

CAMBIOS INDUCIDOS POR LA RADIACIÓN UV EN PELÍCULAS DE CARBOXIMETILCELULOSA Y ALCOHOL POLIVINÍLICO EN PRESENCIA DE BENZOATO DE SODIO

Sabrina Villarruel¹, Leda Gianuzzi¹, Sandra Rivero¹, Adriana Pinotti^{1,2}

1. RESUMEN

La carboximetilcelulosa sódica (CMC) es un derivado de la celulosa con propiedades filmogénicas, utilizada en el área de alimentos. El alcohol polivinílico (PVOH) es un polímero sintético semicristalino obtenido mediante hidrólisis del acetato de polivinilo. El fotoentrecruzamiento de las películas con UV constituye una tecnología que permite mejorar las propiedades de los materiales. Para este tratamiento es necesario incorporar durante el procesamiento de la matriz fotoiniciadores como el benzoato de sodio (BS), para producir radicales que inicien las reacciones de reticulación. Además el BS funcionaliza el material otorgándole propiedades antimicrobianas. Los objetivos del trabajo fueron: I) desarrollar películas puras y compuestas a base de PVOH y CMC, estudiando sus propiedades fisicoquímicas, mecánicas, térmicas y microestructurales; II) analizar las interacciones establecidas entre CMC y PVOH y los cambios inducidos por el tratamiento con radiación UV en presencia de benzoato de sodio (BS); III) evaluar la capacidad antimicrobiana de las películas activas. Análisis térmicos, rayos X, SEM y FTIR evidenciaron los cambios microestructurales producido en la matriz y proporcionaron información acerca de la modificación inducida ya sea por la presencia de BS o por el tratamiento con UV. Los espectros de FTIR reflejaron cierto grado de interacción polímero-polímero a nivel molecular en las regiones amorfas, especialmente en las películas compuestas fotoentrecruzadas con BS. La incorporación de este compuesto

CONTACTO: Sandra Rivero sandra_gmr@yahoo.com

1. Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos, CONICET-La Plata, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP, La Plata, Argentina.

2. Facultad de Ingeniería, UNLP, La Plata, Argentina.

activo combinado con UV fue positiva debido a la inhibición del crecimiento de un amplio espectro de microorganismos (*E. coli*, *Salmonella* spp, *Penicilium* sp. y *Candida* spp.). Asimismo, desde el punto de vista físico-químico y estructural el tratamiento de las películas compuestas modificó significativamente su morfología evidenciada por SEM, obteniendo materiales más insolubles en agua. El desarrollo de películas funcionalizadas permitió obtener un material potencialmente aplicable en el envasado de alimentos.

2. INTRODUCCIÓN

La carboximetilcelulosa sódica (CMC) es un polímero derivado de la modificación química de la celulosa. Dado que la CMC tiene abundantes grupos hidroxilos puede ser usada para preparar películas e hidrogeles (Ibrahim y col., 2010). El alcohol polivinílico (PVA) es un polímero sintético, hidrosoluble con excelentes propiedades filmogénicas, que puede ser utilizado como base para la realización de mezclas con otros polímeros. La solubilidad en agua varía con la temperatura y depende del grado de polimerización e hidrólisis, alcanzando valores máximos con un grado de hidrólisis entre el 86 y 89 %. La mezcla de dos polímeros permite la preparación de materiales compuestos con propiedades controlables que difieren significativamente de sus componentes (Park y col., 2001; Ramakrishna y col., 2011).

La radiación ha sido usada para mejorar las propiedades de los materiales poliméricos debido a la tendencia a la reacción química entre las moléculas del polímero expuestas a radiación. Se usan fotosensibilizadores como el benzoato de sodio, que es conocido por ser fotolisado por la radiación UV (Detduangchan y Wittaya, 2011). Asimismo, el benzoato de sodio, reconocido por su capacidad antimicrobiana, es extensamente usado en la conservación de alimentos.

Este trabajo se centra en, I) desarrollar películas puras y compuestas a base de PVOH y CMC, estudiando sus propiedades fisicoquímicas, mecánicas, térmicas y microestructurales;

II) estudiar los cambios inducidos por el tratamiento con radiación UV de películas compuestas con BS con el fin de alterar sus propiedades de superficie e introducir nuevas funcionalidades, evaluando los cambios experimentados debido a la adición de I foto-iniciator;

III) evaluar la capacidad antimicrobiana de las películas activas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES Y OBTENCIÓN DE LAS PELÍCULAS

Se utilizó carboximetilcelulosa sódica (Parafarm) y alcohol polivinílico (ELVANOL T25) proporcionado por DuPont. Las soluciones de PVA al 2 % (p/v) se prepararon por solubilización en agua destilada a 90 °C bajo agitación durante 45 min. Las soluciones de CMC se prepararon por dispersión de 1,5 % (p/v) del polímero en agua destilada a 80 °C por 24 h. Las soluciones se mezclaron en una proporción 50:50 (p/p). Las películas se prepararon mediante moldeo de las soluciones en placas de acrílico y secado en estufa a 37 °C. Se adicionó 0,1 % (p/p) de BS (Supelco) a soluciones 50:50. Algunas de las películas compuestas con BS se expusieron a luz UV a una longitud de onda de 254 nm. La intensidad de la radiación fue de 0,137 J cm⁻² min⁻¹, y se midió con un Cole-Parmer Radiometer (VLX 3W, EE.UU.)

ESPESOR DE LAS PELÍCULAS

Las medidas de los espesores se realizaron utilizando un medidor electrónico CheckLine 900 (EEUU) para materiales no conductores y sustratos no ferrosos.

SOLUBILIDAD DE LAS PELÍCULAS

La solubilidad se determinó sobre muestras de 3×3cm, las que fueron pesadas y sumergidas en agua destilada. Las muestras se mantuvieron bajo agitación durante 1 h a 20 °C. Las piezas remanentes se secaron nuevamente a 105° hasta alcanzar peso constante.

CONTENIDO DE HUMEDAD

La pérdida de peso de las películas se determinó midiendo el peso a tiempo inicial y luego de ser secadas en estufa a 105 °C hasta peso constante.

PROPIEDADES DE BARRERA

La permeabilidad al vapor de agua (WVP) se determinó según una modificación del método de la ASTM E96 (Rivero y col., 2013). Los valores de permeabilidad al oxígeno (PO₂) de las películas se determinaron utilizando un medidor de permeabilidad al oxígeno Oxtran-2/20 (MOCON, Modern Controls, EEUU), siguiendo el procedimiento descrito en la norma ASTM F1927-07. Los experimentos se realizaron a 23 °C y a 65 % de HR.

PROPIEDADES MECÁNICAS DETERMINADAS POR DMA

Las propiedades mecánicas se analizaron mediante un equipo de análisis dinámico-mecánico térmico Q800 (TA Instruments, New Castle, EEUU) usando pinzas de tensión con un sistema de enfriamiento con N₂ líquido. Las muestras se cortaron de 30 mm de largo y 6 mm de ancho y se aplicó una pre-carga de 1,5 N. El ensayo se realizó a temperatura ambiente, programándose una isoterma a 25 °C y un aumento de fuerza a una velocidad de 0,6 N min⁻¹ obteniéndose las curvas de esfuerzo-deformación hasta la ruptura de las películas o hasta un máximo de 18 N.

PROPIEDADES TÉRMICAS DE LAS PELÍCULAS (MDSC)

Las propiedades térmicas de las películas fueron determinadas usando un calorímetro diferencial de barrido modulado (MDSC) modelo Q100 de (TA Instruments, New Castle, Delaware, USA). Los análisis de DSC se realizaron a 10 °C min⁻¹ desde -100 a 250 °C. Luego la muestra se enfrió hasta -100 °C y se registró una segunda corrida. Los parámetros vinculados al proceso se determinaron con el software Universal Analysis V1.7F (TA Instruments).

DIFRACCIÓN DE RAYOS X

Los patrones de difracción de rayos X se obtuvieron usando un equipo X'Pert Pro P Analytical Model PW 3040/60 (Holanda), utilizando la línea Cu K α (1.542 Å), con una diferencia de potencial de 40 kV y una densidad de corriente de 30mA. Las medidas se registraron entre 3–60° grados (2 θ).

ESPECTROSCOPÍA DE INFRARROJO (FTIR)

Los espectros de las películas fueron obtenidos por FTIR usando un IR espectrofotómetro (Nicolet, iS10 Thermo Scientific, Madison, USA) en el rango 4000-400 cm⁻¹ por acumulación de 64 barridos con una resolución de 4 cm⁻¹.

MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)

Los estudios de la morfología de las películas se realizaron por microscopía electrónica de barrido con un SEM FEI QUANTA 200 (Holanda), sobre muestras criofracturadas por inmersión en N₂ líquido.

CAPACIDAD ANTIMICROBIANA

Candida spp. se cultivaron en caldo nutritivo que contiene extracto de malta (1 %, Biokar, Francia), extracto de levadura (2 %, Biokar, Francia) y glucosa (1 %, Merck, Alemania). *E. coli* y *Salmonella* spp. fueron cultivadas en un caldo nutritivo TSB (Caldo Triptona Soja, Merck, Alemania). Todos los cultivo se incubaron a 37 °C durante 12 h hasta que las concentraciones alcanzaran 10^8 UFC mL⁻¹ determinados por densidad óptica. Se prepararon diluciones 1:10 a partir de estos inóculos con agua de peptona estéril 0,1 % (Oxoid) para obtener concentraciones de 10^7 UFC mL⁻¹. El inóculo de *Penicillium* spp. fue preparado por crecimiento del hongo en agar papa dextrosa (Merck, Alemania) durante 7 días a 30 °C. La capacidad antimicrobiana de las películas se determinó mediante el método de difusión en agar descrito por Rivero *et al.* (2013).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis de los resultados obtenidos se empleó el test de comparación de medias de Fisher (LSD) y análisis de varianza (ANOVA), utilizando el paquete estadístico Systat (versión 10, USA), con un nivel de significación de 0,05.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS, DE BARRERA Y MECÁNICAS

En la Tabla 1 se muestran los valores de humedad, y las propiedades mecánicas y de barrera. Excepto en el caso del esfuerzo, las películas de CMC y PVA presentaron los valores extremos de las variables, mientras que las compuestas tuvieron comportamientos intermedios.

Como era de esperar, las películas de CMC presentan los valores más altos de WVP, en contraste con bajos valores de WVP para películas de PVOH, atribuidos a la alta cristalinidad del polímero. Las películas fotoentrecruzadas mostraron WVP similares a películas compuestas sin tratar ($P > 0,05$). Teniendo en cuenta la PO_2 , se observó tendencia similar como se puede ver en la Tabla 1.

Todas las películas se solubilizaron por completo mientras que en las matrices compuestas con agregado de BS y tratadas con UV la solubilidad fue del 57 %, manteniendo su integridad estructural.

PROPIEDADES TÉRMICAS

La MDSC ha sido extensamente usada para investigar la miscibilidad de las mezclas de polímeros. Los termogramas de CMC, PVA y su mezcla 50:50 se muestran en la Figura 2. Se observó un pico endotérmico localizado a 127,5 °C, el cual fue atribuido a la pérdida de humedad residual de las películas de CMC. El termograma del PVA desplegó dos picos endotérmicos. El primero a 129 °C se asigna al efecto térmico debido a la evaporación de humedad de la muestra, con una entalpía de 131 J g⁻¹ y una transición endotérmica a 207 °C con una entalpía de 41,2 J g⁻¹, atribuida a la fusión de la fase cristalina (Hasimi y col., 2008). Las películas compuestas mostraron que el pico endotérmico correspondiente a la fusión de la fase cristalina del PVA se corrió hacia valores más bajos. Asimismo el valor de la entalpía correspondiente resultó menor. El grado de cristalinidad de la muestra de PVA estuvo en el rango 27 % según la metodología descrita por Hasimi y col. (2008). La cristalinidad de la película compuesta sin tratamiento fue 21 %, valor superior al obtenido para estas películas en presencia de BN y sometidas a la radiación UV (13 y 10 %, respectivamente).

ANÁLISIS DE DIFRACCIÓN DE RAYOS X

Los espectros de difracción de rayos X se utilizaron para estimar la cristalinidad de las películas puras y compuestas. Patrones típicos de XRD de películas de PVOH y CMC y su mezcla con y sin tratamiento UV están representados en la Figura 3. El espectro de difracción de rayos X de la película de CMC exhibió un pico en $2\theta = 21^\circ$, mientras que el espectro de PVA evidenció un pico de difracción a $2\theta = 19,7^\circ$. Los picos de difracción de CMC: PVA se ubicaron en $2\theta = 19,7$ y $10,7^\circ$, siendo su grado de cristalinidad del 22,5 %. Este resultado indicaría la formación de una nueva estructura de PVA/ CMC, como consecuencia de los enlaces de hidrógeno entre -OH y -COONa de CMC y OH de las moléculas de PVA.

Hubo un cambio perceptible en la intensidad del pico de la mezcla en comparación con las películas formuladas con polímeros puros, cuyos valores de cristalinidad fueron 27 y 11 % para PVA y CMC, respectivamente. Se observó que la cristalinidad de PVA se vio afectada por la presencia del otro componente, CMC. Teniendo en cuenta las películas compuestas con la adición de BS, con y sin tratamiento con radiación UV, no se observaron diferencias significativas ($P > 0,05$) en comparación con la matriz formulada con la mezcla sin BS.

ESPECTROSCOPÍA INFRARROJA CON TRANSFORMADA DE FOURIER

Los espectros FTIR de las películas compuestas difirieron de los correspondientes a las películas de los polímeros puros. El pico a 1600 cm^{-1} se asignó a las absorciones características de la vibración de tensión asimétrica del COO^- de la CMC. La fuerte banda de absorción a 1600 cm^{-1} se puso de manifiesto en las películas compuestas. Sobre la base de estos resultados, es probable que los grupos COO^- y OH de la CMC participen en enlaces de hidrógeno intermoleculares con los grupos OH del PVA. En los espectros FTIR de películas compuestas con la adición de BS se observó la aparición de un hombro a 1556 cm^{-1} y un pico de absorción a 725 cm^{-1} que desapareció en las películas compuestas expuestas a radiación, revelando la foto-descomposición del sensibilizador. Se produjo una intensificación del pico a 1141 cm^{-1} en presencia de BS y BS+UV (Figura 4).

Por el contrario la banda a 1418 cm^{-1} disminuyó su intensidad con la adición de BS y la misma aumentó luego de la exposición a luz UV (Miranda y col., 2001).

ANÁLISIS MICROESTRUCTURAL

A pesar de que el PVA y CMC son compuestos polihidroxi solubles en agua y exhiben excelente miscibilidad en soluciones acuosas, en estado sólido demostraron ser sólo parcialmente miscibles. El PVA es un material suave y elástico, mientras que la CMC es más rígida y dura.

Desde el punto de vista microscópico, las películas puras presentaron un aspecto homogéneo, con una buena integridad estructural. Teniendo en cuenta la película de material compuesto, los dos polímeros se presentaron como materiales intercalados, formando una red de aspecto levemente granular (Figura 5a). Esta falta de homogeneidad se hizo más acentuada en presencia de benzoato de sodio. Tal como muestra la Figura 5b, hay dominios claros y regiones oscuras, posiblemente debido a la modificación del grado de cristalinidad tal como se pudo observar por rayos X (Cortázar y col., 1982). Cuando las películas compuestas con adición de BS se sometieron a tratamiento con luz UV se produjeron cambios estructurales, presentando una apariencia de un retículo como un panal de abejas (Figura 5c). Las imágenes microscópicas revelaron que la morfología de las superficies de las películas puras y compuestas con y sin la adición de SB fue suave. En tanto las matrices compuestas que se sometieron a la luz UV, presentaron superficies más rugosas en relación a aquellas sin tratamiento.

CAPACIDAD ANTIMICROBIANA

En todos los casos, la concentración más diluida de inóculo permitió una mejor visualización del efecto inhibitor de la película. La Figura 6 muestra la placa de agar con películas control y matrices CMC: PVOH / SB con y sin tratamiento UV para todos los microorganismos ensayados. Como era de esperar la muestra control no inhibió el crecimiento microbiano. Las películas que contenían BS en su formulación inhibieron el crecimiento microbiano por contacto con el medio de cultivo, independientemente del microorganismo ensayado. En el caso de *Candida* spp. (Figura 6b), la inhibición fue completa después de 24 h de incubación. Como puede verse en la Figura 6 las películas que contienen BS mantuvieron su capacidad antimicrobiana después del tratamiento UV.

5. CONCLUSIONES

Los nuevos materiales obtenidos presentaron diferente estabilidad térmica y química que la de los componentes individuales. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos para las películas compuestas, así como películas tratadas con UV, la PO₂ mostró un valor muy bajo que permita su aplicación como envases con permeabilidad selectiva de oxígeno. El análisis térmico, rayos-X, SEM y FT-IR evidencian los cambios microestructurales que ocurrieron en la matriz, ya que proporcionaron información adicional sobre la modificación inducida ya sea por la presencia de BS o por el tratamiento con UV. Los espectros de FT-IR reflejaron cierto grado de interacción polímero-polímero a un nivel molecular en las regiones amorfas, especialmente en películas compuestas en presencia de SB. En resumen, la incorporación de BS combinado con UV en películas compuestas fue positiva debido a la inhibición del crecimiento de un amplio espectro de microorganismos. Mientras tanto desde un punto de vista fisicoquímico el tratamiento UV de las películas compuestas en presencia de BS cambió su morfología tornándolas más insoluble en agua, convirtiendo las películas compuestas funcionalizadas en un material potencialmente aplicable en el envasado de alimentos.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CORTÁZAR, M., Sarasola, C. y Guzman, G.M. (1982). "X-Ray analysis of the influence of various nucleating agents on the crystallinity of poly-e-butene". *European Polymer Journal*, 18: 439-442.
- DETDUANGCHAN, N. y Wittaya, T. (2011). "Effect of UV-treatment on properties of biodegradable film from rice starch". *World Academy of Science, Engineering and Technology*, 57: 464-469.
- HASIMI, A., Stavropoulou, K.G., Papadokostaki, M. y Sanopoulou. (2008). "Transport of water in polyvinyl alcohol films: Effect of thermal treatment and chemical crosslinking". *European Polymer Journal*, 44: 4098-4107.
- IBRAHIM, M.M., Koschella, A., Kadry, G y Heinze, T. (2010). "Evaluation of cellulose and carboxymethyl cellulose/ poly(vinyl alcohol) membranes". *Carbohydrate Polymers*, 95: 414– 420
- MIRANDA, T.M.R., Goncalves, A.R. y Pessoa Amorim, M.T. (2001). "Ultraviolet-induced crosslinking of poly(vinyl alcohol) evaluated by principal component analysis of FTIR spectra". *Polymer International*, 50: 1068-1072.
- PARK, J.-S. Park, J.-W. y Ruckenstein, E. (2001). "Thermal and dynamic mechanical analysis of PVA/MC blend hydrogels". *Polymer*, 42: 4271-4280.
- RAMAKRISHNA, P., Mallikarjuna, B., Chandra Babu, A., Sudhakar, P., Chowdoji Rao, K. y Subha, M. (2011). "Interpenetrating polymer network of crosslinked blend microspheres for controlled release of Acebutolol HCl". *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 1: 212-219.
- RIVERO S, Giannuzzi L, Garcia M.A, Pinotti A. (2013). "Controlled delivery of propionic acid from chitosan films for pastry dough conservation". *Journal Food Engineering*, 116, 524-531.

7. TABLAS Y FIGURAS

TABLA 1. Contenido de humedad, propiedades de barrera y mecánicas de las películas de un solo componente y compuestas con diferentes tratamientos

Formulación	Humedad (g /100 g _{película})	WVP 10 ¹¹ (g s ⁻¹ m ⁻¹ Pa ⁻¹)	PO ₂ x 10 ¹³ (cm ³ m ⁻¹ s ⁻¹ Pa ⁻¹)	Esfuerzo (MPa)	Elongación %
PVA	5,24 (0,3) ^a	0,83 (0,4) ^a	1,97 (1,2) ^a	48,39 (1,3) ^a	87,40 (3,9) ^a
CMC	24,06 (0,5) ^b	7,68 (0,9) ^b	34,28 (3,5) ^b	46,59 (4,6) ^a	2,09 (0,6) ^b
Compuesta	16,08 (0,6) ^b	2,07 (0,1) ^{ac}	8,34 (6,5) ^c	43,25 (2,9) ^a	5,76 (0,9) ^c
Compuesta BS	15,62 (0,5) ^{bc}	3,07 (0,6) ^c	14,45 (0,9) ^d	35,43 (3,3) ^b	15,63(0,6) ^d
Compuesta BS + UV	14,89 (0,1) ^c	2,02 (0,2) ^{ac}	8,84 (6,4) ^c	34,88 (2,0) ^b	11,29 (1,1) ^e

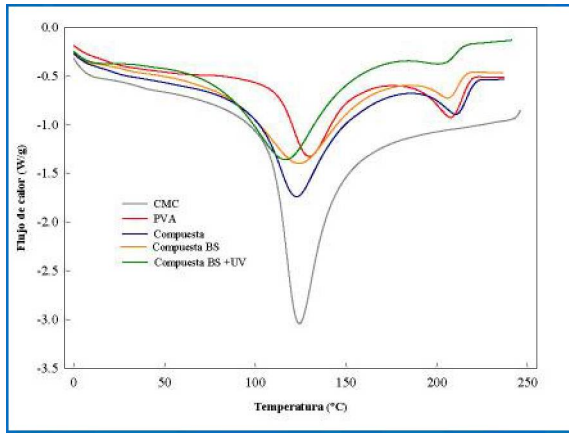


FIGURA 2. Termogramas de películas puras y compuestas obtenidas por MDSC

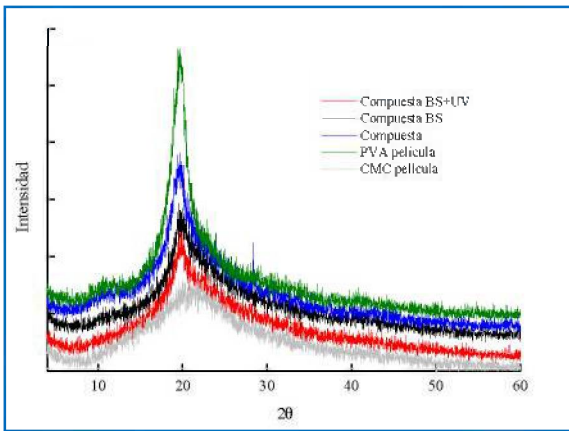


FIGURA 3. Difractogramas de rayos X de películas puras y compuestas

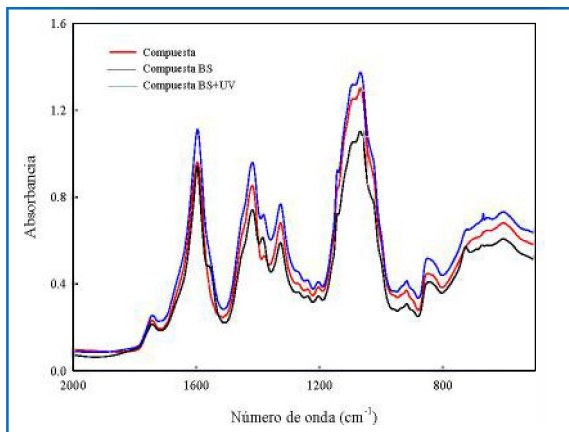


FIGURA 4. Espectros FTIR de películas compuestas 50:50, compuestas BS y compuestas BS+ UV

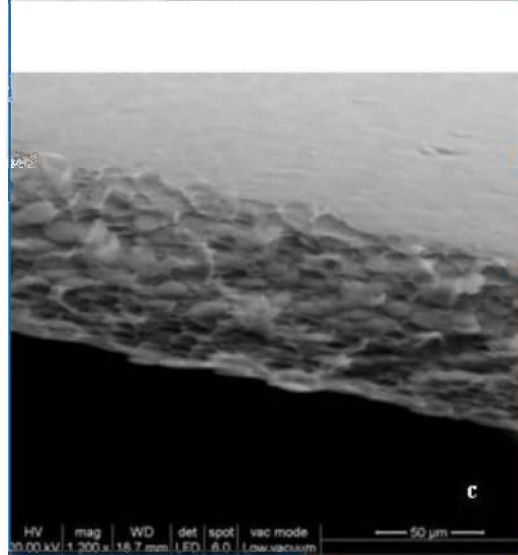
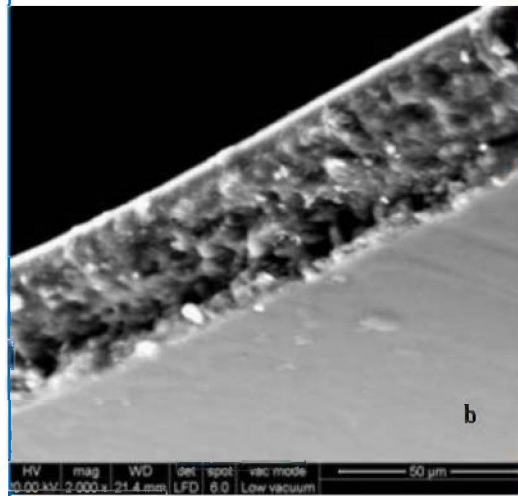
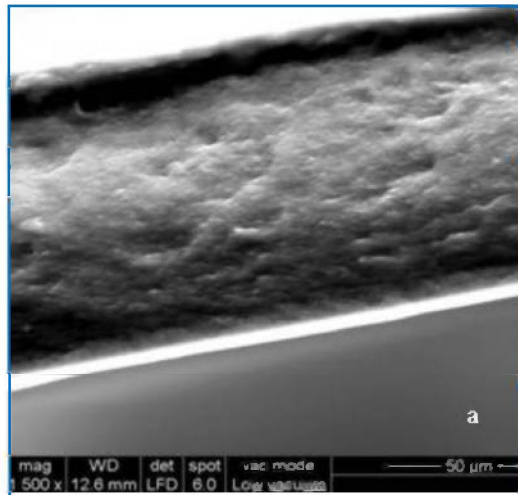


FIGURA 5. Micrografías obtenidas por SEM de películas compuestas 50:50 (a), compuestas con adición de BS sin (b) y con tratamiento UV (c)

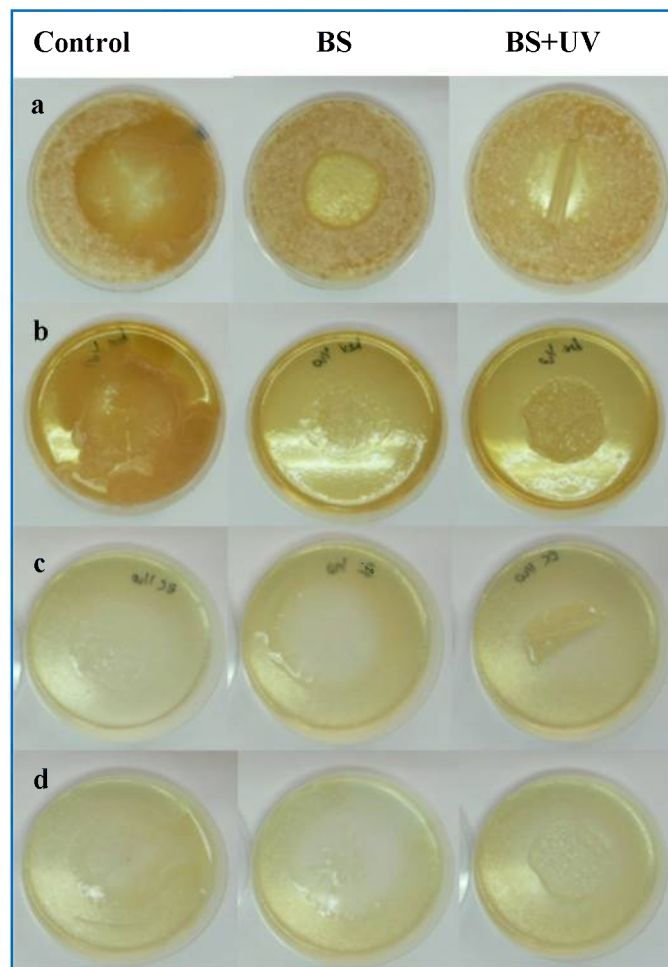


FIGURA 6. Propiedades antimicrobianas de películas compuestas control y matrices conteniendo BS con y sin radiación UV incubadas a 37 ° C contra a) *Penicillium* sp., b) *Candida* spp., c) *E. coli* y d) *Salmonella* spp.