor uniforme, con paredes conformadas correctamente, sencilla procesabilidad y desmolde, con mínima ocurrencia de fallas. En la **Figura 9** se muestran los resultados obtenidos hasta determinar las condiciones óptimas de moldeo, mientras que en la **Figura 10** se presenta el prototipo obtenido del contenedor a partir de la mezcla de gelatina Ge + 40 % U.



Figura 8. Recipiente obtenido a partir del termo-moldeo de una lámina prensada.

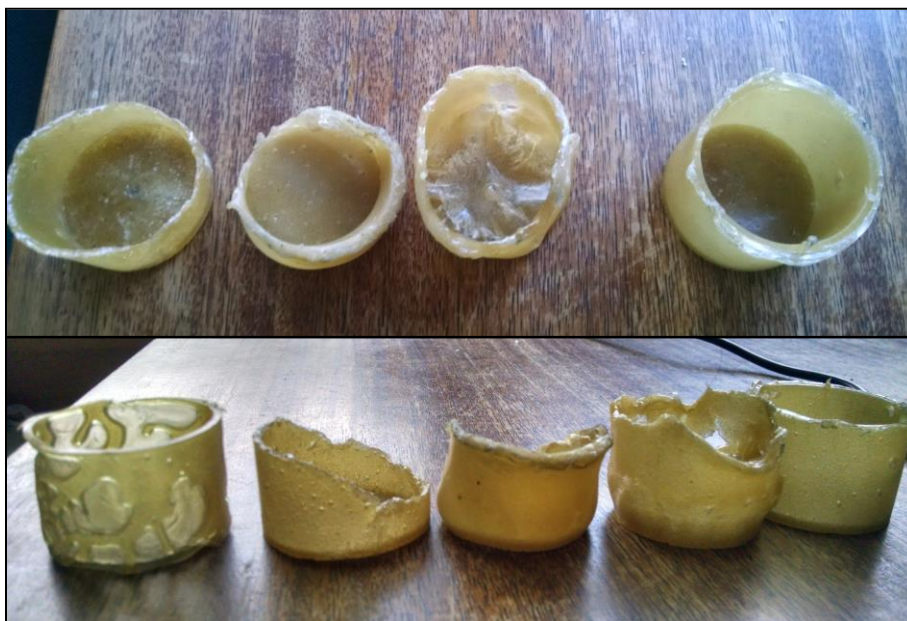


Figura 9. Recipientes obtenidos por termo-moldeado de la mezcla de gelatina.



Figura 10. Recipiente de gelatina enriquecida con urea aplicando la segunda técnica.

Conclusiones

Los resultados obtenidos a partir del plan de trabajo propuesta para la beca sugieren la factibilidad de emplear una matriz de gelatina enriquecida con una solución de urea para el desarrollo de contenedores biodegradables con liberación de fertilizantes.

Se determinó que la formulación de gelatina que combinó las características deseadas fue la mezcla Ge + 40% U, la cual presentó un valor medio de viscosidad tal que la inyección resultó sencilla con un módulo elástico apropiado para la aplicación. Además, se determinó una técnica sencilla para la obtención del recipiente, con mínimas fallas. Como trabajo futuro se deben realizar estudios adicionales para determinar la velocidad de liberación de la urea a partir de los contenedores a base de gelatina.

Cabe destacar que con los resultados de este trabajo se presentaron 2 trabajos en congresos nacionales y se redactó una publicación en una revista internacional de divulgación científica. Los trabajos se listan a continuación. Por otra parte, se está redactando un trabajo para ser publicado en una revista científica internacional.

F. Poggio, E.M. Ciannamea, L.A. Castillo, S.E. Barbosa. Desarrollo de recipientes activos y biodegradables para cultivos agrícolas. *Avances en Ciencias e Ingeniería*, 7(2) (**2016**), 17-25.

F. Poggio, E.M. Ciannamea, L.A. Castillo, S.E. Barbosa. Desarrollo de recipientes biodegradables con liberación controlada de fertilizantes. *5° Encuentro de Jóvenes Investigadores en Ciencia y Tecnología de Materiales (JIM 2015)*.

F. Poggio, E.M. Ciannamea, L.A. Castillo, S.E. Barbosa. Desarrollo de recipientes biodegradables basados en gelatina para liberación controlada de fertilizantes. *Simposio Argentino de Polímeros (SAP 2015)*.

Bibliografía

1. **Vroman I.** y Tighzert L. A review from biodegradable polymers. *Materials*, 2 **(2009)**, 307-344.
2. **Bigi A.**, Bracci B., Cojazzi G., Panzavolta S., Roveri N. Drawn gelatin films with improved mechanical properties. *Biomaterials* 19 **(1998)** 2335-2340.
3. **Yu L.**, Dean K., Li L. Polymer blends and composites from renewable resources. *Progress in Polymer Science* 31 **(2006)**, 576-602.
4. **Sahoo S.**, Behera A., Mohan Nanda R., Sahoo R., and Nayak P. L. Gelatin blended with Cloisite 30B (MMT) for control release of Ofloxacin, *American Journal of Scientific and Industrial Research*, **(2011)**, 363-368.
5. **Hernandez-Izquierdo**, V.M.; Krotcha J.M. Thermoplastic processing of proteins for film formation- a review. *Journal of Food Science*, 73(2) **(2008)**, R30.
6. **Chiellini E.**, Cinelli P., Grillo Fernandes , Kenawy El Refaye S., Lazzeri A. Gelatin-based blends and composites. Morphological and Thermal Mechanical Characterization. *Biomacromolecules* 2 **(2001)**, 806-811.
7. www.profertil.com.ar
8. **Ciannanea E. M.**, Castillo L. A., Martucci J. F., Stefani P. M., Ruseckaite R. A., Barbosa S. E. Rheological studies of gelatin formulations: influence of testing conditions on the results accuracy. *XIVSLAP/XII CIP* **(2014)**.