

ACETILACIÓN SOSTENIBLE DE BIOPOLÍMEROS MEDIADA POR UN α -HIDROXIÁCIDO DE ORIGEN NATURAL

María L. Foresti^{1,2}, Maribel V. Tupa^{1,2}, Jhon A. Ávila Ramírez^{1,2},
Patricia Cerrutti^{1,3}, Analía Vázquez^{1,2}*

¹ Instituto de Tecnología en Polímeros y Nanotecnología (ITPN) – Facultad de Ingeniería,
Universidad de Buenos Aires, Las Heras 2214 (CP 1127AAR) Buenos Aires, Argentina.
(E-mail: mforesti@fi.uba.ar)

² Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina.

³ Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería, Universidad de Buenos Aires,
Buenos Aires, Argentina.

Resumen

La organocatálisis es una rama de la catálisis que utiliza moléculas orgánicas de bajo peso molecular como catalizadores, entre ellos, los ácidos α -hidroxicarboxílicos. En la presente contribución se demuestra la aplicabilidad de la ruta catalizada por un ácido α -hidroxicarboxílico de origen natural y de producción industrial nacional como es el ácido L-(+)-tartárico para la acetilación no convencional de dos biopolímeros: almidón y celulosa bacterial. Algunas ventajas inherentes a la metodología de acetilación propuesta son su sencillez, el uso de un catalizador orgánico no metálico de origen natural, no tóxico y biodegradable; y la operación con alta eficiencia en ausencia de solventes y bajo condiciones moderadas de reacción. En el caso del almidón, la manipulación de las condiciones de reacción permitió obtener almidones acetilados con valores de grado de sustitución (GS) en el rango de 0.06 a 2.93 en 3 horas de reacción, con aplicación potencial en la industria de alimentos, medicina y plásticos. En el caso de la celulosa bacterial (BC), la acetilación organocatalítica permitió alcanzar valores de GS en el rango de 0.35-0.60, de utilidad en la regulación de la polaridad de las nanofibras de celulosa para su potencial compatibilización con matrices/medios no polares. Los productos de la acetilación fueron caracterizados en términos de estructura química y cristalinidad.

Palabras clave: organocatálisis; acetilación; almidón; celulosa bacterial.

Abstract

Sustainable acetylation of biopolymers mediated by a naturally occurring α -hydroxy acid. Organocatalysis refers to a form of catalysis which uses small organic molecules as catalysts, among which α -hydroxy acids are found. In the current contribution the feasibility of a route for the non-conventional acetylation of starch and cellulose catalyzed by a naturally occurring α -hydroxy acid such as L-(+)-tartaric acid is demonstrated. Some inner advantages of the acetylation methodology proposed are its simplicity, the use of a naturally occurring non-toxic and biodegradable organic catalyst, and the operation with high efficiency in absence of solvents and under moderate reaction conditions. In the case of starch, the proper manipulation of reaction conditions allowed obtaining acetylated starches with substitution degree values in the 0.06-2.93 within 3 hours of

reaction, with potential use in the food industry, medicine and plastics. In reference to bacterial cellulose, the organocatalytic acetylation proposed allowed reaching GS values in the 0.35-0.60 range, useful for the modulation of microfibrils polarity and compatibilization with non polar media/matrices. Acetylation products were characterized in terms of chemical structure and crystallinity.

Key words: organocatalysis; acetylation; starch; bacterial cellulose.

1. Introducción

El almidón es el segundo biopolímero más abundante de la naturaleza después de la celulosa. Se trata de un carbohidrato de reserva que se encuentra organizado en partículas discretas (gránulos), cuyo tamaño, forma y estructura supramolecular difieren substancialmente entre diversas fuentes botánicas. El almidón está compuesto por unidades anhidroglucosa de seis carbonos unidas por enlaces glucosídicos α -(1→4) y α -(1→6) que dan lugar a los polímeros de amilosa y amilopectina [1].

El almidón es utilizado en diversas industrias debido a su bajo costo, disponibilidad y habilidad para impartir una variedad de propiedades funcionales a productos industriales alimenticios y no alimenticios. En la industria alimenticia el amplio uso del almidón se debe a que constituye una excelente materia prima para modificar la textura y consistencia de los alimentos. Las múltiples aplicaciones no alimenticias de este polisacárido abarcan su uso como adhesivo en la industria del papel y en la producción de paneles corrugados, aglutinantes para la industria farmacéutica, aditivos para ajustar la viscosidad de fluidos utilizados en la extracción de petróleo, y preparación de películas para embalajes biodegradables, entre otros. [2].

A pesar de los múltiples usos del almidón nativo, para determinadas aplicaciones se requiere de la modificación del almidón, a fines de, por ejemplo, aumentar su solubilidad en agua fría, reducir su tendencia a la retrogradación y sinéresis, disminuir su alta tasa de absorción de agua, aumentar su resistencia al esfuerzo de corte durante el mezclado, aumentar su estabilidad térmica, incrementar la flexibilidad de las películas de almidón, compatibilizarlo con matrices/medios hidrofóbicos, dotarlo de funcionalidades específicas, etc. [3-5]. La esterificación, y en particular la acetilación del almidón, es una de las modificaciones más utilizadas. Tras la incorporación de grupos éster a la molécula de almidón, se alcanzan nuevas propiedades que se encuentran muy relacionadas con el grado de sustitución (GS) logrado, que refiere al número promedio de grupos éster incorporados por molécula de anhidroglucosa, siendo el máximo 3. Actualmente, la mayoría de los ésteres de almidón comerciales son producidos por reacción del almidón en medio acuoso con anhídridos, utilizando hidróxido de sodio como catalizador a pH controlado (pH 7-9) [6]. Se han reportado así mismo acetilaciones de almidón mediadas por piridina, ácidos minerales, bases, iodo, ácidos de Lewis, enzimas de la familia de las lipasas, y líquidos iónicos [6-7].

En cuanto a la celulosa bacterial (BC), ésta está compuesta de microfibrillas de celulosa de *ca.* 80 x 4 nm [8], que se obtienen como metabolito primario extracelular a partir de la fermentación de diversas fuentes de carbono utilizando bacterias del género *Gluconacetobacter*. Bajo condiciones adecuadas de pH, temperatura y concentración de nutrientes, estas bacterias son capaces de producir microfibrillas de celulosa con anchos nanométricos y alta relación de aspecto, que se entretajan formando una película gelatinosa altamente hidratada en la superficie aireada del recipiente donde ocurre la fermentación. La obtención de celulosa bacterial con su estructura nanofibrilada única, se presenta como una alternativa sostenible a la producción de nanopartículas de celulosa por tratamiento

mecánico/hidrólisis ácida de material lignocelulósico. Las nanofibras de celulosa bacteriana se caracterizan por su alta relación superficie/volumen, alta resistencia y rigidez, elevada cristalinidad, bajo coeficiente de expansión térmica, alta pureza química, baja densidad, renovabilidad, biodegradabilidad y biocompatibilidad [9].

La celulosa bacteriana encuentra aplicación en refuerzo de materiales compuestos, medios filtrantes nanoporosos, papeles de alta resistencia para prestaciones específicas, máscaras faciales para aplicaciones cosméticas, diafragmas acústicos, modificadores de reología, agentes de sostén para el crecimiento de tejidos, piel sintética, venas artificiales, y aditivo en adhesivos óseos, entre otros [10-15]. Sin embargo, el carácter hidrofílico de las nanofibras de celulosa nativa, asociado con su estructura rica en grupos OH, dificulta su aplicación en usos que involucren medios/matrices no polares. Este es el caso por ejemplo del uso de nanocelulosa como refuerzo de matrices hidrofóbicas, en las que la hidrofiliidad de la nanocelulosa conduce a materiales con propiedades mecánicas pobres, alta absorción de humedad que produce pérdida de resistencia del refuerzo y deformación del material compuesto, y agregación entre nanofibras que redundan en una pobre dispersión en el material a compatibilizar [16-17].

Para superar las dificultades mencionadas, puede considerarse la modificación química de las nanofibras de celulosa. En particular, las reacciones de esterificación en las cuales el acilante reacciona con los grupos hidroxilos de las nanofibras de celulosa dando lugar a la formación de grupos éster, es una técnica comúnmente utilizada para convertir la superficie de la celulosa en una más hidrofóbica. En la última década, han sido propuestas diferentes metodologías para la esterificación heterogénea de nanocelulosa bacteriana, incluyendo la acetilación de las películas de celulosa bacteriana prensadas catalizada por ácido perclórico en tolueno [18], la esterificación en fase gaseosa libre de solvente de microfibrillas de celulosa bacteriana con cloruro de palmitoilo [19], la acetilación de celulosa bacteriana libre de solvente usando anhídrido acético como acilante y yodo como catalizador [20], la esterificación heterogénea de celulosa bacteriana usando líquidos iónicos como solvente y catalizador [21], y un trabajo reciente de nuestro grupo sobre esterificación organocatalítica de celulosa bacteriana usando ácido acético y ácido propiónico como acilantes y ácido L-(+)-tartárico como catalizador [22], entre otros.

En el marco del creciente interés por el uso de materiales de origen renovable y sin problemas de disposición final, y ante la necesidad de mejorar determinadas propiedades de los mismos haciendo uso también de metodologías de modificación sostenibles, en el presente trabajo se propone la acetilación organocatalítica de almidón y celulosa bacteriana sin solventes agregados, usando como acilante anhídrido acético y como catalizador el ácido L-(+)-tartárico. Este α -hidroxiácido que se encuentra en la naturaleza en forma libre y/o combinada en frutas como uvas, plátanos y tamarindos, y que se produce a nivel industrial en nuestro país desde las primeras décadas del siglo XX [23], se utiliza a diario como aditivo alimentario de bebidas gaseosas, vinos y comidas. La metodología propuesta se inspira en el trabajo inicial de Hafrén y Córdoba (2005) sobre polimerización organocatalítica por apertura de anillo de ϵ -caprolactona usando algodón y papel de celulosa como iniciadores y esterificación con ácido hexadecanoico y pentanoico de fibras de algodón, usando en ambos casos ácido L-(+)-tartárico como catalizador [24]. La estructura química y cristalina de los almidones y las nanofibras de celulosa acetilados en el presente trabajo fue estudiada usando espectroscopía de resonancia magnética nuclear en estado sólido (RMN CP/MAS ^{13}C), espectroscopía infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR), y difracción de rayos X (DRX).

2. Materiales y Métodos

2.1. Materiales

El anhídrido acético (99.5%) y el ácido L-(+)-tartárico fueron adquiridos de Biopack. El ácido clorhídrico (36.5%-38%) y el hidróxido de sodio de grado reactivo utilizados se adquirieron de Anedra y Biopack, respectivamente. El biftalato de potasio y el carbonato de sodio se adquirieron de Laboratorios Cicarelli y Mallinckrodt, respectivamente.

El almidón de maíz nativo fue una donación de Ingredion (ex Productos de Maíz), Argentina. La celulosa bacterial fue obtenida siguiendo protocolos optimizados desarrollados en el marco del EMPRETECNO- PAEBT n° 101 (2013-2016), Desarrollo de la Empresa de Base Tecnológica (EBT) Nanocellu-ar para la fabricación de nanocelulosa bacterial, y utilizando la cepa bacterial *Gluconacetobacter xylinus*.

2.2. Acetilación organocatalítica

Se contactaron anhídrido acético (12-25 mL), ácido tartárico (0.47-4.63 g) y almidón de maíz (2 g, base seca) en un matraz de vidrio de 100 mL equipado con un condensador de reflujo. Las reacciones se llevaron a cabo a temperaturas entre 90 y 130°C con agitación magnética continua y durante tiempos de reacción entre 0.5 y 7 h. Al cumplirse el tiempo de reacción, el producto sólido se separó por filtración bajo vacío, se lavó reiteradamente con agua destilada, y se secó a 50°C durante 12 h.

La acetilación de las nanofibras de celulosa bacterial (0.5 g, base seca) previamente intercambiadas con ácido acético y anhídrido acético se llevó a cabo a 120°C en el mismo sistema de reacción que en el caso del almidón, utilizando 50 mL de anhídrido acético y 0.47 g de ácido tartárico. Las reacciones se continuaron durante períodos de entre 1 y 7 h. La recuperación de la BC esterificada fue la misma que la indicada para los almidones acetilados.

El porcentaje de acilación (Acilo%) y el grado de sustitución (GS) de los almidones y nanofibras de celulosa acetilados fue determinado por saponificación heterogénea y titulación por retroceso con HCl, como una adaptación del método estandarizado para determinar el porcentaje de acilación del acetato de celulosa [25]. Brevemente, 0.1 g de los productos de acetilación y de los biopolímeros sin modificar (blancos) previamente secados (2 h - 105°C) se colocaron en matraces de 100 mL con 20 mL de alcohol etílico (75%) y se llevaron a un baño de agua a 55°C por 30 min. Posteriormente, las suspensiones fueron llevadas a pH ligeramente básico por adición de unas gotas de NaOH 0.1N, utilizando fenolftaleína como indicador. A continuación, se añadieron 20 mL de NaOH 0.1N a cada matraz, y se colocaron nuevamente en un baño de agua a 55°C durante 15 min. Los matraces fueron conservados a temperatura ambiente durante 48 h, y luego valorados con HCl 0.1N. Las soluciones de NaOH y HCl se estandarizaron utilizando biftalato de potasio y carbonato de sodio previamente secados (2 h - 110°C). El nivel de sustitución de los biopolímeros se calculó utilizando las siguientes ecuaciones:

$$\text{Acilo\%} = [(V_B - V_S) \times N_{\text{HCl}} \times 4.3] / W \quad (1)$$

$$\text{GS} = (162 \times \text{Acilo\%}) / [4300 - ((42) \times \text{Acilo\%})] \quad (2)$$

V_B (mL) es el volumen de HCl requerido para la titulación del blanco, V_S (mL) es el volumen de HCl usado para titular la muestra, N_{HCl} es la normalidad de la solución de HCl, y W (g) es la masa de la muestra usada.

2.3. Caracterización de los productos de acetilación

Espectroscopía RMN CP/MAS ^{13}C : Se obtuvieron espectros RMN CP/MAS ^{13}C de muestras de almidón y celulosa bacteriana nativas y acetiladas con un GS de 0.56. El equipo utilizado fue un Bruker Advance II-300 equipado con un cabezal de 4 mm apto para Rotación de Ángulo Mágico disponible en la Facultad de Matemática, Astronomía y Física de la Universidad Nacional de Córdoba. El equipo se operó a una frecuencia de 300.13 Mhz para protones y 75.46 Mhz para carbonos. Se utilizó glicina como referencia y para ajustar las condiciones de Hartmann-Hahn para los experimentos de polarización cruzada. Para el desacople heteronuclear durante la adquisición se utilizó la secuencia SPINAL64. Todas las mediciones se realizaron a temperatura ambiente y la rotación del ángulo mágico fue de 10 kHz.

Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR): Los espectros infrarrojos de los biopolímeros nativos y acetilados con diverso GS fueron adquiridos en un espectrofotómetro Affinity-1 Shimadzu con Transformada de Fourier en modo de transmisión. A tal fin, se prepararon pastillas de almidón:KBr y de BC:KBr en relación 1:25, y se adquirieron los espectros en el rango de 4000 a 700 cm^{-1} con 40 barridos y 4 cm^{-1} de resolución.

Difracción de rayos X (DRX): La estructura de las muestras nativas y acetiladas de almidón y BC fue analizada en un difractómetro de rayos X Rigaku D/Max-C con goniómetro vertical. Los difractogramas se adquirieron en el rango de 2θ de 10 a 45° con un paso de 0.02°, se empleó radiación Cu/K α (0.154 nm), una intensidad de 30 mA y un voltaje de 40kV. En el caso de la celulosa bacteriana se calculó el índice de cristalinidad de las muestras utilizando el método empírico de Segal [26]:

$$\text{CrI} = (I_{002} - I_{\text{am}}) / I_{002} \times 100 \quad (3)$$

Donde I_{002} corresponde a la máxima intensidad del difractograma, y I_{am} es la intensidad en $2\theta=18^\circ$, previa sustracción del registro sin muestra.

3. Resultados y Discusión

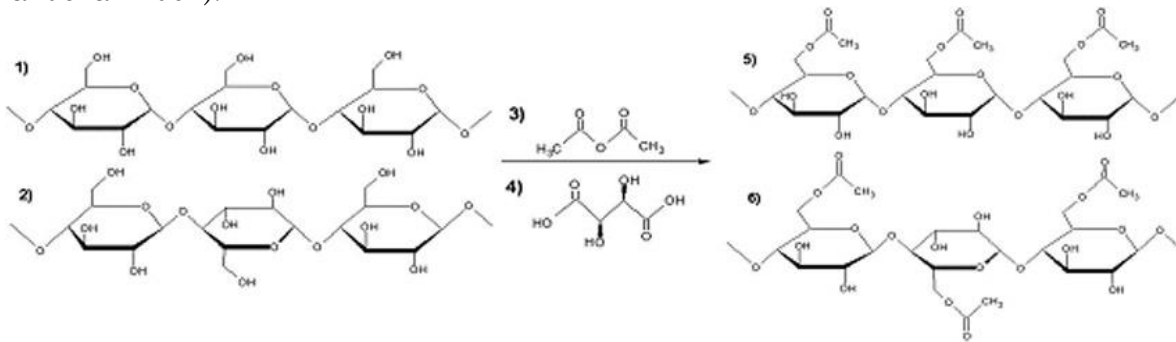
3.1. Acetilación organocatalítica de almidón y celulosa bacteriana

En el presente trabajo se estudió la acetilación de almidón de maíz comercial y de celulosa bacteriana catalizada por ácido L-(+)-tartárico y usando como acilante anhídrido acético. La Fig. 1 esquematiza los sistemas estudiados.

El estudio de la acetilación de almidón de maíz (2 g) catalizada por ácido L-(+)-tartárico incluyó el análisis paramétrico de las siguientes variables de reacción: tiempo (0.5-7 h), temperatura (90-130°C), concentración de catalizador (0.04-0.38 $\text{g}_{\text{cat}}/\text{mL}$), y humedad inicial del almidón (h_0 , 0.6-14.8 %). Cada parámetro se varió de a uno por vez manteniendo las condiciones restantes constantes, y se determinó el GS alcanzado en cada caso. Los principales resultados obtenidos se resumen en la Fig. 2.

Como se puede observar en la Fig. 2 el estudio del tiempo de reacción (2g de almidón base seca, 120°C, 0.15 g ácido L-tartárico/mL, 9.1% humedad inicial) permitió obtener almidones acetilados con valores de GS en el rango de 0.06 (0.5h) a 1.23 (7 h). Fijando luego el tiempo de reacción en 3 h, y secando rigurosamente el almidón de partida a fines de minimizar

la introducción de agua al sistema de reacción ($h_0=0.6\%$), el estudio del efecto de la temperatura (90-130 °C) y la concentración de catalizador (0.04-0.38 g_{cat}/mL) permitieron alcanzar un GS máximo de 2.03 (2 g de almidón base seca, 130°C, 0.31 g_{cat}/mL , 0.6% humedad inicial del almidón).



- | | |
|--------------------------|--|
| (1) Almidón (Amilosa) | (4) Ácido L-(+)-tartárico |
| (2) Celulosa (bacterial) | (5) Almidón parcialmente acetilado |
| (3) Anhídrido acético | (6) Celulosa bacteriana parcialmente acetilada |

Fig. 1. Acetilación de almidón y celulosa bacteriana con anhídrido acético catalizada por ácido L-(+)-tartárico.

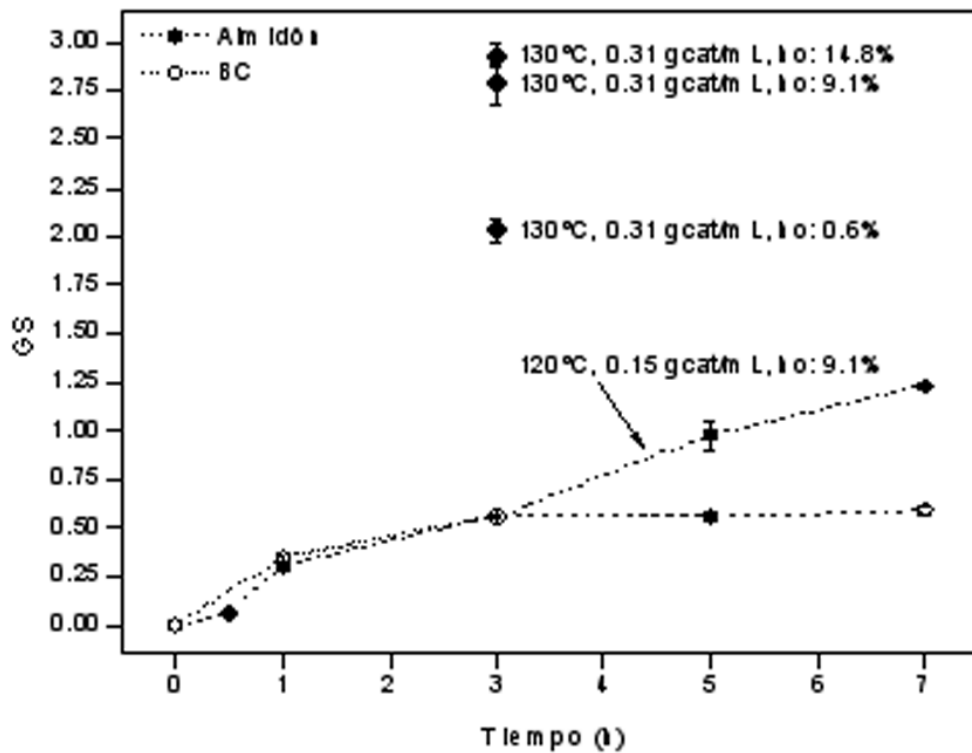


Fig. 2. Grados de sustitución (GS) alcanzados en la acetilación de almidón de maíz y celulosa bacteriana catalizada por ácido L-(+)-tartárico.

El estudio posterior del efecto de la humedad inicial del almidón sobre el GS, evidenció que en el sistema de reacción actual la introducción de agua a través del contenido de humedad inicial del almidón, no sólo no dio lugar a una reducción neta en el avance de la acetilación, sino que condujo a niveles de sustitución mayores a los logrados con almidón previamente seco (GS=2.78 y GS=2.93 para contenidos de humedad inicial del almidón de 9.1 y 14.8%, respectivamente, 2 g de almidón base seca, 130°C, 0.31 g_{cat}/mL). En un sistema de reacción sin agua agregada, estos resultados se explican en términos de la contribución de la

humedad inicial del almidón al hinchamiento de los gránulos, y con ello a un mayor acceso del acilante y catalizador (disuelto en el acilante) a los grupos hidroxilos del interior del gránulo.

El amplio rango de GS alcanzados en la acetilación de almidón de maíz mediante la manipulación de las condiciones de reacción evidencia la potencialidad de esta ruta para obtener en forma sencilla, sin solventes agregados, a presión atmosférica y a temperaturas moderadas, almidones acetilados con el nivel de sustitución que la aplicación lo requiera. En el caso de la industria alimenticia, la FDA (Food and Drug Administration) admite almidones acetilados con GS en el rango de 0.01-0.2, utilizados para dar consistencia, textura y estabilidad a las pastas. Otra aplicación de creciente interés para los almidones acetilados tiene que ver con el cuidado de la salud del colon humano, a partir de la reconocida capacidad de los almidones esterificados para entregar en el intestino grueso ácidos grasos de cadena corta (AGCC) específicos [27-28]. Para esta aplicación se requieren almidones acetilados con GS en el rango de 0.2 a 0.3. Los ésteres con mediano a alto grado de sustitución (GS 0.5-2.5) son comúnmente utilizados como aglutinantes de tabletas, adhesivos de fusión en caliente, filtros de cigarrillos y materiales de recubrimiento [7, 27, 29-30].

En lo que refiere a la acetilación organocatalítica de celulosa bacterial, la variable estudiada para modular el nivel de sustitución conferido a las nanofibras fue el tiempo de reacción. Los resultados incluidos en la Fig. 2 ilustran que en las condiciones de reacción elegidas, en el intervalo de 1 a 3 h es posible obtener nanofibras de celulosa bacterial con GS en el rango de 0.35 a 0.56. Así mismo, se observó que, (a diferencia de los resultados de la evolución de la acetilación del almidón), los incrementos en el valor de sustitución pasadas las 3 horas de reacción fueron sólo marginales, lográndose en 7 horas de reacción un GS de 0.60. Estos resultados en los que se observa una primer etapa con mayor velocidad de reacción, seguida de una segunda etapa en la que la acetilación evoluciona con mucha menor velocidad, podrían explicarse bajo la hipótesis de que, en las condiciones estudiadas, la acetilación organocatalítica de la BC en ausencia de solventes ocurriría preferencialmente en la superficie y regiones amorfas de las nanofibras, viéndose restringido el acceso del acilante/catalizador a los grupos hidroxilos del interior de las mismas.

3.2. Resonancia magnética nuclear (RMN CP/MAS ^{13}C)

La acetilación de almidón y de celulosa bacterial por vía organocatalítica fue confirmada por RMN CP/MAS ^{13}C . En la Fig. 3 se presentan los espectros de los biopolímeros originales y de muestras acetiladas seleccionadas con GS=0.56 (3 h para ambos biopolímeros acetilados).

El espectro del almidón nativo (Fig. 3a) mostró cuatro señales correspondientes a los carbonos del polisacárido: C1: 100 ppm, C4: 82 ppm, clúster C2-C3-C5: 65–80 ppm, y C6: 62 ppm. Estas señales coinciden con las obtenidas para almidones nativos de maíz y de otras fuentes botánicas como tapioca y plátano [29, 31-32]. En tanto, en el espectro del almidón de maíz acetilado (Fig. 3b, GS=0.56) se observaron dos señales adicionales asignables a las resonancias de los grupos acetato formados. La primera de ellas centrada en 170 ppm corresponde a la resonancia del grupo carbonilo del éster, mientras que la segunda, centrada en 20 ppm, es asignable a los carbonos metílicos. La presencia de estas dos señales confirmó que la reacción de acetilación del almidón efectivamente tuvo lugar [33].

En el caso de la celulosa bacterial, la acetilación por la ruta organocatalítica propuesta también puso ser confirmada por RMN CP/MAS ^{13}C . La BC nativa mostró los picos de los carbonos típicos de Celulosa I, a saber: C1: 105 ppm, C4: 89 ppm, C4': 84 ppm, clúster C2-C3-C5: 70-80 ppm, C6: 65 ppm y C6': 63 [34]. Adicionalmente, en la muestra acetilada se

observaron dos nuevas resonancias centradas en 171 ppm y 20 ppm asignables respectivamente, a los carbonos de los grupos C=O y CH₃ incorporados durante la acetilación. Vale así mismo destacar que en ningún caso se observaron resonancias atribuibles a la actuación del L-(+)-ácido tartárico como injerto.

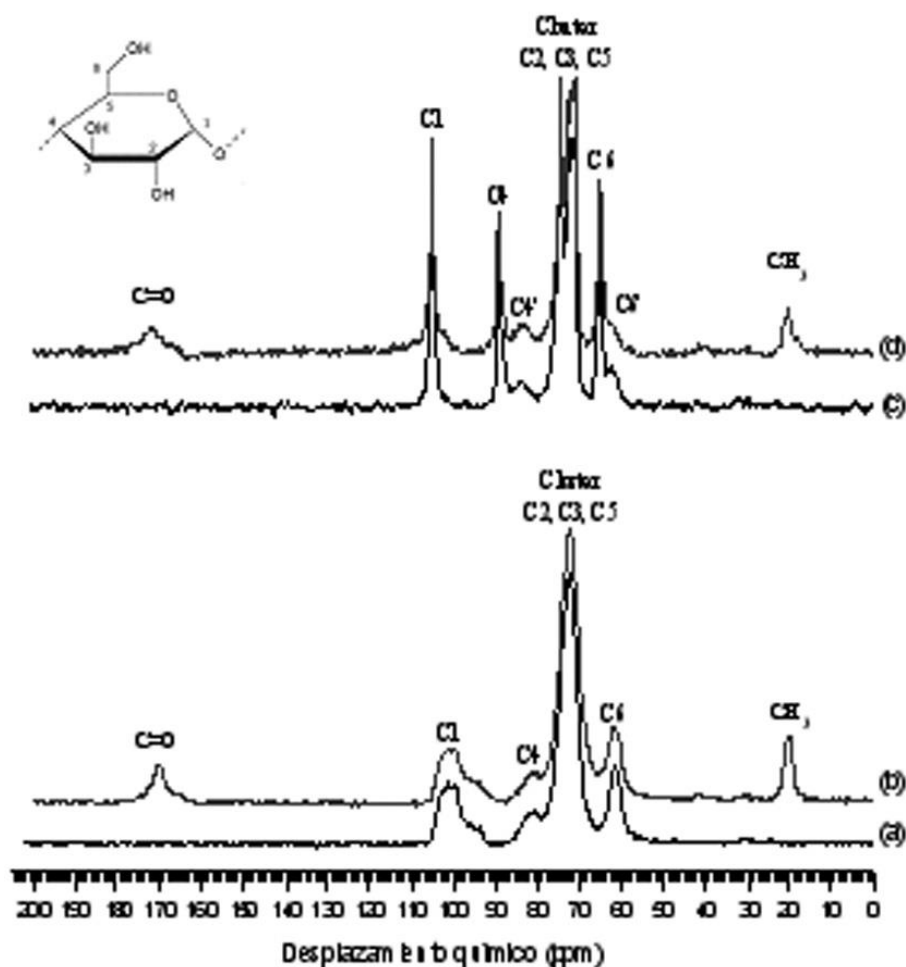


Fig. 3. RMN CP/MAS ¹³C de muestras de almidón y celulosa bacteriana nativos y acetilados con GS=0.56.

3.3. Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

El análisis de FTIR se realizó con la finalidad de identificar la presencia de grupos propios del grupo éster en la estructura química del almidón y de la celulosa bacteriana como consecuencia de la acetilación. La Fig. 4a presenta los espectros infrarrojo de muestras seleccionadas de los almidones acetilados con GS en el rango de 0.06 a 2.93, comparados con el del almidón sin modificar.

El espectro de FTIR del almidón nativo mostró señales propias de los principales grupos característicos del polisacárido: estiramiento de grupos O-H inter e intramoleculares (3700–3000 cm⁻¹), estiramiento C-H (3000-2800 cm⁻¹), y flexión O-H de moléculas de agua absorbidas en las regiones amorfas de los gránulos (1642 cm⁻¹). La región entre 1500 y 1300 cm⁻¹ mostró bandas altamente superpuestas, entre las cuales se han descrito las vibraciones

típicas por flexión C-O-H, torsión CH₂, flexión CH₂ y estiramiento C-O-O. En la región conocida como la huella dactilar, entre 1250 cm⁻¹ y 700 cm⁻¹ se observaron señales asignables a acoplamiento C-O y estiramiento C-C (1158 cm⁻¹), flexión C-O-H (1084 cm⁻¹), estiramiento C-O (1055 cm⁻¹), vibraciones del esqueleto de los enlaces glicosídicos β -1,4 (923 cm⁻¹), deformación C-H y CH₂ (857 cm⁻¹), y estiramiento C-C (763 cm⁻¹) [35-39].

Por su parte, los espectros de los almidones acetilados proveyeron evidencia de la acetilación por la aparición de bandas características del grupo acetato centradas en 1748 cm⁻¹, 1376 cm⁻¹ y 1244 cm⁻¹ [27, 36-37]. La señal en 1748 cm⁻¹, asignada al estiramiento del grupo carbonilo C=O del éster, se utiliza comúnmente como evidencia cualitativa de la esterificación, y su intensidad es altamente dependiente del grado de sustitución [37]. La Fig. 4a ilustra que la intensidad de esta banda se incrementó con la evolución del grado de sustitución de los almidones. Por su parte, las bandas centradas en torno a 3400 cm⁻¹ asignadas a los grupos hidroxilos del almidón, y en 1645 cm⁻¹ correspondiente a vibraciones por flexión de agua absorbida de la muestra, disminuyeron gradualmente con el GS, corroborando que los grupos hidroxilo fueron progresivamente reemplazados por grupos ésteres menos hidrofílicos. La intensidad de las bandas en 1376 cm⁻¹ (deformación del grupo C-H del CH₃ del acetato), y en 1244 cm⁻¹ (enlace C-O del grupo acetato) también se incrementaron con el GS de la muestra.

La Fig. 4b, por su parte, reúne los espectros infrarrojo de la celulosa bacterial nativa y acetilada (GS=0.35-0.60). El espectro de la BC nativa muestra las bandas típicas de la Celulosa I, incluyendo estiramiento O-H (3700–3000 cm⁻¹), estiramiento C-H (3000-2800 cm⁻¹), flexión O-H de moléculas de agua absorbidas (1647 cm⁻¹), flexión simétrica de CH₂ (1427 cm⁻¹), puentes C-O de la celulosa (1168 cm⁻¹), estiramiento C-O (1118 cm⁻¹), funciones éter C-O (1061 cm⁻¹), y la banda a 897 cm⁻¹ típica de polímeros de glucosa tipo β [40-42]. Por su parte, y en forma análoga a lo observado para los almidones acetilados, en los espectros de las muestras de celulosa bacterial acetilada se incorporan las señales correspondientes a los grupos acetato formados: 1741 cm⁻¹ (estiramiento C=O), 1371 cm⁻¹ (deformación C-H del CH₃), y 1236 cm⁻¹ (estiramiento C-O) [43-44].

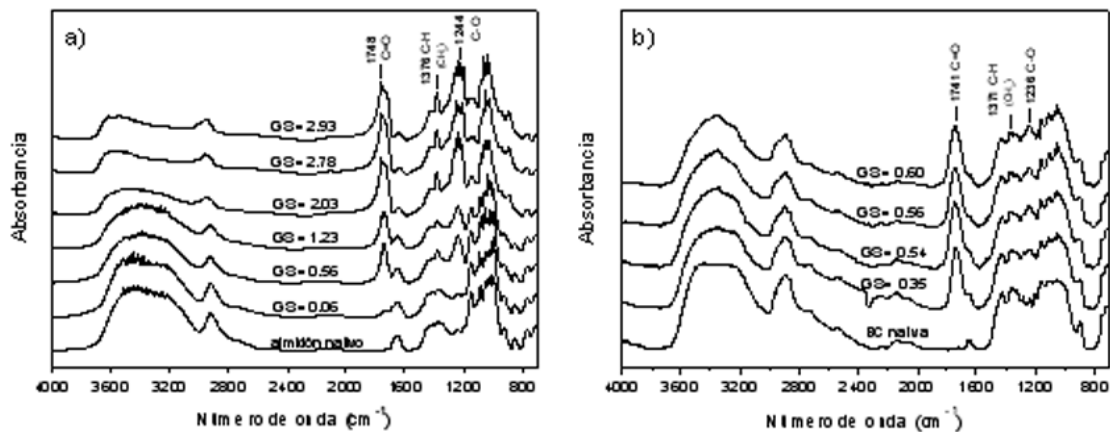


Fig. 4. Espectros FTIR de muestras de almidón y celulosa bacterial nativos y acetilados.

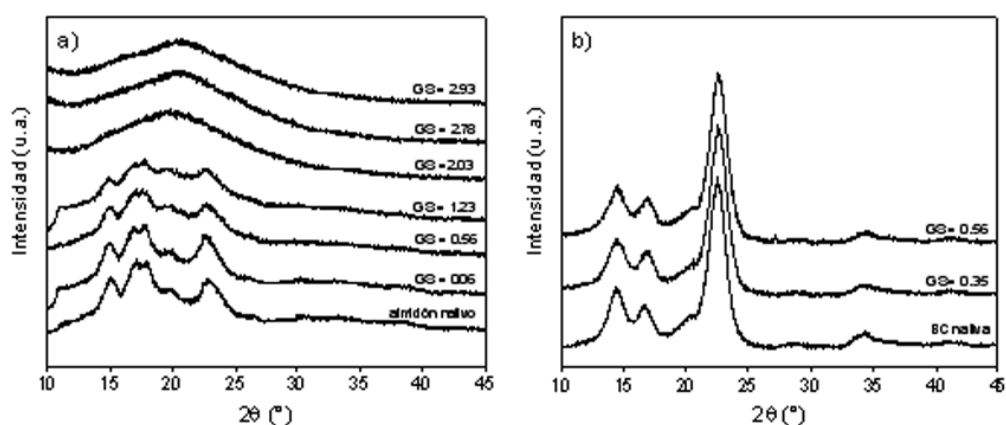
Por otra parte, y a diferencia de lo observado en el caso de las muestras de almidón acetilado, y si bien la acetilación implica la sustitución de una fracción de grupos hidroxilos por grupos acetato, la Fig. 4b no evidenció una reducción significativa de la intensidad de la banda centrada en 3300 cm⁻¹ asociada con la vibración de los grupos OH. Este comportamiento ha sido previamente atribuido a la derivatización de la BC que se da esencialmente en los

grupos hidroxilos accesibles de la superficie de las nanofibras o en la fracción amorfa de la celulosa [44].

Finalmente, cabe destacar que en todos los espectros de los biopolímeros derivatizados la ausencia de absorción en la región de $1850 - 1760 \text{ cm}^{-1}$ indica que las muestras acetiladas fueron recuperadas libres de anhídrido acético no reaccionado [37].

3.4. Difracción de rayos X (DRX)

La técnica de difracción de rayos X fue utilizada con el fin de determinar si la acetilación organocatalítica alteró la estructura de los biopolímeros derivatizados. En cuanto al almidón, este polisacárido exhibe una estructura semicristalina, y dependiendo del origen botánico se identifican patrones de difracción de tipo A, B o C. El patrón tipo A se encuentra principalmente en los almidones de cereales; mientras que el tipo B es característico de almidones de tubérculos, frutas y almidones de maíz con alto contenido de amilosa. El tipo C es una mezcla de las estructuras tipo A y B y se da naturalmente en almidón de frijoles y guisantes [27, 45-46].



La Fig. 5a reúne los difractogramas de rayos X obtenidos para el almidón de maíz nativo y para almidones acetilados con GS en el rango de 0.06 a 2.93. El almidón de maíz nativo exhibe un patrón de difracción tipo A característico de almidones de cereales, con picos de difracción en valores de 2θ de 14.9° , 17.0° , 17.8° , 19.8° y 22.8° . Para almidones acetilados con GS de hasta 1.23, los patrones obtenidos fueron muy similares al del almidón de maíz nativo en términos de número y posición de los picos. Sin embargo, la intensidad de los picos característicos sí mostró una reducción gradual con el aumento del GS, indicando que la incorporación de los grupos acetato redujo progresivamente la cristalinidad de los almidones [27].

La cristalinidad en los almidones de cereales en general ha sido atribuida a la formación de dobles hélices por puentes hidrógeno intermoleculares dentro de los segmentos de amilopectina [37]. En los almidones acetilados, el reemplazo parcial de los grupos hidroxilos por grupos acetato más hidrofóbicos y de mayor volumen redundaría en una menor formación de enlaces de hidrógeno inter e intramoleculares, resultando en la progresiva destrucción de la estructura ordenada original [37, 47]. Para almidones con los mayores GS alcanzados ($\text{GS} \geq 2.03$) se observaron patrones de DRX totalmente amorfos, indicando que para estos niveles de sustitución la estructura cristalina se perdió por completo. Xu et al. (2004), obtuvieron resultados similares en la acetilación de almidón de alta amilosa catalizada por NaOH [35]. Los autores reportaron que cuando los grupos hidroxilos fueron reemplazados parcialmente

por grupos acetato ($GS=0.57$ y $GS=1.11$), los picos cristalinos del almidón de maíz nativo aún se observaron, pero con intensidades más débiles. Patrones de difracción de almidones con $GS=1.68$ ilustraron el progreso de la reducción de cristalinidad, hasta obtenerse para $GS \geq 2.23$ patrones de difracción totalmente amorfos [35].

La celulosa tiene varios polimorfismos cristalinos (I, II, III, IV), siendo la Celulosa I el polimorfismo producido naturalmente por las bacterias del género *Gluconacetobacter*. La Fig. 5b recoge los difractogramas de la celulosa bacterial nativa y de la celulosa bacterial acetilada por vía organocatalítica con $GS=0.35$ y $GS=0.56$. La BC nativa mostró cinco picos de difracción ubicados en $2\theta=14.4^\circ$ (101), 16.7° (10-1), 20.1° (021), 22.5° (002), y 34.4° (040), todos ellos correspondientes a Celulosa I [48-49].

Para los GS alcanzados en la acetilación de BC aquí descrita, los difractogramas de las muestras de BC derivatizada fueron muy similares a los de la BC nativa, tanto en lo que refiere al número y posición de los picos como a su intensidad. A fines de determinar cuantitativamente si la acetilación indujo cambios significativos en la cristalinidad de la celulosa bacterial, se calculó el índice de cristalinidad de la BC nativa y modificada utilizando el método empírico propuesto por Segal (1959) para celulosa [26]. Los índices de cristalinidad obtenidos fueron de 89% para BC nativa, 87% para la BC acetilada con $GS=0.35$, y de 86% para BC acetilada con $GS=0.56$. La escasa variación en el índice de cristalinidad de las muestras analizadas confirmó que la acetilación organocatalítica de BC ocurrió preferencialmente en la superficie y regiones amorfas de las nanofibras, no afectando su ultraestructura [21, 44].

4. Conclusiones

En la presente contribución se propuso la acetilación de dos biopolímeros de interés, mediante una novedosa metodología organocatalítica caracterizada por el uso de un α -hidroxiácido de origen natural como catalizador y por la operación en ausencia de solventes.

En el caso del almidón de maíz, controlando adecuadamente las condiciones de reacción, la metodología propuesta demostró su idoneidad para producir almidones acetilados en todo el rango de GS posible. En lo que respecta a la celulosa bacterial, mediante la sola variación del tiempo de reacción, se logró obtener nanofibras de celulosa con GS en el rango de 0.35 a 0.60.

En ambos casos, la introducción de grupos acetato fue confirmada por RMN CP/MAS ^{13}C y FTIR. La difracción de rayos X, por su parte, permitió evaluar cambios en la estructura cristalina de los biopolímeros como consecuencia de la acetilación. En el caso de la derivatización del almidón de maíz, se observó una progresiva reducción de la cristalinidad del biopolímero con el aumento del GS de las muestras. En el caso de la acetilación de celulosa bacterial, en cambio, la derivatización organocatalítica no indujo cambios significativos en su cristalinidad relativa, aún para valores de GS para los cuales la intensidad de los picos cristalinos del almidón sí se vio alterada ($GS=0.56$, Fig. 5).

Los resultados de DRX (Fig. 5) en conjunto con el patrón de evolución de la acetilación en el tiempo (Fig. 2), y la evolución del área de la banda correspondiente a los grupos hidroxilos en el espectro FTIR (Fig. 4), sugieren que mientras que la acetilación de la BC fue un proceso superficial, en el almidón la acetilación involucró también regiones cristalinas del gránulo.

En este contexto, la ruta de acetilación organocatalítica propuesta se presenta como una metodología prometedora para la modulación sostenible de la polaridad superficial de la BC, con vías a su uso en el refuerzo de matrices apolares como por ejemplo resinas de tipo poliéster biodegradable. En el caso del almidón, la ruta también resulta una alternativa atractiva para la preparación sencilla y sostenible de almidones acetilados en todo el rango de GS, ya sea para su uso en aplicaciones específicas que requieran la funcionalidad introducida, o a efectos de reducir la conocida hidrofiliidad del almidón nativo.

Las ventajas más importantes de la metodología de acetilación propuesta incluyen la operación sin solventes agregados, el uso de catalizadores no tóxicos de origen natural, la operación en condiciones moderadas de temperatura y presión, y la facilidad de recuperación de los biopolímeros esterificados debido a la heterogeneidad del sistema de reacción. Vale destacar finalmente, que el potencial de la metodología de esterificación organocatalítica descrita no se agota en los biopolímeros estudiados en la presente contribución, sino que la misma puede ser fácilmente extendida a la esterificación de otros biopolímeros y nanobiopolímeros usando una variedad de anhídridos y ácidos carboxílicos como agentes acilantes.

5. Agradecimientos

Los autores agradecen al CONICET (PIP 11220110100608), a la Universidad de Buenos Aires (UBACYT 20020120100336BA), y a la ANPCyT (PICT 1957-2012) por el apoyo financiero otorgado. Los autores también agradecen a la Lic. Silvana Arroyo (Laboratorio de Sólidos Amorfos, FIUBA) por las mediciones de DRX.

Referencias

- [1] D.J. Thomas & W.A. Atwell, *AACC International* **1**, 1 (1998).
- [2] B. Kaur, F. Ariffin, R. Bhat & A.A. Karim, *Food Hydrocolloid*. **26**, 398 (2012).
- [3] V.P. Cyras, M.C. Tolosa Zenklusen & A. Vazquez, *J. Appl. Polym. Sci.* **101**, 4313 (2006).
- [4] R.L. Shogren, *Carbohydr. Polym.* **29**, 51 (1996).
- [5] J. Singh, L. Kaur & O.J. McCarthy, *Food Hydrocolloid*. **21**, 1 (2007).
- [6] R.L. Shogren, *Carbohydr. Polym.* **72**, 439 (2008).
- [7] A. Biswas, R.L. Shogren, G. Selling, J. Salch, J.L. Willett & C.M. Buchanan *Carbohydr. Polym.* **74**, 137 (2008).
- [8] M. Iguchi, S. Yamanaka & A. Budhiono, *J. Mater. Sci.* **35**, 261 (2000).
- [9] M.L. Foresti, P. Cerrutti & A. Vazquez, en *Polymer nanocomposites based on inorganic and organic nanomateriales*, Cp. 2, S. Mohanty, S. Nayak, B.S. Kaith & S. Kalia (Editores), Scrivener Publishing. En prensa, 2015.
- [10] G. Siqueira, J. Bras & A. Dufresne, *Polymers*, **2**, 728 (2010).
- [11] S.J. Eichhorn, A. Dufresne, M. Aranguren, N.E. Marcovich, J.R. Capadona, S.J. Rowan, et al. *J. Mater. Sci.* **45**, 1 (2010).
- [12] Y. Habibi, L. Lucia & O.J. Rojas, *Chem. Rev.* **110**, 3479 (2010).
- [13] H. Charreau, M.L. Foresti & A. Vázquez, *Recent Pat. Nanotechnol.* **7**, 56 (2013).
- [14] N. Durán, A.P. Lemes & A.B. Seabra, *Recent Pat. Nanotechnol.* **6**, 16 (2012).
- [15] D. Klemm, F. Kramer, S. Moritz, T. Lindström, M. Ankerfors, D. Gray, et al. *Angew Chem. Int. Ed.* **50**, 5438 (2011).
- [16] K. Missoum, M.N. Belgacem & J. Bras, *Materials* **6**, 1745 (2013).
- [17] I. Siro & D. Plackett, *Cellulose* **17**, 459 (2010).
- [18] S. Ifuku, M. Nogi, K. Abe, K. Handa, F. Nakatsubo & H. Yano,

- Biomacromolecules* **8**, 1973 (2007).
- [19] S. Berlioz, S. Molina-Boisseau, Y. Nishiyama & L. Heux, *Biomacromolecules* **10**, 2144 (2009).
- [20] W. Hu, S. Chen, Q. Xu & H. Wang, *Carbohydr. Polym.* **83**, 1575 (2011).
- [21] L.C. Tomé, M.G. Freire, L.P.N. Rebelo, A.J.D. Silvestre, C.P. Neto, I.M. Marrucho, et al., *Green Chem.* **13**, 2464 (2011).
- [22] J.A. Ávila Ramírez, C. Juan Suriano, P. Cerrutti & M.L. Foresti, *Carbohydr. Polym.* **114**, 416 (2014).
- [23] E. Pérez Romagnoli. *Mundo Agrario* **9**, (2009).
- [24] J. Hafrén & A. Córdova, *Macromol. Rapid Commun.* **26**, **82** (2005).
- [25] ASTM D871-96, Standard Test Methods of Testing Cellulose Acetate.
- [26] L. Segal, J.J Creely, A. Martin & C.M. Conrad, *Text. Res. J.* **29**, 786 (1959).
- [27] A. López-Rubio, J.M. Clarke, B. Scherer, D. Topping & E.P. Gilbert, *Food Hydrocolloid.* **23**, 1940 (2009).
- [28] B.H. Bajka, Ph. D. Thesis, *The effects of increased butyrate delivered as butyrylated starch on large bowel physiology in the rat*, University of Adelaide, 2007.
- [29] H. Chi, K. Xu, X. Wu, Q. Chen, D. Xue, C. Song, et al., *Food Chem.* **106**, 923 (2008).
- [30] S. Garg & A. K. Jana, *Carbohydr. Polym.* **83**, 1623 (2011).
- [31] N.W.H. Cheetham & L. Tao, *Carbohydr. Polym.* **36**, 283 (1998).
- [32] S. Khatoon, Y.N. Sreerama, D. Raghavendra, S. Bhattacharya & K.K. Bhat, *Food Res. Int.* **42**, 1426 (2009).
- [33] J. Li, L. Zhang, F. Peng, J. Bian, T. Yuan, F. Xu & R. Sun, *Molecules* **14**, 3551 (2009).
- [34] W.L. Earl & D.L. VanderHart, *J. Am. Chem. Soc.* **102**, 3251 (1980).
- [35] Y. Xu, V. Miladinov & M.A. Hanna, *Cereal Chem.* **81**, 735 (2004).
- [36] F. Han, M. Liu, H. Gong, S. Lü, B. Ni & B. Zhang, *Int. J. Biol. Macromol.* **50**, 1026 (2012).
- [37] C.I.K. Diop, H. Li, B.J. Xie & J. Shi, *Food Chem.* **126**, 1662 (2011).
- [38] R. Kizil, J. Irudayaraj & K. Seetharaman, *J. Agr. Food Chem.* **50**, 3912 (2002).
- [39] J.J. Cael, J.L. Koenig & J. Blackwell, *Biopolymers* **14**, 1885 (1975).
- [40] C. Castro, R. Zuluaga, J.L. Putaux, G. Caroa, I. Mondragón & P. Gañan, *Carbohydr. Polym.* **84**, 96 (2011).
- [41] M. Moosavi-Nasab & A. Yousefi, *Iranian J. Biotechnol.* **9**, 94 (2011).
- [42] J.I. Morán, V.A. Alvarez, V.P. Cyras & A. Vázquez, *Cellulose* **15**, 149 (2008).
- [43] B. Braun & J.R. Dorgan, *Biomacromolecules* **10**, 334 (2009).
- [44] K.Y. Lee, F. Quero, J.J. Blaker, C.A.S. Hill, S.J. Eichhorn & A. Bismarck, *Cellulose* **18**, 595 (2011).
- [45] L. Copeland, J. Blazek, H. Salman & M.C. Tang, *Food Hydrocolloid.* **23**, 1527 (2009).
- [46] A. A. Karim, M.H. Norziah & C.C. Seow, *Food Chem.* **71**, 9 (2000).
- [47] L.M. Zhang, W.G. Xie, X. Zhao, Y. Liu & W. Gao, *Thermochim Acta* **495**, 57 (2009).
- [48] E.N. Johnson Ford, S.K. Mendon, S.F. Thames & J.W. Rawlins, *J. Eng. Fiber Fabr.* **5**, 10 (2010).
- [49] S. Park, J.O. Baker, M.E. Himmel, P.A. Parilla & D.K. Johnson. *Biotechnol Biofuel.* **3**, 1 (2010).

Manuscrito recibido el 15 de abril de 2015.
Aceptado el 24 de abril de 2015.