



UNIVERSIDAD NACIONAL DE
MAR DEL PLATA
Facultad de Ingeniería
Departamento de Ingeniería en Materiales



Almidón termoplástico de maíz extruido reactivamente vía esterificación organocatalítica de ácido salicílico para el desarrollo de materiales de acolchado agrícola activo y sustentable

Proyecto final para optar al grado de Ingeniera en Materiales

Autora:

Victoria T. Troncoso,

victoriatroncoso23@gmail.com

Director: Dr. Tomy J. Gutiérrez, tomy.gutierrez@fi.mdp.edu.ar

Co-Director: Dr. Leandro N. Ludueña, luduenanmdp@gmail.com

Mar del Plata, 27 de febrero 2025

Lugar de desarrollo de las actividades experimentales:

Grupo de Materiales Compuestos Termoplásticos (CoMP)

Instituto de Investigaciones en Ciencia y Tecnología de Materiales (INTEMA)

CONICET-UNMdP

Tel: +54 223 626-0600 Int 2120

Av. Colón 10850. B7606BWV Mar del Plata. Argentina



RINFI es desarrollado por la Biblioteca de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de Mar del Plata.

Tiene como objetivo recopilar, organizar, gestionar, difundir y preservar documentos digitales en Ingeniería, Ciencia y Tecnología de Materiales y Ciencias Afines.

A través del Acceso Abierto, se pretende aumentar la visibilidad y el impacto de los resultados de la investigación, asumiendo las políticas y cumpliendo con los protocolos y estándares internacionales para la interoperabilidad entre repositorios



Esta obra está bajo una [Licencia Creative Commons Atribución- NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).



UNIVERSIDAD NACIONAL DE
MAR DEL PLATA
Facultad de Ingeniería
Departamento de Ingeniería en Materiales



Almidón termoplástico de maíz extruido reactivamente vía esterificación organocatalítica de ácido salicílico para el desarrollo de materiales de acolchado agrícola activo y sustentable

Proyecto final para optar al grado de Ingeniera en Materiales

Autora:

Victoria T. Troncoso,

victoriatroncoso23@gmail.com

Director: Dr. Tomy J. Gutiérrez, tomy.gutierrez@fi.mdp.edu.ar

Co-Director: Dr. Leandro N. Ludueña, luduenanmdp@gmail.com

Mar del Plata, 27 de febrero 2025

Lugar de desarrollo de las actividades experimentales:

Grupo de Materiales Compuestos Termoplásticos (CoMP)

Instituto de Investigaciones en Ciencia y Tecnología de Materiales (INTEMA)

CONICET-UNMdP

Tel: +54 223 626-0600 Int 2120

Av. Colón 10850. B7606BWV Mar del Plata. Argentina

Agradecimientos

Agradecemos al Dr. Oswaldo Hernandez-Hernandez del Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL), Madrid, España por apoyar esta investigación con la adquisición de los espectros de resonancia magnética nuclear en ^{13}C en estado sólido (^{13}C CP MAS NMR) y los espectros WAXS/SAXS (Wide Angle X-Ray Scattering/Small Angle X-Ray Scattering – dispersión de rayos X de ángulo amplio/dispersión de rayos X de ángulo pequeño). Apreciamos también la colaboración de la Dra. María Victoria Álvarez y Dra. Alejandra G. Ponce del Grupo de Investigación en Ingeniería en Alimentos (GIIA) del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Ambiente (INCITAA) de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de Mar del Plata (UNMdP), quienes permitieron llevar a cabo la determinación de las propiedades antioxidantes y antimicrobianas de los materiales. Valoramos también el apoyo de la Dra. Julieta R. Mendieta del Grupo de Fisiología del Estrés en Plantas del Instituto de Investigaciones Biológicas (IIB) de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UNMdP, quien nos ayudó en la determinación de los ensayos de ecotoxicidad de los materiales. Reconocemos también toda la asistencia brindada por el Lic. Andrés Torres Nicolini durante la manufactura de las muestras.

Índice

Agradecimientos	2
1. Resumen	5
2. Introducción	6
2.1. Marco teórico	6
Plásticos en la industria agrícola	6
Almidón	7
Ácido salicílico y ácido tartárico como aditivos de grado alimentario en películas termoplásticas de almidón	9
Extrusión reactiva	11
2.2. Objetivo general	12
2.3. Objetivos específicos	12
2.4. Hipótesis	13
3. Experimental	13
3.1. Materiales	13
3.2. Formulación y manufactura de las películas	13
3.3. Caracterización de las películas	15
3.3.1. Análisis estructural: Grado de sustitución (DS), espectroscopía de resonancia magnética nuclear de giro angular mágico con polarización cruzada de ¹³ C en estado sólido (¹³ C CP MAS NMR), espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (ATR/FTIR), difracción de rayos X (XRD) y dispersión de rayos X de ángulo amplio y pequeño (WAXS/SAXS)	15
3.3.2. Análisis térmico: Calorimetría diferencial de barrido (DSC) y análisis termogravimétrico (TGA)	18
3.3.3. Análisis fisicoquímico: Hinchamiento (SW), solubilidad en agua (WS), absorción de humedad (WA), densidad (ρ), espesor (e) y opacidad	19
3.3.4. Análisis superficial: Ángulo de contacto de agua (WCA), humedad superficial (SM), microscopía electrónica de barrido (SEM) y microscopía de fuerza atómica (AFM)	20
3.3.5. Análisis mecánico: Ensayo de tracción uniaxial	21
3.3.6. Análisis funcional: Propiedades antioxidantes, antimicrobianas y ecotoxicidad	22
4. Resultados y discusión	23
4.1. Análisis estructural: DS, espectroscopías de ¹³ C CP MAS NMR, ATR/FTIR, XRD y WAXS/SAXS	23
4.2. Análisis térmico: DSC y TGA	34
4.3. Análisis fisicoquímico: SW, WS, WA, ρ, e y opacidad	37

4.4. Análisis superficial: WCA, SM, SEM y AFM.....	40
4.5. Análisis mecánico: Ensayo de tracción uniaxial.....	43
4.6. Análisis funcional: Propiedades antioxidantes, antimicrobianas y ecotoxicidad	45
5. Análisis de factibilidad económica de producción a escala industrial.....	48
6. Conclusiones	49
7. Trabajos futuros	49
8. Presentaciones	50
9. Bibliografía.....	50

1. Resumen

El objetivo de este trabajo fue desarrollar e investigar el efecto de la reacción organocatalítica del almidón termoplástico de maíz mediante el uso de ácido salicílico como sustancia activa a ser esterificada sobre el almidón y de ácido tartárico como organocatalizador verde para facilitar esta reacción. Todo esto con el propósito de mejorar el desempeño global de las películas a base de almidón termoplástico (TPS). Para esto se procesaron, bajo condiciones de extrusión reactiva, cuatro sistemas de película a base de almidón de maíz plastificadas con glicerol: 1) TPS como sistema de película control, 2) TPS con un contenido del 2 % (p/p con respecto al peso de almidón) de ácido salicílico (límite máximo permitido) (TPS + SalAc), 3) TPS con contenido de ácido tartárico (misma relación molar que el ácido salicílico) (TPS + TAc) y 4) TPS conteniendo una mezcla molar 1:1 ácido salicílico:ácido tartárico (TPS + SalAc + TAc). Para evaluar el efecto de la reacción organocatalítica sobre el almidón y su potencial impacto en el desarrollo de acolchados agrícolas activos en términos de actividad antimicrobiana y antioxidante, los materiales fueron analizados en términos estructurales, térmicos, fisicoquímicos, superficiales, mecánicos y funcionales. Los resultados obtenidos han demostrado que el SalAc puede ser injertado sobre la estructura del almidón bajo condiciones de extrusión reactiva vía esterificación organocatalítica. Sin embargo, esta reacción no fue determinante en el desempeño fisicoquímico y mecánico general de los materiales desarrollados. Por otra parte, este estudio reveló que bajos contenidos de agua relacionados intrínsecamente a las materias primas (almidón y glicerol), produjeron la hidrólisis ácida del almidón en presencia de SalAc y de TAc, ya sea de manera individual o en conjunto. En particular, el TAc mostro un efecto hidrolizante del almidón mayor que el SalAc. Por otro lado, todos los sistemas de película mostraron actividad antioxidante insignificante. No obstante, se comprobaron propiedades antimicrobianas sobresalientes contra *L. innocua* (Gram positiva) y *P. aeruginosa* (Gram negativa). Por último, SalAc y TAc bajo las concentraciones ensayadas incidieron negativamente sobre el crecimiento de plántulas de lechuga (efecto ecotóxico).

2. Introducción

2.1. Marco teórico

Los polímeros juegan un rol vital en una amplia variedad de industrias y sectores. Los más utilizados en términos generales son el polietileno de baja y alta densidad (LDPE y HDPE), el polipropileno (PP) el polimetilmetacrilato (PMMA), el polietilentereftalato (PET), etc. Sin embargo, poseen la desventaja de no ser biodegradables. Cuando estos residuos plásticos son depositados en vertederos interactúan con el agua, generando sustancias químicas peligrosas que podrían tener un impacto negativo en el ambiente. Por esta razón, diversas iniciativas están siendo dirigidas a reducir el empleo de plásticos sintéticos y fomentar el uso de bioplásticos.

La producción global de biopolímeros alcanzó las 2.22 millones de toneladas métricas en el año 2022 (1), lo cual representa un número relativamente bajo en comparación con los polímeros derivados del petróleo, cuya producción mundial fue de 400.3 millones de ton/m (1) Por tal razón, en las últimas décadas, la conciencia ambiental de los consumidores ha ido incrementando de forma exponencial, lo que ha generado un aumento significativo de la demanda de productos biodegradables y amigables con el ambiente. Actualmente, los materiales basados en biopolímeros están principalmente constituidos por quitosano, celulosa y/o almidón. Estos polímeros biodegradables están siendo altamente considerados para la producción de películas, recubrimientos y envases alimentarios, acolchados agrícolas, fertilizantes encapsulados, recubrimientos de semillas, etc. Además, la presencia de propiedades antimicrobianas en estos materiales es bien valorada, junto con características tales como hidrofobicidad, alto desempeño mecánico e impermeabilidad.

Plásticos en la industria agrícola

Los plásticos son ampliamente utilizados en la agricultura, desde semillas recubiertas de plástico hasta láminas plásticas para proteger los cultivos, promover cosechas precoces, mejorar el rendimiento y la calidad, evitar el contacto del fruto con el suelo y controlar malezas. El bajo costo y la gran variedad de productos plásticos disponibles han transformado la producción agrícola de una actividad de bajo desperdicio a una industria con un problema significativo de desechos. Aunque esto ha ayudado a los agricultores a aumentar rendimientos y reducir el desperdicio de alimentos, ha traído grandes problemas para reutilizar, reciclar, degradar eficazmente o desechar adecuadamente muchos plásticos agrícolas (2).

El suelo agrícola productivo es un recurso finito y es fácilmente degradado por múltiples fuentes, tales como su uso intensivo, contaminación, cambio climático, etc. Existen diferentes estudios (3) que indican que una acumulación de plástico puede tener impactos de gran alcance en la salud del suelo, la biodiversidad y la productividad, lo cual podría llevar a una reducción de la productividad y podría amenazar la seguridad alimentaria a largo plazo.

Los plásticos en el suelo son una fuente importante de microplásticos para otras partes del ambiente, ya que el escurrimiento superficial y la erosión pueden transportar estas pequeñas partículas desde los campos hacia los cursos de agua. Los microplásticos también son capaces de migrar desde las capas superficiales del suelo hacia capas más profundas (4). Existe evidencia de que los microplásticos tienen impactos variados en las comunidades microbianas, algunos invertebrados y las propiedades fisicoquímicas del suelo, dependiendo del tamaño de las partículas y el nivel de exposición. Distintas investigaciones han encontrado que la presencia de microplásticos puede disminuir el número, la diversidad, el movimiento y la tasa de reproducción de la biota del suelo, disminuir la biomasa de la fauna del suelo, aumentar la biomasa de los microbios y aumentar la actividad microbiana (9).

En particular, los acolchados o cobertores agrícolas se colocan antes de la siembra con el fin de mantener la temperatura y la humedad, controlar el crecimiento de malezas para promover la germinación y el crecimiento de las plantas, evitar la erosión y mejorar la gestión del agua (5). Este tipo de recubrimientos tienen una alta resistencia mecánica y son utilizados principalmente al aire libre, asociados con túneles o bajo invernaderos. Según la Revista Plásticos N°308 (6), publicada por la Cámara Argentina de la Industria Plástica, en el año 2013 los acolchados agrícolas ocupaban una superficie de 7900 hectáreas en la República Argentina.

Almidón

El almidón, un polímero renovable y natural, ha sido ampliamente utilizado para fabricar materiales biodegradables con el potencial de reemplazar a los plásticos sintéticos en diversas aplicaciones. Esto se debe a las notables ventajas del almidón, como su bajo costo, abundancia, renovabilidad anual y biodegradabilidad inherente. La gran diversidad de fuentes de almidón da como resultado diversas composiciones, formas, tamaños y funcionalidades en la estructura semicristalina del almidón.

El almidón puede ser obtenido principalmente de plantas, pero también puede provenir de raíces, tubérculos, cereales y legumbres. Estudios anteriores han revelado que el almidón contiene dos tipos de microestructuras: lineal y ramificada (**Figura 1**) (7). Por lo tanto, se considera un material heterogéneo. La estructura lineal se conoce como amilosa (forma cristizable de almidón compuesta por largas cadenas de polisacáridos no ramificadas), mientras que la estructura ramificada se llama amilopectina (forma no cristizable de almidón con cadenas de polisacáridos ramificadas).

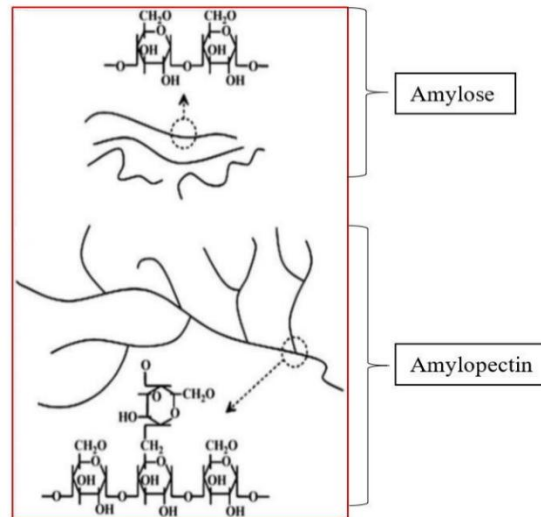


Figura 1. Representación química de los dos tipos de microestructuras presentes en el almidón modificado.

El almidón posee un arreglo cristalino con dobles hélices que genera tres patrones de difracción de rayos X para el almidón, conocidos como tipo-A, tipo-B y tipo-C. El polimorfismo de tipo-A es característico de la mayoría de los cereales, donde las dobles hélices de amilopectina están empaquetadas en forma de celdas unitarias monoclinicas y contienen de 4 a 8 moléculas de agua (siendo este empaquetamiento más denso que el del tipo-B). El polimorfismo de tipo-B, comúnmente encontrado en tubérculos y raíces, presenta dobles hélices empaquetadas hexagonalmente con 36 moléculas de agua. Por su parte, el polimorfismo de tipo-C es una mezcla de los polimorfismos de tipo A y B, característico de los almidones de legumbres. A baja humedad, la alta temperatura y presión pueden causar una transición estructural del tipo B al tipo A, esta transición se debe a la pérdida de agua, lo que provoca una reorganización de las dobles hélices (8)

El almidón es, además, una excelente fuente de material biodegradable para el empaque de alimentos, es ampliamente considerado como un sustituto sostenible de los plásticos para esta aplicación. Las tres formas en que se puede utilizar el almidón en la producción de películas biodegradables son las siguientes: en primer lugar, se pueden usar pequeñas

cantidades de almidón en la preparación, es decir, combinado con otros plásticos. En segundo lugar, puede realizarse la preparación de materiales compuestos de almidón, con este polímero comprendiendo más de la mitad de la masa. En tercer lugar, suele utilizarse la extrusión, procesando mezclas de almidón granular en procesos de preparación especiales (9).

El uso de películas biodegradables a base de almidón para el empaque de alimentos y para recubrimiento de suelos posee numerosas ventajas. Entre ellas se encuentra su contribución a la reducción del consumo de combustibles fósiles, su falta de toxinas, su origen en fuentes vegetales (recursos renovables), su biodegradabilidad y biocompatibilidad, su bajo costo y abundancia, su seguridad para el consumo cuando se usa en el empaque de alimentos, su bajo consumo de energía, su papel como solución de disposición ecológica y la ausencia de un aumento neto de CO₂ en el ecosistema global. A pesar de estos beneficios, este tipo de películas biodegradables presentan ciertas desventajas con respecto a los plásticos sintéticos convencionales, las cuales incluyen propiedades mecánicas deficientes, baja estabilidad en agua, alta sensibilidad a la humedad, presencia de una barrera de humedad deficiente debido a su comportamiento hidrofílico fuerte, su comportamiento quebradizo a temperatura ambiente y su alto contenido de humedad. Estas limitaciones son las que deben superarse de alguna forma, como por ejemplo mediante el uso de aditivos, para aumentar la rentabilidad de los bioplásticos basados en almidón en diversas aplicaciones.

Ácido salicílico y ácido tartárico como aditivos de grado alimentario en películas termoplásticas de almidón

El ácido salicílico (SalAc) es un ácido fenólico orgánico natural y no tóxico con un anillo aromático unido a un grupo hidroxilo (**Figura 2A**) y ha sido utilizado durante décadas en el campo de la conservación de alimentos para extender la vida útil de diversos productos. Muchos estudios han evaluado las excelentes actividades antibacterianas y propiedades mecánicas de las películas compuestas de TPS-SalAc (10).

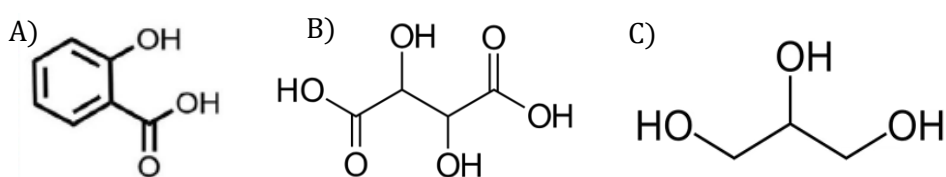


Figura 2. Estructura química del A) ácido salicílico, B) ácido tartárico y C) glicerol.

El SalAc es un posible regulador del crecimiento de plantas mediante la activación de numerosos procesos fisiológicos y metabólicos. También se conoce como un componente crucial de los mecanismos de defensa de las plantas contra estímulos ambientales. En plantas estresadas, se documenta que puede modular de manera efectiva una gran cantidad de procesos metabólicos, incluyendo el fortalecimiento del sistema de defensa oxidativa al limitar directa o indirectamente la acumulación de radicales reactivos de nitrógeno y oxígeno. Aunque desempeña un papel crucial en la tolerancia de las plantas a varios esfuerzos, no está completamente confirmado si las concentraciones bajas o altas de este regulador de crecimiento vegetal (PGR) son efectivas para lograr un crecimiento óptimo de las plantas en ambientes estresantes (11). Tampoco se comprende completamente hasta qué punto y de qué manera se interrelaciona con otros posibles reguladores del crecimiento dentro de la planta. Debido a su papel beneficioso en la protección de los cultivos contra los efectos dañinos de los factores estresantes bióticos y abióticos, que se agravan debido al calentamiento global y al aumento constante de la contaminación industrial, el SalAc ha despertado un mayor interés en los últimos años.

La aplicación de SalAc en plantas induce la acumulación endógena de SalAc, lo que confiere resistencia a la planta contra diferentes patógenos. Sin embargo, el SalAc tiene roles controvertidos en el desarrollo y crecimiento de las plantas, dependiendo de su concentración, del pH de las soluciones de aplicación, así como también de la especie vegetal en cuestión. Por ejemplo, dependiendo de la especie vegetal, una dosis alta de SalAc ($>1-2$ mM) no solo mejora la resistencia de la planta, sino que también regula negativamente los procesos de desarrollo de la planta, afectando la productividad del cultivo. Se ha descubierto también que el SalAc, en algunos casos, inhibe la germinación de semillas y bloquea la respuesta a heridas (12). Generalmente, altos niveles de SalAc (concentraciones mayores a 1 mM son consideradas altas) regulan negativamente el desarrollo y crecimiento de las plantas. No obstante, la aplicación de concentraciones óptimas de SalAc ha mostrado efectos beneficiosos en ellas. Dependiendo de las condiciones experimentales, el SalAc estimuló claramente el crecimiento tanto en condiciones normales como bajo diferentes esfuerzos abióticos en diversas especies vegetales. La aplicación exógena de SalAc también ha demostrado diferentes efectos en el desarrollo de las plantas, incluyendo la germinación de semillas, el brote, la floración y el cuajado y maduración de frutos. Por lo tanto, podría decirse que diferentes concentraciones de SalAc en diferentes plantas tienen efectos ya sea estimulantes o bloqueadores en el desarrollo vegetal (13).

Además, el SalAc desempeña un papel clave en la resistencia de las plantas contra diferentes patógenos microbianos, tales como virus, bacterias, hongos, etc. En las plantas, la

correlación entre los niveles endógenos de SalAc y las respuestas de resistencia contra patógenos biotróficos y hemibiotróficos está bien establecida. Además, la aplicación exógena de SalAc induce resistencia adquirida local y sistémica en diferentes especies vegetales contra varios tipos de patógenos (13). Debido a los distintos resultados obtenidos y a la contradicción que algunos de ellos presentan entre sí, es necesario analizar cada caso cuidadosamente para analizar el efecto del SalAc en diferentes sistemas planta-patógeno y condiciones de campo. Por otra parte, estudios previos han demostrado que la inclusión de SalAc disminuye la resistencia a la tracción y la rigidez de las películas que contienen glicerol (14).

A su vez, el ácido tartárico (TAc) es un ácido orgánico que puede ser encontrado en muchos vegetales y frutas tales como bananas, uvas, cítricos, etc. (**Figura 2B**). El TAc puede también ser comúnmente encontrado en los exudados de las raíces. Cada vez más estudios han demostrado que el ácido tartárico es eficaz en la promoción del crecimiento de las plantas y la acumulación de Cd (15). El TAc, así como otros ácidos orgánicos y algunos aminoácidos, han sido identificados como organocatalizadores verdes de grado alimenticio capaces de esterificar y unir ácidos grasos de cadena corta a la estructura del almidón (16). Imre y Vilaplana (2020) (17) informaron recientemente que el TAc tiene un efecto organocatalítico más alto en comparación con otros organocatalizadores verdes de grado alimenticio como el ácido aspártico, el ácido cítrico, el ácido fumárico, el ácido glutámico, el ácido glicólico, el ácido málico, etc.

En particular, el TAc fue seleccionado para este trabajo como un organocatalizador verde de grado alimenticio porque la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos aprueba su uso como un aditivo alimentario GRAS (Generalmente Reconocido como Seguro)(18). Además, es un organocatalizador fácil de obtener, de bajo costo y ha demostrado una alta tasa de conversión catalítica en comparación con otros organocatalizadores verdes de grado alimenticio.

Extrusión reactiva

En principio, para poder procesar el almidón, se debe añadir un plastificante. Los plastificantes más adecuados para ser utilizados en películas de almidón son los polioles como el glicerol, el glicol y el sorbitol, que interactúan con las cadenas de almidón aumentando la movilidad molecular y la flexibilidad de las películas (19). El glicerol es utilizado a menudo como plastificante en sistemas basados en almidón debido a su capacidad para formar enlaces de hidrógeno fuertes con las moléculas de almidón,

aumentar la hidrofiliidad del sistema al introducir grupos hidroxilo adicionales y mostrar una alta afinidad por el agua (**Figura 2C**) (20). Por esta razón, en el presente trabajo fue seleccionado el glicerol para la producción de las películas. Las películas a base de almidón plastificadas con glicerol muestran una mayor estabilidad térmica que las películas de control. De igual modo, la permeabilidad al vapor de agua de las películas a base de almidón termoplástico plastificadas aumenta con el incremento de la concentración de glicerol (21).

Ahora bien, en comparación con técnicas de procesamiento convencionales, la extrusión reactiva (REx) presenta diferentes ventajas competitivas tales como (22):

- La reacción es llevada a cabo en estado fundido y no se requiere solvente
- Permite trabajar con productos de alta viscosidad
- Las extrusoras son muy versátiles (por ejemplo, permiten la adición secuencial de los ingredientes de la reacción, como monómeros, polímeros, agua, solventes, reactivos, etc.) y son simples de usar debido a la independencia entre la velocidad de alimentación y la velocidad de los tornillos.

La técnica de procesamiento REx combina operaciones de transporte de masa y calor, las cuales ocurren de manera simultánea y junto con reacciones químicas bajo la temperatura y alta presión existentes dentro de la extrusora. Es por esto que la extrusora puede percibirse como un reactor. Para realizar la síntesis del material deseado por REx de manera óptima deben tenerse en cuenta ciertas variables tales como el tipo y contenido de plastificante, el perfil de temperaturas desde la zona de alimentación hasta la boquilla, el tiempo de residencia, la velocidad de rotación del tornillo, la tasa de flujo, etc. (23)

2.2. Objetivo general

Analizar almidón termoplástico de maíz extruido reactivamente *vía* esterificación organocatalítica del ácido salicílico para el desarrollo de materiales de acolchado agrícola activo y sustentable.

2.3. Objetivos específicos

- Manufacturar películas a base de almidón termoplástico de maíz extruido reactivamente *vía* esterificación organocatalítica de ácido salicílico para su aplicación como acolchado agrícola activo y sustentable

- Caracterizar y analizar los materiales obtenidos en términos estructurales, térmicos, fisicoquímicos, superficiales, mecánicos y funcionales.

2.4. Hipótesis

El agregado del ácido tartárico podría promover la esterificación del ácido salicílico sobre las cadenas de almidón, mejorando así el desempeño fisicoquímico y mecánico del material. Además, la adición de ácido salicílico podría favorecer el crecimiento de las plantas y cultivos presentes en el suelo una vez cumplida su función como acolchado agrícola.

3. Experimental

3.1. Materiales

Las materias primas utilizadas para la elaboración de las películas termoplásticas fueron almidón de maíz (Buffalo® 034010, Ingredion Argentina S.R.L., Buenos Aires, Argentina, pureza del almidón ~99% de acuerdo con las especificaciones del fabricante), glicerol (Química Industrial Kubo, pureza > 99,5%, $\rho = 1.26 \text{ g/mL}$ y punto de ebullición = 290 °C), L(+)-ácido tartárico (Fischer Chemical, pureza $\geq 99\%$, code: T/0200/53, lote: 1870187, CAS: 87-69-4, United Kingdom) y ácido salicílico (Química Industrial Kubo).

3.2. Formulación y manufactura de las películas

Cuatro mezclas distintas, todas basadas en almidón (140.0 g) y glicerol (60.0 g) fueron realizadas siguiendo trabajos previos (24). Se utilizó almidón de maíz como matriz termoplástica y glicerol como plastificante. Se realizó un sistema control cuya composición consistía solamente de almidón y glicerol (TPS – almidón termoplástico). Para determinar el efecto del ácido salicílico como agente esterificante del TPS, se manufacturó una segunda mezcla utilizando almidón, glicerol y ácido salicílico (4.0 g) (TPS+SalAc). Cabe destacar que el contenido de ácido salicílico usado (4.0 g) representa el 2% p/p con respecto al peso de la mezcla almidón/glicerol (200.0 g). Se seleccionó este porcentaje de ácido salicílico ya que concentraciones superiores al 2% no se encuentran permitidas según la United States Food and Drug Administration (USFDA) (25). Además, de acuerdo a la Disposición N° 6365/12 de la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) de Argentina (26), el contenido de ácido salicílico no debe exceder el 3%. Una tercera mezcla basada en almidón, glicerol y ácido tartárico (4.35 g = 2,175% p/p con respecto a la mezcla almidón/glicerol) fue fabricada (TPS+TAc) con el propósito de evaluar de forma

independiente el efecto del ácido tartárico (organocatalizador) sobre el TPS. Vale la pena resaltar que las mezclas TPS+SalAc y TPS+TAc tuvieron la misma relación molar ácido salicílico:ácido tartárico 1:1 (0.0290 mol) con el propósito de determinar el efecto químico real de dichos ácidos sobre el TPS (16,27). Es por esto que los porcentajes p/p de ácido salicílico y ácido tartárico con respecto a la mezcla almidón/glicerol fueron diferentes. Por último, se desarrolló un cuarto sistema compuesto por almidón, glicerol, ácido salicílico (4.0 g) y ácido tartárico (4.35 g) (TPS+SalAc+TAc) para determinar el potencial efecto organocatalizador del ácido tartárico en la esterificación del ácido salicílico sobre el almidón.

Todas las mezclas antes mencionadas fueron premezcladas manualmente usando una cuchara de acero inoxidable antes de ser introducidas en la extrusora. Los reactivos en polvo también fueron premezclados antes de agregar y mezclar el glicerol. Una extrusora monotornillo (Industrias Moroz, Modelo E22/24D, Numero 425, Argentina) compuesta por cuatro zonas de calentamiento (perfil de temperatura empleado: 90/100/110/120 °C), diámetro de camisa (Dc) de 22.4 mm, longitud de camisa (Lc) de 380 mm ($Lc/Dc=17$), diámetro de boquilla de 5.5 mm, longitud de boquilla de 123 mm y una entrada de alimentación fue usada para la obtención de las mezclas extruidas reactivamente. Cada sistema fue introducido por separado dentro de la extrusora a través de la tolva y todas las mezclas fueron procesadas usando una velocidad de rotación de tornillo de 100 rpm. Los parámetros de procesamiento fueron seleccionados en base a estudios previos (28).

Tras la obtención de los filamentos a partir de las mezclas extruidas reactivamente, dichos materiales fueron pelletizados empleando una pelletizadora automática (Weinuo Technology Co., Ltd, Jiangsu, China). Luego, los pellets (90g por sistema de película) fueron termo-moldeados con el propósito de obtener las películas. Este proceso fue llevado a cabo en una prensa hidráulica (Proflow, Mar del Plata, Argentina), donde se aplicó una presión de 5×10^6 Pa (50 bar) y una temperatura de 130 °C durante 10 min a los materiales para, a continuación, ser enfriados hasta 30 °C. Finalmente, las películas termo-moldeadas fueron desmoldadas y almacenadas durante una semana a 25 °C bajo una atmósfera de humedad relativa del 57% (atmósfera creada empleando una solución saturada de NaBr - $a_w \sim 0,575$), previo a la caracterización de las películas (24).

3.3. Caracterización de las películas

3.3.1. Análisis estructural: Grado de sustitución (DS), espectroscopía de resonancia magnética nuclear de giro angular mágico con polarización cruzada de ^{13}C en estado sólido (^{13}C CP MAS NMR), espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (ATR/FTIR), difracción de rayos X (XRD) y dispersión de rayos X de ángulo amplio y pequeño (WAXS/SAXS)

El DS de cada sistema de película fue determinado por titulación siguiendo el protocolo descrito por Tupa et al. (29). La metodología se basa en la hidrólisis alcalina de los grupos ésteres insertados en la estructura del almidón, seguido por la titulación inversa del exceso de álcali con una solución estandarizada de HCl al 0.1 N. Todos los sistemas de película fueron molidos y tamizados utilizando un tamiz de tamaño de malla 40 (0.425 mm). Luego, 110 mg de cada sistema hecho polvo fueron transferidos a matraces Erlenmeyer de 100 mL con 20 mL de etanol (75 %) y fueron calentados a 50 °C durante 30 min. Seguidamente, se agregaron 20 mL de una solución de NaOH al 0.1 N a los matraces y se dio la hidrólisis bajo agitación (200 rpm) a 50 °C durante 15 min. Después, los matraces fueron tapados y dejados bajo agitación (200 rpm) a temperatura ambiente durante 48 h. Finalmente, el exceso de NaOH presente en los matraces fue titulado a través de una bureta digital (Top Buret M/H, Eppendorf SE, Alemania) empleando una solución estandarizada de HCl al 0.1 N y utilizando fenolftaleína como indicador de punto final (5 gotas). El DS se determinó mediante la media de tres repeticiones y la titulación de la película control (TPS) fue utilizada como blanco. El contenido de grupos ésteres fue calculado utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Grupos ésteres (\%)} = [(V_B - V_S) \times N_{\text{HCl}} \times M_{w_{\text{éster}}} \times 10^{-3} \times 100] / w \quad \text{Ec. (1)}$$

donde V_B (mL) es el volumen de HCl utilizado para la titulación del blanco, V_S es el volumen de HCl utilizado para la titulación de la muestra, N_{HCl} es la normalidad de la solución de HCl, $M_{w_{\text{éster}}}$ es el peso molecular (Mw) del grupo salicilato (121.11 g/mol) para las muestras TPS+SalAc y TPS+SalAc+TAc, y w es el peso de la muestra (g).

El DS fue calculado entonces de la siguiente manera:

$$\text{DS} = (162 \times \text{grupos ésteres (\%)}) / [M_{w_{\text{éster}}} \times 100 - ((M_{w_{\text{éster}}} - 1) \times \text{grupos ésteres (\%)})] \quad \text{Ec. (2)}$$

donde 162 es el Mw de las unidades de anhidroglucosa.

Cabe destacar que para las películas TPS+SalAc y TPS+SalAc+TAc, el DS debe ser reconocido como $DS_{\text{salicilato}}$, ya que se consideró la esterificación de SalAc (injerto del grupo salicilato sobre la estructura del almidón). Sin embargo, para la muestra TPS+TAc, el Mw_{ester} usado fue de 133.09 g/mol y, por lo tanto, el DS debe ser considerado como $DS_{\text{tartarilo}}$.

Es importante destacar que el SalAc y el TAc son ácidos polifuncionales. Por esta razón, el SalAc puede actuar no solamente como agente esterificante, sino también como agente entrecruzante. Por su parte, el TAc puede funcionar no solamente como organocatalizador, sino que también puede actuar como agente esterificante y entrecruzante. Otro hecho a destacar es que el $DS_{\text{tartarilo}}$ determinado fue calculado considerando que todos los grupos ésteres son provenientes de la monosustitución del almidón con el TAc. Sin embargo, una titulación conductimétrica heterogénea para inferir el $DS_{\text{tartarilo}}$ real de monosustitución (contenido de grupos carboxílicos libres) y reticulación podría ser necesaria (29). Vale la pena también señalar que la determinación del DS para la película TPS+SalAc+TAc, por este método (saponificación), tiene como limitación su incapacidad de distinguir el DS, particularmente en muestras donde pueden estar ocurriendo dos esterificaciones simultáneamente, ya que es el contenido total de grupos ésteres el que se determina. Por esta razón, para la película TPS+SalAc+TAc se asumió un único Mw, el del grupo salicilato (121.11 g/mol).

Por otro lado, se utilizó un espectrómetro Bruker AV WB 400 (^{13}C 100.73 MHz, Bruker Nano GmbH, Berlín, Alemania) para adquirir los espectros unidimensionales de ^{13}C CP MAS NMR, utilizando una sonda de triple canal de 4 mm. Las muestras fueron empaquetadas en un rotor cilíndrico de circonio de 4 mm de diámetro con tapas de Kel-F. El equipo fue operado bajo las siguientes condiciones: fuerza del campo de radiofrecuencia (RF)=90.9 kHz y secuencias de pulsos estándar de modulación de fase en dos pulsos (TPPM) de ^1H (90)=2.75 μs . Los parámetros de registro fueron: tiempo de contacto=3 ms, tiempo de adquisición=40 ms, tiempo de reciclaje=5 s, velocidad de rotación=7 kHz y ancho de banda espectral=25 kHz. Los espectros de ^{13}C CP MAS NMR fueron referenciados inicialmente a una muestra de adamantano. Posteriormente, los desplazamientos químicos de ^{13}C (δ_{C}) fueron recalculados respecto al Me_4Si [para el átomo de CH_2 δ (adamantano) = 29.5 partes por millón (ppm)].

Los espectros FTIR de los distintos sistemas de películas fueron registrados utilizando un espectrómetro FTIR Nicolet 6700 (Thermo Scientific Instrument Co., modelo Nicolet 6700, Madison, Wisconsin, USA). Los espectros de FTIR de las películas fueron obtenidos en modo

reflectancia total atenuada (ATR) en el rango espectral desde 4000 a 650 cm^{-1} , empleando el accesorio ATR horizontal de reflexión simple Smart Orbit y un cristal de diamante en un ángulo de incidencia de 45° . Los espectros de ATR/FTIR fueron además determinados a partir de 32 escaneos co-agregados a una resolución de 4 cm^{-1} a temperatura ambiente. El espectrómetro trabajó con el software OPUS v.7.0. Los sistemas de película se escanearon dos veces para verificar la buena reproducibilidad. Para el análisis de las estructuras cristalinas ordenadas de corto alcance (dobles hélices) con relación a las estructuras amorfas de almidón, se calculó la relación de absorbancia 1043 cm^{-1} (relacionada con almidón ordenado o cristalino) a 1020 cm^{-1} (característica del almidón amorfo) (A_{1043}/A_{1020}) a partir de los espectros ATR/FTIR normalizados (30).

Los difractogramas de rayos X (XRD) de las diferentes películas fueron obtenidos utilizando un difractómetro PAN analytical X-Pert PRO (Países Bajos) equipado con una fuente de radiación Cu $K\alpha$ monocromática ($\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$) operando a un voltaje de 40 kV y una corriente de 40 mA, con una velocidad de barrido de $1^\circ/\text{min}$. La región de escaneo de las muestras fue en el rango de 2θ entre 3 y 33° . El grosor de las muestras fue de aproximadamente 0.90 mm. Adicionalmente, se determinó el grado de cristalinidad (X_c) de las películas a partir de la relación entre el área de la sección cristalina (A_c) y el área total del difractograma (A_t), como se muestra a continuación:

$$X_c (\%) = \frac{A_c}{A_t} * 100 \quad \text{Ec. (3)}$$

Se obtuvo una caracterización estructural más profunda a partir de los espectros WAXS/SAXS (Wide Angle X-Ray Scattering /Small Angle X-Ray Scattering – dispersión de rayos X de ángulo amplio/dispersión de rayos X de ángulo pequeño), los cuales fueron adquiridos empleando un S3-MICRO (Hecus X-ray Systems GmbH, Graz, Austria) acoplado a una fuente de rayos X (radiación Cu $K\alpha$ monocromática) GENIX-Fox 3D (Xenocs, Grenoble, Francia). El instrumento trabajó bajo las siguientes condiciones: voltaje de 50 kV y corriente de 1 mA. Un detector PSD-50 (Hecus X-ray Systems GmbH) fue utilizado para registrar la dispersión transmitida. La temperatura del detector fue controlada usando un Peltier TCCS-3 (Hecus X-ray Systems GmbH) y los difractogramas WAXS/SAXS fueron registrados a 25°C . Los valores q variaron desde 0.1 a 0.6 nm^{-1} para los espectros SAXS mientras que, para los espectros WAXS, los valores q variaron entre 1.30 y 1.75 nm^{-1} . Los espectros fueron registrados a partir de fragmentos de las películas fueron cargados en un capilar de vidrio de flujo continuo (10 μm de espesor de pared y 1 mm de diámetro). Las curvas de dispersión fueron informadas como el módulo del vector de dispersión q :

$$q = (4\pi/\lambda) \times \sin(\theta/2) \quad \text{Ec. (4)}$$

donde λ es la longitud de onda y θ el ángulo de dispersión. El vector de dispersión fue calibrado por medio del behenato de plata estándar. Las curvas de dispersión fueron registradas cada 20 min hasta 2 h y el fondo fue removido apropiadamente. Los resultados fueron analizados empleando un procedimiento de ajuste casero basado en una descripción gaussiana de las bicapas y utilizando un esquema de minimización de Levenberg-Marquardt, el cual incluye las correcciones de smearing pertinentes.

3.3.2. Análisis térmico: Calorimetría diferencial de barrido (DSC) y análisis termogravimétrico (TGA)

Las curvas de DSC fueron adquiridas utilizando un calorímetro TA[®] Instruments (Modelo Q500, Hüllhorst, Germany). Para esto, pequeños fragmentos de cada sistema de película (entre 5 y 10 mg) se pesaron individualmente en cápsulas de aluminio, las cuales fueron luego selladas herméticamente. Se utilizó una cápsula vacía como referencia. La historia térmica y la humedad de las películas fue inicialmente removida siguiendo el procedimiento utilizado por Gutiérrez et al. (31): bajo una atmósfera de nitrógeno (velocidad de flujo = 50 mL/min) las muestras fueron calentadas a una velocidad de 10 °C/min desde 30 °C hasta 110 °C y luego fueron mantenidas a esa temperatura por 5 min. Luego, se utilizó un intracooler (marca TA[®] Instruments, modelo Refrigerated Cooling Systems 90 – RCS90, Hüllhorst, Germany) para enfriar las muestras (velocidad de enfriamiento=10 °C/min) hasta -80 °C. Finalmente, las curvas de DSC fueron obtenidas a partir del segundo calentamiento térmico de las muestras desde -80 hasta 250 °C a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min.

Por otro lado, un analizador termogravimétrico TA[®] Instruments (Modelo Q500, Hüllhorst, Alemania) fue utilizado y operado a una tasa de calentamiento constante (10 °C/min) en el rango de temperatura de 35 a 730°C con el objetivo de examinar la estabilidad térmica de todos los sistemas de películas analizados. Los pesos de las muestras variaron entre 5.6 y 11.3 mg y se ensayaron tres réplicas por sistema de película para garantizar la repetibilidad. Se informaron las curvas de TGA representativas para cada sistema.

3.3.3. Análisis fisicoquímico: Hinchamiento (SW), solubilidad en agua (WS), absorción de humedad (WA), densidad (ρ), espesor (e) y opacidad

Para determinar el hinchamiento (SW) de las películas se cortaron tres discos de 13 mm de diámetro (ϕ) por cada sistema de películas. Inicialmente, se agregaron 20 mL de agua destilada a cada sistema. Pasadas 24 h, los diámetros de cada sistema fueron medidos nuevamente, determinando de esta forma el porcentaje de hinchamiento como:

$$(\phi \text{ final (tras las 24 h)} - \phi \text{ inicial}) / (\phi \text{ inicial}) \times 100. \quad \text{Ec. (5)}$$

Para determinar la solubilidad en agua (WS) de los distintos sistemas películas se cortaron tres discos de 13 mm de diámetro (ϕ) de cada uno. El peso seco inicial (W_i) de cada sistema de película fue obtenido luego de secar las muestras hasta un peso constante en una estufa a 105°C durante 24 h. Pasado este tiempo, las muestras fueron sumergidas en 50 mL de agua destilada y, a continuación, mantenidas a 25°C por 24 h. Luego, se retiró el excedente de agua y las muestras se colocaron nuevamente en la estufa a 105°C por 24 horas. Finalmente, los especímenes de películas secos fueron pesados por última vez para obtener el peso de la materia seca no solubilizada (W_f). Los valores de WS fueron calculados utilizando la Ec. 6 y se informaron los valores medios de WS \pm desviación estándar:

$$WS = (W_i - W_f) * W_i^{-1} * 100 \quad \text{Ec. (6)}$$

Los valores de absorción de humedad (WA) fueron determinados a partir de tres réplicas de cada sistema de películas, las cuales fueron previamente cortadas en forma cuadrada y pesadas ($m_0 \approx 0.5$ g) en una balanza analítica. Luego, las réplicas fueron introducidas en una estufa a 105 °C durante 24 h y, pasado este tiempo, se las mantuvo en una atmósfera de humedad relativa controlada (57%) por 24 h. Por último, cada muestra fue pesada nuevamente (m_f) y, finalmente, se obtuvieron los valores de WA de la siguiente manera:

$$WA = \frac{m_f}{m_0} \cdot 100 \quad \text{Ec. (7)}$$

Los valores de densidad (ρ) fueron estimados a partir de tres réplicas por cada sistema de películas. Todas las muestras fueron cortadas en discos de 13 mm de diámetro (ϕ) y pesadas (m_0). A continuación, se las secó en una estufa a 105 °C por 24 h. Por último, todas las réplicas fueron nuevamente pesadas (m_f). Los valores de ρ se calcularon utilizando la Ec. (8):

$$\rho = \frac{m}{V} = \frac{m}{A \cdot e} = \frac{m_0 - m_f}{\left(\frac{\phi}{2}\right)^2 \cdot \pi \cdot e} \quad \text{Ec. (8)}$$

donde m es la masa y V el volumen. V puede ser calculado como $e \times A$ (espesor \times área) de cada disco. Los resultados de este ensayo, que fue realizado por triplicado para cada sistema, fueron reportados como los valores promedio \pm SD.

Los valores de espesor (e) de cada sistema de película fueron determinados a partir de cinco mediciones hechas aleatoriamente en diferentes ubicaciones de la película. Los valores fueron adquiridos mediante el uso de un micrómetro (Liuling, Shanghái, China) con una precisión de ± 0.001 mm. Los resultados fueron informados como los valores medios \pm SD.

Por último, los valores de opacidad fueron determinados mediante el protocolo descrito por Sukhija et al. (32). La opacidad fue determinada a 350 nm, y calculada como lo indica la **Ec. 9**:

$$\text{Opacidad} = A_{350}/e \quad \text{Ec. (9)}$$

donde A_{350} es la absorbancia a 350 nm y “ e ” el grosor de la película (mm).

3.3.4. Análisis superficial: Ángulo de contacto de agua (WCA), humedad superficial (SM), microscopía electrónica de barrido (SEM) y microscopía de fuerza atómica (AFM)

Los valores de ángulos de contacto de agua (WCA, θ) de las películas fueron determinados depositando cuidadosamente una gota de agua destilada (2 μ L) sobre la superficie de cada una de ellas, empleando una jeringa (KDL Corp., Shanghái, China). Los valores de WCA fueron medidos rápidamente, apenas la gota de agua se depositaba sobre la superficie de cada muestra, ya que el hinchamiento de estos materiales podría afectar la adecuada determinación de estos valores. Para la medición se utilizó un microscopio digital USB (modelo DIGMIC200X, China) equipado con un software de análisis de imágenes 220X 2.0MP, con una precisión de 0.01°. Todas estas determinaciones fueron llevadas a cabo bajo una atmosfera ambiente a 25 °C. Los valores de WCA fueron reportados como el promedio de 12 mediciones por película \pm SD. También se tomó una imagen representativa de cada sistema de película.

La humedad superficial (SM) de los distintos sistemas de películas fue estimada utilizando de un analizador de humedad (Sartorius, modelo MA 150). Para esto, las muestras fueron cortadas en forma de cuadrados de 2.5 \times 2.5 cm y la humedad superficial fue removida

mediante un secado a 105°C durante 90 s. Se utilizaron cuatro réplicas por sistema de película y se reportó la humedad superficial promedio \pm SD.

Por otro lado, se empleó un microscopio electrónico de barrido por emisión de campo (FESEM, Marca Carl Zeiss, Modelo Supra55, Oberkochen, Germany) para analizar la superficie termo-comprimida y crio-fracturada de cada sistema de película. Las imágenes de FESEM fueron tomadas bajo las siguientes condiciones de operación: voltaje de aceleración=10 kV y aumentos de 500x (superficie termo-comprimida) y 1.0 kx (superficie crio-fracturada). En particular, para obtener las muestras crio-fracturadas se realizó la inmersión directa de fragmentos de películas en nitrógeno líquido y, posteriormente, se fracturaron mecánicamente con el objetivo de observar su superficie transversal. Todas las muestras fueron recubiertas con una fina capa de cromo mediante pulverización catódica (Turbomolecular Pumped Coater, Q150T ES PLUS, Quorum Technologies) utilizando un haz de iones Ar⁺. El proceso de pulverización, llevado a cabo antes de que las muestras fueran introducidas en el FESEM, fue realizado a una tasa de 0.1 nm/min hasta llegar a un espesor de 0.07 nm.

Las imágenes de microscopia de fuerza atómica (AFM) fueron adquiridas mediante el uso de un CORE AFM NanoSurf en modo tapping (también conocido como modo dinámico) equipado con una sonda NANOSENSORS™ PPP-NCL (PointProbe® Plus Non-Contact/Tapping Mode - Long Cantilever). La sonda en forma de "V" utilizada tenía una longitud nominal de 225 μ m y una constante de fuerza de 48 N/m. La amplitud de oscilación libre del cantiléver fue de 500 mV. Las imágenes de AFM se registraron bajo condiciones ambientales en régimen repulsivo a partir de un barrido de 5 \times 5 μ m. Las imágenes más representativas de cada película fueron reportadas luego de una exploración previa en el centro y en la periferia de la superficie. Las superficies expuestas al proceso de termocompresión fueron también analizadas en términos de su rugosidad media (Average Roughness - Ra) y rugosidad cuadrática media (Mean Square Roughness - Rq) utilizando el software libre Gwyddion.

3.3.5. Análisis mecánico: Ensayo de tracción uniaxial

Se utilizó un equipo INSTRON® EMIC 23-50 para generar las curvas de fuerza-desplazamiento de cada material, las cuales serían luego transformadas a curvas de tensión-deformación siguiendo la norma ASTM D882-10 (33). Cada sistema de película fue ensayado doce veces utilizando probetas cortadas en forma de hueso. Las dimensiones de las probetas, el espesor del cuello y la distancia entre las mordazas fueron registrados por triplicado para cada réplica mediante el uso de un micrómetro y un calibre. Luego, las

probetas fueron colocadas y sujetadas con mordazas de tracción y, a continuación, fueron sometidas a tracción uniaxial a una velocidad constante de 1 mm/min a 25 °C hasta la ruptura. Las propiedades mecánicas en el punto de ruptura: tensión máxima (σ_m) y deformación en el punto de ruptura (ϵ_b) fueron obtenidas a partir de las curvas de tensión-deformación. El módulo de Young (E) fue determinado a partir de la pendiente de las curvas tensión-deformación en el régimen elástico, mientras que los valores de tenacidad (T) se calcularon a partir del área debajo de esas curvas.

3.3.6. Análisis funcional: Propiedades antioxidantes, antimicrobianas y ecotoxicidad

La capacidad antioxidante de las películas fue analizada usando el radical 2,2-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH•) (34). Para esto, 150 mg de cada película fueron sumergidos en 10 mL de metanol al 80% y, a continuación, la suspensión fue agitada por 1 h. Luego, se utilizó una varilla de vidrio con el propósito de disgregar el material. Al material disgregado se lo dejó solubilizar por 24 h a temperatura ambiente. Después de esto, las muestras fueron sonicadas por 30 min y luego centrifugadas durante 15 min a 10.000 rpm, para finalmente ser filtradas. Se determinó el volumen del filtrado y la solución fue almacenada a -20°C. A continuación, 10 μ L de la solución de cada sistema fueron individualmente colocados por triplicado en diferentes microplacas que contenían 140 μ L de una solución estandarizada del radical DPPH• (Abs. 0.7). Se dejó avanzar la reacción en ausencia de luz durante 60 min y luego se midió la absorbancia de las soluciones contenidas en las microplacas a 515 nm. Además, se preparó un blanco a partir de 10 mL de metanol al 80% y 140 μ L de una solución estandarizada del radical DPPH•.

La evaluación de la actividad antimicrobiana de las películas fue llevada a cabo utilizando el método de halo de inhibición, siguiendo estrictamente el protocolo enunciado por Gutiérrez (24). Las pruebas fueron conducidas por triplicado sobre fragmentos de las películas cortadas circularmente ($\phi=13$ mm). La evaluación de la actividad antimicrobiana fue realizada sobre dos microorganismos Gram positivo (*Listeria innocua* y *Staphylococcus aureus*) y dos microorganismos Gram negativo (*Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa*).

Por otro lado, se realizaron ensayos de ecotoxicidad sobre plántulas de lechuga (*Lactuca sativa*) siguiendo la metodología descrita por Gutiérrez et al. (35,36) con algunas ligeras modificaciones: las concentraciones de cada sistema de película en polvo fueron ensayadas únicamente a 0,1 y 1 mg/mL. El crecimiento de las raíces primarias de las plántulas

expuestas a las películas polvoreadas fue informado como los valores porcentuales medios \pm SD de tres experimentos independientes.

4. Resultados y discusión

4.1. Análisis estructural: DS, espectroscopias de ^{13}C CP MAS NMR, ATR/FTIR, XRD y WAXS/SAXS

A continuación, se presenta en la **Tabla 1** un resumen de los resultados obtenidos a lo largo del trabajo.

Tabla 1. Resultados de DS, cantidad de estructuras cristalinas ordenadas de corto alcance (dobles hélices) de almidón obtenidas a partir de espectros FTIR, hinchamiento (SW), contenido de humedad (MC), solubilidad en agua (WS), absorción de agua (WA), ángulo de contacto con el agua (WCA), humedad superficial (SM), espesor (e), densidad (ρ), opacidad (Op), rugosidad media (Ra), rugosidad cuadrática media (Rq), parámetros de los ensayos de tracción uniaxial: módulo de Young (E), esfuerzo máximo (σ_m), deformación a la rotura (ϵ_b) y tenacidad (T), y actividad de captura de radicales DPPH• de las diferentes películas.

Material	TPS	TPS + SalAc	TPS + TAc	TPS + SalAc + TAc
DS	-	0.05 \pm 0.01 ^a	0.19 \pm 0.02 ^b	0.28 \pm 0.06 ^c
Estructuras cristalinas ordenadas de corto alcance	0.73	0.70	0.68	0.96
SW (%)	10 \pm 9 ^a	15 \pm 8 ^a	13 \pm 4 ^{a,b}	3 \pm 4 ^a
WS (%)	41.6 \pm 0.4 ^a	43 \pm 2 ^a	55 \pm 3 ^b	56 \pm 10 ^b
WA (%)	2.6 \pm 0.2 ^a	3.5 \pm 0.2 ^b	3.9 \pm 0.3 ^b	3.5 \pm 0.1 ^b
WCA (°)	75.0 \pm 0.8 ^c	45 \pm 2 ^a	65 \pm 6 ^b	49 \pm 4 ^a
SM (%)	1.3 \pm 0.7 ^a	2 \pm 1 ^{a,b}	0.7 \pm 0.1 ^a	0.9 \pm 0.5 ^a
e (mm)	1.62 \pm 0.03 ^d	1.22 \pm 0.06 ^c	1.08 \pm 0.05 ^b	0.96 \pm 0.04 ^a
ρ (g/cm ³)	1.25 \pm 0.03 ^a	1.20 \pm 0.05 ^a	1.28 \pm 0.03 ^a	1.54 \pm 0.03 ^b
Op	0.68 \pm 0.04 ^a	0.69 \pm 0.06 ^a	0.74 \pm 0.02 ^a	0.83 \pm 0.07 ^{a,b}
Ra (nm)	69.43	27.46	23.09	61.76
Rq (nm)	94.17	34.82	27.57	77.34
E (MPa)	0.29 \pm 0.01 ^c	0.234 \pm 0.007 ^b	0.241 \pm 0.008 ^b	0.099 \pm 0.005 ^a
σ_m (MPa)	1.86 \pm 0.07 ^d	1.31 \pm 0.04 ^c	0.97 \pm 0.04 ^b	0.39 \pm 0.04 ^a
ϵ_b (%)	18 \pm 1 ^c	15.5 \pm 0.5 ^b	9.0 \pm 0.3 ^a	10 \pm 1 ^a
T (x10 ³) (J/m ³)	22 \pm 4 ^d	13.6 \pm 0.7 ^c	5.8 \pm 0.3 ^b	2.6 \pm 0.3 ^a
Actividad de captura de radicales DPPH• (%)	0	4 \pm 1 ^a	4.2 \pm 0.4 ^a	6 \pm 3 ^a

Las diferentes letras en la misma fila indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$). Los sistemas de películas analizados fueron los siguientes: almidón termoplástico (TPS), TPS + ácido salicílico (TPS + SalAc), TPS + ácido tartárico (TPS + TAc) y TPS + SalAc + TAc.

Los valores de DS sugieren que el SalAc y el TAc son esterificados sobre la estructura del almidón (**Tabla 1**). Sin embargo, el TAc resultó ser más injertado sobre la estructura del almidón que el SalAc. La película TPS + SalAc + Tac presentó el valor más alto de DS, lo cual apunta a que el TAc puede estar actuando como organocatalizador para la esterificación de SalAc. No obstante, debido a las limitaciones propias de la determinación del DS por titulación (ver **Sección 3.3.1**), se analizaron los espectros de ^{13}C CP MAS NMR (**Figura 3**). Todos los sistemas de películas mostraron señales correspondientes a los carbonos C1-C6, relacionadas con la unidad de anhidroglucosa del almidón.

En primer lugar, se observa en todos los sistemas un pico característico de los carbonos C1 presentes en la unidad de anhidroglucosa a 102.95 ppm. Por otro lado, todas las muestras analizadas presentan un pico ubicado a 81.71 ppm, el cual podría ser asignado a los carbonos C4. Adicionalmente, los picos localizados a 71.88 ppm podrían corresponder a los carbonos C2, C3 y C5, mientras que el pico observado a 61.42 ppm podría ser atribuido a los carbonos C6 presentes en las unidades de glucosa del almidón, los cuales son parte de los grupos $-\text{CH}_2\text{OH}$ y suelen aparecer en esta región (37). Además de esto, los picos ubicados en 63.39 ppm podrían deberse a las interacciones de hidrogeno entre el glicerol y el almidón (38). De acuerdo con Tupa et al. (39), tres picos alrededor de 25.46, 28.73 y 33.28 ppm (TPS + SalAc + TAc) pueden ser únicamente atribuidos a la reacción de esterificación sobre el almidón. Esto se condice con el valor más alto de DS para la muestra TPS + SalAc + Tac. Posiblemente, estas tres señales de ^{13}C CP MAS NMR no fueron registradas para las muestras de TPS + SalAc y TPS + TAc, debido a los bajos valores de DS en estas muestras. Otro nuevo pico de ^{13}C CP MAS NMR fue también observado para la película de TPS + SalAc + TAc a 173.61 ppm. Este pico es característico de los carbonos carbonílicos ($\text{C}=\text{O}$) presentes en los grupos carboxilo ($-\text{COOH}$) y puede ser asociados a 1) el enlace éster recién formado (16), 2) los ácidos libres en sí (SalAc y TAc), 3) la posible reacción de entrecruzamiento entre las cadenas de almidón y ambos ácidos (40,41) y 4) una pequeña fracción de almidón hidrolizado debido a la presencia del TAc o el SalAc. Sin embargo, esto último sería inicialmente poco probable considerando que no se añadió agua extra a las formulaciones, siendo esta necesaria para las reacciones de hidrólisis. No obstante, como será discutido más adelante, esta reacción fue determinante para el desempeño global de los materiales a pesar de que la reacción organocatalítica fue comprobada y que el agua disponible para dar la reacción de hidrólisis únicamente podría provenir de la humedad absorbida por el almidón o el glicerol.

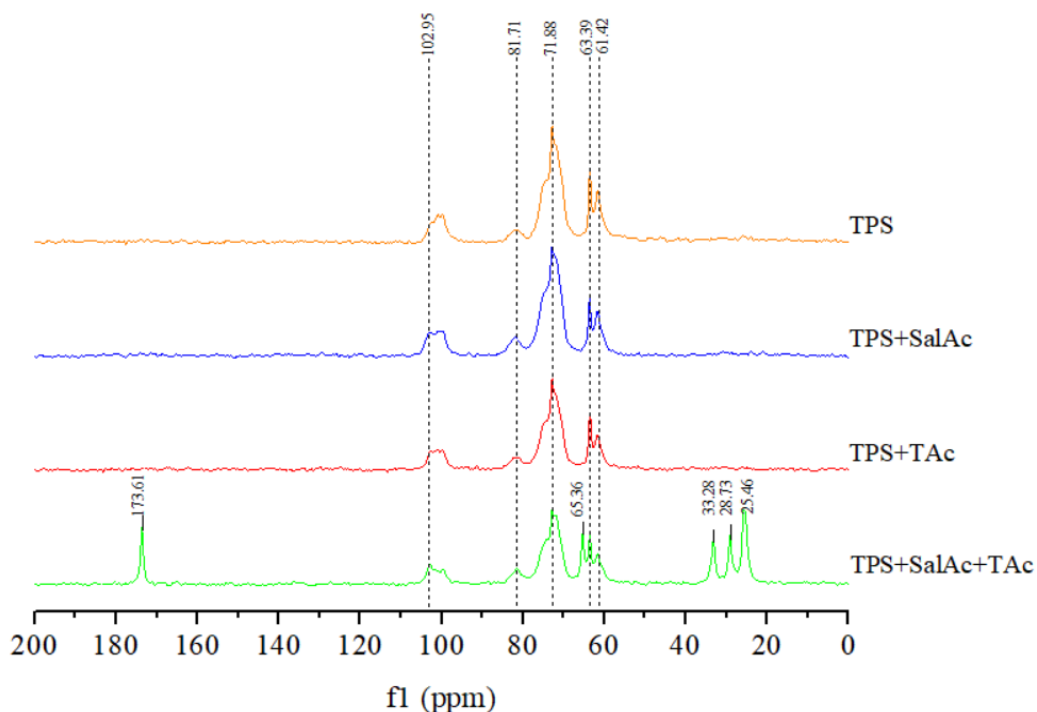


Figura 3. Espectros de ^{13}C CP MAS NMR de los diferentes sistemas de películas estudiados: almidón termoplástico (TPS), TPS + ácido salicílico (TPS + SalAc), TPS + ácido tartárico (TPS + TAc) y TPS + SalAc + TAc.

Todos los espectros de ATR/FTIR (**Figura 4A**) denotan bandas de absorción típicas de películas a base de almidón termoplástico. En todos los sistemas puede observarse una banda ancha y pronunciada a 3282 cm^{-1} , asociada a vibraciones de estiramiento de los grupos O-H (42). Particularmente, se observa una disminución en la intensidad de esta banda para el caso del sistema TPS + SalAc + TAc. Este hecho puede ser atribuido a: 1) la esterificación organocatalítica del grupo salicilo sobre la estructura del almidón, reduciendo de esta forma el número de grupos O-H capaces de causar estas vibraciones de estiramiento (esto concordaría con la discusión previa sobre los espectros de ^{13}C CP MAS NMR) o 2) la formación de enlaces de hidrógeno intermoleculares fuertes entre los grupos salicilo (esterificados sobre la estructura del almidón) y el glicerol, o la formación de enlaces de hidrógeno intramoleculares entre las cadenas de almidón como resultado de la retrogradación del almidón, lo cual reduce los grados de libertad y atenúa la absorbancia de los grupos O-H.

Por su parte, las bandas observadas a los 2932 y 2877 cm^{-1} pueden ser asignadas a las vibraciones de estiramiento de los enlaces C-H presentes tanto en los grupos alifáticos $-\text{CH}_2$ del núcleo hidrofóbico de las hélices de amilosa, como en las moléculas de glicerol, así como también en la estructura de los anillos de glucosa que forman el almidón y en los ácidos

salicílico y tartárico (43). En particular, el pico a 2932 cm^{-1} resulta más pronunciado para el sistema TPS + SalAc + TAc. Podría pensarse entonces que la esterificación organocatalítica del grupo salicilo sobre la estructura del almidón conduce a la apertura de las cadenas glucosídicas α -(1 \rightarrow 4) (amilosa), exponiendo así a los grupos alifáticos $-\text{CH}_2$ presentes en el núcleo hidrofóbico de las hélices de amilosa. Todo esto teniendo en cuenta que todos los sistemas de película poseen la misma cantidad de glicerol y almidón, además de contener el mismo número de moles de ambos ácidos.

Luego, puede observarse una banda particular a 1722 cm^{-1} que podría asociarse a las vibraciones de estiramiento de los enlaces $\text{C}=\text{O}$ presentes en el grupo carbonilo. Esta banda podría relacionarse a los enlaces ésteres formados entre el almidón-grupo salicilo esterificado, entre el almidón-grupo tartarilo esterificado y almidón-grupo salicilo organocatalíticamente esterificado, para los sistemas TPS + SalAc, TPS + TAc y TPS + SalAc + TAc, respectivamente. Esto concuerda con los resultados de DS. Además, cabe resaltar que esta banda (1722 cm^{-1}) resulta notoriamente más intensa en el sistema TPS + SalAc + TAc. Esto reforzaría el hecho de que la esterificación efectivamente ocurrió, lo cual se condice con el análisis realizado de los espectros de ^{13}C CP MAS NMR.

Todos los sistemas de película muestran bandas localizadas en 1650 cm^{-1} y 1412 cm^{-1} , las cuales pueden ser asociadas a las vibraciones de flexión δ de los grupos O-H (44,45) y al estiramiento simétrico del grupo carboxilo ($-\text{COO}$) (46), respectivamente. También se observa una banda en 1363 cm^{-1} en todos los sistemas de película, la cual puede ser asignada a la deformación angular de los enlaces C-O (44,46). Es importante destacar que la película TPS + SalAc + TAc muestra un pico distintivo a 1240 cm^{-1} que es típico de los enlaces ésteres (43). Según Vidal et al. (40), esta banda puede ser atribuida a las vibraciones de estiramiento C-O-C de las fracciones éster. Por otro lado, únicamente la curva asociada a la película TPS + SalAc + TAc posee una banda a 1293 cm^{-1} , la cual podría deberse al estiramiento de los enlaces $\text{C}=\text{C}$ de la estructura aromática del grupo salicilo organocatalíticamente esterificado sobre la estructura del almidón (43). Teniendo en cuenta esto, podría decirse que todas las evidencias espectroscópicas analizadas hasta ahora refuerzan la hipótesis de que efectivamente se dio la esterificación organocatalítica del grupo salicilo sobre la estructura del almidón durante el procesamiento por extrusión reactiva para el caso del sistema TPS + SalAc + TAc.

Pueden observarse, en todos los sistemas, bandas situadas en 1151 cm^{-1} , 922 cm^{-1} y 850 cm^{-1} , las cuales son normalmente atribuidas a la huella digital del almidón (47), ya que están relacionadas a las vibraciones de estiramiento de los enlaces C-O y C-C de la estructura

cíclica de los monómeros de glucosa que lo conforman (45). Por otro lado, se observa en todos los sistemas de película una banda notoria en 1020 cm^{-1} (**Figura 4B**). Esta banda es comúnmente asignada a las vibraciones de estiramiento de los enlaces C-O-C y es característica de los carbohidratos. Su presencia indica la existencia de los enlaces entre las unidades de glucosa que forman la estructura del almidón (44). Sorprendentemente, la película TPS + SalAc + TAc muestra una disminución importante de la absorbancia en comparación a los demás sistemas de película estudiados. Esto representa la primera evidencia notable y concreta de la despolimerización/hidrólisis del almidón en la película TPS + SalAc + TAc donde, como consecuencia, pueden perderse los enlaces glicosídicos C-O-C.

En conclusión, en el sistema de película TPS + SalAc + TAc ocurren al menos dos reacciones: 1) la esterificación organocatalítica del grupo salicilo sobre el almidón, lo cual expone los grupos alifáticos $-\text{CH}_2$ del núcleo hidrofóbico de las hélices de amilosa y 2) la despolimerización/hidrólisis ácida del almidón. Esto sería consistente con el análisis efectuado a partir de los espectros de ^{13}C CP MAS NMR.

Con respecto al estudio y análisis de las estructuras de almidón ordenadas de corto alcance (estructuras de doble hélice formadas a partir de almidón no cristalino), estas mostraron el siguiente orden creciente: TPS + TAc < TPS + SalAc < TPS < TPS + SalAc + TAc (**Tabla 1**). Estos resultados sugieren que la esterificación organocatalítica del grupo salicilo sobre el almidón en el sistema de TPS + SalAc + TAc favorece la formación de estructuras de dobles hélices tales como: hélices dobles independientes, pequeños cúmulos de dobles hélices y hélices dobles nacientes, en comparación al sistema de película control (TPS). Por otro lado, los sistemas TPS + TAc y TPS + SalAc exhibieron una disminución/destrucción de este tipo de ordenamiento si se los compara con el sistema de película control (TPS). Puede también notarse que, aparentemente, el TAc tiene un mayor impacto sobre la disminución/destrucción de las estructuras de almidón ordenadas de corto alcance en comparación con el SalAc.

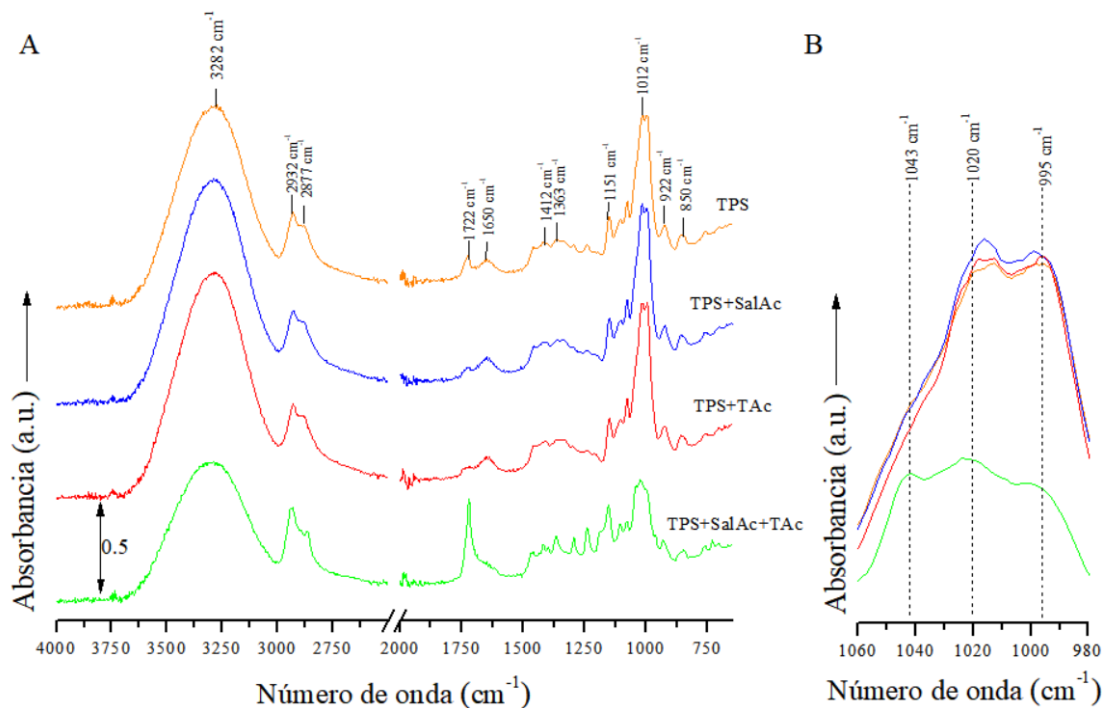
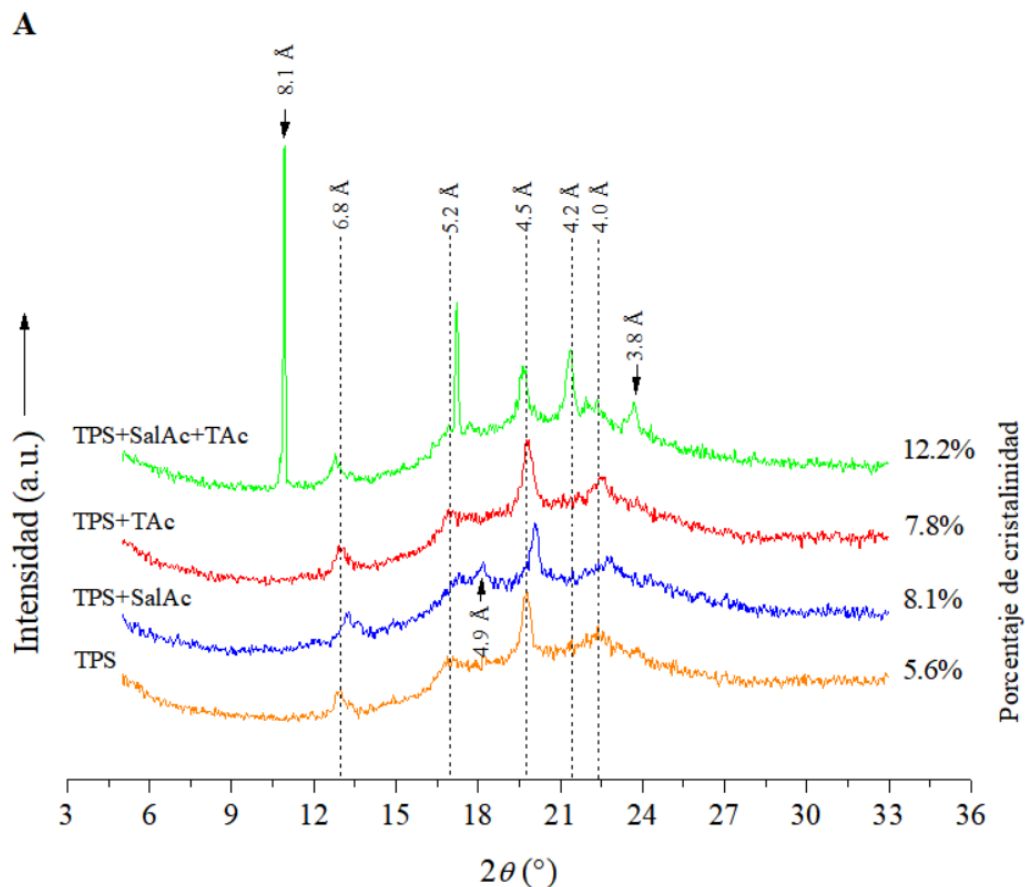


Figura 4. (A) Espectros ATR/FTIR de las diferentes películas estudiadas en todo el rango de absorbancias. (B) Espectros FTIR normalizados en el rango de absorbancias entre 1060 cm^{-1} y 980 cm^{-1} para el análisis de estructuras cristalinas ordenadas de corto alcance. Sistemas de película analizados: TPS, TPS + SalAc, TPS + TAc y TPS + SalAc + TAc.

Dependiendo de su origen, los almidones presentan diferentes patrones de difracción de rayos X, conocidos como estructuras A, B y C (23) (ver **Sección 2.1**). Por lo que puede observarse en la **Figura 5A**, los principales picos correspondientes al almidón termoplástico (TPS) se ubican en: 12.93° , 17.01° , 19.81° y 22.40° . Según estudios previos, estos picos corresponden a una estructura de almidón de tipo A, lo cual se corresponde con lo esperado al tratarse de almidón de maíz. Otros picos observados en 10.9° y 23.7° relacionados a la estructura del tipo A fueron particularmente observados para el sistema de película TPS + SalAc + TAc. Esto sugiere que la esterificación organocatalítica del grupo salicilo sobre la estructura del almidón realiza la estructura del tipo A en este sistema. Todos los sistemas también muestran picos de XRD a $2\theta = 12.9^\circ$ y $2\theta = 19.8^\circ$, los cuales pueden ser relacionados a una estructura tipo V_a (complejo tipo V almidón-glicerol) y V_h (almidón retrogradado), respectivamente (48–50). Por lo tanto, todos los sistemas de película evidencian la formación de los complejos tipo V almidón-glicerol, lo cual confirma la existencia de las interacciones de enlace de hidrógeno entre el glicerol y el almidón, como fue previamente indicado en el análisis de los espectros de ^{13}C CP MAS NMR. Adicionalmente, la película de TPS + SalAc muestra un menor distanciamiento interplanar de su estructura tipo A en comparación con los demás sistemas examinados (picos de XRD alrededor de 17.0° y 22.4°

ligeramente desplazados hacia valores de 2θ más altos), así como también exhibe un pico de XRD adicional localizado en $2\theta = 18.1^\circ$, relacionado a la estructura tipo A. La estructura tipo A para el sistema de película TPS + SalAc + TAc evidencia también un menor distanciamiento interplanar con respecto al sistema control (TPS). Por lo tanto, podría decirse que el SalAc puede potencialmente favorecer el desarrollo de una estructura tipo A más compacta. En contraste, se observa un mayor distanciamiento interplanar de las estructuras tipo V_a (pico de XRD alrededor de 12.9° ligeramente desplazado hacia valores de 2θ más bajos) y V_h (pico de XRD cerca de 19.8° ligeramente desplazado hacia valores de 2θ más bajos) para el sistema de película TPS + SalAc + TAc en comparación al sistema control (TPS). Por último, se muestra un pico de XRD a $2\theta = 21.4^\circ$ para el sistema de película TPS + SalAc + TAc que puede ser tribuido a la estructura tipo V_a (complejo tipo V almidón-glicerol).



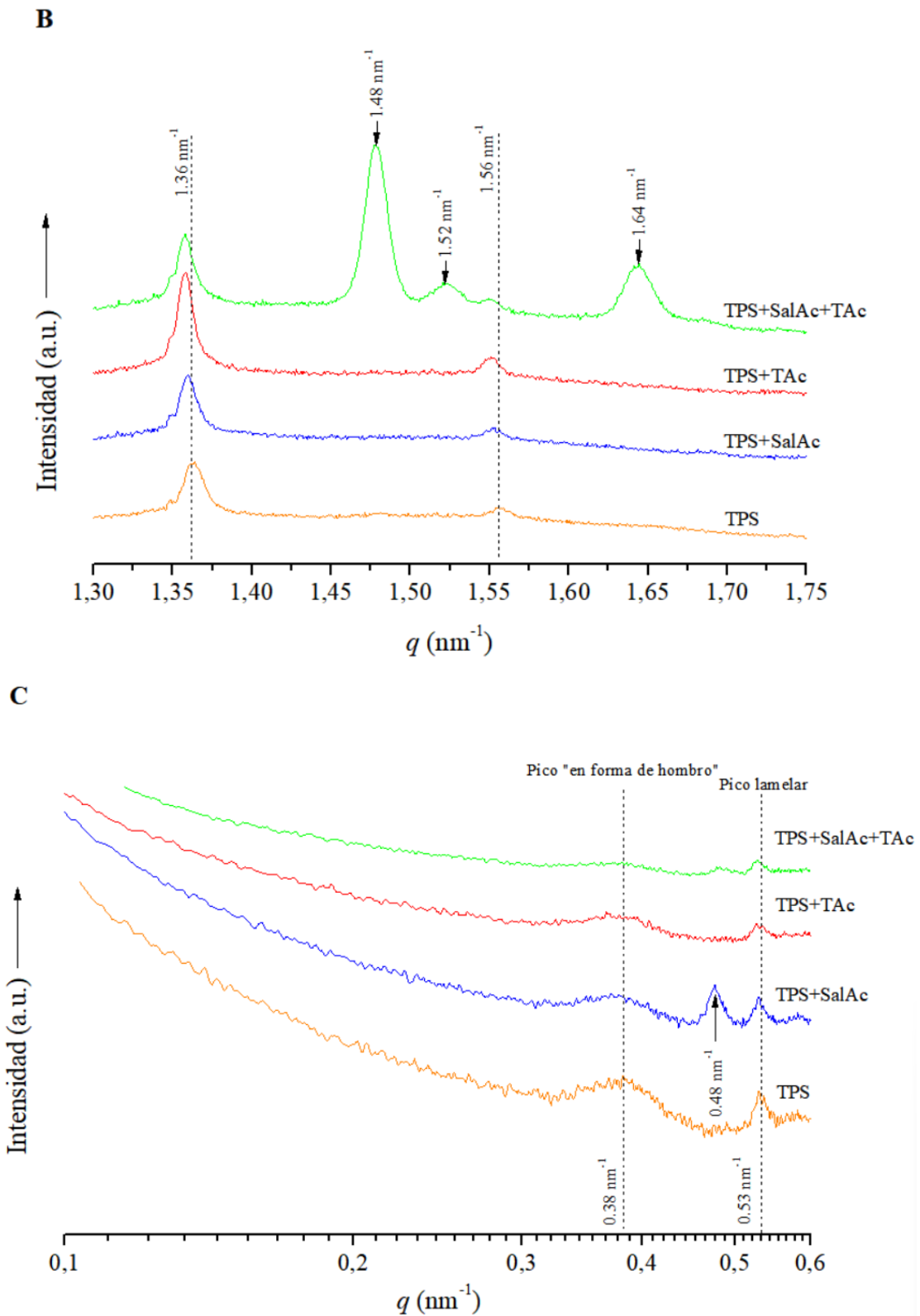


Figura 5. (A) Patrones de XRD en el rango de 2θ de 5 a 33° , y valores de X_c de los diversos sistemas de películas analizadas. (B) Patrones de WAXS de las diferentes películas estudiadas. (C) Patrones de SAXS en doble logaritmo de las diversas películas evaluadas. Sistemas de película analizadas: TPS, TPS + SalAc, TPS + TAc y TPS + SalAc + TAc.

Con respecto a los espectros WAXS (**Figura 5B**), todos los sistemas de películas exhibieron picos de dispersión a 1.36 nm^{-1} y 1.56 nm^{-1} , los cuales pueden ser asociados a la reflexión de segundo orden de las láminas semi-cristalinas del almidón (51) y a los complejos tipo V amilosa-glicerol (52), respectivamente. Estos hallazgos concuerdan con los difractogramas de XDR (**Figura 5A**), es decir, podría confirmarse la formación de los complejos tipo V almidón-glicerol. Sin embargo, cabe destacar que todos los sistemas de película analizados (TPS + SalAc, TPS + TAc y TPS + SalAc + TAc) mostraron un ligero desplazamiento del pico de dispersión WAXS relacionado a los complejos tipo V amilosa-glicerol (1.56 nm^{-1}) hacia valores de q más bajos que el sistema de película control (TPS). Esto sugiere que los ácidos agregados, ya sea en forma individual o en conjunto (SalAc y TAc), aumentan ligeramente el distanciamiento interplanar de la estructura tipo V. Esto está en línea con los análisis de los difractogramas de XDR (**Figura 5A**). Curiosamente, el sistema de película TPS + SalAc + TAc muestra nuevos picos de dispersión WAXS situados a 1.48 cm^{-1} , 1.52 cm^{-1} y 1.64 cm^{-1} que no están presentes en los demás sistemas (TPS, TPS + SalAc y TPS + TAc). Esto es consistente con los difractogramas de XDR del sistema de película TPS + SalAc + TAc (**Figura 5A**). Por lo tanto, esto demuestra nuevamente la existencia de un ordenamiento molecular más acentuado de la estructura tipo A en el sistema TPS + SalAc + TAc si se lo compara con los demás sistemas. Este ordenamiento podría probablemente ser causado por la esterificación organocatalítica del grupo salicilo sobre la estructura del almidón.

La estructura laminar de todos los sistemas de película fue analizada a partir de los espectros de SAXS (**Figura 5C**). Todas las películas mostraron un pico de dispersión SAXS típico a 0.53 nm^{-1} con un espesor laminar promedio de aprox. 11.9 nm (calculado a partir de la ecuación de Woolf-Bragg $d = 2\pi/q$), el cual puede ser atribuido a las estructuras laminares semicristalinas (51,53–56). La intensidad y área de este pico fueron decreciendo en el siguiente orden: TPS > TPS + SalAc > TPS + TAc > TPS + SalAc + TAc. De acuerdo a lo estudiado por Liang et al. (54), este pico puede haber decrecido debido a la hidrólisis del almidón, la cual está relacionada a la disrupción de las estructuras helicoidales simples del almidón. Aparte de esto, Wang et al. (57) indicaron que la hidrólisis enzimática del almidón rompe los enlaces α -1,4- y α -1,6-glicosídicos, lo cual degrada las láminas cristalinas, incrementando así el grosor de las láminas amorfas. En base a esto y teniendo en cuenta el análisis de los espectros ATR/FTIR (fundamentalmente el análisis de la banda observada a 1020 cm^{-1}), aparentemente el TAc produciría una mayor hidrólisis del almidón bajo condiciones de extrusión reactiva en comparación con el SalAc, siendo esta tendencia más evidente para el sistema de película TPS + SalAc + TAc. Estos resultados sugieren que la reacción de hidrólisis del almidón en presencia de SalAc y TAc, ya sea en forma individual o en conjunto, ocurre incluso sin el agregado de agua en la formulación de las películas. Por lo

tanto, la hidrólisis del almidón debida a la adición de cualquiera de los dos ácidos destruye el orden laminar del almidón y las estructuras de almidón ordenadas de corto alcance (dobles hélices). Por otra parte, todos los sistemas de película mostraron un pico de dispersión SAXS “en forma de hombro” localizado en 0.38 nm^{-1} (espesor laminar promedio = 16.5 nm), el cual puede ser atribuido a la formación de estructuras agregadas ordenadas y al reensamblaje del almidón, como resultado del fenómeno natural de retrogradación del almidón (56). En este contexto, Zhang et al. (56) destacaron que el área de este pico aumenta en función de la retrogradación. En este estudio, el área del pico a 0.38 nm^{-1} decreció siguiendo el siguiente orden: $\text{TPS} > \text{TPS} + \text{SalAc} > \text{TPS} + \text{TAc} > \text{TPS} + \text{SalAc} + \text{TAc}$. Se podría decir entonces que el agregado de SalAc y TAc atenúa la retrogradación del almidón. Esto es interesante ya que es bien sabido que los almidones hidrolizados tienen una menor tendencia a la retrogradación con respecto a sus análogos nativos (58). Curiosamente, los sistemas de película con contenido de SalAc ($\text{TPS} + \text{SalAc}$ y $\text{TPS} + \text{SalAc} + \text{TAc}$) mostraron un pico de dispersión SAXS adicional situado a 0.48 nm^{-1} (espesor laminar promedio = 13.1 nm). Este pico de dispersión SAXS adicional podría ser relacionado a un reordenamiento del almidón en una estructura semicristalina heterogénea con un mayor espesor laminar (59).

Por otro lado, el porcentaje de cristalinidad (X_c) de los sistemas de película ensayados varió desde 5.6 hasta 12.2% (**Figura 5A**). Esto apunta a que los materiales manufacturados fueron principalmente amorfos. Los valores de X_c tuvieron una tendencia positiva creciente con respecto a los valores de DS ($\text{TPS} < \text{TPS} + \text{SalAc} < \text{TPS} + \text{TAc} < \text{TPS} + \text{SalAc} + \text{TAc}$), indicando así que la esterificación del almidón *vía* extrusión reactiva influye sobre el grado de ordenamiento de las cadenas de almidón. En particular, el sistema de control (TPS) resultó ser el material más amorfo, mientras que sistema $\text{TPS} + \text{SalAc} + \text{TAc}$ fue el más cristalino. Estos hallazgos son consistentes con los resultados reportados por Hernandez-Hernandez et al. (16) para fideos a base de almidón de maíz nativo y céreo propionilados (esterificado) organocatalíticamente *vía* extrusión reactiva empleando TAc como organocatalizador verde. De acuerdo a Hernandez-Hernandez et al. (16), esta tendencia puede ser atribuida al hecho de que las reacciones de esterificación sobre el almidón de dan fundamentalmente sobre la amilosa. Esto encajaría bien con lo discutido sobre los espectros de ATR/FTIR, donde la esterificación organocatalítica del grupo salicilo sobre el almidón expondría los grupos alifáticos $-\text{CH}_2$ del núcleo hidrofóbico de las hélices de amilosa.

4.2. Análisis térmico: DSC y TGA

Las curvas de DSC para las películas testeadas no revelaron ningún pico de fusión (T_m) (**Figura 6A**), por lo cual las secciones duras (cristalinas) de las películas parecieran no incidir sobre el comportamiento térmico de estos materiales. En contraste, la temperatura de transición vítrea (T_g) para las películas de TPS + SalAc y TPS + TAc no fue detectada, es decir, la transición de fase de segundo orden donde las cadenas o secciones amorfas del polímero comienzan a adquirir movilidad fue imperceptible en estos materiales. Este hecho puede ser atribuido a que la hidrólisis del almidón provocada por el SalAc y el TAc hace que las cadenas de almidón amorfas hidrolizadas tengan alta movilidad y baja estabilidad térmica, sin el obstáculo aparente de alguna sección cristalina (60,61). Mientras tanto, únicamente los sistemas de película TPS y TPS + SalAc + TAc exhibieron valores de T_g a 59.73°C (cambio de capacidad calorífica (ΔC_p) = 0.02806 W/g) y 50.39°C (ΔC_p = 0.02352 W/g), respectivamente (**Figura 6B** y **6C**). Estos resultados sugieren que las cadenas de almidón amorfas en la película de TPS + SalAc + TAc tienen una mayor movilidad y menor estabilidad térmica que el sistema de película control (TPS). Basado en estos resultados y teniendo en cuenta los análisis previos, el hecho de que el valor de T_g sea más bajo para la película de TPS + SalAc + TAc que para la película control (TPS), estaría probablemente ligado a la hidrólisis del almidón en presencia de SalAc y TAc, lo cual aumentaría el movimiento de las cadenas amorfas del almidón.

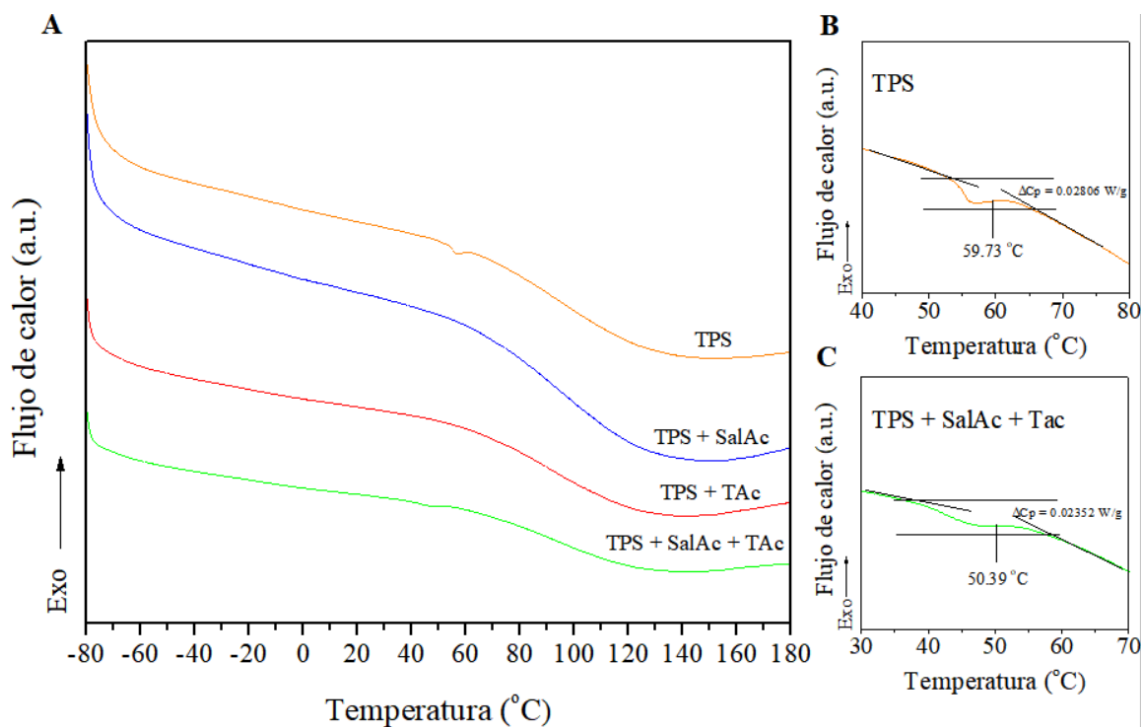


Figura 6. (A) Curvas DSC de los sistemas de películas analizados desde $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta $180\text{ }^{\circ}\text{C}$. (B) Curva DSC de la película de TPS que muestra la T_g de la muestra. (C) Curva DSC de la película TPS + SalAc + TAc que muestra la T_g de la muestra.

En relación al análisis de las curvas de TGA (**Figura 7A**), todos los sistemas de película muestran las tres regiones comunes de degradación térmica para películas a base de almidón. En primer lugar, la pérdida de peso entre los $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ y los $200\text{ }^{\circ}\text{C}$ se asocia a la pérdida de agua (28). Se observa en este rango la pérdida de agua libre y agua ligada físicamente en la estructura del almidón. El glicerol, debido a su naturaleza higroscópica también tiene la capacidad de retener agua. La segunda región ($200\text{--}350\text{ }^{\circ}\text{C}$) demuestra una caída de peso más drástica que las demás. Aquí ocurre la máxima degradación térmica de la fase rica en almidón ($250\text{--}400\text{ }^{\circ}\text{C}$), además de la evaporación de la fase rica en glicerol (temperatura de evaporación del glicerol = $290\text{ }^{\circ}\text{C}$). La estructura molecular del almidón se rompe, liberando compuestos volátiles como CO_2 , H_2O y otros fragmentos orgánicos. En la última región ($450\text{--}700\text{ }^{\circ}\text{C}$), asociada a la región de degradación oxidativa del almidón parcialmente degradado, los residuos carbonosos que quedan tras la descomposición completa del almidón y el glicerol comienzan a oxidarse o carbonizarse. En algunos casos, el material puede dejar un residuo carbonoso a altas temperaturas (24,28,62,63). En particular, en la región entre 220 y $300\text{ }^{\circ}\text{C}$ (ver recuadro en la parte superior derecha de la **Figura 7A**), se registró el siguiente orden decreciente de degradación térmica: $\text{TPS} > \text{TPS} + \text{SalAc} > \text{TPS} + \text{TAc} > \text{TPS} + \text{SalAc} + \text{TAc}$. Cabe destacar que los espectros SAXS mostraron una tendencia idéntica (ver **Sección 4.1**) debido a la hidrólisis del almidón, donde aparentemente el TAc generaría un mayor

grado de hidrólisis del almidón que el SalAc. Esta tendencia es más evidente para el sistema TPS + SalAc + TAc, donde podría nuevamente confirmarse que la reacción de hidrólisis del almidón, en presencia ya sea de SalAc o TAc en forma individual o en conjunto, ocurre incluso sin el agregado de agua en la formulación de las películas. Un comportamiento térmico similar fue reportado por Mohd Zain et al. (64), quienes describieron una menor estabilidad térmica en películas a base de almidón termoplástico conteniendo ácido cítrico en comparación con su respectivo control sin presencia del ácido cítrico. Dichos autores demostraron que el ácido cítrico induce la acidólisis (hidrólisis ácida) del almidón termoplástico procesado por mezclado sin el agregado intencional de agua.-

Los espectros de DTGA (**Figura 7B**) muestran la primera derivada de TGA y se trata de una medida sensible que proporciona información sobre las tasas relativas de volatilización y descomposición del polímero analizado. Los picos máximos en la curva DTGA representan la tasa máxima de pérdida de masa. Cada etapa de pérdida de peso corresponde a un pico en la curva DTGA (63). Con respecto a las curvas de DTGA, todos los sistemas muestran una ligera separación de fases entre la fase rica en glicerol (temperatura de máxima degradación térmica (T_{max}) $\sim 289^{\circ}\text{C}$) y la fase rica en almidón ($T_{max} \sim 319^{\circ}\text{C}$). Esta separación de fases resulta menor para la película control (TPS), donde los picos de DTGA relacionados a la fase rica en glicerol y a la fase rica en almidón aparecen casi superpuestos. Por tal razón, podría decirse que la película de control (TPS) posee una mejor interacción almidón-glicerol en comparación con los demás sistemas manufacturados. Por el contrario, la película TPS + SalAc + TAc muestra la mayor separación de fases, por lo que puede inferirse una interacción almidón-glicerol pobre. Adicionalmente, todas las películas con contenido de SalAc o TAc, de forma individual (sistemas de películas TPS + SalAc y TPS + TAc) o en conjunto (sistema de película TPS + SalAc + TAc), poseen curiosamente un pico de DTGA adicional a una $T_{max} \sim 245^{\circ}\text{C}$ que puede ser asociado a una fracción del almidón hidrolizado. Por último, debido a la adición de los dos ácidos en conjunto (TPS + SalAc + TAc) se observa un nuevo pico en $T_{max} \sim 394^{\circ}\text{C}$ que se podría atribuir a la presencia de nuevas fases o estructuras debido a la reacción organocatalítica favorecida por la presencia de ambos ácidos. La presencia de este último pico se condice con los resultados del ensayo NMR y sugiere que se ha formado un componente o estructura que requiere más energía para descomponerse, lo que indica una mayor estabilidad térmica. Sin embargo, este pico resulta ser muy pequeño, por lo cual no determina el desempeño del material.

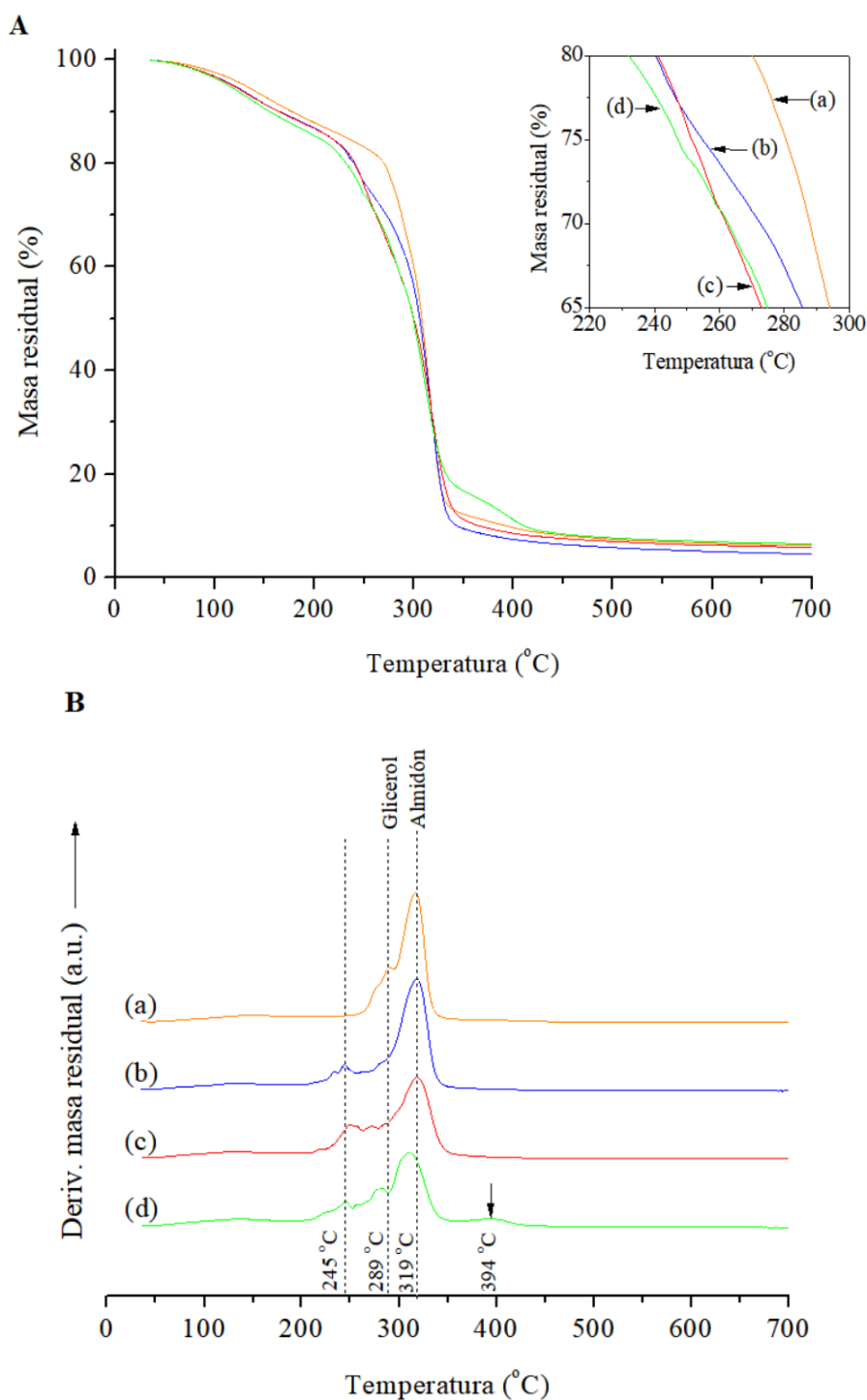


Figura 7. (A) Curvas de TGA. (B) Curvas DTGA entre 30 y 700°C de los distintos sistemas. Sistemas analizados: TPS (a), TPS + SalAc (b), TPS + TAc (c) y TPS + SalAc + TAc (d).

4.3. Análisis fisicoquímico: SW, WS, WA, ρ , e y opacidad

En principio, se realizó un análisis de hinchamiento (SW), cuyos resultados se pueden observar en la **Tabla 1**. Los valores de SW para las películas estudiadas variaron desde 3 hasta 15%. Valores más altos de SW (entre 13 y 42%) que los obtenidos en este estudio

fueron reportados por Gutiérrez et al. (35) para películas manufacturadas por extrusión/termo-compresión a base de almidón conteniendo nanoarcillas cargadas de extracto de flor de Jamaica. En este estudio, no se observaron diferencias significativas entre los resultados obtenidos para el control (TPS) y los demás sistemas, siendo el valor promedio general de hinchamiento del 10.25 ± 6.25 %. Sin embargo, sí se observa una diferencia considerable entre el sistema con contenido de TAc (TPS + TAc) y la película cuya composición contiene ambos ácidos (TPS + SalAc + TAc). Este comportamiento podría estar relacionado a que la esterificación organocatalítica del grupo salicilo sobre el almidón expone los grupos alifáticos $-CH_2$ del núcleo hidrofóbico de las hélices de amilosa en la película TPS + SalAc + TAc (ver **Sección 4.1**).

En cuanto a los valores de solubilidad (WS) (**Tabla 1**), los sistemas de película con contenido de TAc (TPS + TAc y TPS + SalAc + TAc) exhibieron la mayor solubilidad en agua ($\sim 55\%$) en comparación a las películas TPS y TPS + SalAc (valores de WS alrededor de 42.3%). Este hallazgo podría ser atribuido a la mayor actividad hidrolítica aparente del TAc sobre el almidón, la cual genera una despolimerización (hidrólisis ácida del almidón), a la vez que expone las unidades de glucosa del almidón, lo cual conduce a la obtención de películas más hidrofílicas (TPS + TAc y TPS + SalAc + TAc). Esto se condice con lo analizado a partir de la banda de ATR/FTIR a 1020 cm^{-1} y los espectros de ^{13}C CP MAS NMR (ver **Sección 4.1**). En contraste, el sistema de control (TPS) y la película TPS + SalAc mostraron los valores más bajos de WS (en torno a 42.3%), sin diferencias estadísticamente significativas entre ellas.

Los valores de absorción de agua (WA) fueron significativamente más altos ($\sim 3.6\%$) en las películas diseñadas (TPS + SalAc, TPS + TAc y TPS + SalAc + TAc) que en la película control (TPS - WA = 2.6%). Esta tendencia estaría nuevamente en línea con los resultados previamente obtenidos que sugieren que la hidrólisis ácida del almidón en presencia ya sea de SalAc y TAc en forma individual o en conjunto, ocurre incluso sin el agregado de agua en la formulación de las películas, incrementando así la hidrofiliidad de las películas diseñadas a causa de la despolimerización (hidrólisis ácida del almidón) de las unidades de glucosa (monómero hidrofílico) del almidón. Sin embargo, no se observan diferencias apreciables en los valores de WA entre los sistemas de película con contenido de ácidos (TPS + SalAc, TPS + TAc y TPS + SalAc + TAc).

La densidad (ρ) de una película puede proporcionar información sobre su estructura interna y las interacciones entre sus componentes (28). Con respecto a los valores obtenidos de densidad (**Tabla 1**), estos están comprendidos entre 1.20 y 1.54 g/cm^3 y se ajustan a los valores reportados en trabajos previos para materiales obtenidos mediante la

misma metodología. Gutierrez y Valencia (2021) (65) reportaron valores entre 1.17 y 1.4. g/cm³ para films compuestos por almidón de maíz y glicerol, con agregados de tripolifosfato de sodio y sulfato de potasio y obtenidos por extrusión reactiva/termo-compresión. Por otro lado, para películas de almidón de maíz, glicerol y nanoarcillas utilizadas como nanorellenos, Gutierrez y Álvarez (2018) (28) obtuvieron valores comprendidos entre 0.98 y 1.20 g/cm³. Vale la pena destacar que la película de TPS + SalAc + TAc resultó ser el material más denso ($\rho = 1.54 \text{ g/cm}^3$, $p \leq 0,05$). Este comportamiento podría estar relacionado al desarrollo de una estructura tipo A más compacta en este sistema (TPS + SalAc + TAc) (ver **Sección 4.1**). Por el contrario, las películas TPS, TPS + SalAc y TPS + TAc no mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p \geq 0.05$) en los valores de ρ .

Los valores de espesor de la película (e) oscilaron entre los 0.96 y los 1.62 mm (**Tabla 1**), siendo esto concordante con valores obtenidos en estudios previos para obtener materiales similares utilizando la misma metodología. El rango de grosores obtenido por Gutierrez y Valencia (2021) (65) para materiales similares (almidón de maíz, glicerol, tripolifosfato de sodio y sulfato de potasio) fue entre 1.25 y 1.3 mm. Por su parte, Hernou-Julien et. al (2019) (66) obtuvieron, para películas constituidas por almidón de maíz, glicerol y acetato de celulosa, espesores entre 0.9 y 1.18 mm. Por otro lado, para películas de almidón, policaprolactona (PCL) y glicerol, Gutierrez (2018) (67) obtuvo valores de grosor entre 1.15 y 1.36 mm. Además, Gutierrez y Álvarez (2018) (28) registraron valores entre 0.86 y 0.97 mm para films compuestos por almidón de maíz, glicerol y nanoarcillas.

Por último, en cuanto a la opacidad (op) de las películas, los resultados (**Tabla 1**) (**Figura 8**) arrojan que el material con mayor grado de opacidad es aquel que tiene ambos ácidos en su composición (TPS + SalAc + TAc), mientras que el control (TPS) y las películas que contienen ácidos de forma individual no presentan diferencias significativas en sus valores. Se determinó el siguiente orden creciente de opacidad: TPS < TPS + SalAc < TPS + TAc < TPS + SalAc + TAc (**Tabla 1**). Una tendencia similar fue obtenida en los valores de Xc para las películas ensayadas (ver **Sección 4.1 - Figura 5A**). Teniendo esto en mente, las secciones cristalinas de estos materiales podrían dispersar la luz durante su paso a través del material, resultando así en películas más opacas.

Teniendo en cuenta todo lo analizado previamente, las películas con contenido de TAc (TPS + TAc y TPS + SalAc + TAc) mostraron un mayor carácter hidrofílico en comparación al sistema de película con contenido de SalAc (TPS + SalAc). Este hecho no resultó tan evidente en los ensayos fisicoquímicos a nivel global. No obstante, los resultados de WS en particular permitieron visualizar este comportamiento. Esta tendencia podría ser atribuida a la

aparente mayor actividad hidrolítica del TAc sobre el almidón, lo cual genera una despolimerización (hidrólisis ácida del almidón) y expone las unidades de glucosa del almidón, conduciendo de este modo a la obtención de películas más hidrofílicas (TPS + TAc y TPS + SalAc + TAc). Por otro lado, el sistema de película control (TPS) resultó ser el material más hidrófobo. Esto último podría estar ligado a una mayor interacción almidón-glicerol, la cual condujo a una menor separación de fases (ver **Sección 4.2** – análisis de las curvas de DTGA) y a una menor exposición de los grupos hidroxilos (polares) del almidón y glicerol para interactuar con el agua.



Figura 8. Aspecto de las películas: TPS, TPS + SalAc, TPS + TAc y TPS + SalAc + TAc.

4.4. Análisis superficial: WCA, SM, SEM y AFM

En general, el ángulo de contacto con el agua (WCA) es un indicador de la naturaleza fisicoquímica de la superficie de los materiales: valores altos de WCA denotan una superficie con tendencia hidrofóbica, mientras que valores más bajos de WCA sugieren una superficie más hidrofílica (68)(69). Los sistemas de película estudiados registraron el siguiente orden creciente en los valores de WCA: TPS + SalAc (45°) \leq TPS + SalAc + TAc (49°) $<$ TPS + TAc (65°) $<$ TPS (75.0°) (**Tabla 1** – **Figura 9**). Por lo tanto, la película de TPS presenta la superficie más hidrofóbica, lo cual es consistente con el análisis realizado en la sección previa (ver **Sección 4.3** – análisis fisicoquímico). Teniendo esa discusión en mente, las películas con contenido de TAc (TPS + TAc y TPS + SalAc + TAc) deberían, en teoría, ser los materiales con la superficie más hidrofílica. Sin embargo, se observan resultados contradictorios ya que los materiales más hidrofílicos fueron aquellos con contenido de SalAc (TPS + SalAc y TPS + SalAc + TAc) en su composición. Según la teoría de Vogler (68), esto podría indicar que los grupos hidrofílicos de la estructura molecular del almidón de las películas con contenido SalAc (TPS + SalAc y TPS + SalAc + TAc) estarían siendo direccionados hacia adentro del material, mientras que los sitios apolares estarían siendo orientados hacia la superficie del material, disminuyendo de esta forma los sitios de Lewis (sitios polares) sobre la superficie e incrementando los valores de WCA.

Con el objetivo de entender mejor las causas de este comportamiento superficial en las películas analizadas, se determinaron los valores de SM y se adquirieron las imágenes de AFM. Los valores de SM variaron entre 0.7 y 2% (**Tabla 1**). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas ($p \geq 0.05$) entre los valores de SM del sistema de control (TPS) y los demás sistemas de película. Cabe destacar que la única diferencia estadísticamente significativa hallada se observa entre la película TPS + SalAc (2%) y TPS + TAc (0.7%). Esto confirmaría que la superficie de la película TPS + SalAc es más hidrofílica que la película TPS + TAc. Este resultado se condice con lo mencionado previamente sobre la teoría de Vogler (68). No obstante, Vogler (68) también indicó en los fundamentos de su teoría que mayores valores de WCA pueden ser relacionados a superficies más rugosas, ya que en las superficies más rugosas existen obstáculos físicos que pueden impedir el colapso de las gotas de agua sobre la superficie. Es por esto que se adquirieron las imágenes de AFM de las películas (**Figura 9**) y a partir de ellas se cuantificaron los valores de rugosidad media (Ra) y rugosidad cuadrática media (Rq) (**Tabla 1**). Los valores de Ra y Rq siguieron el siguiente orden creciente: TPS + TAc < TPS + SalAc < TPS + SalAc + TAc < TPS. En particular, los resultados de WCA y los valores de Ra y Rq para la película TPS encajan perfectamente con la teoría de Vogler (68), es decir, refuerzan la teoría de que una superficie más rugosa está relacionada a valores más altos de WCA. Sin embargo, los demás sistemas de película no siguieron esta tendencia. Por esta razón, los valores de WCA obtenidos estarían más relacionados a la orientación de los grupos hidrofílicos de la estructura molecular del almidón que a la rugosidad del material, como fue discutido previamente.

Por otro lado, las imágenes SEM de las superficies termo-comprimidas de las películas (**Figura 10**) muestran que, en general, todas las superficies resultaron notablemente lisas y compactas. Esto es consistente con los resultados obtenidos a partir de las imágenes de AFM, donde los máximos valores de Ra ($Ra_{max} = 69.43 \text{ nm}$) y Rq ($Rq_{max} = 94.17 \text{ nm}$) resultaron del orden nanométrico.

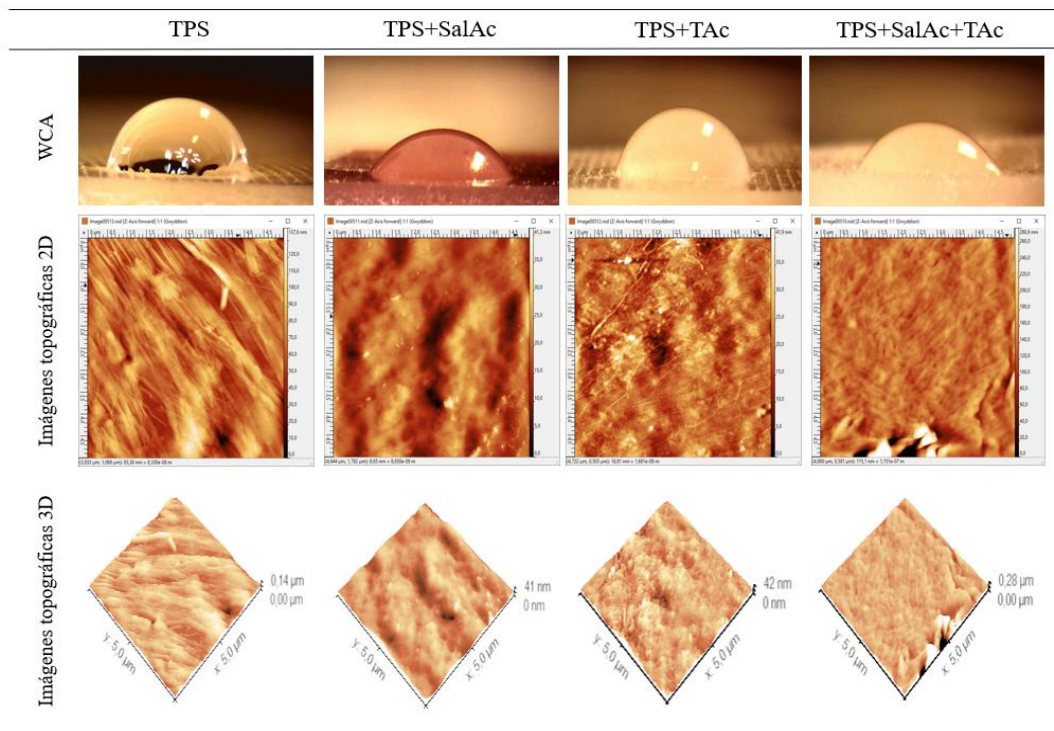


Figura 9. Imágenes de WCA y AFM de las películas: TPS, TPS + SalAc, TPS + TAc y TPS + SalAc + TAc.

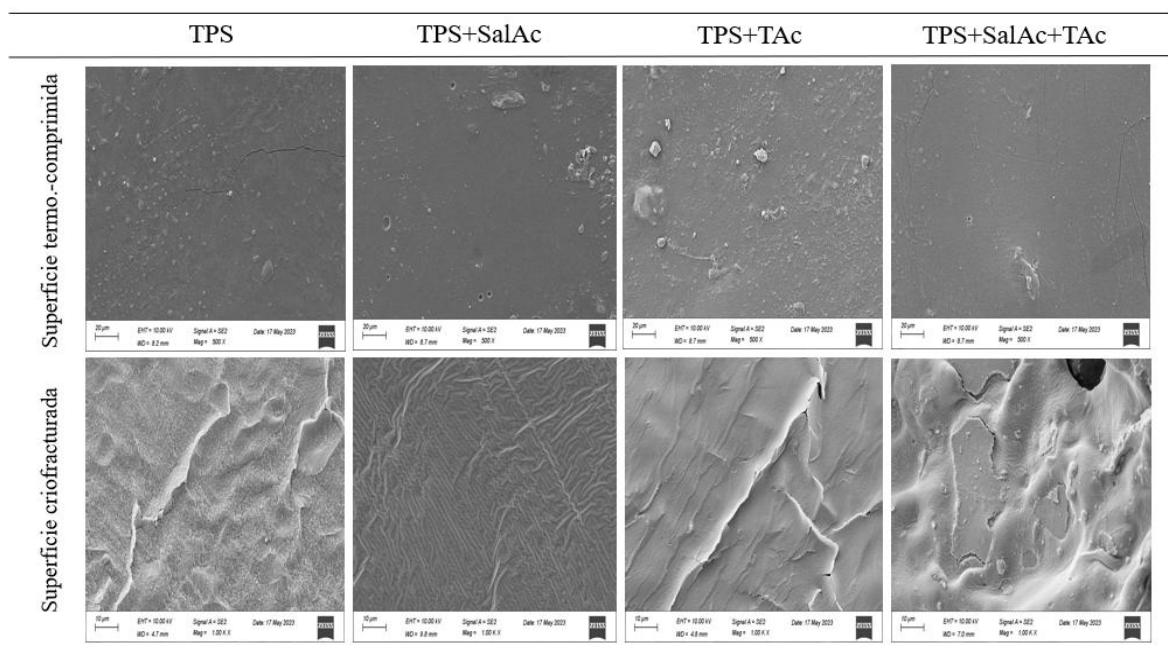


Figura 10. Micrografías SEM de la superficie termo-comprimida (a 500× de aumento) y de la superficie criogénicamente fracturada (a 1.0 k× de aumento) de los diversos sistemas de películas analizados: TPS, TPS + SalAc, TPS + TAc y TPS + SalAc + TAc.

4.5. Análisis mecánico: Ensayo de tracción uniaxial

Se llevaron a cabo ensayos de tracción uniaxial de cada sistema de película para obtener las curvas de tensión (σ) vs. deformación (ϵ) (**Figura 11**), con el fin de calcular los parámetros mecánicos de los materiales estudiados (E , σ_m , ϵ_b y T - **Tabla 1**). En general, se observa en todos los sistemas una pérdida del desempeño mecánico global (E , σ_m , ϵ_b y T) con respecto al material de control (TPS). Esto a pesar de que se comprobó la esterificación organocatalítica del SalAc (ver **Sección 4.1**). Por lo tanto, estos resultados refuerzan la idea de que la reacción de hidrolisis del almidón en presencia, ya sea de SalAc o TAc, en forma separada o en conjunto, ocurre incluso sin el agregado de agua en la formulación de las películas. Por esta razón, al menos dos mecanismos de reacción actuaron sobre las formulaciones: 1) esterificación organocatalítica y 2) hidrolisis del almidón. Esta última reacción no era la esperada teniendo en cuenta la ausencia de agua agregada. No obstante, la reacción de hidrolisis del almidón determinó el desempeño general de los materiales. Este hecho fue más notable en el sistema de película TPS + SalAc + TAc (posee los valores más bajos de E , σ_m , ϵ_b y T). Un comportamiento mecánico similar a causa de la hidrólisis del almidón fue también informado por Olivato et. al (70) para películas a base de almidón/poli(adipato de butileno-*co*-tereftalato) (PBAT) procesadas por extrusión reactiva en presencia de TAc y sin agua agregada. Adicionalmente, los resultados obtenidos hasta ahora denotan que el TAc tiene, aparentemente, un comportamiento hidrolizante más acentuado sobre el almidón, en comparación con el SalAc. Esto puede observarse si se comparan las curvas de σ vs. ϵ para las películas TPS + SalAc y TPS + TAc, donde todos los parámetros mecánicos (E , σ_m , ϵ_b y T) para la película TPS + TAc fueron significativamente ($p \leq 0,05$) más bajos que para la película TPS + SalAc. Esto se condice con todo lo analizado en las secciones previas. Cabe destacar que los sistemas de películas TPS + SalAc y TPS + TAc contienen la misma cantidad molar de ácidos y, por lo tanto, este comportamiento mecánico estaría relacionado intrínsecamente a la naturaleza química de cada uno de estos ácidos y su efecto hidrolizante sobre el almidón: TAc ($pK_{a1} = 2,98$ y $pK_{a2} = 4,34$) y SalAc ($pK_{a1} = 2,97$ y $pK_{a2} = 13,47$).

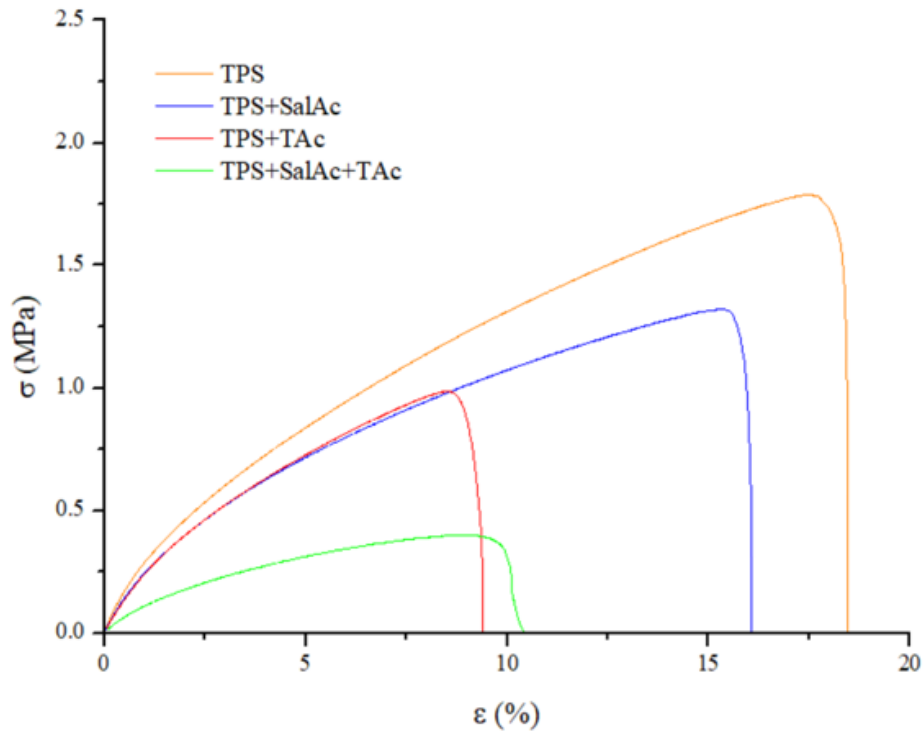


Figura 11. Curvas tensión (σ) - deformación (ϵ) de los diversos sistemas de películas analizados: TPS, TPS + SalAc, TPS + TAc y TPS + SalAc + TAc.

Por otra parte, la morfología superficial de la criofractura de los materiales está normalmente relacionada con su comportamiento mecánico (71). En este caso, todas las películas analizadas mostraron una morfología amorfa, compacta, sin huecos y sin evidencia de gránulos de almidón sin gelatinizar (**Figura 10**). Como fue comentado previamente, las propiedades mecánicas de las películas ensayadas exhibieron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre ellas. No obstante, la morfología superficial de la criofractura de los materiales no se vio alterada notoriamente. Vale la pena resaltar que la ausencia de gránulos de almidón demuestra que las condiciones de extrusión reactiva utilizadas provocaron la gelatinización completa del almidón. Esto es importante ya que no todas las condiciones de extrusión logran esto y una adecuada comprensión entre el proceso de extrusión y la estructura del material es necesaria en los materiales a base de almidón termoplástico, ya que una gelatinización incompleta del almidón podría afectar significativamente las propiedades mecánicas y de barrera de los materiales (72). De todas formas, la morfología predominantemente amorfa de todos los sistemas de película resultó ser consistente con los difractogramas de XRD previamente analizados (ver **Sección 4.1**).

4.6. Análisis funcional: Propiedades antioxidantes, antimicrobianas y ecotoxicidad

Las películas TPS + SalAc, TPS + TAc y TPS + SalAc + TAc mostraron una baja actividad antioxidante, de alrededor del 5% (**Tabla 1**). No obstante, no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p \geq 0.05$) entre los sistemas de película. Esta ligera actividad antioxidante puede ser relacionada a la naturaleza antioxidante del SalAc y TAc (73–75).

En cuanto a las propiedades antimicrobianas (**Tabla 2**), todos los materiales con contenido de ácidos en su composición, ya sea de manera individual o en conjunto, mostraron actividad antimicrobiana contra *L. innocua* (gram-positiva) y *P. aeruginosa* (gram-negativa), como era de esperar. Estos resultados fueron los esperados según la literatura para las películas con contenido de ácidos, ya sea de SalAc (76) o de TAc (77). Además, la actividad antimicrobiana resulta ser significativamente más alta contra *P. aeruginosa* que contra *L. innocua* para las películas TPS + SalAc, TPS + TAc y TPS + SalAc + TAc. En el caso de la *P. aeruginosa* (Gram negativa), no se observan diferencias significativas entre los diferentes materiales. Por otro lado, para el caso de la *L. innocua*, el material cuya composición contiene ambos ácidos (TPS + SalAc + TAc) muestra un aumento estadísticamente significativo de actividad antimicrobiana si se lo compara con los demás sistemas.

En particular, los sistemas de película con contenido de SalAc (TPS + SalAc y TPS + SalAc + TAc) también mostraron actividad antimicrobiana contra *S. aureus* (Gram positiva). Por lo tanto, estos resultados sugieren que la actividad antimicrobiana contra *S. aureus* está relacionada especialmente a la presencia de SalAc. Vale la pena destacar que el sistema de película TPS + SalAc + TAc presenta una mayor actividad antimicrobiana ($p \leq 0,05$) contra *S. aureus* en comparación al sistema de película TPS + SalAc. Es por esto que podría decirse que se observa un efecto sinérgico entre el SalAc y el TAc contra *S. aureus*. Fang et al. (78) también observaron actividad antimicrobiana contra *S. aureus* en películas a base de almidón conteniendo SalAc. De acuerdo a Pizzolitto et al. (79), los compuestos fenólicos tales como el SalAc pueden pasar la parte no polar de su estructura a través de la membrana celular de los microorganismos, provocando así una alteración del gradiente de pH transmembrana entre la membrana plasmática y las membranas de los orgánulos, produciendo pérdida de energía celular y ruptura de la membrana celular y pudiendo ocasionar, como consecuencia, la muerte del microorganismo. Song et al. (80) también notaron que el SalAc genera fuga de fosfatasa alcalinas intracelulares y sustancias

macromoleculares (ácidos nucleicos y proteínas) en las bacterias *E. coli* y *S. aureus*, lo cual confirma la alteración de las paredes celulares bacterianas y las membranas celulares de estos microorganismos. Fang et al. (78) también informaron actividad antimicrobiana contra *E. coli* en películas a base de almidón conteniendo SalAc. Teniendo esto en cuenta, en este estudio se obtuvieron resultados contrarios, ya que la película TPS + SalAc no mostró actividad antimicrobiana contra *E. coli*. Sin embargo, la película TPS + SalAc + TAc sí mostró actividad antimicrobiana contra *E. coli* pero esto se dio, posiblemente, por un efecto sinérgico del SalAc y el TAc.

Otro hecho relevante es que los sistemas de película con SalAc en su composición (TPS + SalAc y TPS + SalAc + TAc) no mostraron diferencias remarcables contra los microorganismos Gram positivos ensayados (*L. innocua* y *S. aureus*). Esto sugiere que los sistemas de película con contenido de SalAc poseen un mecanismo de inhibición antimicrobiana similar contra las bacterias Gram positivas testeadas (*L. innocua* y *S. aureus*). Sin embargo, estos mismos sistemas de película (TPS + SalAc y TPS + SalAc + TAc) sí mostraron diferencias notables entre los dos microorganismos Gram negativos evaluados (*E. coli* y *P. aeruginosa*). Por esta razón, podría destacarse un mecanismo de inhibición antimicrobiana diferente entre *E. coli* y *P. aeruginosa* (bacterias Gram negativas). Particularmente, *E. coli* fue inalterable en presencia de las películas con contenido de SalAc en comparación con *P. aeruginosa*. Esto demuestra que el mecanismo de inhibición de estos sistemas contra los microorganismos Gram negativos evaluados (*E. coli* y *P. aeruginosa*) va más allá de las consideraciones estructurales de la membrana celular de estos microorganismos (81). En resumen, entre todos los materiales estudiados, la actividad antimicrobiana más alta se observó contra *P. aeruginosa* (bacteria Gram negativa).

Tabla 2. Actividad antimicrobiana de las películas desarrolladas contra bacterias Gram positivas y Gram negativas.

Material	Halos de inhibición (mm)			
	Bacterias Gram positivas		Bacterias Gram negativas	
	<i>Listeria innocua</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomona aeruginosa</i>
TPS	0	0	0	0
TPS + SalAc	22 ± 2 ^{a,A}	21.5 ± 0.5 ^{a,A}	0	34 ± 2 ^{a,B}
TPS + TAc	22 ± 2 ^a	0	0	33.0 ± 0.5 ^{a,B}
TPS + SalAc + TAc	28 ± 2 ^{b,A}	26.5 ± 0.5 ^{b,A}	25.5 ± 0.5 ^{a,A}	34 ± 2 ^{a,B}

Las diferentes letras minúsculas en superíndice en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$, $n = 3$) para los diversos materiales analizados respecto al mismo microorganismo. Diferentes letras mayúsculas en superíndice en la misma fila denotan diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$, $n = 3$) para el mismo material variando el microorganismo.

En relación a la ecotoxicidad de las películas manufacturadas (**Figura 12**), aquellas con contenido de SalAc (TPS + SalAc y TPS + SalAc + TAc) no mostraron el efecto benéfico esperado sobre el crecimiento de las plántulas de lechuga. Por el contrario, la presencia de este ácido afectó negativamente el crecimiento de las plántulas de lechuga. Esto está posiblemente relacionado a la concentración de SalAc utilizada para la fabricación de las películas (12,13,82), ya que observando a Koo et al. (13), concentraciones de SalAc superiores a 1 mM pueden ser consideradas altas, afectando así negativamente el desarrollo y crecimiento de las plantas. Por otro lado, el sistema de película con contenido de TAc (TPS + TAc) no alteró significativamente el crecimiento de las plántulas de lechuga en comparación al control. Curiosamente, la película de TPS exhibió un resultado anómalo, ya que no se esperaba un efecto inhibitorio del crecimiento de las plántulas de lechuga. Esto último podría deberse a un impedimento físico, como la formación de un gel, que no permitiría la adecuada absorción de nutrientes de la raíz. Entonces, el material de TPS + TAc sería el único material que, en este sentido, podría ser considerado apto para su uso como acolchado agrícola. No obstante, más estudios en esta área deben ser conducidos sobre otras plántulas.

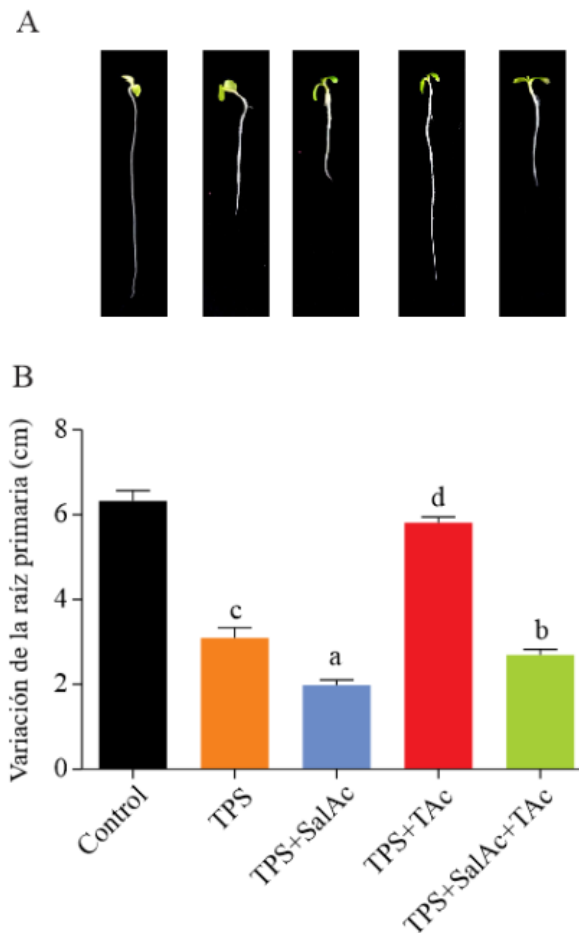


Figura 12. Estudio de ecotoxicidad de cada sistema de película analizado utilizando la variación de la raíz primaria (%) en plántulas de lechuga (*Lactuca sativa*) germinadas en agar-H₂O al 0.8% en placas de Petri. Panel A: Imágenes representativas de las plántulas de lechuga tratadas con cada sistema de película a una concentración de 1 mg/mL (Barras = 1 cm). Panel B: Medición de la variación de la raíz primaria en plántulas de lechuga a diferentes concentraciones de película: 0.1 y 1 mg/mL. Se usaron agua y NaCl 50 mM como controles negativo y positivo, respectivamente. Los datos se expresan como porcentaje respecto al sistema de película de control (película TPG). Los valores son la media (\pm DE) de tres experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía; los valores de p menores de 0.05 se consideraron estadísticamente significativos (prueba de Tukey). *p < 0.05. Sistemas de película analizados: almidón termoplástico (TPS), TPS + ácido salicílico (TPS + SalAc), TPS + ácido tartárico (TPS + TAc) y TPS + SalAc + TAc.

5. Análisis de factibilidad económica de producción a escala industrial

Otros estudios han demostrado el mercado, la rentabilidad (valor presente – VP y la tasa interna de retorno – TIR) y competitividad de los acolchados agrícolas a base de almidón

procesados por extrusión. Por ejemplo, Adler y Capiel (83) determinaron un VP de US\$1.568.495 y una TIR del 135% para la factibilidad económica del escalamiento de los acolchados agrícolas a base de almidón procesados por extrusión. Sin embargo, todos los materiales desarrollados en este trabajo demostraron propiedades pobres e inesperadas, las cuales limitan técnicamente su escalamiento.

6. Conclusiones

Se comprobó la esterificación organocatalítica de SalAc mediante el uso de TAc como catalizador verde. Sin embargo, esta reacción no fue determinante en el desempeño fisicoquímico y mecánico general de los materiales desarrollados. En contraste, este estudio reveló que bajos contenidos de humedad relacionados intrínsecamente a las materias primas (almidón y glicerol) provocaron la hidrólisis del almidón en presencia de SalAc y TAc. Por otra parte, el TAc mostró un efecto hidrolizante del almidón mayor que el SalAc, destruyendo así el orden laminar del almidón y las estructuras de almidón ordenadas de corto alcance (hélices dobles). Esto a pesar de que los sistemas de películas que contenían estos ácidos por separado tenían el mismo número de moles de ácido en su composición. Por lo tanto, la naturaleza química intrínseca de cada uno de estos ácidos fue determinante en el desempeño fisicoquímico y mecánico final de los materiales: TAc ($pK_{a1} = 2,98$ y $pK_{a2} = 4,34$) y SalAc ($pK_{a1} = 2,97$ y $pK_{a2} = 13,47$). Por otro lado, la actividad antioxidante de los materiales desarrollados no fue significativa en ninguno de los casos. Sin embargo, sí se constataron propiedades antimicrobianas de los materiales. Finalmente, bajo las concentraciones de SalAc y TAc ensayadas en este estudio se observó un efecto ecotóxico sobre plántulas de lechuga. No obstante, vale la pena resaltar que más estudios son requeridos en este campo, ya que, como fue indicado en la introducción (ver **Sección 2**), estos ácidos pueden cambiar su acción dependiendo de la planta estudiada.

7. Trabajos futuros

En base a los resultados obtenidos, se proponen los siguientes trabajos futuros para complementar el estudio realizado:

- Análisis del efecto hidrolizante de los ácidos, variando el contenido de agua en las formulaciones del almidón termoplástico.
- Análisis de variaciones en la concentración de los diferentes ácidos (dentro de los límites permitidos)

- Análisis de la factibilidad del uso de los materiales envases o recubrimientos solubles en agua para preservación de alimentos
- Análisis del efecto de la humedad intrínseca de las materias primas en el comportamiento general de los materiales manufacturados. Para esto, se propone llevar a cabo la extrusión de las formulaciones empleando materias primas previamente secadas en estufa.

8. Presentaciones

Los trabajos presentados durante la realización de este trabajo final de grado son detallados abajo:

Victoria Troncoso, María Victoria Alvarez, Andrés Torres Nicolini, Alejandra G. Ponce, Tomy J. Gutiérrez. Almidón de maíz extruido reactivamente vía esterificación organocatalítica de ácido salicílico para el desarrollo de materiales de envasado alimentario activos. XVIII Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CyTAL 2023). 4-6 de octubre, 2023. Buenos Aires, Argentina. Tipo de presentación: póster.

Victoria Troncoso, María Victoria Alvarez, Andrés Torres-Nicolini, Alejandra G. Ponce, Tomy J. Gutiérrez. Materiales de envasado alimentario activos hechos a base de almidón de maíz extruido reactivamente *vía* esterificación organocatalítica con ácido salicílico. VX Simposio Argentino de Polímeros (SAP 2023). 5-7 de diciembre, 2023. Mar del Plata, Argentina. Tipo de presentación: póster.

9. Bibliografía

1. Fernandez R. <https://es.statista.com/estadisticas/1124990/capacidad-global-de-produccion-de-bioplasticos/>. 2024. Evolución de la capacidad de producción de bioplásticos a nivel mundial de 2022 a 2028.
2. United Nations Environment Programme. Plastics in Agriculture – An Environmental Challenge. Foresight Brief. julio de 2022;29.
3. ONU. Los microplásticos también están contaminando nuestros suelos [Internet]. 2021. Disponible en: <https://www.unep.org/es/noticias-y-reportajes/reportajes/los-microplasticos-tambien-estan-contaminando-nuestros-suelos>
4. Baker E, Thygesen K. Plastics in agriculture: sources and impacts. 2021.

5. Kader MA, Senge M, Mojid MA, Ito K. Recent advances in mulching materials and methods for modifying soil environment. *Soil Tillage Res.* 1 de mayo de 2017;168:155–66.
6. Stavisky A. Panorama de la plasticultura en Argentina. *Plásticos.* septiembre de 2013;308:27–33.
7. Jiang T, Duan Q, Zhu J, Liu H, Yu L. Starch-based biodegradable materials: Challenges and opportunities. *Advanced Industrial and Engineering Polymer Research.* 1 de enero de 2020;3(1):8–18.
8. García-Guzmán L, Cabrera-Barjas G, Soria-Hernández CG, Castaño J, Guadarrama-Lezama AY, Rodríguez Llamazares S. Progress in starch-based materials for food packaging applications. Vol. 3, *Polysaccharides.* Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2022. p. 136–77.
9. Onyeaka H, Obileke K, Makaka G, Nwokolo N. Current research and applications of starch-based biodegradable films for food packaging. Vol. 14, *Polymers.* MDPI; 2022.
10. Liu J, Wang T, Hu C, Lei L, Liang Y, Gao Z, et al. Hydrophobic chitosan/salicylic acid blends film with excellent tensile properties for degradable food packaging plastic materials. *J Appl Polym Sci.* 15 de noviembre de 2022;139(43).
11. Kaya C, Ugurlar F, Ashraf M, Ahmad P. Salicylic acid interacts with other plant growth regulators and signal molecules in response to stressful environments in plants. *Plant Physiology and Biochemistry.* 1 de marzo de 2023;196:431–43.
12. Mansilla AY, Salcedo MF, Colman SL, Chevalier MT, Lanfranconi MR, Alvarez VA, et al. Characterization of functionalized bentonite as nanocarrier of salicylic acid with protective action against *Pseudomonas syringae* in tomato plants. *Eur J Plant Pathol.* el 1 de septiembre de 2020;158(1):211–22.
13. Koo YM, Heo AY, Choi HW. Salicylic acid as a safe plant protector and growth regulator. *Plant Pathol J.* 1 de febrero de 2020;36(1):1–10.
14. Singh N, Georget DMR, Belton PS, Barker SA. Physical properties of zein films containing salicylic acid and acetyl salicylic acid. *J Cereal Sci.* septiembre de 2010;52(2):282–7.
15. Yuan T yue, Wan D juan, Yang W jun, Gu J feng, Zhou H, Zeng P, et al. Tartaric acid coupled with gibberellin improves remediation efficiency and ensures safe production of crops: A new strategy for phytoremediation. *Science of The Total Environment.* 15 de enero de 2024;908:168319.
16. Hernandez-Hernandez O, Julio-Gonzalez LC, Doyagüez EG, Gutiérrez TJ. Structure-digestibility relationship from noodles based on organocatalytically esterified regular and waxy corn starch obtained by reactive extrusion using sodium propionate. *Food Hydrocoll.* 1 de octubre de 2022;131:107825.
17. Imre B, Vilaplana F. Organocatalytic esterification of corn starches towards enhanced thermal stability and moisture resistance. *Green Chemistry.* 7 de agosto de 2020;22(15):5017–31.
18. U.S. Food and Drug Administration. Title 21, Volume 3. CFR - Code of Federal Regulations Title 21 - Food and Drugs.
19. Isotton FS, Bernardo GL, Baldasso C, Rosa LM, Zeni M. The plasticizer effect on preparation and properties of etherified corn starches films. *Ind Crops Prod.* 15 de diciembre de 2015;76:717–24.

20. Xu X, Wang B, Gao W, Sui J, Wang J, Cui B. Effect of different proportions of glycerol and D-mannitol as plasticizer on the properties of extruded corn starch. *Front Nutr.* 2023;10.
21. Basiak E, Lenart A, Debeaufort F. How glycerol and water contents affect the structural and functional properties of starch-based edible films. *Polymers (Basel).* 8 de abril de 2018.
22. Gaspar-Cunha A, Covas JA. Optimization in polymer processing. Nova Science Publishers, Inc.; 2011.
23. Guarás MP, Alvarez VA, Ludueña LN. Effect of storage time, plasticizer formulation and extrusion parameters on the performance of thermoplastic starch films. *Adv Mater Lett.* 1 de marzo de 2019;10(3):206–14.
24. Gutiérrez TJ. Starch-based food packaging films processed by reactive extrusion/thermo-molding using chromium octanoate-loaded zeolite A as a potential triple-action mesoporous material (reinforcing filler/food-grade antimicrobial organocatalytic nanoreactor). *Food Packag Shelf Life [Internet].* 2022;34:100974. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214289422001661>
25. United States Food and Drug Administration (USFDA). CFR - Code of Federal Regulations Title 21. 2024. Topical antimicrobial drug products for over-the-counter human use. Disponible en: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=333.310&SearchTerm=salicylic%20acid>
26. Administración Nacional de Medicamentos A y TM (ANMAT). Disposición N° 6365/12 [Internet]. 2012. Disponible en: <https://www.boletinoficial.gob.ar/detalleAviso/primera/281417/20230217>
27. Hernandez-Hernandez O, Julio-Gonzalez LC, Doyagüez EG, Gutiérrez TJ. Potentially health-promoting spaghetti-type pastas based on doubly modified corn starch: Starch oxidation *via* wet chemistry followed by organocatalytic butyrylation using reactive extrusion. *Polymers (Basel).* 1 de abril de 2023;15(7).
28. Gutiérrez TJ, Alvarez VA. Bionanocomposite films developed from corn starch and natural and modified nano-clays with or without added blueberry extract. *Food Hydrocoll.* 1 de abril de 2018;77:407–20.
29. Cavallo E, Tupa Valencia MV, Rossi E, Errea MI, Foresti ML. Production of resistant starches via citric acid modification: Effects of reaction conditions on chemical structure and final properties. *Int J Biol Macromol [Internet].* 2024;278(3):134922. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813024057271>
30. Van Soest JGG, Tournois H, de Wit D, Vliegthart JFG. Short-range structure in (partially) crystalline potato starch determined with attenuated total reflectance Fourier-transform IR spectroscopy. *Carbohydr Res [Internet].* 27 de diciembre de 1995 [citado el 20 de septiembre de 2017];279:201–14. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0008621595002707>
31. Gutiérrez TJ, Herniou-Julien C, Álvarez K, Alvarez VA. Structural properties and in vitro digestibility of edible and pH-sensitive films made from guinea arrowroot starch and wastes from wine manufacture. *Carbohydr Polym.* 2018;184:135–43.

32. Sukhija S, Singh S, Riar CS. Physicochemical, crystalline, morphological, pasting and thermal properties of modified lotus rhizome (*Nelumbo nucifera*) starch. Food Hydrocoll. 1 de octubre de 2016;60:50–8.
33. ASTM D882-18. Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting [Internet]. 2018. Disponible en: <https://www.astm.org/Standards/D882.htm>
34. Molyneux P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. Songklanakarin Journal of Science and Technology. 2004;26(2):211–9.
35. Gutiérrez TJ, Toro-Márquez LA, Merino D, Mendieta JR. Hydrogen-bonding interactions and compostability of bionanocomposite films prepared from corn starch and nano-fillers with and without added Jamaica flower extract. Food Hydrocoll. 1 de abril de 2019;89:283–93.
36. Gutiérrez TJ, Mendieta JR, Ortega-Toro R. In-depth study from gluten/PCL-based food packaging films obtained under reactive extrusion conditions using chrome octanoate as a potential food grade catalyst. Food Hydrocoll [Internet]. febrero de 2021;111:106255. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268005X20318099>
37. El Nokab MEH, Alassmy YA, Abduljawad MM, Al-shamrani KM, Alnafisah MS, Asgar Pour Z, et al. Solid-state NMR spectroscopy: Towards structural insights into starch-based materials in the food industry. Polymers (Basel). 1 de noviembre de 2022;14(21).
38. Šmídová N, Šoltýs A, Hronský V, Olčák D. Solid state NMR study of plasticized starch [Internet]. 2016. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/312972353>
39. Tupa M V, Arroyo S, Herrera ML, Foresti ML. Production of esterified starches with increased resistant starch content by an α -hydroxy acid-catalyzed route. Starch - Stärke [Internet]. 1 de mayo de 2018;70(5–6):1700155. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/star.201700155>
40. Vidal NP, Bai W, Geng M, Martinez MM. Organocatalytic acetylation of pea starch: Effect of alkanoyl and tartaryl groups on starch acetate performance. Carbohydr Polym. 15 de octubre de 2022;294:119780.
41. Jantas R, Draczyński Z, Stawski D. Starch functionalized by chloroacetate groups: Coupling of bioactive alicyclic acid. Starch - Stärke. 10 de agosto de 2007;59(8):366–70.
42. Gutiérrez TJ, Valencia GA. Reactive extrusion-processed native and phosphorylated starch-based food packaging films governed by the hierarchical structure. Int J Biol Macromol. 1 de marzo de 2021;172:439–51.
43. Colthup NB. Spectra-structure correlations in the infra-red region. J Opt Soc Am [Internet]. Junio de 1950;40(6):397–400. Disponible en: <https://opg.optica.org/abstract.cfm?URI=josa-40-6-397>
44. Gutiérrez TJ. Effects of exposure to pulsed light on molecular aspects of edible films made from cassava and taro starch. Innovative Food Science & Emerging Technologies [Internet]. 2017;41:387–96. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1466856417301108>
45. Mathew S, Brahmakumar M, Abraham TE. Microstructural imaging and characterization of the mechanical, chemical, thermal, and swelling properties of

- starch–chitosan blend films. *Biopolymers* [Internet]. 5 de junio de 2006; 82(2):176–87. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1002/bip.20480>
46. Gutiérrez TJ, Suniaga J, Monsalve A, García NL. Influence of beet flour on the relationship surface-properties of edible and intelligent films made from native and modified plantain flour. *Food Hydrocoll.* 2016;54:234–44.
 47. Romero Hernández HA, Gutiérrez TJ, Tovar J, Bello-Pérez LA. Complexation of octenyl succinic anhydride-esterified corn starch/polyphenol-rich Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extract: Structural and digestibility features. *Food Hydrocoll* [Internet]. diciembre de 2023;145:109125. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X23006719>
 48. Gutiérrez TJ, Tovar J. Update of the concept of type 5 resistant starch (RS5): Self-assembled starch V-type complexes. *Trends Food Sci Technol.* 2021;109:711–24.
 49. Gutiérrez TJ, Bello-Pérez LA. Self-assembled and assembled starch V-type complexes for the development of functional foodstuffs: A review. *Food Hydrocoll* [Internet]. 2022;125:107453. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X21008699>
 50. Esmaeili M, Pircheraghi G, Bagheri R. Optimizing the mechanical and physical properties of thermoplastic starch via tuning the molecular microstructure through co-plasticization by sorbitol and glycerol. *Polym Int.* 1 de junio de 2017;66(6):809–19.
 51. Zhang B, Xie F, Wang DK, Zhao S, Niu M, Qiao D, et al. An improved approach for evaluating the semicrystalline lamellae of starch granules by synchrotron SAXS. *Carbohydr Polym* [Internet]. 20 de febrero de 2017;158:29–36. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861716313704>
 52. Vermeylen R, Derycke V, Delcour JA, Goderis B, Reynaers H, Koch MHJ. Structural transformations during gelatinization of starches in limited water: Combined wide- and small-angle X-ray scattering study. *Biomacromolecules* [Internet]. 1 de abril de 2006;7(4):1231–8. Disponible en: <https://doi.org/10.1021/bm050651t>
 53. Liu X, Huang S, Chao C, Yu J, Copeland L, Wang S. Changes of starch during thermal processing of foods: Current status and future directions. *Trends Food Sci Technol* [Internet]. 2022;119:320–37. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.12.011>
 54. Liang W, Ding L, Guo K, Liu Y, Wen X, Kirkensgaard JJK, et al. The relationship between starch structure and digestibility by time-course digestion of amylopectin-only and amylose-only barley starches. *Food Hydrocoll* [Internet]. Mayo de 2023;139:108491. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X23000371>
 55. Chi C, Xu K, Wang H, Zhao L, Zhang Y, Chen B, et al. Deciphering multi-scale structures and pasting properties of wheat starch in frozen dough following different freezing rates. *Food Chem* [Internet]. 2023;Part A:134836. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814622027984>
 56. Zhang L, Li X, Janaswamy S, Chen L, Chi C. Further insights into the evolution of starch assembly during retrogradation using SAXS. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2020;154:521–7. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.03.135>
 57. Wang H, Wang Y, Wang R, Liu X, Zhang Y, Zhang H, et al. Impact of long-term storage on multi-scale structures and physicochemical properties of starch isolated from

- rice grains. *Food Hydrocoll* [Internet]. Marzo de 2022;124:107255. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X21006718>
58. Zhai Y, Li X, Bai Y, Jin Z, Svensson B. Maltogenic α -amylase hydrolysis of wheat starch granules: Mechanism and relation to starch retrogradation. *Food Hydrocoll* [Internet]. marzo de 2022;124(Part A):107256. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X2100672X>
 59. Fabra MJ, Martínez-Sanz M, Gómez-Mascaraque LG, Gavara R, López-Rubio A. Structural and physicochemical characterization of thermoplastic corn starch films containing microalgae. *Carbohydr Polym* [Internet]. 15 de abril de 2018;186:184–91. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861718300390>
 60. Khosravi A, Fereidoon A, Khorasani MM, Naderi G, Ganjali MR, Zarrintaj P, et al. Soft and hard sections from cellulose-reinforced poly(lactic acid)-based food packaging films: A critical review. *Food Packag Shelf Life* [Internet]. 1 de marzo de 2020; 23:100429. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214289419304430>
 61. Biliaderis CG, Swan RS, Arvanitoyannis I. Physicochemical properties of commercial starch hydrolyzates in the frozen state. *Food Chem* [Internet]. Marzo de 1999;64(4):537–46. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814698001654>
 62. Gutiérrez TJ, Morales NJ, Pérez E, Tapia MS, Famá L. Physico-chemical properties of edible films derived from native and phosphated cush-cush yam and cassava starches. *Food Packag Shelf Life* [Internet]. 2015;3:1–8. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214289414000684>
 63. Liu X, Wang Y, Yu L, Tong Z, Chen L, Liu H, et al. Thermal degradation and stability of starch under different processing conditions. *Starch - Stärke*. 22 de enero de 2013;65(1-2):48–60.
 64. Zain AHM, Kahar AWM, Noriman NZ. Chemical-mechanical hydrolysis technique of modified thermoplastic starch for better mechanical performance. *Procedia Chem* [Internet]. 2016;19:638–45. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1876619616001108>
 65. Gutiérrez TJ, Valencia GA. Reactive extrusion-processed native and phosphated starch-based food packaging films governed by the hierarchical structure. *Int J Biol Macromol*. 1 de marzo de 2021;172:439–51.
 66. Herniou-Julien C, Mendieta JR, Gutiérrez TJ. Characterization of biodegradable/non-compostable films made from cellulose acetate/corn starch blends processed under reactive extrusion conditions. *Food Hydrocoll*. 1 de abril de 2019;89:67–79.
 67. Gutiérrez TJ. Biological Macromolecule Composite Films Made from Sagu Starch and Flour/Poly(ϵ -Caprolactone) Blends Processed by Blending/Thermo Molding. *J Polym Environ*. 1 de septiembre de 2018;26(9):3902–12.
 68. Vogler EA. Structure and reactivity of water at biomaterial surfaces. 1998.
 69. Gutiérrez TJ, Ollier R, Alvarez VA. Surface Properties of Thermoplastic Starch Materials Reinforced with Natural Fillers. En 2018. p. 131–58.
 70. Olivato JB, Müller CMO, Carvalho GM, Yamashita F, Grossmann MVE. Physical and structural characterisation of starch/polyester blends with tartaric acid. *Materials Science and Engineering: C*. Junio de 2014;39:35–9.

71. Bai H, Wang Y, Zhang Z, Han L, Li Y, Liu L, et al. Influence of annealing on microstructure and mechanical properties of isotactic polypropylene with β -phase nucleating agent. *Macromolecules* [Internet]. 8 de septiembre de 2009;42(17):6647–55. Disponible en: <https://doi.org/10.1021/ma9001269>
72. Shirai MA, Grossmann MVE, Mali S, Yamashita F, Garcia PS, Müller CMO. Development of biodegradable flexible films of starch and poly(lactic acid) plasticized with adipate or citrate esters. *Carbohydr Polym* [Internet]. 2013;92(1):19–22. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861712009551>
73. Moustafa-Farag M, Mohamed HI, Mahmoud A, Elkelish A, Misra AN, Guy KM, et al. Salicylic acid stimulates antioxidant defense and osmolyte metabolism to alleviate oxidative stress in watermelons under excess boron. *Plants*. 8 de junio de 2020;9(6):724.
74. Poojari J, Sunil D, Kamath PR, Ananda K, Kiran DP. Antioxidant properties and electrochemical behavior of some acetyl salicylic acid derivatives. *J Appl Pharm Sci*. 2016;6(11):165–71.
75. Jantwal A, Durgapal S, Upadhyay J, Joshi T, Kumar A. Tartaric acid. En: *Antioxidants Effects in Health*. Elsevier; 2022. p. 485–92.
76. Sykes EME, White D, McLaughlin S, Kumar A. Salicylic acids and pathogenic bacteria: new perspectives on an old compound. *Can J Microbiol*. 1 de enero de 2024;70(1):1–14.
77. Mikaelyan AR, Babayan BG, Vartanyan AA, Tokmajyan H V. Tartaric acid synthetic derivatives effect on phytopathogenic bacteria. *Agronomy Research*. 2022;20(3):644–59.
78. Fang Y, Fu J, Tao C, Liu P, Cui B. Mechanical properties and antibacterial activities of novel starch-based composite films incorporated with salicylic acid. *Int J Biol Macromol*. 15 de julio de 2020;155:1350–8.
79. Pizzolitto RP, Barberis CL, Dambolena JS, Herrera JM, Zunino MP, Magnoli CE, et al. Inhibitory effect of natural phenolic compounds on *Aspergillus parasiticus* growth. *J Chem* [Internet]. 1 de enero de 2015;2015(1):547925. Disponible en: <https://doi.org/10.1155/2015/547925>
80. Song X, Li R, Zhang Q, He S, Wang Y. Antibacterial effect and possible mechanism of salicylic acid microcapsules against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Int J Environ Res Public Health*. 6 de octubre de 2022;19(19):12761.
81. Brul S, Coote P. Preservative agents in foods: Mode of action and microbial resistance mechanisms. *Int J Food Microbiol* [Internet]. 1999;50(1):1–17. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160599000720>
82. Benjamin G, Pandharikar G, Frendo P. Salicylic acid in plant symbioses: Beyond plant pathogen Interactions. *Biology (Basel)*. 3 de junio de 2022;11(6):861.
83. Adler MS, Capiel J. Desarrollo de acolchados agrícolas biodegradables [Internet]. [Mar del Plata]: Universidad Nacional de Mar del Plata; 2022. Disponible en: <chrome-extension://efaidnbnmnnibpcajpcgclclefindmkaj/https://rinfi.fi.mdp.edu.ar/bitstream/handle/123456789/635/MSAdler%2BJCapiel-TFG-IM-2022.pdf?sequence=1&isAllowed=y>