

04-001

EVALUATION OF DIFFERENT METHODS OF ZINC INCORPORATION INTO SOY PROTEIN-BASED MATRICES FOR USE IN HORTICULTURE

Jiménez Rosado, Mercedes; Pérez Puyana, Víctor; Cordobés Carmona, Felipe; Romero García, Alberto; Guerrero Conejo, Antonio

Universidad de Sevilla

Protein-based matrices, due to their technological, economic and environmental benefits, are potentially attractive for the incorporation and subsequent release of micronutrients that are essential for the health and development of plants, such as zinc, avoiding the typical excesses of conventional fertilizers. Specifically, soy protein isolate (SPI), obtained as a by-product of the industrial production of soy oil, seems to be an adequate resource to produce these natural matrices due to its hydrophilicity and excellent processability when combined with a plasticizer. In addition, due to it comes from a by-product of the agri-food industry, its added value is increased, and its life cycle is closed when it returns to nature after biodegrading. The objective of this work is the evaluation of different methods of incorporation of a selected micronutrient (Zinc), in soy protein-based matrices. The results confirm that large amount of micronutrient can be incorporated in the matrices, with their mechanical properties, microstructure and level of loading depending on the method used. In all cases, the results show a great potential for the use of matrices as a source of micronutrient supply in horticulture.

Keywords: *matrices; micronutrients; soy; zinc; horticulture*

EVALUACIÓN DE DIFERENTES MÉTODOS DE INCORPORACIÓN DE ZINC A MATRICES PROTEICAS DE SOJA PARA SU USO EN HORTICULTURA

Las matrices proteicas, debido a sus beneficios tecnológicos, económicos y medioambientales son potencialmente atractivas para la incorporación y subsecuente liberación de micronutrientes que son esenciales para la salud y desarrollo de las plantas, como el zinc, evitando los típicos excesos de fertilizantes convencionales. Concretamente, el aislado proteico de soja (SPI), obtenido como subproducto de la producción industrial de aceite de soja, parece ser un recurso adecuado para la elaboración de estas matrices naturales debido a su carácter hidrofílico y su excelente procesabilidad cuando se combinan con un plastificante. Además, debido a que proviene de un subproducto de la industria agroalimentaria, se aumenta su valor añadido y se cierra su ciclo de vida al volver a la naturaleza después de biodegradarse. El objetivo de este trabajo es la evaluación de diferentes métodos de incorporación de un micronutriente seleccionado (Zinc), en matrices de proteína de soja. Los resultados confirman que se pueden incorporar grandes cantidades de micronutrientes en las matrices, siendo sus propiedades mecánicas, microestructura y nivel de carga dependientes del método usado. En todos los casos, los resultados muestran un gran potencial para el uso de matrices como fuente de suministro de micronutrientes en horticultura.

Palabras clave: *matrices; micronutrientes; soja; zinc; horticultura*

Correspondencia: Mercedes Jiménez Rosado mjimenez42@us.es

Acknowledgements/Agradecimientos: Este trabajo forma parte de un proyecto financiado por MINECO/FEDER (Ref. CTQ2015-71164-P). Los autores agradecen su apoyo financiero. Además, los autores agradecen la beca predoctoral de Mercedes Jiménez-Rosado (FPU2017/01718) concedida por el Ministerio



©2019 by the authors. Licensee AEIPRO, Spain. This article is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. Introducción

La horticultura es definida como aquella rama de la agricultura dedicada al crecimiento de plantas para el consumo humano, medicina y uso estético ("The Agricultural Act," 2014). Debido a la gran demanda en este sector en los últimos años, la horticultura se ha vuelto cada vez más dependiente de la ciencia y la tecnología para satisfacer las necesidades del mercado ("Specialty Crops Competitiveness Act," 2004). Según los últimos estudios realizados por FAOSTAT (Organismo de Estadística de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura), en 2013 la producción hortícola mundial fue cercana a los 2000 millones de toneladas, un 29,2% más que diez años atrás. Esta producción está liderada por China con 511,55 millones de toneladas, Estados Unidos (69,95), Brasil (46), Turquía (36,04), Italia (34,55) y España (30,35) (Hortoinfo, 2016). Según FEPEX (Federación Española de Asociaciones de Productores Exportadores de Frutas, Hortalizas, Flores y Plantas Vivas), en España, el consumo hortícola fue de 7155 millones de kilos en 2017, siendo las patatas frescas el producto más consumido (889 millones de kilos), seguido de cerca por las naranjas (734 millones de kilos) (FEPEX, 2018).

Esta alta demanda ha llevado a la necesidad de crear un sistema de plantación masiva, que tiene asociado la desventaja de la excesiva degradación de los suelos. Esta degradación hace que el suelo sea incapaz de realizar un reciclaje efectivo de nutrientes y energía que, consecuentemente, tienen que ser suministrados por una fuente externa de nutrientes (Hazell y Wood, 2008).

Los nutrientes son elementos necesarios por las plantas. Entre ellos, los micronutrientes, aunque se necesitan en pequeñas cantidades, son muy importantes en el crecimiento y desarrollo de las plantas. Hay siete micronutrientes esenciales en horticultura: hierro, cobre, boro, zinc, manganeso, molibdeno, níquel y cloro. Todos ellos tienen un papel importante en el crecimiento y desarrollo de las plantas (Alloway, 2008). Particularmente, el zinc (Zn) se requiere para la síntesis de triptófano, que a su vez es necesario para la formación del ácido indolacético y es esencial para varias metaloenzimas de las plantas necesarias para su crecimiento. Por otra parte, el zinc tiene un papel importante en la síntesis de ARN y proteínas (Uchida, 2000). El requerimiento de zinc en los cultivos es muy variado, aunque se puede estimar unos requerimientos generales de zinc entre 15-20 mg de zinc/kg de cultivo, siendo deficiente por debajo de este valor y tóxico por encima (Broadley et al., 2007). La deficiencia de zinc puede provocar pérdidas en el rendimiento y la calidad del cultivo, pudiendo causar en la mayoría de los casos un retraso en el crecimiento, clorosis, manchas marrones en las hojas y hojas distorsionadas. Tampoco se puede abusar de su uso, ya que llegar a niveles tóxicos puede provocar la retirada de los cultivos del mercado alimentario.

Normalmente, los micronutrientes son incorporados directamente en los sustratos en forma de sales para cubrir las carencias de los mismos, aunque esto causa problemas derivados de la baja asimilación por parte de la planta, ya que ésta solo asimila lo que necesita en ese preciso momento siendo el resto arrastrado por el agua del riego o la lluvia, lo que lleva a la contaminación de los suelos y aguas subterráneas por exceso de nutrientes (Muscanescu, 2013) Entre todas las sales incorporadas, las de zinc son las más solubles, por lo que son las que más problemas de arrastre por agua causan. Una posible alternativa que podría solucionar este inconveniente es el uso de matrices bioplásticas que contengan los micronutrientes necesarios, haciendo que estos se liberen de manera controlada durante la

degradación de la matriz o el riego de las plantas, incrementando así la eficiencia de asimilación por parte de la misma.

El término bioplástico se refiere a los materiales poliméricos que son obtenidos de fuentes renovables o que pueden exhibir una degradabilidad natural, lo que ayuda a eliminar su acumulación. Dentro de los bioplásticos, hay un grupo que está despertando gran interés debido a que presentan ambas características, como son las proteínas y los polisacáridos (Flieger et al., 2003). Además, hay una gran disponibilidad de estas materias primas, que pueden presentar un bajo coste si provienen de subproductos o residuos de la industria agroalimentaria, aumentando su valor añadido y potenciando la economía circular, ya que cierra el ciclo de vida de los bioplásticos al volver de nuevo a la naturaleza gracias a su excelente biodegradabilidad.

Concretamente, las matrices con base proteica están compuestas por una matriz polimérica y, en ciertos casos, algunos aditivos específicos. Además, aunque para su moldeo es necesario el uso de un plastificante, éste es eliminado de la matriz (una vez formada) a través de una inmersión en agua o secado. La soja (*Glycine max L. Merrill*) es una de las materias primas más utilizadas como base proteica para la producción de matrices debido a que es una fuente renovable y asequible (Cuadri et al., 2017; Felix et al., 2015; Fernández-Espada et al., 2016a; Guo et al., 2015). Además, la proteína de soja se obtiene como un co-producto de la industria del aceite de soja, lo que su uso en estos materiales le otorga un valor añadido (Song et al., 2011; Tian et al., 2010). Una de las ventajas de este material es su alto carácter hidrofílico, que es mayor al de otras proteínas, siendo capaz de absorber y retener agua del medio, manteniendo su integridad sin disolverse (Cuadri et al., 2018; Fernández-Espada et al., 2016a), pudiendo, así, servir como fuente de agua en momentos de sequía o en sitios con dificultad de regadío. Los plastificantes son agentes de bajo peso molecular, que tienen la habilidad de incrementar la movilidad de las cadenas proteicas, reduciendo el número de interacciones inter e intramoleculares y la temperatura de transición vítrea. La glicerina (Gly) es uno de los plastificantes más usados (Bourny et al., 2017; Guerrero et al., 2010; Matveev et al., 2000). Una de las ventajas del uso de la glicerina para aplicaciones de este tipo de matrices es que puede eliminarse fácilmente por inmersión en agua, después de moldear la matriz, además de ser inerte y no afectar al medioambiente. Los aditivos son usualmente añadidos para mejorar la procesabilidad o las propiedades finales de los bioplásticos (Bourny et al., 2017).

En cuanto a los métodos de procesado, las técnicas clásicas de procesado de polímeros termoplásticos, como la extrusión o moldeo por compresión, se han utilizado para obtener diferentes materiales bioplásticos basados en proteínas (Hernandez-Izquierdo y Krochta, 2008; Liu et al., 2005). Entre ellos, el moldeo por inyección es uno de los procesos más importantes y adecuados para sistemas que pueden exhibir un carácter termoplástico limitado como las proteínas, proporcionando una preparación eficiente, simple y rápida, así como un alto volumen de producción (Félix et al., 2014; Zárata-Ramírez et al., 2014). Este método consiste en tres etapas: en primer lugar, se lleva a cabo una etapa de mezclado con el objetivo de obtener una masa polimérica homogénea; la segunda etapa es el llenado del molde, que comprende inyección, compresión y mantenimiento (post-inyección); y, finalmente, la muestra se enfría (Adamy y Verbeek, 2013; Félix et al., 2014). Es importante seleccionar los parámetros de inyección óptimos (presión de inyección, tiempo de moldeo y temperatura de pre-inyección) requeridos para reducir la viscosidad de la mezcla y tener las condiciones apropiadas para asegurar una óptima velocidad de inyección, permitiendo que la mezcla se inserte en el molde, evitando, al mismo tiempo, la degradación o el entrecruzamiento temprano de las proteínas (Zárata-Ramírez et al., 2014). Por último, la

eliminación del plastificante de los bioplásticos procesados permite obtener matrices con alta porosidad y alta capacidad de absorción de agua (Fernández-Espada et al., 2016a).

El uso de estos materiales podría brindar grandes ventajas debido a su nula toxicidad y alta biodegradabilidad (Guo et al., 2015), así como el aporte extra de nutrientes (nitrógeno) tras su degradación (Saenghirunwattana et al., 2014). Estos efectos, se suman a sus propiedades esenciales de mejorar la eficacia de asimilación de micronutrientes por parte de la planta, como se ha comentado anteriormente, y a la habilidad de retener agua incrementando la eficiencia del ciclo del agua (Fernández-Espada et al., 2016a).

La gran aportación de este trabajo es el desarrollo de un nuevo sector productivo dentro de soluciones a la horticultura, que eviten la contaminación actual causada por los fertilizantes, a partir de una materia prima, inicialmente con menor valor añadido, aportando una solución medioambientalmente sostenible, y mejorando, así, la competitividad de las empresas ya que no tienen que pagar o deshacerse de sus residuos, sino que pueden producir coproductos que conduzcan a materias primas de nuevos procesos productivos, creando así un ciclo de economía circular. Estos productos medioambientalmente sostenibles suponen una solución a varios problemas y una estrategia de marketing para unos consumidores cada vez más preocupados por aspectos medioambientales.

2. Objetivo

El objetivo global del presente trabajo fue la evaluación de diferentes métodos para la incorporación de micronutrientes en matrices con base proteica de soja para su potencial uso en horticultura.

3. Metodología

Para conseguir el objetivo principal, se usó un aislado proteico de soja y glicerina (plastificante) para formar la matriz proteica. Además, el zinc (Zn) se seleccionó como micronutriente incorporándose en forma de sal ($ZnSO_4$) en diferentes etapas del procesado (mezclado e inmersión). Las diferentes alternativas de procesado se evaluaron a través de su potencial para incorporar micronutrientes a la matriz proteica, la distribución de este micronutriente en la matriz y las propiedades mecánicas y microestructura de la matriz final.

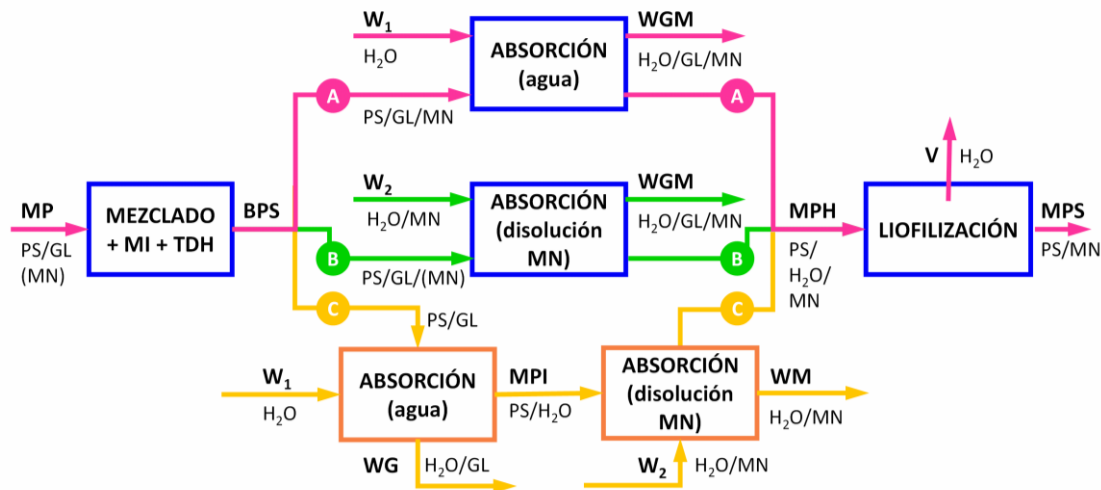
3.1 Materiales

Se utilizó un aislado proteico de soja (PS, *Glycine max L. Merril*) como base proteica de la matriz. Este aislado fue suministrado por Protein Technologies International (SUPRO 500E, Bélgica), siendo un subproducto de la producción industrial de aceite de soja con un mínimo del 91% en peso de proteína. El resto de los componentes de este son humedad (máx. 6%) y cenizas (máx. 5%). Además, se usó la glicerina (GL) como plastificante, la cual fue suministrada por Panreac Química S.A. (España). Finalmente, el zinc se incorporó en la matriz como sulfato de zinc monohidratado ($ZnSO_4 \cdot H_2O$) en la etapa de mezclado y como sulfato de zinc heptahidratado ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) en la etapa de inmersión (absorción). Estas dos sales fueron proporcionadas por Panreac Química S.A. (España).

3.2 Preparación de matrices proteicas de soja

Para la incorporación de zinc en las matrices proteicas de soja se siguieron diferentes métodos de preparación (Figura 1). Todas las alternativas de procesado de matrices estudiadas se basaron en un método general que consiste en un mezclado previo, seguido de un moldeo por inyección (MI), un tratamiento dehidrotérmico (TDH) y una o varias etapas de inmersión en agua (absorción) para finalizar con un secado por liofilización (Jiménez-Rosado et al., 2018).

Figura 1: Diagrama de los diferentes procesos de obtención de matrices proteicas de soja con zinc incorporado.



MP: Materia prima. PS: Proteína de soja. GL: Glicerina. MN: Micronutriente. MI: Moldeo por inyección. TDH: Tratamiento dehidrotérmico. BPS: bioplástico seco. W₁: agua. W₂: disolución saturada de ZnSO₄·H₂O. WGM: agua con micronutriente y glicerina. WG: agua con glicerina. WM: agua con micronutriente. MPH: matriz proteica hinchada. V: vapor de agua. MPS: matriz proteica seca.

3.2.1 Método A: Incorporación de zinc en la etapa de mezclado

En este procedimiento, se mezclaron PS y GL, en una relación 1:1, con un 10% en peso de ZnSO₄·H₂O (MN), siendo este el porcentaje máximo inyectable obtenido en estudios anteriores (Jiménez-Rosado et al., 2018). Esta mezcla se realizó en un reómetro discontinuo de mezclado Haake PolyLab QC (ThermoHaake, Alemania) en condiciones adiabáticas, empezando los ensayos a una temperatura de 26,0 ± 1,0 °C, a una velocidad de 50 rpm durante 10 min, usando el mismo protocolo que en estudios previos (Felix et al., 2015; Fernández-Espada et al., 2016b).

Una vez obtenida una mezcla homogénea de las materias primas, la siguiente etapa consistió en un moldeo por inyección (MI) con la finalidad de obtener bioplásticos. Para este propósito, se utilizó una inyectora MiniJet Piston Injection Moulding System II (ThermoHaake, Alemania). En esta etapa es necesario determinar unos parámetros de procesado adecuados para la obtención de bioplásticos. En este caso, los parámetros seleccionados, según estudios previos (Fernández-Espada et al., 2016a), fueron una temperatura de cilindro de 40 °C, temperatura de molde de 90 °C, presión de inyección de 600 bar durante 20 s y presión de post-inyección de 200 bar durante 300 s. Estos bioplásticos fueron sometidos, a continuación, a un tratamiento dehidrotérmico (TDH) consistente en una etapa de calentamiento en un horno convencional a una temperatura de 50 °C durante 24 h. Esta etapa implica cierto fortalecimiento de la red, necesario para mantener la integridad física de las matrices en la etapa posterior de inmersión en agua, sin

este paso previo las matrices pierden su integridad física debido al hinchamiento causado por la penetración del agua durante la inmersión. Por lo que esta etapa sirvió para obtener los bioplásticos estructurados (BPS).

El siguiente paso fue someter al bioplástico a una etapa de inmersión en agua en un recipiente cerrado durante 24 h. En esta etapa, considerablemente toda la glicerina se libera al agua (WGM). Además, algo de proteína y micronutriente, también se liberan. Por otro lado, los bioplásticos absorben agua hinchándose, por lo que esta etapa también se suele llamar etapa de absorción. A modo de comparativa, se puede calcular el grado de hinchamiento de la matriz provocado por el paso por esta etapa, comparando el volumen de la misma antes y después de su inmersión en agua.

Finalmente, las matrices proteicas hinchadas después de la inmersión (MPH) se sometieron a un proceso de eliminación del agua para obtener las matrices proteicas secas (MPS). Para ello, las MPH se congelaron a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 2 h y luego, estas matrices congeladas, se introdujeron dentro de un equipo liofilizador con cabezal Flask M8 (LyoQuest, Testlar, España) con el objetivo de eliminar el agua mediante sublimación.

3.2.2 Método B: Incorporación de zinc mediante inmersión en disolución de sal

Este método difiere en el método A en la forma de incorporación de la sal a la matriz final. En este caso la sal ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) se incorporó en la etapa de inmersión. Así, se obtuvieron dos sub-métodos: incorporación de sal a matrices que no tienen sal aún o incorporación de sal a matrices que ya tienen sal incorporada en el mezclado. Merece la pena mencionar que, en el caso de la inmersión, la sal incorporada es heptahidratada, al ser el hidrato más estable del sulfato. No obstante, la sal incorporada en el mezclado es la monohidratada ($\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) porque mayores hidratos hacen imposible la posterior inyección de la masa (Jiménez-Rosado et al., 2018).

3.2.2.1 Método B-1: Inmersión de matrices sin zinc

En el método B-1 se mezclaron PS y GL en una proporción 1:1 y se elaboraron y estructuraron los bioplásticos utilizando los mismos parámetros que en el método A. No obstante, en este caso, la temperatura del molde a la hora de realizar los bioplásticos fue de $70\text{ }^{\circ}\text{C}$, al ser la temperatura óptima para obtener bioplásticos con la mayor capacidad absorbente (Fernández-Espada et al. 2016a). Una vez obtenidos los bioplásticos estructurados (BPS), estos se sometieron a una inmersión en disolución saturada de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ /mL de agua) durante 24 h. Finalmente, las matrices proteicas hinchadas (MPH) se liofilizaron, como en el método A, para obtener las matrices proteicas secas (MPS).

3.2.2.2 Método B-2: Inmersión de matrices con zinc

El método B-2 fue una combinación del método A (3.2.1) y el método B-1 (3.2.2.1). Así, se elaboró un bioplástico estructurado (BPS) con PS y GL al 1:1 con un 10% de $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ como en el método A. Después, una vez elaborado el BPS, este se sometió a los mismos pasos definidos por el método B-1 (inmersión en disolución saturada y liofilización).

3.2.3 Método C: Incorporación del zinc mediante dos etapas de inmersión

El método C fue una modificación del método B-1 donde se realizó la etapa de inmersión en dos partes separadas. En primer lugar, el BPS (obtenido como en el método B-1) se sometió a una inmersión en agua donde se eliminó la glicerina y la matriz proteica se hinchó (MPI), y luego, la MPI se sometió a una inmersión en disolución saturada de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ donde la matriz captó el micronutriente (MPH). Esta última matriz pasó por una etapa de liofilización como en los casos anteriores obteniendo la matriz proteica seca (MPS).

3.3 Caracterización de matrices proteicas de soja

Una vez elaboradas las matrices con los diferentes métodos de incorporación de micronutrientes estas se caracterizaron para poder dar una comparación detallada de las mismas de forma composicional, estructural y mecánica.

3.3.1 Espectroscopía de emisión atómica de plasma acoplado por inducción (ICP-AES)

Las medidas de ICP-AES se llevaron cabo con el propósito de determinar la cantidad de zinc y sulfato incorporado a las matrices proteicas secas (MPS) elaboradas por los diferentes métodos con un error relativamente despreciable. Para realizar estos ensayos, primero se sometieron a las matrices a un pretratamiento de digestión ácida con la ayuda de ácido nítrico y peróxido de hidrógeno (7:1). Finalmente, las soluciones obtenidas tras la digestión pasaron por un espectrómetro óptico de emisión SpectroBlue-TI (Spectro, Alemania) donde se nebulizaron y se sometieron a una temperatura cercana a los 6000 K, disociándose en átomos libres e iones que emiten en diferentes longitudes de onda (características de cada elemento), que son medidas y registradas en el equipo, pudiendo así determinar los elementos que componen la muestra y la cantidad de los mismos.

3.3.2 Propiedades mecánicas

Las medidas mecánicas se llevaron a cabo para comprobar las cualidades mecánicas de las matrices (MPS) para su uso en horticultura. Estos ensayos se realizaron en modo de compresión, sometiendo a las matrices a una fuerza de compresión oscilatoria de pequeña amplitud. Así, se realizaron barridos de frecuencia en un intervalo de 0,02 a 20 Hz, a una temperatura de $25,0 \pm 0,5$ °C y una deformación constante de 0,01% (inferior a la deformación crítica). El equipo utilizado para realizar dichas medidas fue un analizador dinámico-mecánico RSA3 (TA Instruments, EE.UU.) con una geometría cilíndrica de platos paralelos de 8 mm de diámetro. De esta forma se evaluaron el módulo elástico (E') y la tangente de pérdidas ($\tan \delta$) a una frecuencia constante de 1 Hz (E'_1 y $\tan \delta_1$, respectivamente) con el objetivo de realizar una adecuada comparación de los sistemas estudiados.

3.3.3 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La microestructura de las matrices (MPS) seleccionadas se determinó según el método descrito por Orawan et al (2006). Previamente, las muestras se recubrieron con paladio/oro con la finalidad de que las micrografías tuvieran buena calidad. Inmediatamente después, las muestras se observaron usando un microscopio electrónico de barrido JEOL 6460LV (EE.UU.) con un voltaje de aceleración de 20 kV, observando tanto la superficie como el interior de las matrices. Además, con la finalidad de obtener el tamaño de poro medio de las

diferentes matrices, las micrografías se analizaron mediante un software de análisis de imagen (Image-J).

3.3.4 Análisis dispersivo de energía de rayos X (EDAX)

La distribución de la concentración de elementos para las matrices (MPS) estudiadas se analizó junto con los análisis de SEM en el mismo microscopio electrónico de barrido (JEOL 6460LV). Estas medidas se realizan con la finalidad de detectar la cantidad de zinc depositado en la superficie y dentro de las matrices. 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 interaccionan 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.

3.4 Análisis estadístico

Se realizó al menos tres mediciones 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, $p \leq 0,05$) mediante el paquete estadístico SPSS 18. Además, se calcularon las desviaciones estándar de algunos parámetros seleccionados.

4. Resultados

4.1 Espectroscopía de emisión atómica de plasma acoplado por inducción (ICP-AES)

La Tabla 1 recoge los valores de zinc (Zn^{2+}) y sulfato (SO_4^{2-}) incorporados en las matrices (MPS) elaboradas por los diferentes métodos.

Tabla 1. Concentración en peso de Zn y S obtenidos en los análisis de ICP-AES y EDAX de las diferentes matrices proteicas secas (MPS).

Matrices MPS	ICP-AES		EDAX			
	%Zn	%SO ₄	Superficie		Interior	
			%Zn	%S	%Zn	%S
Método A	1,8 ^A	<0,1 ^E	5,0 ^a	0,8 ^f	4,2 ^a	0,9 ^f
Método B-1	10,5 ^B	14,8 ^F	27,2 ^{bd}	12,2 ^g	19,6 ^c	6,5 ^h
Método B-2	12,6 ^C	15,5 ^G	27,5 ^b	11,6 ^g	24,0 ^d	11,3 ^g

Método C	18,4 ^D	27,9 ^H	30,2 ^e	13,9 ⁱ	32,2 ^e	8,7 ⁱ
----------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	------------------

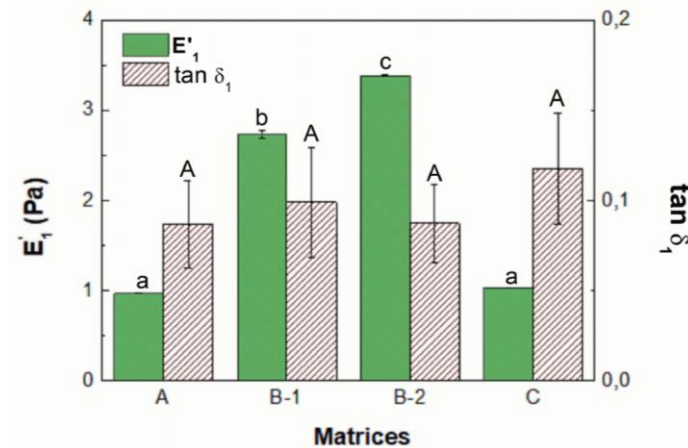
Valores con diferentes letras tienen diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Como se puede observar, las matrices obtenidas por el método A fueron las que menor cantidad de zinc incorporaron, siendo las obtenidas por el método C las que incorporaron la mayor cantidad de zinc. Finalmente, las matrices obtenidas por los métodos B-1 y B-2 incorporaron cantidades similares, quedándose en un valor intermedio. En cuanto a la cantidad de sulfato incorporada en las matrices, esta siguió un comportamiento similar al zinc, donde es prácticamente inexistente en las matrices elaboradas por el método A. Este comportamiento puede deberse al equilibrio químico entre la matriz y el medio. En el método A, donde el medio es agua, la matriz tendió a equilibrar el sistema, liberando la mayor cantidad de iones zinc y sulfato. No obstante, ocurre exactamente lo contrario en el método B-1, donde los iones están en una disolución saturada en vez de en la matriz. En el método B-2, la incorporación de la sal en ambas fases (matriz y medio) hizo que la cantidad de iones en la matriz aumentara ligeramente con respecto al método B-1. Finalmente, en el método C, la previa absorción con agua causó que las matrices se hincharan, favoreciendo incluso más el equilibrio. Así, se incorporó una mayor cantidad de iones a la matriz. Cabe señalar que, con respecto a los iones, siempre hubo una mayor cantidad de iones Zn^{2+} presentes en las matrices con respecto a la cantidad de iones SO_4^{2-} . Este comportamiento es debido al hecho de que la proteína está cargada negativamente, lo que atrae a los iones positivos y repele a los negativos por fuerzas electrostáticas.

4.2 Propiedades mecánicas

La Figura 2 muestra las propiedades mecánicas de las matrices (MPS) procesadas por los diferentes métodos a partir de los valores del módulo elástico y la tangente de pérdidas a 1 Hz (E'_1 y $\tan \delta_1$, respectivamente). Estas propiedades se obtuvieron mediante ensayos de barrido de frecuencia de pequeña amplitud en compresión. Se puede observar como las matrices obtenidas por una inmersión directa en una disolución saturada de sal (B-1 y B-2) exhibieron valores similares de E'_1 , siendo mayores a los obtenidos para las matrices que se sumergieron en agua, ya sea en una sola etapa (A) o como una primera etapa (C). Estas dos últimas matrices también mostraron valores similares de E'_1 . Este comportamiento puede atribuirse al grado de hinchamiento presentado por las matrices cuando son introducidas en agua ($309,8 \pm 77,4\%$ para las matrices A y C), que hace que tengan poros más grandes que aquellas introducidas directamente en una disolución saturada de sal (B-1 y B-2). El moderado hinchamiento que presentan estas últimas matrices ($25,8 \pm 2,8\%$) puede deberse a las altas fuerzas iónicas del medio salino, causando que estas muestren una estructura más rígida. Por otro lado, los valores de $\tan \delta_1$ son siempre inferiores a 0,2, demostrando que, a pesar de la porosidad, las matrices presentan un considerable carácter sólido reflejado en una respuesta predominantemente elástica (E' mayor que E''). En cualquier caso, los valores de $\tan \delta_1$ no muestran diferencias significativas entre las diferentes matrices, indicando que la relación entre E' y E'' no se vio afectada por el cambio en el procesado de las matrices.

Figura 2: Módulo elástico (E'_1) y tangente de pérdidas ($\tan \delta_1$) obtenidos a 1 Hz a partir de los barridos de frecuencia realizados a las matrices proteicas secas (MPS).

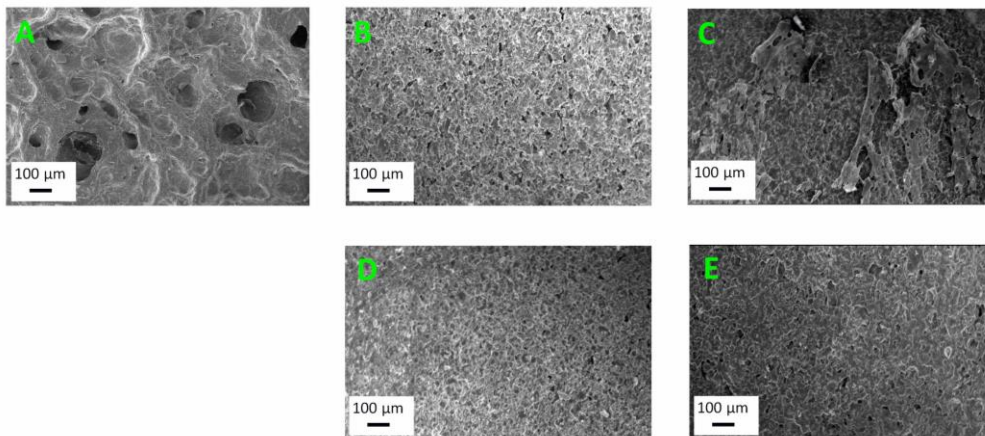


Columnas con diferentes letras tienen diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

4.3 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La Figura 3 muestra las imágenes de SEM de las matrices (MPS) obtenidas por los diferentes métodos. Generalmente, todas las matrices tienen poros homogéneos. Se puede observar una clara diferencia entre la matriz sin micronutriente (Figura 3A) y las que si lo contienen (Figuras B-E), independientemente del método usado. Parece ser que, en cualquier caso, la incorporación de zinc a la matriz conduce a una superficie más plana y uniforme, con poros significativamente más pequeños.

Figura 3: Imágenes de SEM de las matrices MPS obtenidas por los diferentes métodos.



Matrices sin micronutriente (A) y con micronutrientes métodos A (B), B-1 (C), B-2 (D) y C (E).

En cuanto a las matrices que contienen micronutriente (Figuras (3B-3E)), también se observan algunas diferencias. Las matrices obtenidas por el método A (Figura 3B) y C (Figura 3E) tienen el mayor tamaño de poro ($14,7 \pm 5,5^a$ y $13,2 \pm 2,3^a \mu\text{m}$, respectivamente), sin diferencias significativas entre los dos sistemas. Estos resultados son coherentes con los obtenidos para las medidas mecánicas, reforzando la idea de la importancia del grado de hinchamiento de la matriz, ya que las matrices que se sometieron a una inmersión con agua (A y C) tienen poros mayores que aquellas introducidas en una disolución saturada de sal (B-1 (Figura 3C) y B-2 (Figura 3D), con un tamaño de poro medio de $7,2 \pm 2,3^b$ y $6,3 \pm 1,5^b$

µm, respectivamente). Como se puede observar, tampoco hay diferencias significativas en el tamaño de poro de estos dos últimos sistemas.

4.4 Análisis dispersivo de energía de rayos X (EDAX)

Este análisis se llevo a cabo para obtener la distribución de los micronutrientes en las matrices y, de esta forma, observar las posibles diferencias que se pueden encontrar en la incorporación por los diferentes métodos.

La Tabla 1 muestra también los porcentajes de zinc y azufre obtenidos en el mapeo con EDAX en diferentes zonas de las matrices. La concentración en la superficie corresponde con las imágenes tomadas en la superficie de cada matriz, mientras que la concentración en el interior se corresponde con las imágenes tomadas en un corte transversal de cada matriz. Se puede observar que, en la matriz obtenida por el método A, el zinc está distribuido homogéneamente a través de la matriz debido a la incorporación del mismo en la etapa de mezclado donde se homogeniza con el resto de los componentes. En la matriz obtenida por el método B-1, el porcentaje de zinc que entra en la matriz es mucho menor que el que permanece en la superficie, evidenciando un recubrimiento de zinc en la superficie de la matriz favorecido por las fuerzas iónicas de la disolución, que evitan la entrada de zinc al interior de la matriz. En el caso de la matriz procesada por el método B-2, la diferencia de zinc dentro de la matriz y en su superficie es menor. Esto puede deberse al hecho de que, aunque se forme un recubrimiento de zinc en la superficie de la matriz durante la etapa de inmersión, hay también una homogenización de zinc en la etapa de mezclado, quedando este porcentaje de zinc retenido en la matriz debido al recubrimiento. Finalmente, la matriz obtenida por el método C es la que presenta mayor cantidad de zinc contenido en la superficie e interior de la misma, siendo su distribución homogénea. Este resultado se atribuye al incremento del tamaño de poros como consecuencia de la etapa previa de inmersión en agua, que permite al zinc entrar dentro de la matriz, impidiendo la formación del recubrimiento hasta que los poros están llenos.

Por otro lado, si se observan los valores obtenidos para el azufre, se puede ver que en todos los casos son inferiores a los obtenidos para el zinc, incluso después de considerar sus pesos atómicos relativos. Este hecho corresponde a que la proteína está cargada negativamente, lo que es favorable a la hora de capturar al zinc, ya que forma un ion positivo, pero crea fuerzas repulsivas hacia el sulfato (ion negativo). No obstante, el impedimento para incorporar azufre puede ser beneficioso, ya que no ocupa espacio en los poros de la matriz pudiendo quedar libres para la incorporación de zinc.

5. Conclusiones

Las matrices proteicas de soja han generado gran interés debido a su habilidad para retener y liberar de forma controlada micronutrientes esenciales para las plantas, aumentando su eficiencia de asimilación y evitando el exceso de los fertilizantes convencionales. De esta forma, una cantidad significativa del micronutriente seleccionado (Zn) se ha incorporado en las matrices, alcanzando valores de hasta un 18 wt.%. Además, estas matrices tienen las propiedades mecánicas suficientes para su industrialización y uso en horticultura.

Por último, una vez evaluado y optimizado el método de carga de micronutriente en las matrices proteicas de soja, se realizarán, en estudios futuros, estudios sobre la liberación del micronutriente a las plantas.

Referencias

- Adamy, M. & Verbeek, C.J.R. (2013). Injection molding performance and mechanical properties of blood meal-based thermoplastics. *Advances in Polymers Technology*, 32, 1-9.
- Alloway, B.J. (2008). *Micronutrient deficiencies in global crop production*. Berlín, Alemania. Springer Science+Business Media.
- Bourny, V., Perez-Puyana, V., Felix, M., Romero, A. & Guerrero, A. (2017). Evaluation of the injection moulding conditions in soy/nanoclay based composites. *European Polymer Journal*, 95, 539-546.
- Broadley, M.R., White, P.J. Hammond, J.P., Zelko, I. & Lux, A. (2007). Zinc in plants: Tansley review. *New Phytologist*, 173, 677-702.
- Cuadri, A.A., Romero, A., Bengoechea, C. & Guerrero, A. (2018). The effect of carboxyl group content in water uptake capacity and tensile properties of functionalized soy protein-based superabsorbent plastics. *Journal of Polymers and the Environment*, 26, 2934-2944.
- Cuadri, A.A., Romero, A., Bengoechea, C. & Guerrero, A. (2017). Natural superabsorbent plastic materials based on a functionalized soy protein. *Polymer Testing*, 58, 126-134.
- Félix, M., Lucio-Villegas, A., Romero, A. & Guerrero, A. (2015). Development of rice protein bio-based plastic materials processed by injection molding. *Industrial Crops Production*, 79, 152-159.
- FEPEX (2018). Seguimiento mensual consumo hortofrutícola 2017 en hogares. Obtenido el día 13 de marzo de 2019 desde <http://www.fepex.es/datos-del-sector/consumo-frutas-hortalizas>.
- Fernández-Espada, L., Bengoechea, C., Cordobés, F. & Guerrero, A. (2016a). Thermomechanical properties and water uptake capacity of soy protein-based bioplastics processed by injection molding. *Journal of Applied Polymer Science*, 133, 43524.
- Fernández-Espada, L., Bengoechea, C., Cordobés, F. & Guerrero, A. (2016b). Protein/glycerol blends and injection-molded bioplastic matrices: Soybean versus egg albumen. *Journal of Applied Polymer Science*, 133, 42980.
- Flieger, M., Kantorová, M., Prell, A., Rezanka, T. & Votruba, J. (2003). Biodegradable plastic from renewable sourcer. *Folia Microbiologica*, 48, 27.
- Guerrero, P., Retegi, A., Gabilondo, N. & De la Caba, K. (2010). Mechanical and thermal properties of soy protein-films processed by casting and compression. *Journal of Food Engineering*, 100, 145-151.
- Guo, G., Zhang, C., Du, Z., Zou, W., Tian, H., Xiang, A. & Li, H. (2015). Structure and property of biodegradable soy protein isolate/PBAT blends. *Industrial Crops and Products*, 74, 731-736.
- Hazell, P. & Wood, S. (2008). Drivers of change in global agriculture. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 236, 495-515.
- Hernández-Izquierdo, V.M., & Krochta, J.M. (2008). Thermoplastic processing of proteins for film formation: A review- *Journal of Food Science*, 73, R30-R39.
- Hortoinfo (2016). Producción mundial de hortalizas y frutas. Obtenido el día 13 de marzo de 2019 desde <http://www.hortoinfo.es/index.php/noticias-3/977-prod-mund-hort-frut-181116>.

- Jiménez-Rosado, M., Perez-Puyana, V., Cordobés, F., Romero, A. & Guerrero, A. (2018). Development of soy protein-based matrices containing zinc as micronutrient for horticulture. *Industrial Crops and Products*, 121, 345-351.
- Liu, W., Misra, M., Askeland, P., Drzal, L.T. & Mohanty, A.K. (2005). 'Green' composites from soy based plastic and pineapple leaf fiber fabrication and properties evaluation. *Polymer*, 46, 2710-2721.
- Matveev, Y.I., Grinberg, V.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, 425-437.
- Muscanescu, A. (2013). Organic versus conventional advantages and disadvantages of organic farming. *Economic Engineering in Agriculture and Rural Development*, 13, 253-256.
- Orawan, J. Scoottawat, B. & Wonnup, V. (2006). Effect to phosphate compounds on gel-forming ability of surimi from bigeye snapper (*Priacanthus tayanus*). *Food Hydrocolloids*, 20, 1153-1163.
- Saenghirunwattana, P., Noomhorm, A. & Rungsardthong, V. (2014). Mechanical properties of soy protein based 'green' composites reinforced with surface modified cornhusk fiber. *Industrial Crops and Products*, 60, 144-150.
- Song, F., Tang, D., Wang, X. & Wang, Y. (2011). Biodegradable soy protein isolate-based materials: a review. *Biomacromolecules*. 12, 3369-3380.
- Specialty Crops Competitiveness Act, de Diciembre de 2004. pp. 108-465 [consultado el día 13 de mayo de 2019].
- The agricultural act, Public Law, de Febrero de 2014. pp. 649-1005 [consultado el día 12 de marzo de 2019].
- Tian, H., Wang, Y., Zhang, L., Quan, C. & Zhang, X. (2010). Improved flexibility and water resistance of soy protein thermoplastics containing waterborne polyurethane. *Industrial Crops and Products*, 32, 13-20.
- Uchida, R. (2000). Essential nutrients for plant growth: nutrient functions and deficiency symptoms, in plant nutrient management in Hawaii's soils, approaches for tropical and subtropical agriculture. Manoa, College of Tropical Agriculture and Human Resources.
- Zárate-Ramírez, L.S., Romero, A., Bengoechea, C., Partal, P. & Guerrero, A. (2014). Thermomechanical and hydrophilic properties of polysaccharide/gluten-based bioplastics. *Carbohydrate Polymers*, 112, 24-31.